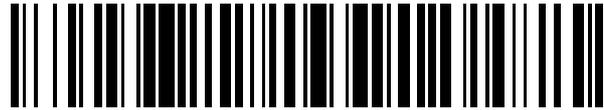


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 951**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2012 PCT/US2012/056728**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13044147**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2012 E 12772616 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2758071**

54 Título: **Vacunoterapia**

30 Prioridad:  
**23.09.2011 WO PCT/US2011/052992**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.05.2019**

73 Titular/es:  
**AC IMMUNE S.A. (100.0%)  
EPFL Innovation Park, Building B  
1015 Lausanne, CH**

72 Inventor/es:  
**PFEIFER, ANDREA;  
MUHS, ANDREAS;  
MADANI, RIME;  
BELICHENKO, PAVEL VASILYEVICH y  
MOBLEY, WILLIAM CHARLES**

74 Agente/Representante:  
**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 712 951 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

## Vacunoterapia

La presente invención proporciona medios para tratar la patología relacionada con el amiloide en sujetos jóvenes o de mediana edad con síndrome de Down (DS). En particular, la presente invención proporciona fragmentos de péptidos antigénicos derivados de la proteína amiloide o de la proteína semejante a la amiloide para uso en el tratamiento de la demencia semejante a la enfermedad de Alzheimer (AD) en sujetos jóvenes o de mediana edad con síndrome de Down (DS).

La patología genética del síndrome de Down (DS) es la trisomía más común y ocurre en uno de cada 700-1000 recién nacidos. Las estimaciones sugieren que el 25% o más de los individuos con síndrome de Down mayores de 35 años muestran los signos y síntomas de demencia semejantes al Alzheimer (Stanton L.R y Coetzee R.H, 2004). El porcentaje aumenta con la edad. En el DS, la totalidad o al menos una parte del cromosoma 21 está presente por triplicado (Antonarakis et al. 2004; Moncaster et al. 2010). En consecuencia, las tres copias del gen de la proteína precursora de amiloide (APP) conducen a la generación de un exceso de  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), una de las principales proteínas anormales bien conocidas por ser responsables de la enfermedad de Alzheimer (AD) (Ballard et al 2011). Por lo tanto, se sugiere que el  $A\beta$  tiene un posible papel para la demencia semejante a la AD en la mayoría de las personas con DS (Lee et al. 2005; Liu et al. 2005; Gilman et al. 2005).

En las personas con síndrome de Down, los defectos de la memoria semejantes a la AD pueden estar relacionados con varias proteínas patológicas, tales como  $A\beta$ , Tau, Dyrk1A, Apo E, etc. El aumento de  $A\beta$  ya comienza en la etapa embrionaria, progresa al nacer y continúa creciendo al aumentar la edad (Stoltzner et al. 2000). Además, los niveles de  $A\beta$ 42 en el líquido cerebroespinal (CSF) fueron más bajos y los niveles de tau fueron más altos en las personas mayores (>40 años) que en las personas más jóvenes con DS (Tapiola et al. 2001). Una vez que el  $A\beta$  se deposita en las placas, la Apo E se puede detectar en muchas placas a los 12 años y aumenta continuamente con la edad (Lemere et al. 1996). Las marañas neurofibrilares (NFTs) se detectan en el cerebro del DS durante la cuarta década de la vida. Se cree que estas NFT resultan de la acumulación de tau. Se ha demostrado que la hiperfosforilación puede ser causada por la sobreexpresión de una quinasa llamada Dyrk1A (quinasa regulada por fosforilación de tirosina de doble especificidad 1A) (Lemere et al. 1996; Liu et al. 2008). Por lo tanto, las personas con DS pueden desarrollar la patología relacionada con el amiloide a los 40 años y la mayoría tienen síntomas clínicos similares a los del Alzheimer, tales como declive cognitivo y deterioro de la memoria a los 60 años (Stanton 2004).

Mientras que los individuos con DS reciben atención médica principalmente por sus diversos problemas de salud (tales como defectos cardíacos, infecciones e hipotiroidismo), el tratamiento específico para los rasgos neuropatológicos, es decir, la discapacidad mental y la deficiencia de la memoria, rara vez se considera. Actualmente, están en curso solo unos pocos experimentos clínicos, todos tratando de mejorar las capacidades mentales o de reducir el daño nervioso. Los fármacos para tratar el DS también se utilizan en la AD y todos actúan sobre el sistema colinérgico o la neurotransmisión glutamatérgica, tales como rivastigmina o donepezilo, unos inhibidores de la colinesterasa y memantina, un antagonista del receptor NMDA (Prasher, 1993; Prasher, 2004). Sin embargo, faltan pruebas de la eficacia para las personas con DS. Actualmente, hay muchos tratamientos modificadores de amiloide en revisión, que incluyen la inmunoterapia dirigida contra  $A\beta$  (Rafii, 2010). Varias vacunas han alcanzado recientemente fases clínicas (Weiner y Frenkel, 2006) después de haber demostrado una reducción eficiente de la carga cerebral de  $A\beta$  y revertir el declive cognitivo en los modelos de ratón AD. Por el contrario con la AD, las inmunoterapias dirigidas contra  $A\beta$  no están siendo abordadas en el DS.

De los varios enfoques para tratar el deterioro cognitivo en adultos con DS, los estudios existentes que utilizan inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChEIs) o antagonistas de los receptores NMDA han mostrado poco o ningún efecto (Fernández et al., 2007, Hanney et al., 2012). Por el contrario, hay un apoyo significativo para la hipótesis de que el amiloide desempeña un papel en el deterioro cognitivo de personas con DS; Netzer y sus colegas mostraron que la alteración de la división de la APP, por un inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa, tiene un efecto beneficioso en la memoria de un modelo de ratón DS (Netzer et al., 2010). Estas observaciones se basan en estudios en modelos de ratón que muestran que el aumento de dosis génica para APP, la proteína parental del péptido Abeta responsable de la deposición de amiloide, es necesaria para la degeneración de las neuronas ligadas a la edad que caracteriza al DS y la AD (Salehi et al 2006, 2009). Por lo tanto, seleccionar como diana el amiloide puede ser una estrategia terapéutica prometedora para la prevención de la progresión de la AD. El desarrollo de una inmunoterapia contra  $A\beta$  se basa en la hipótesis de que si una molécula se dirige y secuestra el  $A\beta$  (en forma soluble y como oligómeros) in situ, la molécula puede mejorar la eliminación de Abeta del cerebro y brindar beneficios clínicos a las personas con DS. Se anticipa que los anticuerpos generados por la vacuna anti- $A\beta$  se unirán a los depósitos fibrilares de  $A\beta$  para solubilizar o inhibir finalmente el crecimiento de las placas previas. Los oligómeros  $A\beta$  se consideran hoy en día como la especie  $A\beta$  más tóxica, lo que perjudica la mayoría de las funciones cognitivas en las personas con DS (Teller et al., 1996).

El documento WO 2007/068411A2 describe métodos y composiciones para el uso terapéutico y diagnóstico en el tratamiento de enfermedades y patologías causadas por proteínas amiloides o semejantes a las amiloides, o asociadas con ellas. En particular, el documento WO 2007/068411A2 describe una construcción antigénica que comprende un fragmento de un péptido antigénico  $A\beta$ , que consiste en una extensión, única o repetitiva de entre 13 y 15 restos de aminoácidos contiguos de la parte N-terminal del péptido  $A\beta$  reconstituido en un liposoma para uso en el

tratamiento de una enfermedad o una condición asociada a amiloide.

El documento WO 2010/106127A2 describe una composición antigénica que comprende un antígeno derivado de una proteína amiloide o una proteína semejante a la amiloide tales como, por ejemplo, beta amiloide, proteína priónica, proteína tau, alfa-sinucleína, huntingtina, que está modificado con un resto lipófilo o hidrófobo que facilita la inserción en la bicapa lipídica de un liposoma para inducir una respuesta inmunitaria independiente de células T tras el tratamiento de una enfermedad, condición o patología en un paciente necesitado de tal respuesta independiente de células T.

Por lo tanto, existe una necesidad de una terapia de prevención que trate de prevenir o retardar el desarrollo de síntomas clínicos asociados con patologías relacionadas con el amiloide en sujetos con síndrome de Down (DS), tales como, particularmente, deterioros o anomalías cognitivas y/o de la memoria.

En particular, existe una necesidad de un tratamiento de los síntomas clínicos asociados con la patología relacionada con el amiloide en sujetos con síndrome de Down (DS), que conduce a una mejoría en las capacidades de aprendizaje en sujetos con síndrome de Down (DS) y/o mejoría o recuperación de la memoria y/o capacidades cognitivas.

Dentro del alcance de la presente invención, se proporcionan medidas y medios que ayudan a satisfacer esta necesidad. En particular, la presente invención proporciona péptidos antigénicos para uso en terapia de prevención y en el tratamiento de deterioros cognitivos semejantes a la AD en sujetos niños y en jóvenes o de mediana edad con síndrome de Down.

La presente invención se define por las reivindicaciones y las siguientes realizaciones:

En una primera realización, la presente invención se refiere a un péptido antigénico derivado de la proteína beta amiloide para uso en el tratamiento y/o alivio y/o prevención de deterioros o anomalías cognitivas de la memoria en sujetos con síndrome de Down, en donde el péptido antigénico consiste en los restos A $\beta$ 1-15 y está modificado por un ácido palmítico unido al extremo N- y/o C-terminal del péptido y está reconstituido en un liposoma y dichos sujetos con síndrome de Down aún no han desarrollado placas asociadas a proteínas amiloides en el cerebro .

En una realización específica, el péptido A $\beta$ 1-15 está modificado con cuatro ácidos palmíticos unidos al extremo N- y/o C-terminal del péptido.

En otra realización específica, el péptido A $\beta$ 1-15 está modificado con dos ácidos palmíticos unidos al extremo N- y/o C-terminal del péptido.

