

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 868**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2008** **PCT/JP2008/057612**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2008** **WO08133208**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2008** **E 08751882 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017** **EP 2149584**

54 Título: **Método para aumentar la respuesta inmunitaria con un péptido**

30 Prioridad:

20.04.2007 JP 2007112060
26.10.2007 JP 2007279083

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
22.02.2018

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 2 655 868 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

Método para aumentar la respuesta inmunitaria con un péptido**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a un péptido inmunogénico que induce un aumento de la respuesta inmunitaria, que comprende un péptido derivado de amiloide β ($A\beta$), una sustancia causante de la enfermedad de Alzheimer, o una porción del mismo con adición o inserción de cisteína en donde se inserta cisteína entre los residuos de aminoácido 18° y 19°, entre los residuos de aminoácido 25° y 26°, o entre los residuos de aminoácido 28° y 29° contados a partir del extremo N terminal de un péptido β amiloide o una porción del mismo. La presente invención también se refiere a un medicamento para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer que comprende como ingrediente activo dicho péptido. El péptido inmunogénico de la presente invención, puesto que induce suficientemente un aumento de respuesta inmunitaria por sí mismo sin coadyuvante, puede utilizarse de forma segura como medicamento para la prevención o el tratamiento sin una reacción adversa al fármaco asociada con el uso de coadyuvante.

Técnica anterior

La inmunidad es uno de los mecanismos autoprotectores de defensa biológica contra la invasión de organismos extraños, tales como bacterias y virus, e incluye la inmunidad innata asociada con la fagocitosis de leucocitos, etc., y la inmunidad adquirida contra un antígeno/patógeno específico. Una vacuna es un medicamento para inducir con seguridad la inmunidad adquirida contra un patógeno y recientemente se ha utilizado no solo para la protección sino también para el tratamiento.

Una vacuna incluye una vacuna viva, una vacuna inactivada, una vacuna de componentes y similares. Una vacuna viva es altamente inmunogénica y tiene un efecto inmunológico prolongado, pero también tiene el riesgo de que la patogenidad permanezca o se revierta. Una vacuna inactivada, preparada mediante el tratamiento de virus con formalina, etc. para eliminar la patogenidad, es más segura que una vacuna viva pero tiene el defecto que la inmunidad resultante no se prolonga.

Una vacuna de componentes comprende como un componente principal una proteína antigénica, preparada extrayendo y purificando una proteína que tiene un efecto vacunal de un patógeno o preparada artificialmente mediante técnicas de ingeniería genética o procedimientos químicos, y es altamente segura sin contaminación de proteínas no deseadas. Recientemente, se ha estudiado en profundidad una vacuna peptídica como una de las vacunas de componentes. Un péptido se refiere a una molécula que consiste en aminoácidos unidos entre sí a través del enlace peptídico. Generalmente, un péptido con 10 o menos residuos de aminoácido se denomina oligopéptido, un péptido con menos de 100 residuos de aminoácido se denomina polipéptido (tanto el oligopéptido como el polipéptido se denominan en la presente memoria "péptido"), y uno con 100 o más residuos de aminoácido se denomina proteína.

Recientemente, se han determinado secuencias de aminoácidos de diversas proteínas y proteínas antigénicas víricas. Un péptido sintetizado artificialmente basándose en dicha secuencia de aminoácidos se utiliza como vacuna, que se denomina vacuna peptídica. La ventaja de utilizar un péptido como vacuna es que se puede obtener un antígeno altamente puro artificialmente sin manipular microorganismos patógenos. Por otro lado, es difícil obtener un efecto inmunológico suficiente ya que los péptidos tienen un peso molecular pequeño y, por lo tanto, no se reconocen como una sustancia extraña en el organismo vivo durante la inmunización. Por lo tanto, un péptido se combina con una proteína grande denominada proteína transportadora para que sea reconocido como una sustancia extraña y/o se administra junto con un coadyuvante (inmunomodulador) para potenciar el efecto inmunológico. Sin embargo, con estos tratamientos, es posible que se produzca un anticuerpo contra una proteína transportadora o que se induzca inesperadamente un efecto secundario adverso de un coadyuvante. Además, aunque se ha demostrado que un coadyuvante es eficaz a nivel de investigación, solo se permite el uso de un gel de hidróxido de aluminio en Japón para uso humano.

Por otro lado, se ha intentado utilizar una vacuna peptídica para prevenir y/o tratar enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer es uno de los trastornos de demencia y se asocia con la disminución de la función cognitiva y un cambio en la personalidad como síntomas principales. El número creciente de pacientes junto con el rápido aumento del envejecimiento de la población se ha convertido en un problema social. Las indicaciones patológicas de la enfermedad de Alzheimer incluyen tres características de atrofia y/o caída de las neuronas, formación de placas seniles debido a la agregación y/o deposición de $A\beta$ y cambios neurofibrilares debidos a proteínas tau anormales. El comienzo de la enfermedad de Alzheimer se inicia mediante el depósito de péptidos $A\beta$ (formación de placa senil) seguido de desnaturalización y caída de neuronas con aumento del depósito de $A\beta$. El depósito de péptidos $A\beta$ desencadena el depósito de proteínas tau seguido de cambios neurofibrilares. El péptido $A\beta$ se obtiene a partir de un precursor de péptido amiloide (APP) que existe en el cerebro y el cuerpo. En el procedimiento normal, el APP se escinde mediante α -secretasa en el medio y a continuación mediante γ -secretasa

en el extremo C-terminal para generar un péptido P3 que posteriormente se degrada por completo. En el caso de el depósito de péptido A β , el APP se escinde mediante β -secretasa y a continuación mediante γ -secretasa en el extremo C terminal para generar péptidos A β que consisten en 40 o 42 aminoácidos (A β 40, A β 42). Entre estos, A β 42, fácilmente agregado y depositado, se secreta extracelularmente para ser insolubilizado, y se agrega y se deposita para formar placas seniles. El aumento de la producción y la acumulación de péptidos A β 42 afectaría a una sinapsis. Además, se reúnen células microgliales y astrocitos alrededor de los péptidos A β agregados. Se cree que los daños en la sinapsis y la neurita progresan ulteriormente para conducir a la degeneración y la muerte celular de las neuronas, lo que produce demencia.

Hoy en día, la elección como diana de péptidos A β se considera un método de tratamiento para disminuir los péptidos A β , incluyendo, por ejemplo, la inhibición de la acción de secretasas que producen péptidos A β , el uso de una enzima que degrada A β que puede degradar los péptidos A β producidos, el uso de una vacuna o un anticuerpo para eliminar los excretados extracelularmente y los agregados, y similares.

El enfoque del tratamiento de la enfermedad de Alzheimer con una vacuna fue referido por primera vez por Schenk et al. (Referencia no relacionada con patentes 1), que comprende administrar péptidos A β 42 junto con un coadyuvante mediante inyección intramuscular para producir de este modo un anticuerpo contra A β para eliminar los péptidos A β acumulados. Se realizó un ensayo clínico para la vacuna administrando por vía intramuscular un medicamento que comprende el péptido A β 42 junto con una saponina purificada como coadyuvante. Como resultado, se demostró que se producía un anticuerpo específico para el péptido A β en pacientes con enfermedad de Alzheimer mediante la administración de la vacuna y que la producción del anticuerpo específico para el péptido A β podía retrasar el desarrollo de trastornos cognitivos en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Referencia no relacionada con patentes 2) y se demostró que las placas seniles desaparecieron (Referencia no relacionada con patentes 3). Sin embargo, dado que se observó meningoencefalitis grave en algunos sujetos, se suspendió el ensayo clínico. Se supone que una de las causas del efecto secundario adverso es el coadyuvante contenido en la vacuna. Por consiguiente, para una vacuna peptídica, se desea fervientemente el desarrollo de una formulación que sea eficaz y segura.

Anteriormente, se han descrito sustancias específicas para amiloides, más específicamente, aptámeros específicos de amiloides, así como su uso para diagnóstico y/o tratamiento de, p.ej., enfermedad de Alzheimer, mientras que se describe que estos aptámeros específicos de amiloide están estabilizados frente a nucleasas (Referencia de Patente 1).

Referencia no relacionada con patentes 1: Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, et al., Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer disease -disease-like pathology in the PDAPP mouse. Nature 1999; 400: pág. 173-177

Referencia no relacionada con patentes 2: Fox NC, Black RS, Gilman S, Rossor MN, Griffith SG, Jenkins L, et al. Effects of A beta immunization (AN1792) on MRI measures of cerebral volume in Alzheimer disease. Neurology 2005; 64: pág. 1563-1572

Referencia no relacionada con patentes 3: Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. Nat Med 2003; 9: pág. 448-452

Referencia de patente 1: Documento DE 199 16 417 A1

Descripción de la invención

(Problema técnico a resolver por la invención)

Como se mencionó anteriormente, existe la preocupación de que las sustancias que se sabe que tienen un efecto coadyuvante pueden ejercer efectos secundarios adversos contrarios al efecto coadyuvante. Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo método para potenciar una respuesta inmunitaria utilizando una sustancia que ya se ha confirmado que es segura para el organismo vivo y un péptido inmunogénico que induce un aumento de la respuesta inmunitaria para utilizar en dicho método.

(Medios para resolver los problemas)

Los autores de la presente invención han investigado seriamente un método para la inmunización y para mejorar la inmunización que es seguro para el organismo vivo, eficaz y económico, y como resultado, han encontrado que la capacidad de inducir un aumento de la respuesta inmunitaria de un péptido de interés puede mejorarse mediante la adición o inserción de un residuo de cisteína, un aminoácido que constituye una proteína natural, para así completar la presente invención.

Por lo tanto, se describe un método para aumentar una propiedad inductora de la respuesta inmunitaria de un péptido derivado de A β , que es una sustancia causante de la enfermedad de Alzheimer, o una porción de la misma,

caracterizado por la adición o inserción de cisteína al péptido Aβ o una porción del mismo. La presente invención se caracteriza en las reivindicaciones. Por lo tanto, se relaciona con los siguientes puntos (1) a (11).

- (1.) Un péptido inmunogénico que induce un aumento de la respuesta inmunitaria mediante la inducción de un anticuerpo específico para el péptido, en donde dicho péptido inmunogénico comprende un péptido β-amiloide o una porción del mismo que comprende al menos los 28 aminoácidos N-terminales del SEQ ID NO: 34 y que tiene una adición o inserción de al menos una cisteína, en donde cisteína se inserta entre los residuos de aminoácido 18° y 19°, entre los residuos de aminoácido 25° y 26°, o entre los residuos de aminoácido 28° y 29° contados desde el extremo N terminal de dicho péptido β-amiloide o una porción del mismo.
- (2.) El péptido inmunogénico del punto (1.), que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de los grupos que consisten en el SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ. ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 56.
- (3.) Un medicamento que comprende el péptido inmunogénico de los puntos (1) o (2).
- (4.) Un medicamento que comprende el péptido inmunogénico de los puntos (1) o (2) junto con un coadyuvante.
- (5.) Una vacuna de ADN que comprende un fragmento génico que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido inmunogénico de los puntos (1) o (2).
- (6.) El péptido inmunogénico de los puntos (1) o (2) para su uso en el aumento de una respuesta inmunitaria.
- (7.) El péptido inmunogénico de los puntos (1) o (2) junto con un coadyuvante para uso en el aumento de una respuesta inmunitaria.
- (8.) Una vacuna de ADN que comprende un vector que contiene un fragmento génico que codifica una secuencia de aminoácidos del péptido inmunogénico de los puntos (1) o (2) para su uso en el aumento de una respuesta inmunitaria.
- (9.) El uso del péptido inmunogénico de los puntos (1) o (2) para la preparación de un medicamento para el aumento de una respuesta inmunitaria.
- (10.) El uso del péptido inmunogénico de (1) o (2) junto con un coadyuvante para la preparación de un medicamento para potenciar una respuesta inmunitaria.
- (11.) El uso de la vacuna de ADN de los puntos (5) u (8) para la preparación de un medicamento para el aumento de una respuesta inmunitaria.