En otras realizaciones diversas, la invención se refiere al péptido antigénico para uso según una cualquiera de las realizaciones 1-3, en donde dicho deterioro o anomalía se refiere a un deterioro de la memoria de reconocimiento, un deterioro de la memoria asociativa contextual, un deterioro del aprendizaje asociativo, un deterioro de la memoria declarativa para hechos y eventos, deterioro de la memoria episódica, una disfunción del lenguaje, un deterioro visuoespacial, una disminución de las funciones ejecutivas, cambios de personalidad, cambios emocionales, apraxia, deterioros en la realización de tareas motoras aprendidas, signos piramidales y extrapiramidales, así como mioclonías o convulsiones, o una combinación de los mismos.

En aún otras realizaciones, la invención se refiere al péptido antigénico para uso según una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde dicho sujeto con síndrome de Down es

(a) un sujeto joven o de mediana edad; o

(b) un sujeto de mediana edad; o

(c) un sujeto joven; o

(d) un sujeto de edad infantil, o,

(e) un sujeto menor de 65 años.

En diversas realizaciones adicionales, la invención se refiere al péptido antigénico para uso según una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde dicho uso

a) conduce a una mejora y/o recuperación de la memoria; y/o

b) conduce a un aumento de la retención o una recuperación completa de la capacidad cognitiva en el sujeto tratado; y/o

c) conduce a mejorar o recuperar la memoria y/o la capacidad cognitiva; y/o

d) no induce efectos secundarios indeseados.

En una realización específica, la invención se refiere al péptido antigénico para uso según una cualquiera de las realizaciones precedentes para la prevención del desarrollo de placas asociadas de A $\beta$  en el cerebro.

- 5 En otra realización, la invención se refiere a una composición que comprende el péptido antigénico como se define en una cualquiera de las realizaciones anteriores en una cantidad terapéuticamente eficaz junto con un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento y/o alivio y/o prevención de deterioros o anomalías cognitivas de la memoria en sujetos con síndrome de Down, en donde dichos sujetos con síndrome de Down aún no han desarrollado placas asociadas a proteínas amiloides en el cerebro.
- 10 En diversas realizaciones específicas, la invención se refiere a la composición para uso según la realización precedente, que comprende un adyuvante, particularmente en donde el adyuvante es el lípido A, particularmente en donde el adyuvante es un lípido A destoxificado, particularmente en donde el adyuvante es un lípido A monofosforilado o difosforilado, alumbre, fosfato cálcico, interleucina 1 y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas.
- 15 En otra realización específica, la presente invención se refiere al péptido antigénico para uso según una cualquiera de las realizaciones precedentes o a la composición para uso según una cualquiera de las realizaciones precedentes, para la prevención de la neurodegeneración en un sujeto con síndrome de Down
- 20 En una realización, la presente invención se refiere al péptido antigénico para uso según una cualquiera de las realizaciones precedentes o a la composición para uso según una cualquiera de las realizaciones precedentes, para inducir una respuesta inmunitaria contra la proteína beta amiloide en un sujeto con Síndrome de Down.
- 25 Se describe en la presente memoria un fragmento de péptido antigénico derivado de la proteína amiloide o la proteína semejante a la amiloide, particularmente un fragmento de péptido antigénico derivado de la proteína beta amiloide, o una composición que comprende dicho péptido antigénico, para uso en el tratamiento y/o alivio y/o prevención de deterioros o anomalías cognitivas de la memoria, particularmente de la memoria semejante a la AD y/o deterioros o anomalías cognitivas, particularmente deterioros y anomalías que se originan en el hipocampo y/o la corteza prefrontal y/o la corteza entorrinal del cerebro, en sujetos jóvenes o de mediana edad con síndrome de Down, en particular en sujetos jóvenes con síndrome de Down, que aún no han desarrollado placas asociadas a proteínas amiloides o proteínas semejantes a las amiloides, particularmente placas asociadas de A $\beta$  en el cerebro.
- 30 Se describe además en la presente memoria un fragmento de péptido antigénico derivado de la proteína amiloide o la proteína semejante a la amiloide, particularmente un fragmento de péptido antigénico derivado de la proteína beta amiloide, o una composición que comprende dicho péptido antigénico, para uso en el tratamiento, y/o alivio y/o prevención de deterioros o anomalías cognitivas de la memoria, particularmente de la memoria semejante a la AD y/o deterioros o anomalías cognitivas, particularmente deterioros y anomalías que se originan en el hipocampo y/o la corteza prefrontal y/o la corteza entorrinal del cerebro, en sujetos de mediana edad con síndrome de Down, en particular en sujetos de mediana edad con síndrome de Down, que aún no han desarrollado placas asociadas a proteínas amiloides o proteínas semejantes a las amiloides, particularmente asociadas de A $\beta$  en el cerebro.
- 35 Se describe además en la presente memoria un fragmento de péptido antigénico derivado de la proteína amiloide o la proteína semejante a la amiloide, particularmente derivado de la proteína beta amiloide, o una composición que comprende dicho péptido antigénico, para uso en el tratamiento, y/o alivio y/o prevención de deterioros o anomalías cognitivas de la memoria, particularmente de la memoria semejante a la AD y/o deterioros o anomalías cognitivas, particularmente deterioros y anomalías que se originan en el hipocampo y/o la corteza prefrontal y/o la corteza entorrinal del cerebro, en sujetos jóvenes con Síndrome de Down, en particular en sujetos jóvenes con síndrome de Down, que aún no han desarrollado placas asociadas a proteínas amiloides o proteínas semejantes a las amiloides, particularmente asociadas de A $\beta$  en el cerebro.
- 40 Se describe además en la presente memoria un fragmento de péptido antigénico derivado de la proteína amiloide o la proteína semejante a la amiloide, particularmente derivado de la proteína beta amiloide, o una composición que comprende dicho péptido antigénico, para uso en el tratamiento, y/o alivio y/o prevención de deterioros o anomalías cognitivas de la memoria, particularmente de la memoria semejante a la AD y/o deterioros o anomalías cognitivas, particularmente deterioros y anomalías que se originan en el hipocampo y/o la corteza prefrontal y/o la corteza entorrinal del cerebro, en niños con síndrome de Down, en particular en sujetos niños con síndrome de Down, que aún no han desarrollado placas asociadas a proteínas amiloides o proteínas semejantes a las amiloides, particularmente asociadas de A $\beta$  en el cerebro.
- 45 Se describe además en la presente memoria un fragmento de péptido antigénico derivado de la proteína amiloide o la proteína semejante a la amiloide, particularmente derivado de la proteína beta amiloide, o una composición que comprende dicho péptido antigénico, para uso en la prevención de la memoria y/o deterioros o anomalías cognitivas, particularmente de la memoria semejante a la AD y/o deterioros o anomalías cognitivas, particularmente deterioros y anomalías que se originan en el hipocampo y/o la corteza prefrontal y/o la corteza entorrinal del cerebro, en sujetos niños y en jóvenes o de mediana edad con síndrome de Down, en particular en sujetos jóvenes con síndrome de Down, que aún no han desarrollado placas asociadas a proteínas amiloides o proteínas semejantes a las amiloides, particularmente asociadas de A $\beta$  en el cerebro.
- 50 En particular, el péptido antigénico se administra a un sujeto con síndrome de Down, particularmente a un sujeto con síndrome de Down que padece de memoria y/o deterioros o anomalías cognitivas, particularmente de la memoria semejante a la AD y/o deterioros o anomalías cognitivas, particularmente deterioros y anomalías que se originan en
- 55

5 el hipocampo y/o la corteza prefrontal y/o la corteza entorrinal del cerebro, en donde dicho sujeto es menor de 60 años, particularmente menor de 55 años, particularmente menor de 50 años, particularmente menor de 45 años, particularmente menor de 40 años, particularmente menor de 35 años, particularmente menor de 30 años, particularmente menor de 25 años, particularmente menor de 20 años, particularmente menor de 15 años, particularmente menor de 10 años, particularmente menor de 5 años, particularmente menor de 3 años;

10 o el péptido antigénico se administra a un sujeto con síndrome de Down, particularmente a un sujeto con síndrome de Down que padece de memoria y/o deterioros o anomalías cognitivas, particularmente de la memoria semejante a la AD y/o deterioros o anomalías cognitivas, particularmente deterioros y anomalías que se originan en el hipocampo y/o la corteza prefrontal y/o la corteza entorrinal del cerebro, en donde dicho sujeto es menor de 35 años, particularmente menor de 30 años, particularmente menor de 25 años, particularmente menor de 20 años, particularmente menor de 15 años;

15 o el péptido antigénico se administra a un sujeto con síndrome de Down, particularmente a un sujeto con síndrome de Down que padece de memoria y/o deterioros o anomalías cognitivas, particularmente de la memoria semejante a la AD y/o deterioros o anomalías cognitivas, particularmente deterioros y anomalías que se originan en el hipocampo y/o la corteza prefrontal y/o la corteza entorrinal del cerebro, en donde dicho sujeto es menor de 15 años, particularmente menor de 10 años, particularmente menor de 5 años, particularmente menor de 3 años;

20 o el péptido antigénico se administra a un sujeto con síndrome de Down, particularmente a un sujeto con síndrome de Down que padece de memoria y/o deterioros o anomalías cognitivas, particularmente de la memoria semejante a la AD y/o deterioros o anomalías cognitivas, particularmente deterioros y anomalías que se originan en el hipocampo y/o la corteza prefrontal y/o la corteza entorrinal del cerebro, en donde dicho sujeto es menor de 10 años, particularmente menor de 5 años, particularmente entre 0 y 10, particularmente entre 1 y 10, particularmente entre 2 y 10, particularmente entre 3 y 10, particularmente entre 4 y 10, particularmente entre 5 y 10.

25 El tratamiento con el péptido antigénico como se describe en la presente memoria previene el desarrollo de placas asociadas de A $\beta$  en el cerebro, particularmente en el hipocampo y/o la corteza prefrontal y/o la corteza entorrinal del cerebro.

30 Se contempla además en la presente memoria utilizar, el fragmento de péptido antigénico derivado de la proteína amiloide o proteína semejante a la amiloide, o una composición que comprende dicho péptido antigénico según la invención y como se describe en la presente memoria, en el tratamiento y/o alivio y/o prevención de deterioros o anomalías cognitivas de la memoria, particularmente de la memoria semejante a la AD y/o deterioros o anomalías cognitivas, particularmente deterioros y anomalías que se originan en el hipocampo y/o la corteza prefrontal y/o la corteza entorrinal del cerebro, en sujetos niños y en jóvenes o de mediana edad con síndrome de Down que ya han desarrollado placas asociadas de A $\beta$  en el cerebro.

35 El tratamiento con el péptido antigénico como el proporcionado en la presente invención reduce la cantidad de placas asociadas de A $\beta$  en el cerebro, particularmente en el hipocampo y/o la corteza prefrontal y/o la corteza entorrinal del cerebro.

40 El grupo de pacientes que se va a tratar con el péptido antigénico o la composición como se describe en la presente memoria puede comprender sujetos jóvenes o de mediana edad con síndrome de Down, particularmente sujetos que son menores de 65 años, particularmente menores de 60, 55 o 50 años. En una realización, los sujetos con una edad de entre 0 y 65 años, particularmente de entre 5 y 55 años, particularmente de entre 10 y 50 años, particularmente entre 15 y 45 años, particularmente de entre 20 y 40 años, particularmente de entre 25 y 35 años, se pueden tratar con el péptido antigénico o la composición según la invención.

45 Para los fines de la presente invención, niños se refiere a sujetos que son menores de 18 años, particularmente sujetos con una edad de entre 0 y 18 años, particularmente de entre 1 y 10, particularmente de entre 2 y 9, particularmente de entre 3 y 9, particularmente de entre 4 y 9, particularmente de entre 5 y 18.

Para los fines de la presente invención, sujetos jóvenes se refiere a sujetos que son menores de 35 años, particularmente sujetos con una edad de entre 0 y 35 años particularmente de entre 1 y 30 años, particularmente de entre 5 y 25 años.

Para los fines de la presente invención, sujetos de mediana edad se refiere a sujetos con una edad de entre 36 y 65 años, particularmente de entre 40 y 60 años, particularmente de entre 45 y 55 años.

50 El tratamiento de un sujeto niño o joven o de mediana edad con síndrome de Down y que padece de memoria y/o deterioros o anomalías cognitivas, particularmente de la memoria semejante a la AD y/o deterioros o anomalías cognitivas, particularmente deterioros y anomalías que se originan en el hipocampo y/o la corteza prefrontal y/o la corteza entorrinal del cerebro, que utilizan el péptido antigénico o la composición como se describe en la presente memoria, conduce a una mejora o recuperación de dichos deterioros o anomalías, particularmente a la mejora de la memoria, particularmente a la mejora o recuperación de la memoria de reconocimiento y/o la memoria asociativa contextual.

En particular, el tratamiento de un sujeto niño o joven o de mediana edad con síndrome de Down y que padece de deterioros o anomalías cognitivas, particularmente de la memoria semejante a la AD y/o deterioros o anomalías cognitivas, que utilizan el péptido antigénico o la composición como se describe en la presente memoria, conduce a un aumento de la retención o una recuperación completa de la capacidad de memoria cognitiva en el sujeto tratado.

5 El tratamiento de los deterioros o anomalías cognitivas semejantes a la AD en sujetos niños y jóvenes o de mediana edad con síndrome de Down con el péptido antigénico, como se describe en la presente memoria, muestra los efectos terapéuticos como se describen en la presente memoria sin inducir efectos secundarios indeseados tales como la meningoencefalitis y la microhemorragia.

10 El sujeto puede ser un sujeto de edad infantil, particularmente un sujeto joven, particularmente un sujeto de mediana edad como se define en la presente memoria, con síndrome de Down y que padece de memoria y/o deterioros o anomalías cognitivas, particularmente de memoria semejante a la AD y/o deterioros o anomalías cognitivas, particularmente deterioros y anomalías que se originan en el hipocampo y/o la corteza prefrontal y/o la corteza entorrinal del cerebro.

15 El tratamiento con el péptido antigénico o la composición como se describe en la presente memoria, previene el desarrollo de placas asociadas de A $\beta$  en el cerebro, particularmente en el hipocampo y/o la corteza prefrontal y/o la corteza entorrinal del cerebro, en sujetos con síndrome de Down, particularmente en el cerebro de sujetos jóvenes o de mediana edad, particularmente en el cerebro de sujetos en edad infantil, particularmente en el cerebro de sujetos jóvenes, particularmente en el cerebro de sujetos de mediana edad, con síndrome de Down.

20 El péptido antigénico como se describe en la presente memoria se puede derivar de una proteína amiloide o proteína semejante a la amiloide seleccionada del grupo que consiste en proteína priónica, proteína tau, alfa-sinucleína, huntingtina y  $\beta$ -amiloide o una combinación de uno o más de los péptidos anteriores. .

25 Dicho fragmento de péptido antigénico A $\beta$  puede corresponder a la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , particularmente a la parte N-terminal que comprende al menos 5, particularmente al menos 6, particularmente al menos 7, particularmente al menos 8, particularmente al menos 9, particularmente al menos 10, particularmente al menos 11, particularmente al menos 12, particularmente al menos 13, particularmente al menos 14, particularmente todos los restos de aminoácidos del fragmento A $\beta$ 1-15.

30 El fragmento de péptido antigénico A $\beta$  puede corresponder a la parte N-terminal del péptido A $\beta$  que comprende al menos 5, particularmente al menos 6, particularmente al menos 7, particularmente al menos 8, particularmente al menos 9, particularmente al menos 10, particularmente al menos 11, particularmente al menos 12, particularmente al menos 13, particularmente al menos 14, particularmente al menos 15, particularmente todos los restos de aminoácidos del fragmento A $\beta$ 1-16, el fragmento A $\beta$ 1-17, el fragmento A $\beta$ 1-18, el fragmento A $\beta$ 1-19, el fragmento A $\beta$ 1-20, el fragmento A $\beta$ 1-22, el fragmento A $\beta$ 1-23, el fragmento A $\beta$ 1-24, el fragmento A $\beta$ 1-25 o el fragmento A $\beta$ 1-26, o el fragmento A $\beta$ 3-15.

35 En la alternativa, el fragmento de péptido antigénico A $\beta$  puede corresponder a la parte C-terminal del péptido A $\beta$  que comprende al menos 5, particularmente al menos 6, particularmente al menos 7, particularmente al menos 8, particularmente al menos 9, particularmente al menos 10 , particularmente al menos 11, particularmente al menos 12, particularmente al menos 13, particularmente al menos 14, particularmente al menos 15, particularmente todos los restos de aminoácidos del fragmento A $\beta$ 20-40 o A $\beta$ 20-42, el fragmento A $\beta$ 21-40 o A $\beta$ 21-42, el fragmento A $\beta$ 22-40 o A $\beta$ 22-42, el fragmento A $\beta$ 23-40 o A $\beta$ 23-42, el fragmento A $\beta$ 24-40 o A $\beta$ 24-42, el fragmento A $\beta$ 25-40 o A $\beta$ 25-42, el fragmento A $\beta$ 26-46 o A $\beta$ 27-42, o el fragmento A $\beta$ 27-40 o A $\beta$ 27-42, o el A $\beta$ 29-40.

40 En la alternativa, el fragmento de péptido antigénico A $\beta$  puede corresponder a la parte media del péptido A $\beta$  que comprende al menos 5, particularmente al menos 6, particularmente al menos 7, particularmente al menos 8, particularmente al menos 9, particularmente al menos 10, particularmente al menos 11, particularmente al menos 12, particularmente al menos 13, particularmente al menos 14, particularmente al menos 15, particularmente todos los restos de aminoácidos del fragmento A $\beta$ 15-35, particularmente el fragmento A $\beta$ 20-35.

45 En particular, el fragmento de péptido antigénico A $\beta$  puede corresponder a la parte central del péptido A $\beta$ , particularmente el fragmento A $\beta$ 14-29; o

el fragmento de péptido antigénico A $\beta$  puede corresponder a la parte C-terminal del péptido A $\beta$ , particularmente el fragmento del extremo C-terminal A $\beta$ 22-35.

50 En la alternativa, se puede utilizar el fragmento de longitud completa A $\beta$ 1-39, A $\beta$ 1-40, o A $\beta$ 1-42.

El fragmento de péptido antigénico A $\beta$  como se describe en la presente memoria puede contener uno o más restos de aminoácidos modificados o no naturales.

55 También se contempla en la presente memoria el uso de fragmentos de péptidos antigénicos A $\beta$ , que no son fragmentos que consisten en una extensión única o repetitiva de entre 13 y 15 restos de aminoácidos contiguos de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , particularmente no son fragmentos, en donde dicha extensión contigua de 13 a 15

restos de aminoácidos se obtiene del fragmento del extremo N-terminal 1-16 o 1-17 del péptido A $\beta$ , particularmente de la parte N-terminal del péptido A $\beta$  seleccionado del grupo que consiste en los restos 1-15, 1-14, y 1-13, que consiste particularmente en un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-15</sub> como indica la secuencia SEQ ID NO:1 y A $\beta$ <sub>1-16</sub> ( $\Delta$ 14) como se da en la secuencia SEQ ID NO:3 descrita en el documento WO 2007/068411.

5 El péptido antigénico como se describe en la presente memoria se puede presentar reconstituido en un vehículo tal como, por ejemplo, una vesícula, un cuerpo en partículas o una molécula, pero particularmente reconstituido en un liposoma.

En particular, el péptido antigénico como se describe en la presente memoria se puede presentar en un conjunto ordenado único o repetitivo en la superficie del vehículo o liposoma.

10 Dicho conjunto ordenado altamente repetitivo en la superficie del vehículo o liposoma puede comprender al menos 10 unidades antigénicas repetitivas/molécula de vehículo, particularmente al menos 50 unidades antigénicas repetitivas/molécula de vehículo, particularmente al menos 100 unidades antigénicas repetitivas/molécula de vehículo, particularmente al menos 200 unidades antigénicas repetitivas/molécula de vehículo, particularmente al menos 300 unidades antigénicas repetitivas/molécula de vehículo; particularmente al menos 400 unidades antigénicas repetitivas/molécula de vehículo, particularmente al menos 500 unidades antigénicas repetitivas/molécula de vehículo.