Efectos de la invención

La presente invención proporciona un péptido inmunogénico que induce un aumento de la respuesta inmunitaria y suficiente incluso si se utiliza solo sin un coadyuvante. De acuerdo con la presente invención, meramente mediante la adición o inserción de residuos de cisteína en el péptido β-amiloide o una porción del mismo, en donde la cisteína se inserta entre los residuos de aminoácidos 18° y 19°, entre los residuos aminoácido 25° y 26°, o entre los residuos de aminoácido 28° y 29° contados a partir del extremo N de un péptido β-amiloide o una porción del mismo, se puede aumentar la producción de anticuerpos de un péptido inmunogénico.

Por lo tanto, no existe desventaja asociada con el uso de un coadyuvante para permitir un diseño más fácil de una formulación de fármaco.

El péptido inmunogénico de la presente invención que induce un aumento de la respuesta inmunitaria, cuando se administra al organismo vivo, puede inducir rápida y abundantemente un anticuerpo específico para el péptido en la sangre. No se conoce toxicidad de la 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 un aumento de la respuesta inmunitaria puede utilizarse en el cuerpo de forma muy segura.

El péptido inmunogénico de la presente invención que induce un aumento de la respuesta inmunitaria, cuando se utiliza como una vacuna peptídica, puede ser la vacuna más simple que comprende como ingrediente activo solo el péptido inmunogénico con adición o inserción de cisteína. Dicho péptido inmunogénico con adición o inserción de cisteína se puede preparar mediante síntesis química sin síntesis biológica y, por tanto, con una mayor uniformidad que las vacunas de componentes convencionales. Además, con el menor riesgo de toxicidad, infección y disminución de 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 un aumento de la respuesta inmunitaria puede administrarse 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 causados por la aguja de la jeringa.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

Para preparar el péptido inmunogénico de la presente invención que induce un aumento de la respuesta inmunitaria, se puede añadir o insertar un residuo de cisteína al péptido A β o en una porción del mismo, en donde se inserta cisteína entre los residuos de aminoácido 18° y 19°, entre el 25° y los residuos de aminoácido 25° y 26°, o entre los residuos de aminoácido 28° y 29° contados a partir del extremo N terminal de un péptido β -amiloides o una porción del mismo, o alternativamente se puede añadir o insertar una secuencia de nucleótidos que codifica cisteína a la secuencia de ADN o ARN del péptido A β o una porción del mismo para su expresión. Con respecto a la posición de adición o inserción de cisteína al péptido A β o una porción del mismo, en el caso de la adición, se describe que la cisteína se puede añadir al extremo N o C o ambos del péptido y en el caso de la inserción, la cisteína puede insertarse en cualquier posición en el péptido. Es preferible la adición al extremo C del péptido en donde se pueden añadir 1 o 2 residuos de cisteína. Sin embargo, en la medida en que se pueda obtener el efecto de aumento de la respuesta inmunitaria, la posición de adición e inserción o la cantidad de residuos de cisteína no están especialmente limitadas. En otro aspecto de la presente invención, también se puede añadir un péptido que contenga cisteína, en lugar de cisteína, al extremo C terminal del péptido.

El péptido A β consta de 42 residuos de aminoácido (A β 42) y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVIA (SEQ ID NO: 34). Se puede añadir o insertar cisteína (Cys) al péptido A β o una porción del mismo para proporcionar el péptido inmunogénico de la presente invención que induce un aumento de la respuesta inmunitaria. Una porción del péptido A β incluye aquellas que consisten en una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1°-28° de la secuencia de aminoácidos de A β 42 antes mencionada. Alternativamente, se puede añadir un péptido que contenga cisteína al péptido A β o a una porción del mismo. El péptido inmunogénico así obtenido que induce un aumento de la respuesta inmunitaria es eficaz para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer.

Específicamente, un ejemplo preferido del péptido inmunogénico de la presente invención que induce un aumento de la respuesta inmunitaria incluye los siguientes péptidos A β con adición o inserción de cisteína en donde un residuo de cisteína añadido o insertado está subrayado.

(1) Péptido con adición de 1 molécula en el terminal C:

28AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKC (SEQ ID NO: 6)

29AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGC (SEQ ID NO: 8)

30AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAC (SEQ ID NO: 10)

31AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIC (SEQ ID NO: 12)

35AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMC (SEQ ID NO: 21)

36AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVC (SEQ ID NO: 23)

37AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGC (SEQ ID NO: 25)

38AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGC (SEQ ID NO: 27)

39AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVC (SEQ ID NO: 29)

40AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVC (SEQ ID NO: 32)

42AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAC (SEQ ID NO: 36)

(2) Péptido con la adición de 2 moléculas en el extremo C-terminal:

28AACysCys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKCC (SEQ ID NO: 38)

(3) Péptido con adición de 1 molécula en el extremo N-terminal:

Cys28AA:

CDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 40)

(4) Péptido con adición de cada 1 molécula en el extremo C-terminal y el extremo N-terminal:

Cys28AACys:

CDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKC (SEQ ID NO: 42)

(5) Péptido con inserción de 1 molécula:

28AA18Cys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVCFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 46)

28AA25Cys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGCSNK (SEQ ID NO: 48)

33AA28Cys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKCGAIIG (SEQ ID NO: 50)

35AA28Cys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKCGAIIGLM (SEQ ID NO: 52)

(6) Péptido con adición de 1 molécula en el extremo C terminal + adición de un péptido exógeno (el péptido exógeno se coloca en el extremo C terminal del residuo de cisteína añadido):

28AACysTTD:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKCTTD (SEQ ID NO: 54)

28AACysEIFEFTTD:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKCEIFEFTTD (SEQ ID NO: 56)

Entre los péptidos A β con adición o inserción de cisteína, el péptido A β de 28 aminoácidos con adición de cisteína (28AACys: SEC ID NO: 6), el péptido A β de 29 aminoácidos con adición de cisteína (29AACys: SEC ID NO: 8), el péptido A β de 31 aminoácidos con adición de cisteína (31AACys: SEC ID NO: 12), el péptido A β de 35 aminoácidos con adición de cisteína (35AACys: SEC ID NO: 21), el péptido A β de 36 aminoácidos con adición de cisteína (36AACys: SEC ID NO: 23), el péptido A β de 39 aminoácidos con la adición de cisteína (39AACys: SEC ID NO: 29), el péptido A β de 40 aminoácidos con adición de cisteína (40AACys: SEC ID NO: 32), el péptido A β de 42 aminoácidos con la adición de cisteína (42AACys: SEC ID NO: 36), el péptido A β de 28 aminoácidos con la adición de 2 cisteínas en el extremo C-terminal (28AACysCys: SEC ID NO: 38) y El péptido A β de 28 aminoácidos con la

inserción de cisteína entre los residuos de aminoácido 18°-19° (28AA18Cys: SEQ ID NO: 46) anteriormente mencionados podrían inducir particularmente el aumento de la respuesta inmunitaria y, por lo tanto, se pueden utilizar para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer de manera eficaz.

- 5 De acuerdo con la presente invención, se puede preparar un péptido que induce un aumento de la respuesta inmunitaria insertando cisteína entre los residuos de aminoácido 18° y 19°, entre los residuos de aminoácido 25° y 26°, o entre los residuos de aminoácido 28° y 29° contados a partir del extremo N de un péptido β -amiloide o una porción del mismo.
- 10 Que un péptido obtenido después de la adición o inserción de cisteína ejerce un efecto de aumento de la respuesta inmunitaria puede corroborarse mediante la inmunización de ratones con el péptido utilizando las técnicas convencionales y determinando un título de anticuerpos IgG anti-A β en sangre. Por lo tanto, también se describe un método para preparar un péptido inmunogénico que induce un aumento de la respuesta inmunitaria caracterizado por la adición de una o más cisteínas al extremo N-terminal, al extremo C-terminal o tanto al extremo N-terminal
- 15 como al extremo C-terminal del péptido A β o una porción del mismo o la inserción de una o más cisteínas al péptido, inmunizando un animal con el péptido resultante, y a continuación determinando un título de anticuerpos IgG anti-A β en la sangre del animal.

- 20 Una preparación de péptido que contiene el péptido inmunogénico de la presente invención que tiene una propiedad inductora del aumento de la respuesta inmunitaria puede administrarse por cualquier vía de administración tal como subcutánea, transdérmica, intramuscular, oral o transnasal.

- Si bien el péptido inmunogénico de la presente invención que induce un aumento de la respuesta inmunitaria puede proporcionar suficiente inmunización incluso si se administra solo sin un coadyuvante, puede proporcionar una
- 25 inmunización adicional suficiente si se combina con un coadyuvante. Por lo tanto, será posible seleccionar varios tipos de coadyuvantes, tales como p.ej. un coadyuvante que otorgue importancia a un efecto de aumento de la inmunización o un coadyuvante que otorgue importancia a la seguridad.

- Además, un vector que comprende un fragmento génico que codifica cada uno de los péptidos inmunogénicos de la presente invención enumerados anteriormente que induce un aumento de la respuesta inmunitaria obtenido por
- 30 adición o inserción de cisteína al péptido A β o una porción del mismo puede utilizarse como vacuna de ADN para prevenir y tratar eficazmente la enfermedad de Alzheimer. Una secuencia de nucleótidos que codifica cisteína incluye, p.ej. tgt pero puede ser cualquier secuencia en la medida en que codifique cisteína. A continuación se describe un fragmento génico que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido A β (A β 42) que consiste en los
- 35 42 residuos de aminoácido mencionados anteriormente (SEQ ID NO: 34). Sin embargo, la secuencia de nucleótidos descrita a continuación representa una secuencia génica típica del péptido A β , pero puede emplearse cualquier secuencia génica en la medida en que codifique la misma secuencia de aminoácidos.

```
gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
ggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaaa caaaggtgca atcattggac
tcattggtggg cggtgttggtc atagcgc (SEQ ID NO: 35)
```

- 40 Un ejemplo de un fragmento génico que codifica cada uno de los péptidos inmunogénicos de la presente invención enumerados anteriormente que induce un aumento de la respuesta inmunitaria obtenido mediante la adición o inserción de cisteína al péptido A β o una porción del mismo incluye los descritos a continuación. Sin embargo, las secuencias de nucleótidos descritas a continuación representan una secuencia génica típica que codifica cada uno de los péptidos mencionados anteriormente, pero puede emplearse cualquier secuencia génica en la medida en que
- 45 codifique la misma secuencia de aminoácidos.

Fragmento génico que codifica 26AACys:

```
gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
ggtgttcttt gcagaagatg tgggttcatgt (SEQ ID NO: 2)
```

50

Fragmento génico que codifica 27AACys:

```
gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
ggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaaa ctgt (SEQ ID NO: 4)
```

Fragmento génico que codifica 28AACys:

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
gggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaaa caaatgt (SEQ ID NO: 7)

5 Fragmento génico que codifica 29AACys:

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
gggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaaa caaaggttgt (SEQ ID NO: 9)

Fragmento génico que codifica 30AACys:

10 gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
gggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaaa caaaggtgca tgt
(SEQ ID NO: 11)

Fragmento génico que codifica 31AACys:

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
gggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaaa caaaggtgca atctgt
15 (SEQ ID NO: 13)

Fragmento génico que codifica 32AACys:

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
gggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaaa caaaggtgca atcatttgt
20 (SEQ ID NO: 15)

Fragmento génico que codifica 33AACys:

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
gggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaaa caaaggtgca atcattggatgt
(SEQ ID NO: 17)

25 Fragmento génico que codifica 34AACys:

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
gggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaaa caaaggtgca atcattggac
tctgt (SEQ ID NO: 19)

Fragmento genético que codifica 35AACys:

30 gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
gggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaaa caaaggtgca atcattggac
tcatgtgt (SEQ ID NO: 22)

Fragmento génico que codifica 36AACys:

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
 ggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaaa caaaggtgca atcattggac
 tcatggtgtg t (SEQ ID NO: 24)

Fragmento génico que codifica 37AACys:

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
 ggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaaa caaaggtgca atcattggac
 tcatggtggg ctgt (SEQ ID NO: 26)

Fragmento génico que codifica 38AACys:

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
 ggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaaa caaaggtgca atcattggac
 tcatggtggg cggttgt (SEQ ID NO: 28)

Codificación del fragmento gen 39AACys:

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
 ggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaaa caaaggtgca atcattggac
 tcatggtggg cggtgttgt (SEQ ID NO: 30)

Fragmento génico que codifica 40AACys:

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
 ggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaaa caaaggtgca atcattggac
 tcatggtggg cggtgttgt (SEQ ID NO: 33)

Fragmento génico que codifica 42AACys:

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
 ggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaaa caaaggtgca atcattggac
 tcatggtggg cggtgttgt (SEQ ID NO: 37)

Fragmento génico que codifica 28AACysCys:

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
 ggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaaa caaagtgtgt (SEQ ID NO: 39)

Fragmento génico que codifica Cys28AA:

tgtgatgcag aattccgaca tgactcagga tatgaagttc atcatcaaaa
 attggtgttc tttgcagaag atgtgggttc aaacaaa (SEQ ID NO: 41)

Fragmento génico que codifica Cys28AACys:

tgtgatgcag aattccgaca tgactcaggatat gaagttc atcatcaaaa
attggtgttc tttgcagaag atgtgggttc aaacaaatgt (SEQ ID NO: 43)

Fragmento génico que codifica 28AA18Cys:

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
 5 ggtgtgtttc tttgcagaag atgtgggttc aaacaaa (SEQ ID NO: 47)

Fragmento génico que codifica 28AA25Cys:

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
 10 ggtgttcttt gcagaagatg tgggtgttcaaa caaa (SEQ ID NO: 49)

Fragmento génico que codifica 33AA28Cys:

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
 ggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaaa caaatgtggt gcaatcattg ga
 (SEQ ID NO: 51)

15 Fragmento génico que codifica 35AA28Cys:

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
 ggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaaa caaatgtggt gcaatcattg
 gactcatg (SEQ ID NO: 53)

20 Fragmento génico que codifica 28AACysTTD:

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
 ggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaaa caaatgtact actgac
 (SEQ ID NO: 55)

25 Fragmento génico que codifica 28AACysEIFEFTTD:

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt
 ggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaaa caaatgtgaa atcttcgaat
 tcactactga c (SEQ ID NO: 57)

30 La presente invención se explica con más detalle por medio de los siguientes ejemplos, pero no se debe considerar que se limita a los mismos.

Ejemplo 1

Comparación de la capacidad de inducción de anticuerpos entre péptidos Aβ con y sin adición de cisteína

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

28AA:

40 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 5)

28AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKC (SEQ ID NO: 6)

35AA:

5 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLM (SEQ ID NO: 20)

35AACys:

10 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMC (SEQ ID NO: 21)

Los péptidos anteriores se sintetizaron (Hokkaido System Science Co., Ltd.) y se diluyeron con solución salina para obtener una solución de partida de 5 mg/ml. A 100 µL de la solución de partida se le añadieron 900 µL de solución salina a 0,5 mg/ml de la 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.

15 (2) Ratones inmunizados

Se adquirieron ratones C57BL/6 macho (7 semanas de edad, SPF) de Japan Charles River Co., Ltd. y se criaron en un ambiente SPF.

20 (3) Grupos de inmunización

Los 16 ratones se dividieron en 4 grupos que comprendían cada uno 4 ratones: al Grupo 1 se le administró 28AA; al Grupo 2 se le administró 28AACys; al Grupo 3 se le administró 35AA; y al Grupo 4 se le administró 35 AACys.

25 (4) Inmunización y calendario

Se administraron 200 µL/ratón de un inmunógeno a cada ratón utilizando una jeringa de tuberculina de 1 mL (Terumo, SS-01T2613s) por vía intradérmica o subcutánea en el abdomen (dosis por ratón: 100 µg). Los ratones se inmunizaron 3 veces a intervalos de 2 semanas.

(5) Muestra de sangre

35 El día 7 de la 2ª inmunización, se recogieron de 50 a 150 µL de sangre de la vena de la cola. Adicionalmente, el Día 7 de la tercera inmunización final, se recogió sangre de la aorta abdominal de todos los ratones bajo anestesia de pentobarbital sódico (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Somnopentyl). La muestra de sangre se transfirió a Microtainer (Becton Dickinson Co., Ltd), se produjo una coagulación adecuada a temperatura ambiente y a continuación se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. Cada uno de los sueros separados se dispensó a dos tubos de 0,5 mL y se almacenó a -80°C o menos hasta la medición.

40 (6) Medición de anticuerpos IgG anti-Aβ

45 El péptido Aβ (secuencia de 1-40 aminoácidos: DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO: 31) sintetizado por Hokkaido System Science Co., Ltd.), diluido a 10 µg/ml con tampón de carbonato 0,1 M, pH 9,6, se añadió a tiras de 8 pocillos (Nalge Nunc KK, Immobilizer Amino) a 100 µL/pocillo y se dejaron incubando a 4°C durante la noche para su inmovilización. Al día siguiente, cada pocillo se lavó 3 veces con 300 µL de PBS que contenía Tween20 (PBST) al 0,05%, se añadió etanolamina 10 mM a 300 µL/pocillo y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 1 hora.

50 Después de 1 hora, la etanolamina 10 mM se eliminó por completo y se añadió una muestra diluida con PBST de 50 a 10000 veces a cada pocillo a 100 µL/pocillo. Después de 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. Después del lavado, la solución de lavado en el pocillo se retiró por completo, se añadió un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con HRP (American Curlex, A131PS) diluido con la solución para la dilución de muestra a 2000 µL/pocillo seguido de
55 reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la reacción, la solución para la dilución del anticuerpo marcado se descartó y cada pocillo se lavó dos veces con 300 µL/pocillo de PBST y dos veces con la cantidad equivalente de agua destilada, a la cual se le añadieron 100 µL/pocillo de una solución de sustrato cromogénico TMB+ (Dako Inc.) seguido de reacción a temperatura ambiente durante 30 min. bajo sombreado. A continuación, se añadieron 100 µL/pocillo de ácido sulfúrico 1 N para detener el desarrollo y se midió la densidad óptica a 450 nm
60 (valor DO450).

Se utilizó un anticuerpo monoclonal comercialmente disponible para Aβ (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 del título del anticuerpo. Se determinó un anticuerpo IgG anti-Aβ de cada muestra de

suero murino y simultáneamente se midió el valor de DO450 de cada muestra diluida. Se calculó un título de anticuerpos IgG anti-A β de cada espécimen de suero murino utilizando la unidad de los patrones resultantes y la curva patrón del valor DO450.

- 5 La Tabla 1 muestra el título de anticuerpos anti-A β calculado del suero murino en cada uno de los grupos de inmunización. Como se muestra en la Tabla 1, en comparación con la inmunización con fragmentos de péptido A β sin adición de cisteína (28AA, 35AA), la inmunización con fragmentos de péptido A β con adición de cisteína (28AACys, 35AACys) proporcionó un título de anticuerpos más elevado contra A β . Se observó un aumento del título de anticuerpos para el 28AA con la adición de cisteína de aproximadamente 39 veces y para el 35AA con la adición de cisteína de aproximadamente 26 veces.

Tabla 1

Grupo	Núm. de Animal	Título de anticuerpos (ng/mL)	
		Día 7 desde la 3ª administración	Día 7 desde la 2ª administración
28AA	1	216,6	35,1
	2	149,7	21,0
	3	2531,0	5075,0
	4	79,9	10851,0
	Media	744,30	3995,53
28AACys	1	20265,0	74096,0
	2	2337,0	30542,0
	3	69198,0	389239,0
	4	12372,0	137192,0
	Media	26043,00	157767,25
35AA	1	78,7	34,4
	2	435,2	3584,0
	3	236,2	1745,0
	4	409,5	23739,0
	Media	289,90	7275,60
35AACys	1	3231,0	382533,0
	2	3240,0	37390,0
	3	3237,0	88795,0
	4	3237,0	257920,0
	Media	3236,25	191659,50

Ejemplo 2

Comparación de la capacidad inductora de anticuerpos entre el péptido A β con la adición de cisteína y el péptido A β conectado a un portador (con/sin coadyuvante)

(1) Preparación del péptido con adición de cisteína y péptido A β conectado a un portador

28AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKC (SEQ ID NO: 6)

28AA-KLH:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK-C-KLH

Los péptidos anteriores se sintetizaron (KITAYAMA LABES Co., Ltd.) y se diluyeron con solución salina para obtener

una solución de partida de 1 mg/ml que se almacenó a -80°C o menos hasta su uso. La KLH (hemocianina de lapa californiana) es una proteína portadora de 60 kDa. Se utilizó Cys en el 28AA-KLH como un conector para combinar el péptido 28AA con KLH y no se pretendía que mejorara el efecto de la respuesta inmunitaria. La combinación de una proteína portadora con el péptido inmunogénico utilizando Cys es un método de rutina para la inmunización con péptidos.

(2) Coadyuvante

Se utilizaron como coadyuvantes coadyuvante completo de Freund (en lo sucesivo denominado "FCA"), coadyuvante incompleto de Freund (en lo sucesivo denominado "FICA"), (GERBU, Núm. 1841, Núm. 1842), coadyuvante MM de Gerbu (GERBU, Núm. 3001.0106) y Alhydrogel '85' al 2% (Brenntag) que estaban disponibles comercialmente.

(3) Ratones que van a recibir la administración

Se adquirieron ratones C57BL/6 macho (9 semanas de edad, SPF) de Japan Charles River Co., Ltd. y se criaron en un entorno SPF.

(4) Grupos de inmunización

Los 25 ratones se dividieron en 5 grupos que comprendían cada uno 5 ratones: al Grupo 1 se le administró 28AACys; al Grupo 2 se le administró 28AA-KLH; al Grupo 3 se le administró 28AA-KLH + FCA/FICA; al Grupo 4 se le administró 28AA-KLH + coadyuvante Gerbu MM; y al Grupo 5 se le administró 28AA-KLH + Alhydrogel '85' al 2%.