15 La composición antigénica como se describe en la presente memoria puede comprender un antígeno conformacional, particularmente un antígeno A $\beta$  como se describe en la presente memoria, en donde más del 30%, particularmente más del 40%, particularmente más del 50%, particularmente más del 60%, particularmente más del 70%, particularmente más del 80%, particularmente más del 90%, particularmente más del 95% y hasta el 100% está en una conformación de lámina beta.

20 En particular, la composición puede comprender el péptido antigénico como se describe en la presente memoria en una cantidad terapéuticamente eficaz junto con un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento, y/o alivio y/o prevención de deterioros o anomalías de la memoria en sujetos con Síndrome de Down.

25 En la alternativa, la composición puede comprender el péptido antigénico de la invención como se describe en la presente memoria en una cantidad terapéuticamente eficaz junto con un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento, y/o alivio y/o prevención de los deterioros o anomalías cognitivas en sujetos con síndrome de Down.

En particular, dicha memoria y/o deterioro cognitivo se originan en el hipocampo y/o la corteza prefrontal y/o la corteza entorrinal del cerebro.

30 La composición que comprende el péptido antigénico como se describe en la presente memoria en una cantidad terapéuticamente eficaz junto con un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable se puede utilizar en el tratamiento y/o alivio y/o prevención de deterioros de la memoria de reconocimiento y/o deterioros de la memoria asociativa contextual y/o deterioros del aprendizaje asociativo y/o deterioros de la memoria declarativa para hechos y eventos y/o deterioros de la memoria episódica y/o disfunción del lenguaje tal como afasia y/o deterioros visuoespaciales, tal como la mala colocación de los artículos y la dificultad para navegar en terreno desconocido y familiar y/o disminución de las funciones ejecutivas, tal como apatía, desinhibición, aislamiento social, falta de juicio, dificultades con la planificación y/o pobre razonamiento abstracto y/o cambios de personalidad y/o cambios emocionales tal como apatía, agitación y psicosis y/o apraxia y/o deterioros en la realización de tareas motoras aprendidas y/u otros signos neurológicos que incluyen signos piramidales y extrapiramidales, así como mioclonías o convulsiones.

40 En particular, dicho deterioro o anomalía se refiere a la memoria de reconocimiento.

Dicho péptido antigénico para uso en mejorar o recuperar la memoria de reconocimiento en sujetos con síndrome de Down se puede derivar de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , particularmente dicho péptido antigénico consiste en todos o parte de los restos de aminoácidos A $\beta$ <sub>1-15</sub>, A $\beta$ <sub>1-16</sub>, A $\beta$ <sub>1-17</sub>, A $\beta$ <sub>1-18</sub>, A $\beta$ <sub>1-19</sub>, A $\beta$ <sub>1-20</sub>, A $\beta$ <sub>1-22</sub>, o A $\beta$ <sub>1-23</sub>.

45 En particular, dicho péptido antigénico consiste en restos de aminoácidos A $\beta$ <sub>1-15</sub>.

En la alternativa, dicho péptido antigénico para uso en mejorar o recuperar la memoria de reconocimiento en sujetos con síndrome de Down se puede derivar de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , particularmente dicho péptido antigénico consiste en todos o parte de los restos de aminoácidos.

En particular, dicho deterioro o anomalía se refiere a la memoria asociativa contextual.

50 En particular, dicho péptido antigénico para uso en mejorar o recuperar la memoria asociativa contextual en sujetos con síndrome de Down se puede derivar de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , particularmente dicho péptido antigénico consiste en todos o parte de los restos de aminoácidos A $\beta$ <sub>1-15</sub>, A $\beta$ <sub>1-16</sub>, A $\beta$ <sub>1-17</sub>, A $\beta$ <sub>1-18</sub>, A $\beta$ <sub>1-19</sub>, A $\beta$ <sub>1-20</sub>, A $\beta$ <sub>1-22</sub>, o A $\beta$ <sub>1-23</sub>.

En particular, dicho péptido antigénico consiste en restos de aminoácidos A $\beta$ <sub>1-15</sub>.

En particular, dicho deterioro o anomalía se refiere al aprendizaje asociativo.

Dicho péptido antigénico para uso en mejorar o recuperar el aprendizaje asociativo en sujetos con síndrome de Down se puede derivar de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , particularmente dicho péptido antigénico consiste en todos o parte de los restos de aminoácidos A $\beta$ 1-15, A $\beta$ 1-16, A $\beta$ 1-17, A $\beta$ 1-18, A $\beta$ 1-19, A $\beta$ 1-20, A $\beta$ 1-22, o A $\beta$ 1-23.

5 En particular, dicho péptido antigénico consiste en restos de aminoácidos A $\beta$ 1-15.

En otra alternativa, dicho péptido antigénico para uso en mejorar o recuperar el aprendizaje asociativo en sujetos con síndrome de Down se puede derivar de la parte C-terminal del péptido A $\beta$ , particularmente dicho péptido antigénico consiste en todos o parte de los restos de aminoácidos A $\beta$ 20-36, A $\beta$ 20-40, A $\beta$ 20-42, A $\beta$ 21-36, A $\beta$ 21-40, A $\beta$ 21-42, A $\beta$ 22-36, A $\beta$ 22-40 o A $\beta$ 22-42.

10 En particular, dicho péptido antigénico consiste en restos de aminoácidos A $\beta$ 22-35.

La formación y estabilización de la conformación deseada del péptido antigénico se puede conseguir presentando el péptido antigénico unido a, o incorporado o reconstituido, parcial o totalmente, en un vehículo tal como, por ejemplo, una vesícula, un cuerpo en partículas o molécula o cualquier otro medio que pueda servir adecuadamente como vehículo/adyuvante para el péptido antigénico. En particular,

15 el péptido antigénico se puede unir a, o incorporarse o reconstituirse en el vehículo a través de interacciones débiles tales como, por ejemplo, las interacciones de Van der Waals, interacción hidrófoba o electrostática, o una combinación de dos o más de dichas interacciones, de manera que el péptido se presente en la superficie del vehículo con una conformación específica, que se mantiene y estabiliza restringiendo dicho péptido antigénico en su libertad de movimiento tridimensional, de modo que se evitan o restringen severamente los cambios conformacionales.

20 Cuando se utiliza una vesícula, una partícula o un cuerpo en partículas como un vehículo/adyuvante tal como, por ejemplo, un liposoma, la composición del péptido antigénico se puede elegir de manera que su carga neta total sea idéntica a la de la superficie del vehículo/adyuvante al cual está unido el péptido. Siendo las fuerzas de repulsión electrostáticas efectivas entre la superficie del vehículo/adyuvante cargado idéntica y el péptido antigénico, pero particularmente la superficie del vehículo con carga idénticamente y los restos de aminoácidos que constituyen el péptido antigénico y más particularmente la superficie del vehículo cargado idénticamente y los restos de aminoácidos cargados idénticamente comprendidos en el péptido antigénico, puede conducir a que el péptido antigénico tome una conformación definida, altamente específica y estabilizada que garantiza una alta actividad biológica. Como resultado, el péptido antigénico es expuesto y presentado en una conformación que es altamente biológicamente activa, ya que permite que el sistema inmune del organismo objetivo interactúe libremente con los determinantes antigénicos contenidos en la construcción antigénica en la conformación biológicamente activa, que conduce a una respuesta inmunitaria fuerte y específica de la conformación, que da como resultado, por ejemplo, en un alto título de anticuerpos en el organismo objetivo.

La respuesta inmunogénica puede ser aumentada adicionalmente utilizando un liposoma como un vehículo, liposoma que puede funcionar como un adyuvante para aumentar o estimular la respuesta inmunitaria en el animal o ser humano objetivo que va a ser tratado con la vacuna terapéutica según la invención. Opcionalmente, el liposoma puede contener, además, un adyuvante adicional tal como, por ejemplo, lípido A, alumbre, fosfato de calcio, interleucina 1 y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas, pero particularmente un lípido A destoxificado, tal como un lípido A monofosforilado o difosforilado, o cualquier otro adyuvante que se pueda utilizar adecuadamente dentro del alcance de la presente invención, tal como, por ejemplo, alumbre, fosfato de calcio, interleucina 1 y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas, LPS, CpG ODN, Pam2CSK4, Pam3CSK4, dsRNA, ssRNA, muramil dipéptido, Quil Q, QS-21.

Los liposomas que se pueden utilizar en las composiciones descritas en la presente memoria incluyen aquellas conocidas por los expertos en la técnica. Se puede utilizar cualquiera de los lípidos estándar útiles para preparar liposomas. Se pueden utilizar liposomas bicapa y multicapa estándar para preparar composiciones como se describe en la presente memoria. Si bien se puede utilizar cualquier método para preparar liposomas conocido por un experto en la técnica, los liposomas que más se prefieren están preparados de acuerdo con el método de Alving et al., Infect. Immun. 60: 2438-2444, 1992, (Lauer et al. 1992) El liposoma puede tener una función dual por cuanto puede ser usado como un vehículo que comprende la construcción supramolecular como se describe anteriormente en la presente memoria y, al mismo tiempo, funciona como un adyuvante para aumentar o estimular la respuesta inmunitaria en el animal o ser humano objetivo que va a ser tratado con la vacuna terapéutica descrita en la presente memoria.

50 Opcionalmente, el liposoma puede contener, además, un adyuvante adicional o un inmunomodulador o ambos, tal como, por ejemplo, lípido A, alumbre, fosfato de calcio, interleucina 1 y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas, pero particularmente un lípido A, más particularmente un lípido A destoxificado, tal como lípido A monofosforilado o difosforilado, o alumbre.

55 El liposoma puede estar compuesto de constituyentes seleccionados del grupo que consiste en dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPEA), dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) y colesterol.