(5) Dosis y preparación de la muestra para su administración

Una dosis primaria de péptido A β fue de 100 μ g por animal, y la segunda y tercera dosis fueron de 50 μ g por animal. A saber, para preparar la dosis primaria para el grupo al que se administró 28 AACys, se mezclaron 0,5 mL de 28 AACys y 0,5 mL de solución salina, y para preparar la segunda y tercera dosis, se mezclaron 0,25 mL de 28 AACys y 0,75 mL de solución salina. Para preparar la dosis primaria para el grupo al que se administró 28AA-KLH, se mezclaron 0,5 mL de 28AA-KLH y 0,5 mL de solución salina, y para preparar la segunda y tercera dosis, se mezclaron 0,25 mL de 28AA-KLH y 0,75 mL de solución salina. Para preparar la dosis primaria para el grupo al que se administró 28AA-KLH + FCA/FICA, se mezclaron 0,5 mL de 28AA-KLH y 0,5 mL de FCA para su emulsión, y para preparar la segunda y tercera dosis, se mezclaron 0,25 mL de 28AA-KLH, 0,25 mL de solución salina y 0,5 mL de FICA para su emulsión. Para preparar la dosis primaria para el grupo al que se administró 28AA-KLH + coadyuvante MM de Gerbu, se mezclaron 0,5 mL de 28AA-KLH, 0,4 mL de solución salina y 0,1 mL de coadyuvante MM de Gerbu, y para preparar la segunda y tercera dosis, se mezclaron 0,25 mL de 28AA-KLH, 0,65 mL de solución salina y 0,1 mL de coadyuvante MM de Gerbu. Para preparar la primera dosis para el grupo al que se administró 28AA-KLH + Alhydrogel '85' al 2%, se mezclaron 0,5 mL de 28AA-KLH y 0,5 mL de Alhydrogel '85' al 2%, y para preparar la segunda y tercera dosis, se mezclaron 0,25 mL de 28AA-KLH, 0,25 mL de solución salina y 0,5 mL de Alhydrogel '85' al 2%.

(6) Inmunización y calendario

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

(7) Muestra de sangre

El día 7 de la tercera inmunización final, se recogió sangre de la aorta abdominal de todos los ratones bajo anestesia de pentobarbital sódico (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Somnopentyl). La muestra de sangre se transfirió a Microtainer (Becton Dickinson Co., Ltd), se produjo una coagulación adecuada a temperatura ambiente y a continuación se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. Cada uno de los sueros separados se dispensó a dos tubos de 0,5 mL y se almacenó a -80°C o menos hasta la medición.

(8) Medición de anticuerpos IgG anti-A β

La medición del anticuerpo IgG anti-A β se realizó como se describió anteriormente. La Tabla 2 muestra el título de anticuerpos anti-A β calculado del suero murino en cada uno de los grupos de inmunización. Como se muestra en la Tabla 2, el fragmento del péptido A β con la adición de una KLH portadora junto con el coadyuvante completo/incompleto de Freund proporcionó el título de anticuerpos más alto contra A β . El segundo título de anticuerpo más alto lo proporcionó el fragmento de péptido A β con adición de cisteína, que fue significativamente más elevado que aquellos en los que como coadyuvante se utilizaron coadyuvante MM de Gerbu (GERBU) o

Alhydrogel '85' al 2% o del fragmento de péptido A β con adición de una KLH portadora.

Tabla 2

Grupo	Título de anticuerpos (ng/mL)						
	Núm. de Animal	1	2	3	4	5	Media
1. 28AACys		1714,4	5949,1	10122,3	716,6	2685,0	4237,48
2. 28AA-KLH		47,8	33,9	430,4	42,7	42,2	119,40
3. 28AA-KLH + FCA/FICA		12162,5	11484,1	12132,3	12161,9	2329,9	10054,14
4. 28AA-KLH + GERBU		417,5	324,7	2846,0	3910,9	1774,3	1854,68
5. 28AA-KLH + ALHYDROGEL '85' al 2%		51,4	37,7	35,0	33,3	159,6	63,40

5 Ejemplo 3

Comparación de la capacidad de inducción de anticuerpos entre péptidos A β con adición de cisteína que tiene una secuencia de 26-40 aminoácidos de longitud

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

26AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSC (SEQ ID NO: 1)

15

27AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNC (SEQ ID NO: 3)

20

28AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKC (SEQ ID NO: 6)

25

29AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGK (SEQ ID NO: 8)

30AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAK (SEQ ID NO: 10)

30

31AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIK (SEQ ID NO: 12)

35

32AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIKC (SEQ ID NO: 14)

40

33AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGK (SEQ ID NO: 16)

34AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLC (SEQ ID NO: 18)

45

35AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMK (SEQ ID NO: 21)

50

36AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVC (SEQ ID NO: 23)

37AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGC (SEQ ID NO: 25)

38AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG (SEQ ID NO: 27)

39AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV (SEQ ID NO: 29)

40AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO: 32)

Los péptidos anteriores se sintetizaron (Hokkaido System Science Co., Ltd.) y se diluyeron con solución salina para obtener una solución de partida de 5 mg/ml. A 100 µL de la solución de partida se le añadieron 900 µL de solución salina a 0,5 mg/ml de la concentración y la mezcla se dispensó a un tubo de 1,5 mL (inmunógeno) y se almacenó a -80°C o menos hasta su uso.

(2) Ratones inmunizados

Se adquirieron ratones C57BL/6 macho (7 semanas de edad, SPF) de Japan Charles River Co., Ltd. y se criaron en un ambiente SPF.

(3) Grupos de inmunización

Los 60 ratones se dividieron en 15 grupos que comprendían cada uno 4 ratones: al Grupo 1 se le administró 26AACys; al Grupo 2 se le administró 27AACys; al Grupo 3 se le administró 28AACys; al Grupo 4 se le administró 29AACys; al Grupo 5 se le administró 30AACys; al Grupo 6 se le administró 31AACys; al Grupo 7 se le administró 32AACys; al Grupo 8 se le administró 33AACys; al Grupo 9 se le administró 34AACys; al Grupo 10 se le administró 35 AACys; al Grupo 11 se le administró 36AACys; al Grupo 12 se le administró 37AACys; al Grupo 13 se le administró 38 AACys; al Grupo 14 se le administró 39 AACys; y al Grupo 15 se le administró 40 AACys.

(4) Inmunización y calendario

Se administraron 200 µL/ratón de un inmunógeno a cada uno de los ratones utilizando una jeringa de tuberculina de 1 mL (Terumo, SS-01T2613s) por vía intradérmica o subcutánea en el abdomen (dosis por ratón: 100 µg). Los ratones se inmunizaron 3 veces a intervalos de 2 semanas.

(5) Muestra de sangre

El día 7 de la tercera inmunización final, se recogió sangre de la aorta abdominal de todos los ratones bajo anestesia de pentobarbital sódico (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Somnopentyl). La muestra de sangre se transfirió a Microtainer (Becton Dickinson Co., Ltd), se produjo una coagulación adecuada a temperatura ambiente y a continuación se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. Cada uno de los sueros separados se dispensó a dos tubos de 0,5 mL y se almacenó a -80°C o menos hasta la medición.

(6) Medición de anticuerpos IgG anti-Aβ

La medición del anticuerpo IgG anti-Aβ se realizó como se describió anteriormente. La Tabla 3 muestra el título de anticuerpos anti-Aβ calculado del suero murino en cada uno de los grupos de inmunización. Como se muestra en la Tabla 3, se observó que, entre los grupos a los que se habían administrado péptidos Aβ con adición de cisteína que tienen 26 a 40 residuos de aminoácido de longitud, aquellos con 28 o más residuos de aminoácido de longitud tenían la capacidad inductora de anticuerpos contra Aβ. En particular, 28AACys, 29AACys, 31AACys, 35AACys, 36AACys, 39AACys y 40AACys mostraron el mayor título de anticuerpos.

Tabla 3

	Grupo	Título de anticuerpos (ng/mL)					
		Núm. de Animal	1	2	3	4	Media
1.	26AACys		39	19	21	19	24,5
2.	27AACys		15	19	24	19	19,0
3.	28AACys		8120	2191	115618	86736	51916,1
4.	29AACys		143754	5545	74235	114322	84464,2
5.	30AACys		10705	72	7335	1414	4881,5
6.	31AACys		110312	377757	5809	51904	136445,4
7.	32AACys		27	18	213	19	69,4
8.	33AACys		44	28	35	27	33,4
9.	34AACys		24	25	74	18	35,3
10.	35AACys		382533	37390	88795	257920	191659,5
11.	36AACys		36535	16261	44439	13262	27624,4
12.	37AACys		228	3003	2763	1061	1761,1
13.	38AACys		4936	952	478	4371	2684,3
14.	39AACys		447512	196147	85137	13445	185560,2
15.	40AACys		22998	15192	204464	26604	67041,8

Ejemplo 4

- 5 Comparación de la capacidad de inducción de anticuerpos entre péptidos A β sin adición de cisteína, con la adición de 1 molécula de cisteína y con la adición de 2 moléculas de cisteína

(1) Preparación de péptidos A β sin y con adición de cisteína.

10 28AA:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 5)

15 28AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKC (SEQ ID NO: 6)

28AACysCys:

20 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKC (SEQ ID NO: 38)

Los péptidos anteriores se sintetizaron (Hokkaido System Science Co., Ltd.) y se diluyeron con solución salina para obtener una solución de partida de 5 mg/ml, que se almacenó a -80°C o menos hasta su uso.

25 (2) Ratones inmunizados

Se adquirieron ratones C57BL/6 macho (7 semanas de edad, SPF) de Japan Charles River Co., Ltd. y se criaron en un ambiente SPF.

30 (3) Grupos de inmunización

Los 12 ratones se dividieron en 3 grupos que comprendían cada uno 4 ratones: al Grupo 1 se le administró 28AA; al Grupo 2 se le administró 28AACys; y al Grupo 3 se le administró 28AACysCys.

35 (4) Inmunización y calendario

Se administraron 200 μ L/ratón de un inmunógeno a cada uno de los ratones utilizando una jeringa de tuberculina de

1 mL (Terumo, SS-01T2613S) por vía intradérmica o subcutánea en el abdomen (dosis por ratón: 100 µg). Los ratones se inmunizaron 3 veces a intervalos de 2 semanas.

(5) Muestra de sangre

El día 7 de la cuarta inmunización final, se recogió sangre de la aorta abdominal de todos los ratones bajo anestesia de pentobarbital sódico (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Somnopentyl). La muestra de sangre se transfirió a Microtainer (Becton Dickinson Co., Ltd), se produjo una coagulación adecuada a temperatura ambiente y a continuación se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. Cada uno de los sueros separados se dispensó a dos tubos de 0,5 mL y se almacenó a -80°C o menos hasta la medición.

(6) Medición de anticuerpos IgG anti-Aβ

La medición del anticuerpo IgG anti-Aβ se realizó como se describió anteriormente. La Tabla 4 muestra el título calculado de anticuerpos anti-Aβ del suero murino en cada uno de los Grupos de inmunización. Como se muestra en la Tabla 4, se encontró casi la misma capacidad inductora de anticuerpos en los grupos a los que se habían administrado 28AACys o 28AACysCys.