Se contempla además en la presente memoria utilizar como una sustitución para los lípidos catiónicos en la membrana liposomal, lípidos aniónicos seleccionados del grupo que consiste en:

a. diacil-fosfolípidos con grupos de cabeza fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, L- $\alpha$ -fosfatidilinositol-4-fosfato o ácido fosfatídico;

5 b. liso-fosfolípidos con grupos de cabeza fosfatidilglicerol, fosfatidilserina o ácido fosfatídico, y

c. cardiolipina, diliso-cardiolipina, monoliso-cardiolipina.

En un aspecto, se contempla utilizar como una sustitución para los lípidos aniónicos en la membrana liposomal, los lípidos catiónicos seleccionados del grupo que consiste en:

10 a. diacil-fosfolípidos con grupos de cabeza 3-trimetilamonio-propano, 3-dimetilamonio-propano, 3-etilfosfocolina o 3-fosfatidiletanolamina; y

b. D-eritro-esfingosina, bromuro de dimetildioctadecilamonio, bromuro de N-[1-(2,3-dimiristiloxi)propil]-N,N-dimetil-N-(2-hidroxietil) amonio, 1-propanamio N,N,N-trimetil-2bis[(1-oxo-9-octedecenil)oxi]-(Z,Z) metil sulfato o 3 $\beta$ -[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil] hidrocloreto de colesterol.

En particular, las cadenas lipídicas unidas a los grupos de cabeza anteriores pueden

15 a. ser saturadas o insaturadas,

b. variar en longitud desde (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> en donde n está entre 3 y 24, y

estar sustituidas simétrica o asimétricamente.

20 La composición antigénica como se describe en la presente memoria puede comprender una preparación de liposomas y un adyuvante, particularmente lípido A, alumbre, fosfato de calcio, interleucina 1 y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas, pero particularmente un lípido A, más particularmente un lípido A destoxificado, tal como, lípido A monofosforilado o difosforilado, o alumbre.

La composición liposomal descrita en la presente memoria que comprende un péptido A $\beta$  unido con restos lipófilos incrustados en liposomas como se describe en la presente memoria se puede preparar según la metodología descrita en la presente memoria.

25 Cuando se utilizan liposomas como vehículo/adyuvante, el péptido antigénico como se describe en la presente memoria se puede modificar además por acoplamiento a un resto lipófilo o hidrófobo que facilita la inserción en la bicapa lipídica del vehículo de liposoma/adyuvante. Dicho resto hidrófobo puede ser un ácido graso, un triglicérido, un diglicérido, un esteroide, un esfingolípido, un glicolípido o un fosfolípido.

30 En particular, el resto lipófilo o hidrófobo puede ser un grupo alquilo o un ácido graso con una cadena principal de carbono de al menos 1 átomo de carbono, particularmente de al menos 2 átomos de carbono, particularmente de al menos 3 átomos de carbono, particularmente de al menos 4 carbonos átomos, particularmente de al menos 6 átomos de carbono, particularmente de al menos 8 átomos de carbono, particularmente de al menos 12 átomos de carbono, particularmente de al menos 16 átomos de carbono.

35 Los restos lipófilos o hidrófobos pueden ser ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos, en donde la cadena principal de carbono del ácido graso tiene al menos 4 átomos de carbono, particularmente los restos lipófilos que tienen ácidos grasos con una cadena principal de carbono de al menos aproximadamente 14 átomos de carbono y hasta aproximadamente 24 átomos de carbonos, más particularmente restos hidrófobos que tienen una cadena principal de carbono de al menos 14 átomos de carbono. Ejemplos de restos hidrófobos incluyen, pero no se limitan a, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linoléico y colesterol o DSPE. Particularmente, el resto hidrófobo es ácido palmítico.

40 En particular, la composición antigénica como se describe en la presente memoria comprende un antígeno de péptido que comprende dos restos de ácido palmítico, particularmente cuatro restos de ácido palmítico.

45 La palmitoilación, mientras proporciona un anclaje para el péptido en la bicapa del liposoma, debido a la longitud relativa reducida del resto de ácido graso C<sub>16:0</sub> conduce a que el péptido sea presentado, expuesto en, o en estrecha proximidad a la superficie del liposoma. Por lo tanto, las células que procesan el antígeno tendrán que tomar todo el liposoma con el péptido.

50 Las construcciones antigénicas de la presente invención pueden comprender péptidos modificados mediante pegilación (utilizando polietilenglicol (PEG) o polietilenglicol modificado), o modificado a través de otros métodos tales como por ácido palmítico, como se describe anteriormente en la presente memoria, poliaminoácidos (p. ej., poliglicina, polihistidina), polisacáridos (p. ej., ácido poligalacturónico, ácido poliláctico, poliglicolido, quitina, quitosano), polímeros sintéticos (poliamidas, poliuretanos, poliésteres) o copolímeros (p. ej. poli(ácido metacrílico) y N-(2-hidroxi) propil

metacrilamida ) y similares.

Si se utiliza PEG en la preparación de la construcción antigénica, el terminal libre de PEG se puede unir covalentemente a una molécula de fosfatidiletanolamina (donde el ácido graso puede ser: mirístico, palmítico, esteárico, oleico, etc. o una combinación de los mismos). Esta estructura supramolecular se puede reconstituir en liposomas que consisten en fosfolípidos y colesterol (fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, colesterol en diversas relaciones molares). Se pueden utilizar otros fosfolípidos. El lípido A se puede utilizar a una concentración de aproximadamente 40 µg/pmol de fosfolípidos. En particular, las construcciones antigénicas descritas en la presente memoria pueden comprender una secuencia peptídica antigénica como se describe anteriormente en la presente memoria, unidas covalentemente a lisina pegilada al menos una en cada terminal, pero particularmente 1 o 2 en cada terminal. La longitud de la cadena de PEG (polietilenglicol) puede variar desde n=8 a n=150000 o más, particularmente desde n=10 a n=80000, más particularmente desde n=10 a n=10000. En una realización específica de la invención, la longitud de la cadena de PEG no es mayor que n=45, particularmente entre n=5 y n=40, más particularmente entre n=10 y n=30, y aún más particularmente n=10.

En particular, el antígeno del péptido Aβ está modificado con dos ácidos palmíticos unidos a los extremos N- y/o C-terminal de la molécula peptídica.

También se contempla en la presente memoria la post-inserción de diferentes tipos de péptidos (p. ej., antígenos) y/o tipos de adyuvantes en la capa externa de liposomas preformados en diferentes concentraciones como se describe en la solicitud EP2632434. Este método de post-inserción comprende la pre-formación de liposomas en disolución y la modificación de péptidos antigénicos a través de restos hidrófobos, de manera que el péptido antigénico modificado está disponible en una forma micelar. El método comprende además la liberación de los péptidos antigénicos de las micelas induciendo a la descomposición micelar seguida por la integración en el liposoma preformado. Este procedimiento de integración es impulsado por las interacciones hidrófobas del antígeno modificado y/o el adyuvante con la bicapa (fosfo)lipídica de los liposomas. En particular, la solubilización del péptido antigénico modificado y/o adyuvante en la capa externa de los liposomas se logra sin la ayuda de ninguna reacción química o modificación adicional de la molécula, diluyendo el péptido antigénico solubilizado o adyuvante (presentado inicialmente en forma micelar), por debajo de la concentración micelar crítica del tensioactivo. La forma libre del péptido antigénico o adyuvante se integra después en la capa externa de los liposomas debido a la solubilización de sus dominios hidrófobos en el resto acilo de los fosfolípidos. Por lo tanto, el método proporciona una cantidad de "liposomas vacíos" que están disponibles para cargarlos según las necesidades respectivas.

En particular, este método de post-inserción para preparar una construcción antigénica basada en liposomas que comprende un péptido antigénico de la invención y como se describe en la presente memoria modificado a través de restos hidrófobos reconstituidos en un liposoma, comprende las etapas de i) preparar liposomas en disolución; ii) preparar un péptido antigénico modificado añadiendo a los extremos N- y/o C-terminal de la molécula peptídica al menos un resto hidrófobo; iii) solubilizar el péptido antigénico modificado en presencia de un tensioactivo; iv) diluir el péptido solubilizado y, opcionalmente, un adyuvante por debajo de la concentración micelar crítica (CMC) del tensioactivo; y v) cargar los liposomas preformados con el péptido antigénico solubilizado diluido y, opcionalmente, el adyuvante, añadiendo dicho péptido antigénico y, opcionalmente, dicho adyuvante a la preparación liposomal preformada y solubilizar el péptido añadido y, opcionalmente, el adyuvante añadido en la capa externa de los liposomas, particularmente sin la ayuda de ninguna reacción química o modificación adicional de la molécula.

Como se emplea en esta memoria, el término "concentración micelar crítica", también conocido como CMC, se define como la concentración de tensioactivos por encima de la cual se forman micelas espontáneamente. Tras la introducción de tensioactivos (o cualesquiera materiales de superficie activa) en un sistema, los tensioactivos se repartirán inicialmente en la interfaz, reduciendo así la energía libre del sistema a) reduciendo la energía de la interfaz (calculada como área x tensión superficial) y b) eliminando las partes hidrófobas del tensioactivo del contacto con el agua. Posteriormente, cuando el recubrimiento superficial por los tensioactivos aumenta y la energía libre de la superficie (tensión superficial) disminuye y los tensioactivos comienzan a agregarse en micelas, disminuye así de nuevo la energía libre del sistema disminuyendo el área de contacto de las partes hidrófobas del tensioactivo con el agua. Al alcanzar la CMC, cualquier adición adicional de tensioactivos solo aumentará el número de micelas. (IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997)).

Ventajosamente, este método conduce a altos rendimientos de la incorporación del péptido y/o adyuvante con una visualización molecular única en el liposoma frente a la capa externa de la bicapa del liposoma. En particular, al menos 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y hasta el 100% del péptido antigénico reconstituido está presente en la superficie del liposoma, insertado en la bicapa lipídica a través de sus restos hidrófobos.