Tabla 4

Grupo	Título de anticuerpos (ng/mL)					
	Núm. de Animal	1	2	3	4	Media
28AA		69	54	67	42	58,0
28AACys		211	365	19578	127	5070,2
28AACysCys		139	19262	451	2928	5695,3

Ejemplo 5

Comparación de la capacidad de inducción de anticuerpos entre los péptidos Aβ con la adición de cisteína en el extremo C-terminal, el extremo N-terminal y ambos extremos terminales

(1) Preparación de péptidos Aβ con adición de cisteína

28AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLFFFAEDVGSNKC (SEQ ID NO: 6)

Cys28AA:

CDAEFRHDSGYEVHHQKLFFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 40)

Cys28AACys:

CDAEFRHDSGYEVHHQKLFFFAEDVGSNKC (SEQ ID NO: 42)

Los péptidos anteriores se sintetizaron (Hokkaido System Science Co., Ltd.) y se diluyeron con solución salina para obtener una solución de partida de 5 mg/ml, que se almacenó a -80°C o menos hasta su uso.

(2) Ratones inmunizados

Se adquirieron ratones C57BL/6 macho (7 semanas de edad, SPF) de Japan Charles River Co., Ltd. y se criaron en un ambiente SPF.

(3) Grupos de inmunización

Los 12 ratones se dividieron en 3 grupos que comprendían cada uno 4 ratones: al Grupo 1 se le administró 28 AACys; al Grupo 2 se le administró Cys28AA; y al Grupo 3 se le administró Cys28AACys.

(4) Inmunización y calendario

Se administraron 200 µL/ratón de un inmunógeno a cada uno de los ratones utilizando una jeringa de tuberculina de 1 mL (Terumo, SS-01T2613S) por vía intradérmica o subcutánea en el abdomen (dosis por ratón: 100 µg). Los

ratones se inmunizaron 3 veces a intervalos de 2 semanas.

(5) Muestra de sangre

El día 7 de la cuarta inmunización final, se recogió sangre de la aorta abdominal de todos los ratones bajo anestesia de pentobarbital sódico (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Somnopenyl) y se sacrificaron los ratones. La muestra de sangre se transfirió a Microtainer (Becton Dickinson Co., Ltd), se produjo una coagulación adecuada a temperatura ambiente y a continuación se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. Cada uno de los sueros separados se dispensó a dos tubos de 0,5 mL y se almacenó a -80°C o menos hasta la medición.

(6) Medición de anticuerpos IgG anti-A β

La medición del anticuerpo IgG anti-A β se realizó como se describió anteriormente. La Tabla 5 muestra el título calculado de anticuerpos anti-A β del suero murino en cada uno de los grupos de inmunización. Como se muestra en la Tabla 5, independientemente de la posición de la adición de Cys, se encontró la capacidad inductora de anticuerpos en todos los grupos.

Tabla 5

Grupo	Título de anticuerpos (ng/mL)					
	Núm. de Animal	1	2	3	4	Media
28AACys		290461	94	139927	192986	155867,0
Cys28AA		7708	423	15328	108	5891,8
Cys28AACys		772	49849	1537	48	13051,6

Ejemplo 6

Comparación de la capacidad de inducción de anticuerpos entre secuencias de péptidos A β con inserción de cisteína

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

28AA7Cys:

DAEFRHDCSGYEVHHQKLFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 44)

28AA10Cys:

DAEFRHDSGYCEVHHQKLFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 45)

28AA18Cys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVCFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 46)

28AA25Cys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLFFAEDVGCSNK (SEQ ID NO: 48)

33AA28Cys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLFFAEDVGSNKCQGAIG (SEQ ID NO: 50)

35AA28Cys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLFFAEDVGSNKCQGAIGLM (SEQ ID NO: 52)

28AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLFFAEDVGSNKC (SEQ ID NO: 6)

Los péptidos anteriores se sintetizaron (Sigma-Aldrich Japan K.K.) y se diluyeron con solución salina para obtener una solución de partida de 5 mg/ml, que se almacenó a -80°C o menos hasta su uso.

(2) Ratones inmunizados

Se adquirieron ratones C57BL/6 macho (7 semanas de edad, SPF) de Japan Charles River Co., Ltd. y se criaron en un ambiente SPF.

(3) Grupos de inmunización

Los 28 ratones se dividieron en 7 grupos que comprendían cada uno 4 ratones: al Grupo 1 se le administró 28AA7Cys; al Grupo 2 se le administró 28AA10Cys; al Grupo 3 se le administró 28AA18Cys; al Grupo 4 se le administró 28AA25Cys; al Grupo 5 se le administró 33AA28Cys; al Grupo 6 se le administró 35AA28Cys; y al Grupo 7 se le administró 28 AACys.

(4) Inmunización y calendario

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

(5) Muestra de sangre

El día 7 de la cuarta inmunización final, se recogió sangre de la aorta abdominal de todos los ratones bajo anestesia de pentobarbital sódico (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Somnopenyl). La muestra de sangre se transfirió a Microtainer (Becton Dickinson Co., Ltd), se produjo una coagulación adecuada a temperatura ambiente y a continuación se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. Cada uno de los sueros separados se dispensó a dos tubos de 0,5 mL y se almacenó a -80°C o menos hasta la medición.

(6) Medición de anticuerpos IgG anti-A β

La medición del anticuerpo IgG anti-A β se realizó como se describió anteriormente. La Tabla 6 muestra el título calculado de anticuerpos anti-A β del suero murino en cada uno de los Grupos de inmunización. Como se muestra en la Tabla 6, la capacidad inductora de anticuerpos se encontró en los grupos a los que se habían administrado 28AA18Cys, 28AA25Cys, 33AA28Cys, 35AA28Cys o 28AACys. En particular, se encontró una mayor capacidad inductora de anticuerpos para el grupo al que se administró 28AA18Cys, el péptido A β de 28 aminoácidos con inserción de cisteína entre el residuo de aminoácidos 18 y 19, en comparación con el grupo al que se administró 28AACys, el péptido A β de 28 aminoácidos con la adición de cisteína en el extremo C-terminal.

Tabla 6

Grupo	Título de anticuerpos (ng/mL)					
	Núm. de Animal	1	2	3	4	Media
28AA7Cys		21	24	17	30	23,0
28AA10Cys		26	19	18	8	17,7
28AA18Cys		2163676	92083	54037	137801	611899,2
28AA25Cys		14972	4721	4483	3267	6860,8
33AA28Cys		245	1932	29	14214	4105,0
35AA28Cys		1753	17265	2103	6469	6897,5
28AACys		20883	10503	38907	5491	18946,0

Ejemplo 7

Evaluación de la capacidad inductora de anticuerpos del péptido A β con la adición de cisteína junto con la adición de la secuencia de aminoácidos exógenos (no derivada del péptido A β)

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

28AA:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 5)

28AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKC (SEQ ID NO: 6)

28AACysTTD:

5 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKC TTD (SEQ ID NO: 54)

28AACysEIFEFTTD:

10 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKC EIFEFTTD (SEQ ID NO: 56)

Los péptidos anteriores se sintetizaron (Hokkaido System Science Co., Ltd.) y se diluyeron con solución salina para obtener una solución de partida de 5 mg/ml, que se almacenó a -80°C o menos hasta su uso.

(2) Ratones inmunizados

15 Se adquirieron ratones C57BL/6 macho (7 semanas de edad, SPF) de Japan Charles River Co., Ltd. y se criaron en un ambiente SPF.

(3) Grupos de inmunización

20 Los 16 ratones se dividieron en 4 grupos que comprendían cada uno 4 ratones: al Grupo 1 se le administró 28AA; al Grupo 2 se le administró 28AACys; al Grupo 3 se le administró 28AACysTTD; y al Grupo 4 se le administró 28AACysTTD.

25 (4) Inmunización y calendario

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

30 (5) Muestra de sangre

El día 7 de la cuarta inmunización final, se recogió sangre de la aorta abdominal de todos los ratones bajo anestesia de pentobarbital sódico (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Somnopenyl). La muestra de sangre se transfirió a Microtainer (Becton Dickinson Co., Ltd), se produjo una coagulación adecuada a temperatura ambiente y a continuación se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. Cada uno de los sueros separados se dispensó a dos tubos de 0,5 mL y se almacenó a -80°C o menos hasta la medición.

(6) Medición de anticuerpos IgG anti-Aβ

40 La medición del anticuerpo IgG anti-Aβ se realizó como se describió anteriormente. La Tabla 7 muestra el título calculado de anticuerpos anti-Aβ del suero murino en cada uno de los Grupos de inmunización. Como se muestra en la Tabla 7, la capacidad inductora de anticuerpos se encontró en los grupos a los que se habían administrado 28AACys, 28AACysTTD o 28AACysEIFEFTTD. Por lo tanto, se descubrió que la capacidad inductora de anticuerpos de la secuencia Aβ con la adición de Cys permanecía incluso si una secuencia peptídica exógena adicional se unía a dicha secuencia Aβ.

Tabla 7

Grupo	Título de anticuerpos (ng/mL)					
	Núm. de Animal	1	2	3	4	Media
28AA		69	54	67	42	58,0
28AACys		211	365	19578	127	5070,2
28AACysTTD		46	106899	4316	1855	28279,3
28AACysEIFEFTTD		8196	28782	2162	45257	21099,2

50 Ejemplo 8

Administración nasal, intradérmica y oral del péptido Aβ con adición de cisteína

(1) Preparación del péptido Aβ con adición de cisteína

35AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMC (SEQ ID NO: 21)

El péptido anterior se sintetizó (Hokkaido System Science Co., Ltd.) y se diluyó con solución salina para obtener una solución de partida de 5 mg/ml, que se almacenó a -80°C o menos hasta su uso.

(2) Ratones inmunizados

Se adquirieron ratones C57BL/6 macho (7 semanas de edad, SPF) de Japan Charles River Co., Ltd. y se criaron en un ambiente SPF.

(3) Grupos de inmunización

Los 9 ratones se dividieron en 3 grupos que comprendían cada uno 3 ratones: Grupo 1 administración por vía nasal; Grupo 2 administración por vía intradérmica; y Grupo 3 administración por vía oral.

(4) Inmunización y calendario

Inmunización primaria

Común para cada uno de los Grupos, a 200 µL de la solución de partida se les añadieron 1800 µL de solución salina a 0,5 mg/mL de concentración y se administraron 200 µL de la mezcla a los ratones utilizando una jeringa de tuberculina de 1 mL (Terumo, SS-01T2613S) por vía intradérmica o subcutánea en el abdomen (dosis por ratón: 100 µg). Las inmunizaciones segunda, tercera y cuarta (final) de los ratones de cada grupo se realizaron a intervalos semanales después de la inmunización primaria como se describe a continuación.

Grupo 1: Administración nasal

Se administraron 20 µL de la solución de partida a cada uno de los ratones a través de la cavidad nasal utilizando Pipetman P-20 (Gilson) (dosis por ratón: 100 µg).

Grupo 2: Administración intradérmica

El día antes de la administración, se afeitó el dorso de los ratones. Bajo anestesia de isoflurano, la zona afeitada se desinfectó con alcohol del 70% y se secó antes de la administración y a continuación se administraron 20 µL de la solución de partida gota a gota a los ratones utilizando Pipetman P - 20 (Gilson) (dosis por ratón: 100 µg).

Grupo 3: Administración oral

Para la segunda y tercera inmunizaciones, a 200 µL de la solución de partida se les añadieron 2300 µL de solución salina a 0,2 mg/mL de concentración y se administraron 500 µL/ratón de la mezcla al estómago de los ratones utilizando una sonda para uso oral (Natsume Seisakusho CO LTD., KN-348, para ratones) adosada a una jeringa de tuberculina de 1 mL (Terumo, SS-01T2613S) (dosis por ratón: 200 µg). Para la cuarta inmunización (final), a 100 µL de la solución de partida se les añadieron 2400 µL de solución salina a 0,2 mg/mL de concentración y se administraron 500 µL/ratón de la mezcla al estómago de los ratones utilizando una sonda para uso oral adosada a una jeringa de tuberculina de 1 mL (dosis por ratón: 100 µg).

(5) Muestra de sangre

El Día 6 de la inmunización primaria, el Día 6 de la 2ª inmunización y el Día 6 de la 3ª inmunización, se recogieron de 50 a 150 µl de sangre de la vena de la cola. Adicionalmente, el Día 7 de la cuarta inmunización final, se recogió sangre de la aorta abdominal de todos los ratones bajo anestesia de pentobarbital sódico (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Somnopentyl). La muestra de sangre se transfirió a Microtainer (Becton Dickinson Co., Ltd), se produjo una coagulación adecuada a temperatura ambiente y a continuación se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. Cada uno de los sueros separados se dispensó a dos tubos de 0,5 mL y se almacenó a -80°C o menos hasta la medición.

(6) Medición de anticuerpos IgG anti-Aβ

La medición del anticuerpo IgG anti-Aβ se realizó como se describió anteriormente. La Tabla 8 muestra el título de anticuerpos anti-Aβ calculado del suero murino en cada uno de los Grupos de inmunización. Como se muestra en la Tabla 8, se descubrió que el fragmento de péptido Aβ con la adición de cisteína mostró la capacidad de inducir

anticuerpos contra A β independientemente de la administración nasal, percutánea u oral.

Tabla 8

Grupo	Núm. de Animal	Título de anticuerpos (ng/mL)			
		Día 6 desde la administración primaria	Día 6 desde la 2ª administración	Día 6 desde la 3ª administración	Día 6 desde la 4ª administración
Nasal	1	57,0	2564,0	19183,0	54669,0
	2	554,0	5707,0	20814,0	36128,0
	3	461,8	11773,0	10497,0	11895,0
	Media	357,60	6681,33	16831,33	34230,67
Intradérmica	1	28,0	82,0	110,8	64,9
	2	13,6	1682,0	1746,0	1148,0
	3	293,2	2413,0	3809,0	11372,0
	Media	111,60	1392,33	1888,60	4194,97
Oral	1	59,7	4412,0	4746,0	7301,0
	2	90,1	1526,0	1522,0	3396,0
	3	18,4	1960,0	1260,0	1752,0
	Media	56,07	2632,67	2509,33	4149,67

5 Ejemplo 9

Comparación de la capacidad de inducción de anticuerpos en la administración intradérmica entre péptidos A β con y sin adición de cisteína

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

35AA:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLM (SEQ ID NO: 20)

15

35AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLM \underline{C} (SEQ ID NO: 21)

20 Los péptidos anteriores se sintetizaron (Hokkaido System Science Co., Ltd.) y se diluyeron con solución salina para obtener una solución de partida de 5 mg/ml, que se almacenó a -80°C o menos hasta su uso.

(2) Ratones inmunizados

25 Se adquirieron ratones C57BL/6 macho (7 semanas de edad, SPF) de Japan Charles River Co., Ltd. y se criaron en un ambiente SPF.

(3) Grupos de inmunización

30 Los 10 ratones se dividieron en 2 grupos que comprendían cada uno 5 ratones: al Grupo 1 se le administró el péptido A β de 35 aminoácidos con la adición de cisteína; y al Grupo 2 se le administró el péptido A β de 35 aminoácidos sin adición de cisteína.

(4) Inmunización y calendario

35

La inmunización primaria se realizó como en el Ejemplo 8. Las inmunizaciones segunda, tercera y cuarta (final) se realizaron a intervalos semanales después de la inmunización primaria como se describe a continuación. El día antes de la administración, se afeitó el dorso de los ratones. Bajo anestesia con isoflurano, la zona afeitada se desinfectó con alcohol del 70% antes de la administración, la aplicación/desprendimiento de una cinta quirúrgica (Nichiban Co., Ltd.) se repitió 10 veces para eliminar la capa corneal de la epidermis y a continuación se administraron gota a gota 20 μ L de la solución de partida a los ratones utilizando Pipetman P-20 (Gilson) (dosis por

40

ratón: 100 µg).

(5) Muestra de sangre

- 5 El día 7 de la cuarta inmunización final, se recogió sangre de la aorta abdominal de todos los ratones bajo anestesia de pentobarbital sódico (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Somnopentyl). La muestra de sangre se transfirió a Microtainer (Becton Dickinson Co., Ltd), se produjo una coagulación adecuada a temperatura ambiente y a continuación se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. Cada uno de los sueros separados se dispuso a dos tubos de 0,5 mL y se almacenó a -80°C o menos hasta la medición.

10 (6) Medición de anticuerpos IgG anti-Aβ

La medición del anticuerpo IgG anti-Aβ se realizó como se describió anteriormente. La Tabla 9 muestra el título calculado de anticuerpos anti-Aβ del suero murino en cada uno de los Grupos de inmunización. Como se muestra en la Tabla 9, se descubrió que el fragmento de péptido Aβ con la adición de cisteína mostró una capacidad de inducción de anticuerpo 10 veces mayor o más en comparación con el péptido Aβ sin adición de cisteína.

Tabla 9

Grupo	Título de anticuerpos (ng/mL)						
	Núm. de Animal	1	2	3	4	5	Media
35AACys		130292	21945	13948	83671	62464	62464,0
35AA		17579	2585	1843	58	5516	5516,2

20 Ejemplo 10

Comparación del péptido Aβ con/sin adición de cisteína y con y sin adición de coadyuvante

(1) Preparación de péptidos Aβ con/sin adición de cisteína

28AA:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 5)

28AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKC (SEQ ID NO: 6)

Los péptidos anteriores se sintetizaron (Hokkaido System Science Co., Ltd.) y se diluyeron con solución salina para obtener una solución de partida de 5 mg/ml. A 100 µL de la solución de partida se les añadieron 900 µL de solución salina a 0,5 mg/ml de la concentración y la mezcla se dispuso a un tubo de 1,5 mL (inmunógeno) y se almacenó a -80°C o menos hasta su uso.

(2) Coadyuvante

Como coadyuvante, se utilizaron las emulsiones Quil-A (Accurate Chemical & Scientific Corporation) y MPL+TDM disponibles en el mercado (Corixa). Quil-A se disolvió en solución salina para obtener 5 mg/ml de una solución de partida. Además, se disolvió 1 vial de emulsión MPL+TDM en 1 mL de solución salina para obtener una solución de partida, que se almacenó a 4°C hasta su uso.

(3) Ratones inmunizados

Se adquirieron ratones C57BL/6 macho (9 semanas de edad, SPF) de Japan Charles River Co., Ltd. y se criaron en un entorno SPF.

(4) Grupos de inmunización

Los 24 ratones se dividieron en 6 grupos que comprendían cada uno 4 ratones: al Grupo 1 se le administró 28AA; al Grupo 2 se le administró 28AA + Quil-A; al Grupo 3 se le administró 28AA + emulsión MPL+TDM; al Grupo 4 se le administró 28AACys; al Grupo 5 se le administró 28AACys + Quil-A; y al Grupo 6 se le administró 28AACys + emulsión MPL+TDM.

(5) Dosis y preparación de muestra para administración

Una dosis de péptido A β fue de 100 μ g por animal y se administraron 0,2 mL de 500 μ g/mL de muestra para la administración. Con respecto al grupo al que se había administrado 28AA y el grupo al que se había administrado 28AACys, se mezclaron 20 μ L de cada solución de partida y 180 μ L de solución salina y la mezcla se almacenó a -80°C hasta la administración. Con respecto al grupo al que se había administrado 28AA + Quil-A y el grupo al que se había administrado 28AACys + Quil-A, se mezclaron 20 μ L de cada solución de partida, 10 μ L de la solución de partida de 5 mg/mL de Quil-A (50 μ g por animal) y 170 μ L de solución salina y la mezcla se almacenó a -80°C hasta la administración. Con respecto al grupo al que se había administrado 28AA + emulsión MPL+TDM y el grupo al que se había administrado 28AACys + emulsión MPL+TDM, se mezclaron 90 μ L de cada solución de partida y 660 μ L de solución salina para preparar la solución de partida para la administración, que se almacenó a -80°C. Se añadieron 0,5 mL de la solución de partida de emulsión MPL+TDM inmediatamente antes de la administración para obtener la suspensión (para 4,5 individuos).

(6) Inmunización y calendario

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

(7) Muestra de sangre

El día 7 de la tercera inmunización final, se recogió sangre de la aorta abdominal de todos los ratones bajo anestesia de pentobarbital sódico (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Somnopentyl). La muestra de sangre se transfirió a Microtainer (Becton Dickinson Co., Ltd), se produjo una coagulación adecuada a temperatura ambiente y a continuación se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. Cada uno de los sueros separados se dispensó a dos tubos de 0,5 mL y se almacenó a -80°C o menos hasta la medición.

(8) Medición de anticuerpos IgG anti-A β

La medición del anticuerpo IgG anti-A β se realizó como se describió anteriormente. La Tabla 10 muestra el título calculado de anticuerpos anti-A β del suero murino en cada uno de los Grupos de inmunización. Como se muestra en la Tabla 10, se encontró que la inducción de anticuerpos contra A β apenas se podía observar para 28AA junto con Quil-A, pero se observó para 28AA junto con la emulsión MPL+TDM. En el caso de 28AACys, se puede observar un alto título de anticuerpos con Quil-A o con la emulsión MPL+TDM. La inducción de anticuerpos de 28AACys solo fue similar a la de 28AA junto con la emulsión MPL+TDM.

Tabla 10

Grupo	Título de anticuerpos (ng/mL)					
	Núm. de Animal	1	2	3	4	Media
1.28AA		37	72	37	27	43,2
2.28AA + Quil-A		84	62	288	78	124,2
3. 28AA + Emulsión MPL+TDM		20602	26442	14814	8832	17422,6
4.28AACys		8847	9458	10446	48224	19243,7
5.28AACys + Quil-A		277061	809713	504433	55412	411654,9
6.28AACys + Emulsión MPL+TDM		455340	177449	111462	454037	299572,1

Ejemplo 11

Evaluación farmacológica del péptido A β con adición de cisteína utilizando ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer

(1) Preparación del péptido A β con adición de cisteína

35AACys:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMC NH_2 (SEQ ID NO: 21)

El péptido anterior se sintetizó (Hokkaido System Science Co., Ltd.) y se diluyó con solución salina para obtener una solución de partida de 5 mg/mL. A 100 μ L de la solución de partida se le añadieron 900 μ L de solución salina a 0,5 mg/mL de la concentración y la mezcla se dispensó a un tubo de 1,5 mL (inmunógeno) y se almacenó a

-80°C o menos hasta su uso.

(2) Ratones inmunizados

- 5 Los ratones transgénicos (TG2576, hembra, 11 semanas de edad, SPF), que mostraron un estado patológico similar al Alzheimer con acumulación de A β humano en el cerebro a través de la expresión de una proteína precursora A β humana, se adquirieron de Taconic Farms, Inc. y se criaron en ambiente SPF.