El método da como resultado además preparaciones de liposomas que muestran una distribución de tamaño homogénea con un índice de polidispersidad en el intervalo de entre 0,4 y 0,6, particularmente de 0,45 a 0,55, particularmente de 0,5. Además, el método y las construcciones permiten una alta biodisponibilidad del péptido y/o adyuvante para el sistema inmune y, como consecuencia, una respuesta inmunitaria mejorada. La degradación del adyuvante, p. ej., la degradación de MPLA se minimiza o no se presenta en absoluto y, por lo tanto, se proporciona una reproducibilidad de lote aumentada. Las construcciones preparadas por el método anterior son estables, capaces

de filtración estéril y no inducen respuestas inmunitarias laterales.

5 Por consiguiente, se describe además en la presente memoria una construcción antigénica que comprende un péptido antigénico descrito en la presente memoria para uso como se describe en la presente memoria reconstituido en un liposoma, en donde al menos el 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82 %, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y hasta el 100% del péptido antigénico reconstituido está presente en la superficie del liposoma, insertado en la bicapa lipídica a través de sus restos hidrófobos.

En particular, se describe una preparación liposomal que comprende dicha construcción antigénica, cuya preparación muestra una distribución de tamaño homogénea con un índice de polidispersidad en el intervalo de entre 0,4 y 0,6, particularmente de 0,45 a 0,55, particularmente de 0,5.

10 El péptido antigénico se puede presentar en la superficie de la molécula vehículo en un conjunto ordenado altamente repetitivo, particularmente un conjunto ordenado repetitivo que comprende al menos 10 unidades antigénicas repetitivas/molécula vehículo, particularmente al menos 50 unidades antigénicas repetitivas/molécula vehículo, particularmente al menos 100 unidades antigénicas repetitivas/molécula vehículo, particularmente al menos 200 unidades antigénicas repetitivas/molécula vehículo, particularmente al menos 300 unidades antigénicas repetitivas/molécula vehículo; particularmente al menos 400 unidades antigénicas repetitivas/molécula vehículo, particularmente al menos 500 unidades antigénicas repetitivas/molécula vehículo.

15 Además, se puede utilizar en los métodos un anticuerpo, como se describe en la presente memoria, para el tratamiento y/o alivio y/o prevención de deterioros o anomalías cognitivas de la memoria, particularmente de la memoria semejante a la AD y/o deterioros o anomalías cognitivas, particularmente deterioros de memoria y/o cognitivos que se originan en el hipocampo y/o la corteza prefrontal y/o la corteza entorrinal del cerebro, particularmente deterioros de la memoria de reconocimiento y/o deterioros de la memoria asociativa contextual y/o deterioros del aprendizaje asociativo y/o deterioros de la memoria declarativa para hechos y eventos y/o deterioros de la memoria episódica y/o disfunción del lenguaje, tal como afasia y/o deterioros visuoespaciales, tal como la mala colocación de los artículos y la dificultad para navegar en un terreno desconocido y familiar y/o disminución de las funciones ejecutivas, tal como apatía, desinhibición, aislamiento social, falta de juicio, dificultades con la planificación y/o pobre razonamiento abstracto y/o cambios de personalidad y/o cambios emocionales tal como apatía, agitación y psicosis y/o apraxia y/o deterioros en la realización de tareas motoras aprendidas y/u otros signos neurológicos, que incluyen signos piramidales y extrapiramidales, así como mioclonías o convulsiones, en sujetos niños y jóvenes o de mediana edad con síndrome de Down, cuyo anticuerpo ha sido generado en respuesta a una cualquiera de las construcciones antigénicas descritas en la presente memoria. Este anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo completamente humano, un diacuerpo, un anticuerpo camélido o un fragmento funcional de cualquiera de los anticuerpos anteriores, cuyo fragmento tiene sustancialmente la misma actividad biológica en términos de tratamiento de memoria y/o deterioros o anomalías cognitivas como el anticuerpo del que se deriva dicho fragmento.

20 Además, se puede utilizar en los métodos un anticuerpo, como se describe en la presente memoria, para el tratamiento y/o alivio y/o prevención de deterioros o anomalías cognitivas de la memoria, particularmente de la memoria semejante a la AD y/o deterioros o anomalías cognitivas, particularmente deterioros de memoria y/o cognitivos que se originan en el hipocampo y/o la corteza prefrontal y/o la corteza entorrinal del cerebro, particularmente deterioros de la memoria de reconocimiento y/o deterioros de la memoria asociativa contextual y/o deterioros del aprendizaje asociativo y/o deterioros de la memoria declarativa para hechos y eventos y/o deterioros de la memoria episódica y/o disfunción del lenguaje, tal como afasia y/o deterioros visuoespaciales, tal como la mala colocación de los artículos y la dificultad para navegar en un terreno desconocido y familiar y/o disminución de las funciones ejecutivas, tal como apatía, desinhibición, aislamiento social, falta de juicio, dificultades con la planificación y/o pobre razonamiento abstracto y/o cambios de personalidad y/o cambios emocionales tal como apatía, agitación y psicosis y/o apraxia y/o deterioros en la realización de tareas motoras aprendidas y/u otros signos neurológicos, que incluyen signos piramidales y extrapiramidales, así como mioclonías o convulsiones, en niños con síndrome de Down, cuyo anticuerpo ha sido generado en respuesta a una cualquiera de las construcciones antigénicas descritas en la presente memoria. Este anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo completamente humano, un diacuerpo, un anticuerpo camélido o un fragmento funcional de cualquiera de los anticuerpos anteriores, cuyo fragmento tiene sustancialmente la misma actividad biológica en términos de tratamiento de memoria y/o deterioros o anomalías cognitivas como el anticuerpo del que se deriva dicho fragmento.

25 En la alternativa, se puede utilizar en los métodos un anticuerpo, como se describe en la presente memoria, para el tratamiento, y/o alivio y/o prevención de deterioros o anomalías cognitivas de la memoria, particularmente de la memoria semejante a la AD y/o deterioros o anomalías cognitivas, particularmente deterioros de memoria y/o cognitivos que se originan en el hipocampo del cerebro, particularmente deterioros de la memoria de reconocimiento y/o deterioros de la memoria asociativa contextual y/o deterioros del aprendizaje asociativo y/o deterioros de la memoria declarativa para hechos y eventos y/o deterioros de la memoria episódica y/o disfunción del lenguaje, tal como afasia y/o deterioros visuoespaciales, tal como la mala colocación de los artículos y la dificultad para navegar en un terreno desconocido y familiar y/o disminución de las funciones ejecutivas, tal como apatía, desinhibición, aislamiento social, falta de juicio, dificultades con la planificación y/o pobre razonamiento abstracto y/o cambios de personalidad y/o cambios emocionales tales como apatía, agitación y psicosis y/o apraxia y/o deterioros en la

- realización de tareas motoras aprendidas y/u otros signos neurológicos que incluyen signos piramidales y extrapiramidales, así como mioclonías o convulsiones, en sujetos niños con síndrome de Down, cuyo anticuerpo ha sido generado en respuesta a una cualquiera de las construcciones antigénicas descritas en la presente memoria. Este anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo completamente humano, un diacuerpo, un anticuerpo camélido o un fragmento funcional de cualquiera de los anticuerpos anteriores, cuyo fragmento tiene sustancialmente la misma actividad biológica en términos de tratamiento de memoria y/o deterioros o anomalías cognitivas como el anticuerpo del que se deriva dicho fragmento.
- 5
- En particular, el fragmento de péptido antigénico derivado de la proteína amiloide o proteína semejante a la amiloide se puede utilizar en un método como se describe en la presente memoria para el tratamiento y/o alivio y/o prevención de deterioros cognitivos de la memoria que se originan en el hipocampo y/o la corteza prefrontal y/o la corteza entorrinal del cerebro.
- 10
- Se describe además en la presente memoria un método para tratar y/o aliviar y/o prevenir deterioros o anomalías de la memoria en un sujeto con síndrome de Down que comprende administrar a dicho sujeto un péptido antigénico o una composición como se describe en la presente memoria.
- 15
- Se describe también un método para tratar y/o aliviar y/o prevenir deterioros o anomalías cognitivas en un sujeto con síndrome de Down que comprende administrar a dicho sujeto un péptido antigénico o una composición como se describe en la presente memoria.
- En particular, dicho deterioro o anomalía se refiere a la memoria de reconocimiento.
- 20
- En particular, dicho péptido antigénico para uso en un método para mejorar o recuperar la memoria de reconocimiento en sujetos con síndrome de Down se deriva de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , particularmente dicho péptido antigénico consiste en todos o parte de los restos de aminoácidos A $\beta$ 1-15, A $\beta$ 1-16, A $\beta$ 1-17, A $\beta$ 1-18, A $\beta$ 1-19, A $\beta$ 1-20, A $\beta$ 1-22 o A $\beta$ 1-23.
- En particular, dicho péptido antigénico consiste en restos de aminoácidos A $\beta$ 1-15.
- 25
- Dicho péptido antigénico para uso en un método para mejorar o recuperar la memoria de reconocimiento en sujetos con síndrome de Down se puede derivar de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , particularmente dicho péptido antigénico consiste en todos o parte de los restos de aminoácidos.
- En particular, dicho deterioro o anomalía se refiere a la memoria asociativa contextual.
- 30
- En la alternativa, dicho péptido antigénico para uso en un método para mejorar o recuperar la memoria asociativa contextual en sujetos con síndrome de Down se puede derivar de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , particularmente dicho péptido antigénico consiste en todos o parte de los restos de aminoácidos A $\beta$ 1-15, A $\beta$ 1-16, A $\beta$ 1-17, A $\beta$ 1-18, A $\beta$ 1-19, A $\beta$ 1-20, A $\beta$ 1-22, o A $\beta$ 1-23.
- En particular, dicho péptido antigénico consiste en restos de aminoácidos A $\beta$ 1-15.
- En particular, dicho deterioro o anomalía se refiere al aprendizaje asociativo.
- 35
- Dicho péptido antigénico para uso en un método para mejorar o recuperar el aprendizaje asociativo en sujetos con síndrome de Down se puede derivar de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , particularmente dicho péptido antigénico consiste en todos o parte de los restos de aminoácidos A $\beta$ 1-15, A $\beta$ 1-16, A $\beta$ 1-17, A $\beta$ 1-18, A $\beta$ 1-19, A $\beta$ 1-20, A $\beta$ 1-22, o A $\beta$ 1-23.
- 40
- Se describe además en la presente memoria un agente activo, que es un agente de inmunoterapia. Los ejemplos no limitantes de agentes de inmunoterapia incluyen agentes inflamatorios, factores biológicos, proteínas reguladoras inmunitarias, anticuerpos humanos y humanizados y fármacos de inmunoterapia, tal como AZT y otros nucleótidos derivados o modificados. Las moléculas pequeñas también se pueden emplear como agentes en la presente invención.
- En particular, dicho péptido antigénico consiste en restos de aminoácidos A $\beta$ 1-15.
- 45
- Se describe además en la presente memoria un péptido antigénico para uso en un método para mejorar o recuperar el aprendizaje asociativo en sujetos con síndrome de Down derivado de la parte C-terminal del péptido A $\beta$ , particularmente dicho péptido antigénico consiste en todos o parte de los restos de aminoácidos A $\beta$ 20-36, A $\beta$ 20-40, A $\beta$ 20-42, A $\beta$ 21-36, A $\beta$ 21-40, A $\beta$ 21-42, A $\beta$ 22-36, A $\beta$ 22-40 o A $\beta$ 22-42.
- En particular, dicho péptido antigénico consiste en los restos de aminoácidos A $\beta$ 22-35.
- 50
- Los péptidos antigénicos que son particularmente útiles para mejorar y/o recuperar el aprendizaje asociativo en sujetos con síndrome de Down tal como, por ejemplo, un péptido antigénico que consiste en los restos de aminoácidos A $\beta$ 22-35, se puede combinar con uno o más compuestos biológicamente activos, que tienen un efecto positivo en la memoria de reconocimiento y/o la memoria asociativa contextual.