(3) Grupos de inmunización

- 10 Los 6 ratones se dividieron en 2 grupos que comprendían cada uno 3 ratones: al Grupo 1 se le administró 35AACys; y al Grupo 2 no se le administró nada (control).

(4) Inmunización y calendario

- 15 Se administraron 200 μ L/ratón de un inmunógeno a cada uno de los ratones utilizando una jeringa de tuberculina de 1 mL (Terumo, SS-01T2613S) por vía intradérmica o subcutánea en el abdomen (dosis por ratón: 100 μ g). Los ratones se inmunizaron 4 veces a intervalos de 2 semanas a partir de las 18 semanas de edad y a continuación a intervalos mensuales con un total de 11 inmunizaciones.

(5) Muestra de sangre

- 25 El día 13 de la inmunización final, se recogió sangre de la aorta abdominal de todos los ratones bajo anestesia de pentobarbital sódico (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Somnopentyl). La muestra de sangre se transfirió a Microtainer (Becton Dickinson Co., Ltd), se produjo una coagulación adecuada a temperatura ambiente y a continuación se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. Cada uno de los sueros separados se dispensó a dos tubos de 0,5 mL y se almacenó a -80°C o menos hasta la medición.

(6) Extracción de A β humano depositado en el cerebro

- 30 Después de la toma de muestras de sangre, el cerebro se aisló mediante craneotomía. Una parte del lóbulo frontal se seccionó y se pesó. A esto se le añadió TBS que contenía un inhibidor de proteinasa (Roche, Complete Protease Inhibitor Cocktail Set, 1 comprimido/50 mL de solución) (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, pH 7,6; en lo sucesivo denominado "CP/TBS") a 150 mg (peso húmedo de cerebro)/mL y la mezcla se homogeneizó con un
35 homogeneizador elaborado de teflón (marca registrada). A continuación, la mezcla se centrifugó a 12.000 g a 4°C durante 10 min. El sobrenadante se descartó y el precipitado resultante se resuspendió en Triton X-100 al 1%/CP/TBS (en la misma cantidad que la de CP/TBS anterior) y la suspensión se sometió a agitación vortical durante 1 minuto. La suspensión se centrifugó a 12.000 g a 4°C durante 10 min. El sobrenadante se descartó y el precipitado resultante se resuspendió en SDS al 2%/CP/TBS (en la misma cantidad que la de CP/TBS anterior) y la
40 suspensión se sometió a agitación vortical durante 1 minuto. La suspensión se centrifugó adicionalmente a 12.000 g a 4°C durante 10 min. El sobrenadante resultante se usó como una fracción de muestra que contenía el A β humano depositado en el cerebro.

(7) Medición de anticuerpos IgG anti-A β

- 45 La medición del anticuerpo IgG anti-A β se realizó como se describió anteriormente.

(8) Medición de A β humano depositado en el cerebro

- 50 La medición se realizó utilizando el kit de ELISA WAKO (WAKO, número de código 296 - 64401) para β -amiloide (1-42) humano. A una placa de microtitulación inmovilizada con un anticuerpo humano contra A β (BAN50) se le añadió una muestra que contenía A β humano diluido 50 veces a 100 μ L/pocillo. Después de la reacción durante la noche a 4°C, cada una de las muestras diluidas añadidas se descartó y la placa de microtitulación se lavó 5 veces con 350 μ L/pocillo de la solución de lavado en el kit. Se añadió una solución de anticuerpo marcado con HRP (BC05) (100 μ L)
55 a cada uno de los pocillos seguido de una reacción de 1 hora a 4°C. Después de la reacción, la solución de anticuerpo marcado se descartó y la placa de microtitulación se lavó 5 veces con 350 μ L/pocillo de la solución de lavado. Se añadió una solución de TMB (agente cromogénico, 100 μ L) a cada uno de los pocillos, seguido de reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación, se añadieron 100 μ L/pocillo de la solución de parada para inactivar la reacción enzimática y se midió la densidad óptica a 450 nm (valor DO450). Se realizó una curva patrón utilizando la solución patrón adjunta (β -amiloide humano (1-42), 20 pmoles/L). En la
60 medición de las muestras, dicha solución patrón se diluyó con la solución de dilución patrón a 0,156, 0,3125, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 pmoles/mL. El valor DO450 de cada una de las soluciones patrón diluidas se midió simultáneamente con la medición de cada una de las muestras. Se calculó una concentración de A β humano en cada una de las muestras utilizando la unidad resultante de los patrones y la curva patrón del valor DO450.

Las Tablas 11 y 12 muestran el título de anticuerpos anti-A β calculado en el suero murino y la concentración de A β humano depositado en el cerebro de cada uno de los grupos de inmunización. Como se muestra en la Tabla 11, se observó producción de anticuerpo contra A β para ratones modelo de Alzheimer inmunizados con 35AACys. Además, como se muestra en la Tabla 12, se encontró que la concentración de depósito de A β (hA β) humano en el cerebro era menor que la de los ratones modelo de Alzheimer a los que no se administraba nada. Por lo tanto, se demostró que el péptido A β con la adición de Cys era eficaz no solo como agente profiláctico (vacuna peptídica) sino también como agente terapéutico.

Tabla 11

Grupo	Título de anticuerpo (ng/mL)				Media
	Núm. de Animal	1	2	3	
Grupo al que se administró 35AACys		43085	159564	308485	170378,0
Grupo al que no se administró nada		242	105	660	335,2

Tabla 12

Grupo	Núm. de Animal	Conc. hA β (pmol/mL)			Media
		1	2	3	
Grupo al que se administró 35AACys		544	1137	2377	1353,0
Grupo al que no se administró nada		4170	6379	4442	4997,1

Aplicabilidad industrial

El péptido inmunogénico que induce un aumento de la respuesta inmunitaria que comprende un péptido A β o una porción del mismo con adición o inserción de cisteína o con la adición de un péptido que contiene cisteína y el fragmento génico que codifica dicho péptido de la presente invención se puede utilizar como un método seguro y conveniente para la estimulación inmunitaria en una vacuna peptídica, una vacuna de ADN y similares. Además, el péptido A β que induce un aumento de la respuesta inmunitaria o una porción del mismo, preparado mediante un método para potenciar una respuesta inmunitaria de la presente invención, puede ser un medicamento eficaz para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer.

LISTA DE SECUENCIAS

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

<120> Métodos para aumentar las respuestas inmunitarias a péptidos

<130> 668285

<150> JP 2007-112060

<151> 2007-04-20

<150> JP 2007-279083

<151> 2007-10-26

<160> 57

<170> Patent In versión 3.4

<210> 1

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Sintetizado

<400> 1

ES 2 655 868 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 Cys
 20 25

<210> 2
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN que codifica una secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado

<400> 2

gatgcagaat tccgacatga ct caggat at gaagtt cat c at caaaaat t ggtgttcttt 60
 gcagaagatg tgggttcatg t 81

<210> 3
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido Sintetizado

<400> 3

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

<210> 4
 <211> 84
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN que codifica una secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado

<400> 4

gatgcagaat tccgacatga ct caggat at gaagtt cat c at caaaaat t ggtgttcttt 60
 gcagaagatg tgggttcaaa ctgt 84

<210> 5
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

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
 20 25

<210> 6
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido Sintetizado

ES 2 655 868 T3

<400> 6

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							

5
 <210> 7
 <211> 87
 <212> ADN
 <213> Artificial

10
 <220>
 <223> ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado

<400> 7

gatgcagaat	tccgacatga	ctcaggat	atgaagtt	catc	atcaaaaatt	gggtgttcttt	60
gcagaagatg	tgggttcaaa	caaatgt					87

15
 <210> 8
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

20
 <220>
 <223> Péptido Sintetizado

25
 <400> 8

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	Cys		
			20					25					30		

30
 <210> 9
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Artificial

35
 <220>
 <223> ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado

<400> 9

gatgcagaat	tccgacatga	ctcaggat	atgaagtt	catc	atcaaaaatt	gggtgttcttt	60
gcagaagatg	tgggttcaaa	caaaggttgt					90

40
 <210> 10
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

45
 <220>
 <223> Péptido Sintetizado

50
 <400> 10

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	Cys	
			20					25					30		

55
 <210> 11
 <211> 93
 <212> ADN

ES 2 655 868 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> ADN que codifica una secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado
 5
 <400> 11
 gatgcagaat tccgacatga ct caggat at gaagt t cat c at caaaaat t ggtgt t ctt t 60
 gcagaagat g tgggt t caaa caaaggt gca t gt 93
 10
 <210> 12
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Péptido Sintetizado
 <400> 12
 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 Cys
 20 25 30
 20
 <210> 13
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> ADN que codifica una secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado
 30
 <400> 13
 gatgcagaat tccgacatga ct caggat at gaagt t cat c at caaaaat t ggtgt t ctt t 60
 gcagaagat g tgggt t caaa caaaggt gca at ct gt 96
 35
 <210> 14
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Péptido Sintetizado
 <400> 14
 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
 Cys
 45
 <210> 15
 <211> 99
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> ADN que codifica una secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado
 55
 <400> 15

ES 2 655 868 T3

		gatgcagaat tccgacatga ct caggat at gaagttcatc atcaaaaatt ggtgttcttt	60
		gcagaagatg tgggttcaaa caaaggtgca at catttgt	99
5	<210> 16 <211> 34 <212> PRT <213> Artificial		
10	<220> <223> Péptido Sintetizado		
	<400> 16		
		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 Cys	
15	<210> 17 <211> 102 <212> ADN <213> Artificial		
20	<220> <223> ADN que codifica una secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado		
	<400> 17		
25		gatgcagaat tccgacatga ct caggat at gaagttcatc atcaaaaatt ggtgttcttt	60
		gcagaagatg tgggttcaaa caaaggtgca at cattggat gt	102
30	<210> 18 <211> 35 <212> PRT <213> Artificial		
	<220> <223> Péptido Sintetizado		
35	<400> 18		
		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 Cys 35	
40	<210> 19 <211> 105 <212> ADN <213> Artificial		
45	<220> <223> ADN que codifica una secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado		
	<400> 19		
50		gatgcagaat tccgacatga ct caggat at gaagttcatc atcaaaaatt ggtgttcttt	60
		gcagaagatg tgggttcaaa caaaggtgca at cattggac tctgt	105
	<210> 20 <211> 35 <212> PRT <213> Homo sapiens		

<400> 20

```

Asp 1 Ala 5 Glu 10 Phe 15 Arg 20 His 25 Asp 30 Ser 35 Gly 40 Tyr 45 Glu 50 Val 55 His 60 His 65 Gln 70 Lys 75
Leu 1 Val 5 Phe 10 Phe 15 Ala 20 Glu 25 Asp 30 Val 35 Gly 40 Ser 45 Asn 50 Lys 55 Gly 60 Ala 65 Ile 70 Ile 75
Gly 1 Leu 5 Met 10
    
```

5

<210> 21

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Péptido Sintetizado

<400> 21

15

```

Asp 1 Ala 5 Glu 10 Phe 15 Arg 20 His 25 Asp 30 Ser 35 Gly 40 Tyr 45 Glu 50 Val 55 His 60 His 65 Gln 70 Lys 75
Leu 1 Val 5 Phe 10 Phe 15 Ala 20 Glu 25 Asp 30 Val 35 Gly 40 Ser 45 Asn 50 Lys 55 Gly 60 Ala 65 Ile 70 Ile 75
Gly 1 Leu 5 Met 10 Cys 15
    
```

<210> 22

<211> 108

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> ADN que codifica una secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado

25

<400> 22

```

gatgcagaat tccgacatga ctcaggat at gaagttcatc atcaaaaatt ggtgttcttt 60
gcagaagatg tgggttcaaa caaagggtgca atcattggac tcatgtgt 108
    
```

30

<210> 23

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> Péptido Sintetizado

<400> 23

```

Asp 1 Ala 5 Glu 10 Phe 15 Arg 20 His 25 Asp 30 Ser 35 Gly 40 Tyr 45 Glu 50 Val 55 His 60 His 65 Gln 70 Lys 75
Leu 1 Val 5 Phe 10 Phe 15 Ala 20 Glu 25 Asp 30 Val 35 Gly 40 Ser 45 Asn 50 Lys 55 Gly 60 Ala 65 Ile 70 Ile 75
Gly 1 Leu 5 Met 10 Val 15 Cys 20
    
```

40

<210> 24

<211> 111

<212> ADN

<213> Artificial

45

<220>

<223> ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado

50

<400> 24

ES 2 655 868 T3

gatgcagaat tccgacatga ct caggat at gaagt t cat c at caaaaat t ggtgt t ctt t 60
gcagaagat g tgggt t caaa caaaggt gca at cat t ggac t cat ggtgt g t 111

<210> 25
<211> 38
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido Sintetizado

<400> 25

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 30
Gly Leu Met Val Gly Cys
35

<210> 26
<211> 114
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado

<400> 26

gatgcagaat tccgacatga ct caggat at gaagt t cat c at caaaaat t ggtgt t ctt t 60
gcagaagat g tgggt t caaa caaaggt gca at cat t ggac t cat ggt ggg ctgt 114

<210> 27
<211> 39
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido Sintetizado

<400> 27

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 30
Gly Leu Met Val Gly Gly Cys
35

<210> 28
<211> 117
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado

<400> 28

gatgcagaat tccgacatga ct caggat at gaagt t cat c at caaaaat t ggtgt t ctt t 60
gcagaagat g tgggt t caaa caaaggt gca at cat t ggac t cat ggt ggg cgggtgt 117

<210> 29
<211> 40
<212> PRT

ES 2 655 868 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Sintetizado

5

<400> 29

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	Cys								
		35					40								

10

<210> 30

<211> 120

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado

<400> 30

20

gatgcagaat	tccgacatga	ctcaggat	atgaagt	tcatc	atcaaaaatt	gggtgttcttt	60
gcagaagatg	tgggttcaaa	caaagg	tgcaat	catggac	tcatgg	ggg	cggtgtt
							120

<210> 31

<211> 40

<212> PRT

25

<213> Homo sapiens

<400> 31

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								

30

<210> 32

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> Péptido Sintetizado

<400> 32

40

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	Cys							
		35					40								

<210> 33

<211> 123

<212> ADN

<213> Artificial

45

<220>

<223> ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado

50

<400> 33

ES 2 655 868 T3

gatgcagaat tccgacatga ct caggat at gaagt t cat c at caaaaat t ggtgt t ct t t 60
gcagaagat g t ggg t t caaa caaagg t gca at cat t ggac t cat ggt ggg cgg t gt t gt c 120
t gt 123

<210> 34
<211> 42
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

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

<210> 35
<211> 126
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 35

gatgcagaat tccgacatga ct caggat at gaagt t cat c at caaaaat t ggtgt t ct t t 60
gcagaagat g t ggg t t caaa caaagg t gca at cat t ggac t cat ggt ggg cgg t gt t gt c 120
at agcg 126

<210> 36
<211> 43
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido Sintetizado

<400> 36

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 Cys
35 40

<210> 37
<211> 129
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado

<400> 37

gatgcagaat tccgacatga ct caggat at gaagt t cat c at caaaaat t ggtgt t ct t t 60
gcagaagat g t ggg t t caaa caaagg t gca at cat t ggac t cat ggt ggg cgg t gt t gt c 120
at agcgt gt 129

<210> 38
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

ES 2 655 868 T3

<223> Péptido Sintetizado

<400> 38

Asp Al a Gl u Phe Arg Hi s Asp Ser Gly Tyr Gl u Val Hi s Hi s Gl n Lys
1 5 10 15
Leu Val Phe Phe Al a Gl u Asp Val Gly Ser Asn Lys Cys Cys
20 25 30

<210> 39

<211> 90

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado

<400> 39

gatgcagaat tccgacatga ct caggat at gaagt t cat c at caaaaat t ggtgt t c t t t 60
gcagaagat g t ggg t t caaa caaatgt t gt 90

<210> 40

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Sintetizado

<400> 40

Cys Asp Al a Gl u Phe Arg Hi s Asp Ser Gly Tyr Gl u Val Hi s Hi s Gl n
1 5 10 15
Lys Leu Val Phe Phe Al a Gl u Asp Val Gly Ser Asn Lys
20 25

<210> 41

<211> 87

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado

<400> 41

tgtgatgcag aattccgaca tgactcagga tatgaagt t c at cat caaaa att ggtgt t c 60
tttgcagaag atgtgggt t c aaacaaa 87

<210> 42

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Sintetizado

<400> 42

Cys Asp Al a Gl u Phe Arg Hi s Asp Ser Gly Tyr Gl u Val Hi s Hi s Gl n
1 5 10 15
Lys Leu Val Phe Phe Al a Gl u Asp Val Gly Ser Asn Lys Cys
20 25 30

<210> 43

ES 2 655 868 T3

<211> 90
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado

<400> 43

10

t g t g a t g c a g a a t t c c g a c a t g a c t c a g g a t a t g a a g t t c a t c a t c a a a a a t t g g t g t t c 60
 t t t g c a g a a g a t g t g g g t t c a a a c a a a t g t 90

<210> 44
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Péptido Sintetizado

20

<400> 44

Asp Al a Gl u Phe Ar g Hi s Asp Oys Ser Gl y Tyr Gl u Val Hi s Hi s Gl n
 1 5 10 15
 Lys Leu Val Phe Phe Al a Gl u Asp Val Gl y Ser Asn Lys
 20 25

25

<210> 45
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Péptido Sintetizado

<400> 45

Asp Al a Gl u Phe Ar g Hi s Asp Ser Gl y Tyr Oys Gl u Val Hi s Hi s Gl n
 1 5 10 15
 Lys Leu Val Phe Phe Al a Gl u Asp Val Gl y Ser Asn Lys
 20 25

35

<210> 46
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Péptido Sintetizado

45

<400> 46

Asp Al a Gl u Phe Ar g Hi s Asp Ser Gl y Tyr Gl u Val Hi s Hi s Gl n Lys
 1 5 10 15
 Leu Val Oys Phe Phe Al a Gl u Asp Val Gl y Ser Asn Lys
 20 25

50

<210> 47
 <211> 87
 <212> ADN
 <213> Artificial

55

<220>
 <223> ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado

<400> 47

ES 2 655 868 T3

gatgcagaat tccgacatga ct caggat at gaagttcatc atcaaaaatt ggtgtgtttc 60
 ttgcagaag atgtgggttc aaacaaa 87

5 <210> 48
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Péptido Sintetizado

<400> 48

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 Oys Ser Asn Lys
 20 25

15 <210> 49
 <211> 87
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado

<400> 49

25 gatgcagaat tccgacatga ct caggat at gaagttcatc atcaaaaatt ggtgttcttt 60
 gcagaagatg tgggtgtgttc aaacaaa 87

30 <210> 50
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido Sintetizado

35 <400> 50

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 Oys Gly Ala Ile
 20 25 30
 Ile Gly

40 <210> 51
 <211> 102
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado

<400> 51

50 gatgcagaat tccgacatga ct caggat at gaagttcatc atcaaaaatt ggtgttcttt 60
 gcagaagatg tgggttcaaa caaatgtggt gcaatcat t g ga 102

55 <210> 52
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 655 868 T3

<220>

<223> Péptido Sintetizado

<400> 52

5

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 Gly Ala Ile
 20 25 30
 Ile Gly Leu Met
 35

10

<210> 53

<211> 108

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado

<400> 53

20

gatgcagaat tccgacatga ct caggat at gaagtt cat c at caaaaatt ggtgttcttt 60
 gcagaagat g tgggt t caaa caaat gt ggt gcaat cat t g gact cat g 108

<210> 54

<211> 32

<212> PRT

25

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Sintetizado

30

<400> 54

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 Thr Thr Asp
 20 25 30

35

<210> 55

<211> 96

<212> ADN

<213> Artificial

40

<220>

<223> ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado

<400> 55

45

gatgcagaat tccgacatga ct caggat at gaagtt cat c at caaaaatt ggtgttcttt 60
 gcagaagat g tgggt t caaa caaat gt act act gac 96

<210> 56

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial

50

<220>

<223> Péptido Sintetizado

<400> 56

ES 2 655 868 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 Qys Glu Ile Phe
 20 25 30
 Glu Phe Thr Thr Asp
 35

<210> 57

<211> 111

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido sintetizado

<400> 57

gatgcagaat tccgacatga ct caggat at gaagttcatc atcaaaaatt ggtgttcttt 60
 gcagaagatg tgggttcaaa caaatgtgaa atcttcgaat tcactactga c 111

REIVINDICACIONES

1. Un péptido inmunogénico que induce un aumento de la respuesta inmunitaria mediante la inducción de un anticuerpo específico para el péptido, en donde dicho péptido inmunogénico comprende un péptido β -amiloide o una porción del mismo que comprende al menos los 28 aminoácidos N-terminales del SEQ ID NO: 34 y que tiene una adición o inserción de al menos una cisteína, en donde la cisteína se inserta entre los residuos de aminoácido 18° y 19°, entre los residuos de aminoácido 25° y 26°, o entre los residuos de aminoácido 28° y 29° contados desde el extremo N terminal de dicho péptido β amiloide o una porción del mismo.
2. El péptido inmunogénico de la reivindicación 1, que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 56.
3. Un medicamento que comprende el péptido inmunogénico de la reivindicación 1 o 2.
4. Un medicamento que comprende el péptido inmunogénico de la reivindicación 1 o 2 junto con un coadyuvante.
5. Una vacuna de ADN que comprende un fragmento génico que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido inmunogénico de la reivindicación 1 o 2.
6. El péptido inmunogénico de la reivindicación 1 o 2 para utilizar en el aumento de una respuesta inmunitaria.
7. El péptido inmunogénico de la reivindicación 1 o 2 junto con un coadyuvante para uso en el aumento de una respuesta inmunitaria.
8. Una vacuna de ADN que comprende un vector que contiene un fragmento génico que codifica una secuencia de aminoácidos del péptido inmunogénico de la reivindicación 1 o 2 para su uso en el aumento de una respuesta inmunitaria.
9. El uso del péptido inmunogénico de la reivindicación 1 o 2 para la preparación de un medicamento para el aumento de una respuesta inmunitaria.
10. El uso del péptido inmunogénico de la reivindicación 1 o 2 junto con un coadyuvante para la preparación de un medicamento para el aumento de una respuesta inmunitaria.
11. El uso de la vacuna de ADN de la reivindicación 5 u 8 para la preparación de un medicamento para el aumento de una respuesta inmunitaria.