En particular, dicho sujeto con síndrome de Down, es un sujeto joven o de mediana edad.

En la alternativa, dicho sujeto es un sujeto joven; o

dicho sujeto es un sujeto de edad infantil.

5 En particular, dichos sujetos son menores de 60 años, particularmente menores de 55 años, particularmente menores de 50 años, particularmente menores de 45 años, particularmente menores de 40 años, particularmente menores de 35 años, particularmente menores de 30 años, particularmente menores de 25 años, particularmente menores de 20 años, particularmente menores de 15 años, particularmente menores de 10 años, particularmente menores de 5 años, particularmente menores de 3 años.

10 El término "anticuerpo" o "anticuerpos" como se utilizan en la presente memoria, es un término reconocido en la técnica y se entiende que se refiere a moléculas o fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos, particularmente a moléculas de inmunoglobulina y a partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión que se une inmunoespecíficamente a un antígeno. La inmunoglobulina según la invención puede ser de cualquier tipo (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA e IgY) o clase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclases de moléculas de inmunoglobulina.

15 "Anticuerpos", dentro del alcance de la presente invención, pretende incluir anticuerpos monoclonales, policlonales, quiméricos, de cadena simple, biespecíficos, simianizados, anticuerpos humanos y humanizados, así como fragmentos activos de los mismos. Ejemplos de fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos incluyen los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub>, que incluyen los productos de una biblioteca de expresión de inmunoglobulina Fab y fragmentos de unión a epítopo de cualquiera de los anticuerpos y fragmentos mencionados anteriormente.

20 Estos fragmentos activos se pueden derivar de un anticuerpo como se describe en la presente memoria mediante un número de técnicas. Por ejemplo, anticuerpos monoclonales purificados se pueden escindir con una enzima, tal como pepsina, y sometidos a filtración en gel HPLC. La fracción adecuada que contiene fragmentos Fab se puede recoger y concentrar después por filtración de membrana y similares. Para una descripción adicional de las técnicas generales para el aislamiento de fragmentos activos de anticuerpos, véase por ejemplo, Khaw, B. A. et al. J. Nucl. Med. 23: 1011-1019 (1982); Rousseaux et al. Methods Enzymology, 121: 663-69, Academic Press, 1986.

25 Un "anticuerpo humanizado" se refiere a un tipo de anticuerpo manipulado que tiene sus CDR derivadas de una inmunoglobulina donadora no humana, estando derivadas el resto de las porciones derivadas de inmunoglobulina de la molécula, de una (o más) inmunoglobulina(s) humana(s). Además, los restos de soporte del marco se pueden alterar para conservar la afinidad de unión. Los métodos para obtener "anticuerpos humanizados" son bien conocidos por los expertos en la técnica. (véase, p. ej., Queen et al., Proc. Natl Acad Sci EE.UU., 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology, 9: 421 (1991)).

30 Un "anticuerpo humanizado" se puede obtener también mediante un nuevo enfoque de ingeniería genética que permite la producción de anticuerpos policlonales de tipo humano madurados por afinidad en animales grandes, tales como, por ejemplo, conejos.

35 El término "anticuerpo monoclonal" también es bien reconocido en la técnica y se refiere a un anticuerpo que se produce en masa en el laboratorio a partir de un único clon y que reconoce solamente un antígeno. Los anticuerpos monoclonales se preparan típicamente fusionando una célula B productora de anticuerpos normalmente de vida corta con una célula de crecimiento rápido, tal como una célula cancerosa (denominada a veces célula "inmortal"). La célula híbrida resultante, o hibridoma, se multiplica rápidamente, creando un clon que produce grandes cantidades del anticuerpo.

40 El término "memoria y/o deterioros y anomalías cognitivas" se refiere principalmente a los síntomas clínicos asociados con la patología relacionada con el amiloide en sujetos con síndrome de Down (DS), pero particularmente a los deterioros y anomalías que se originan en el hipocampo, la corteza prefrontal y/o corteza entorrinal del cerebro. Ejemplos de dicha memoria y/o deterioro cognitivo son, p. ej., pero sin estar limitados a ello, deterioros de la memoria de reconocimiento y/o deterioros de la memoria asociativa contextual y/o deterioros del aprendizaje asociativo y/o deterioros de la memoria declarativa para hechos y eventos y/o deterioros de la memoria episódica y/o disfunción del lenguaje, tal como afasia y/o deterioros visuoespaciales, tal como la mala colocación de los artículos y la dificultad para navegar en un terreno desconocido y familiar y/o disminución de las funciones ejecutivas, tal como apatía, desinhibición, aislamiento social, falta de juicio, dificultades con la planificación y/o pobre razonamiento abstracto y/o cambios de personalidad y/o cambios emocionales tal como apatía, agitación y psicosis y/o apraxia y/o deterioros en la realización de tareas motoras aprendidas y/u otros signos neurológicos, que incluyen signos piramidales y extrapiramidales, así como mioclonías o convulsiones.

55 El término "deterioro de la memoria" se refiere además a la característica cardinal del DS y es a menudo su manifestación más temprana. Incluso cuando no es la dolencia principal, los déficits de memoria se pueden iniciar en la mayoría de los pacientes con DS en el momento de la presentación. El patrón de deterioro de la memoria en el DS es bastante distintivo. La memoria declarativa para hechos y eventos, que depende de las estructuras temporales mediales, tal como la corteza entorrinal y el hipocampo, se ve profundamente afectada en el DS, mientras que los

sistemas subcorticales que soportan la memoria de procedimiento están relativamente a salvo hasta muy tarde en el curso de la enfermedad.

La memoria episódica está más profundamente deteriorada en pacientes jóvenes con DS, comparada con la memoria para hechos tales como vocabulario y conceptos (memoria semántica), que a menudo se deteriora algo más tarde. Dentro de la memoria episódica, hay una distinción entre recuerdo inmediato (p. ej., entrenamiento mental de un número de teléfono), memoria para eventos recientes (que entra en juego una vez que se debe recordar el material que se ha apartado de la conciencia) y memoria de eventos más remotos. La memoria para eventos recientes, atendida por el hipocampo, la corteza entorrinal en el lóbulo temporal medial, se deteriora prominentemente en pacientes jóvenes con DS. Por el contrario, la memoria inmediata (codificada en las cortezas prefrontales) se conserva en etapas tempranas, como son las memorias que se consolidan por largos períodos de tiempo (años), que se pueden recordar en ausencia del funcionamiento hipocampal.

Los deterioros de la memoria de procedimiento aparecen solo en pacientes de mediana edad con DS. La disfunción en el lenguaje, la función ejecutiva y otros dominios cognitivos se desarrollan a tasas variables a lo largo del curso de la enfermedad. La heterogeneidad de la presentación clínica del DS refleja presumiblemente una distribución topográfica variable de la carga de la patología cerebral. La disfunción del lenguaje, que es la afasia, es un síntoma común del DS, y las primeras manifestaciones de la disfunción del lenguaje generalmente incluyen dificultades para encontrar palabras, circunlocución y vocabulario reducido en el habla espontánea y con anomia en los ensayos de denominación de confrontación. Esto puede progresar para incluir errores parafásicos, contenido del habla empobrecida y comprensión deteriorada. Sin embargo, los pacientes generalmente pueden repetir frases literalmente hasta que la enfermedad esté bastante avanzada. Las dificultades del lenguaje en el DS se han descrito a menudo como el tipo de afasia de Wernicke y Broca. Cuando se les pide que generen listas de palabras en un minuto de tiempo, los pacientes con DS se comportan significativamente peor en una prueba de fluidez semántica (p. ej., listas de animales) que en una prueba de fluidez de letra (p. ej., listas de palabras que comienzan con F). Esto refleja el déficit específico en la memoria semántica.

La pérdida de habilidades visuoespaciales es otra característica temprana del DS que a veces puede ser bastante prominente en la presentación. Los deterioros visuoespaciales se manifiestan como la mala colocación de los artículos y la dificultad de navegar en un primer terreno desconocido y luego familiar. La agnosia visual (incapacidad para reconocer objetos) y la prosopagnosia (incapacidad para reconocer caras) son características posteriores.

El deterioro en la función ejecutiva se observa también en pacientes con DS. Estos síntomas incluyen una percepción pobre y una capacidad reducida para el razonamiento abstracto. A medida que la enfermedad progresa, los cambios de personalidad (tal como apatía, desconexión social y desinhibición), falta de juicio y planificación, y una incapacidad para completar las tareas que surgen típicamente. La depresión superpuesta, que puede ser difícil de diagnosticar en el contexto de la demencia, también se puede presentar de esta manera.

La percepción reducida de los déficits (anosognosia) es otro rasgo característico del DS. No es raro que los pacientes nieguen o subestimen sus déficits y ofrezcan explicaciones cuando se les señala. Entrevistar a un historiador colateral, tal como un cónyuge, es fundamental para obtener un historial preciso. De hecho, a menudo es el miembro de la familia quien lleva la queja del deterioro cognitivo a la atención médica. La pérdida de percepción aumenta a lo largo del tiempo junto con la gravedad general de la enfermedad, y se puede asociar con trastornos del comportamiento; aquellos con una percepción relativamente conservada son más susceptibles de estar deprimidos, mientras aquellos con una percepción más deteriorada son susceptibles de estar agitados, desinhibidos y presentan características psicóticas. La aparición de trastornos del comportamiento, que incluye agitación, agresión, deambular y psicosis (alucinaciones, delirios, síndromes de identificación errónea) puede conducir a una angustia significativa para el paciente y los miembros de la familia, y se ve típicamente en etapas posteriores del DS.

Los pacientes más jóvenes con DS tienen generalmente un examen neurológico normal, excepto para el examen cognitivo. Mientras los signos motores piramidales y extrapiramidales, mioclonías y convulsiones ocurren en pacientes con DS, estos son típicamente signos de la etapa avanzada. De forma similar, los signos de liberación frontal (agarre, reflejo hocico, gegenhalten) y la incontinencia son características tardías, más que tempranas, del DS.

La composición inmunogénica descrita en la presente memoria, que puede ser una vacuna terapéutica, comprende la construcción antigénica

como se describe anteriormente en la presente memoria en una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz y se puede preparar como una disolución líquida, o como una suspensión inyectable, o si no en una forma sólida adecuada para la solubilización antes de la inyección en el contexto de, por ejemplo, un kit para hacer uso de la presente composición, como se describe a continuación.

Una "cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz" se refiere a la cantidad de anticuerpo, péptido, compuesto o composición farmacéutica que, cuando se administra a un ser humano o animal, conduce a un efecto terapéutico o profiláctico en dicho ser humano o animal. La cantidad efectiva se determina fácilmente por un experto en la técnica siguiendo los procedimientos de rutina.

La composición inmunogénica descrita en la presente memoria se puede administrar a un ser humano o animal,

particularmente a un ser humano o animal con síndrome de Down que padece de deterioros o anomalías cognitivas semejantes a la AD, particularmente deterioros o anomalías que se originan en el hipocampo y/o la corteza prefrontal y/o la corteza entorrinal del cerebro, para inducir una respuesta inmunitaria en dicho ser humano o animal para aliviar dichos síntomas semejantes a la AD asociados con la enfermedad o para recuperar una condición encontrada en individuos sanos que no están afectados por la enfermedad.

Ya que prácticamente todas las personas con Síndrome de Down padecerán finalmente deterioros cognitivos semejantes a la AD en algún momento de la vida, será beneficioso también administrar dicha vacuna a las personas con Síndrome de Down antes de la manifestación de los deterioros semejantes a la AD. Dicha vacuna actuaría entonces como un tratamiento preventivo.

La composición inmunogénica descrita en la presente memoria se puede administrar a un ser humano o a un animal por cualquier vía de administración estándar adecuada. En general, la composición se puede administrar por vía tópica, oral, rectal, nasal o parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular). Además, la composición se puede incorporar en matrices de cesión prolongada tales como polímeros biodegradables, implantándose los polímeros en la proximidad del sitio en que se desea la aplicación, por ejemplo, en el sitio de un tumor. El método incluye la administración de una dosis única, la administración de dosis repetidas en intervalos de tiempo predeterminados y la administración prolongada durante un período de tiempo predeterminado.

La construcción antigénica descrita en la presente memoria, particularmente una composición inmunogénica que comprende dicha construcción antigénica en una cantidad terapéuticamente eficaz, se administra en dosis repetidas, en particular en 1 a 15 dosis, más particularmente en 2 a 10 dosis, más particularmente en 3 a 7 dosis y aún más particularmente en 4 a 6 dosis, en intervalos de tiempo de entre 1 y 10 semanas, particularmente en intervalos de tiempo de entre 1 y 6 semanas, más particularmente en intervalos de tiempo de entre 1 y 4 semanas, y aún más particularmente en intervalos de tiempo de entre 2 y 3 semanas. La respuesta inmunitaria se monitoriza tomando muestras de sueros en un momento adecuado después del refuerzo, particularmente de 3 a 10 días después del refuerzo, más particularmente de 4 a 8 días después del refuerzo y más particularmente de 5 a 6 días después del refuerzo y determinando la inmunogenicidad de la construcción antigénica utilizando metodología conocida, particularmente uno de los inmunoensayos comúnmente utilizados, tal como por ejemplo un ensayo ELISA.

En particular, la composición del péptido antigénico descrita en la presente memoria se administra mediante inyección parenteral, particularmente por vía intraperitoneal, intravenosa, subcutánea e intramuscular.

La dosificación de la composición dependerá de la condición que está siendo tratada, de la composición particular utilizada y otros factores clínicos tales como el peso, tamaño y el estado del paciente, la superficie corporal, el compuesto o la composición particular a administrar, otros fármacos que se administren de forma concurrente, y la vía de administración.

La composición inmunogénica descrita en la presente memoria se puede administrar en combinación con otras sustancias biológicamente activas y procedimientos para el tratamiento de los síntomas asociados con el síndrome de Down. Las otras sustancias biológicamente activas pueden ser parte de la misma composición que ya comprende la composición inmunogénica como se describe en la presente memoria, en forma de una mezcla, en donde la composición inmunogénica y la otra sustancia biológicamente activa se mezclan entre sí o con el mismo disolvente y/o vehículo farmacéuticamente aceptables o se pueden proporcionar por separado como parte de composiciones separadas, que se pueden ofrecer por separado o juntas en forma de un kit de partes.

La composición inmunogénica descrita en la presente memoria se puede administrar simultáneamente con la otra sustancia o sustancias biológicamente activas, intermitentemente o sucesivamente. Por ejemplo, la composición inmunogénica descrita en la presente memoria se puede administrar simultáneamente con una primera sustancia adicional biológicamente activa o sucesivamente después o antes de la administración de dicha composición. Si se elige un plan de aplicación donde se administra más de una sustancia adicional biológicamente activa junto con al menos una de las composiciones inmunogénicas descritas en la presente memoria, los compuestos o sustancias se pueden administrar parcialmente de manera simultánea, parcialmente de manera sucesiva en diversas combinaciones.

Además, se describen por lo tanto en la presente memoria mezclas de una composición inmunogénica como se describe en la presente memoria y, opcionalmente, además una o más sustancias adicionales biológicamente activas en una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz, así como los métodos de uso de tal composición como se describe en la presente memoria, o mezclas de los mismos para la prevención y/o el tratamiento terapéutico y/o el alivio de los efectos de la patología relacionada con el amiloide en sujetos niños, o en jóvenes o de mediana edad con síndrome de Down, particularmente para mejorar o recuperar los deterioros o anomalías de la memoria, particularmente deterioros y anomalías que se originan en el hipocampo y/o la corteza prefrontal y/o la corteza entorrinal del cerebro, particularmente para mejorar o recuperar los deterioros de la memoria de reconocimiento y/o deterioros de la memoria asociativa contextual y/o deterioros del aprendizaje asociativo y/o deterioros de la memoria declarativa para hechos y eventos y/o deterioros de la memoria episódica y/o disfunción del lenguaje tal como afasia y/o deterioros visuoespaciales, tal como la mala colocación de los artículos y la dificultad para navegar en terreno desconocido y familiar y/o disminución de las funciones ejecutivas, tal como apatía, desinhibición, aislamiento social,

falta de juicio, dificultades con la planificación y/o pobre razonamiento abstracto y/o cambios de personalidad y/o cambios emocionales tal como apatía, agitación y psicosis y/o apraxia y/o deterioros en la realización de tareas motoras aprendidas y/u otros signos neurológicos, que incluyen signos piramidales y extrapiramidales así como mioclonías o convulsiones.

5 Las mezclas descritas en la presente memoria pueden comprender, además de una composición inmunogénica como se describe en la presente memoria, una sustancia biológicamente activa tal como, por ejemplo, compuestos conocidos utilizados en la medicación de los síntomas semejantes a la AD en sujetos niños, o en jóvenes o de mediana edad con el síndrome de Down.

10 La otra sustancia o compuesto biológicamente activo puede ejercer su efecto biológico mediante el mismo o un mecanismo similar como la composición inmunogénica descrita en la presente memoria o mediante un mecanismo de acción no relacionado o mediante una multiplicidad de mecanismos de acción relacionados y/o no relacionados.

15 Generalmente, el otro compuesto biológicamente activo puede incluir anticuerpos generados contra y que se unen a un péptido antigénico como se describe en la presente memoria o compuestos utilizados en la medicación de patologías neurológicas tal como potenciadores de la transmisión de neutrones, fármacos psicoterapéuticos, inhibidores de la acetilcolinesterasa, bloqueantes de los canales de calcio, aminos biogénicas, tranquilizantes del grupo de las benzodiazepinas, intensificadores de la síntesis, almacenamiento o liberación de acetilcolina, agonistas de receptores postsinápticos de acetilcolina, inhibidores de la monoaminoxidasa A o B, antagonistas del receptor de N-metil-D-aspartato glutamato, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, antioxidantes y antagonistas de los receptores serotogénicos.

20 En particular, la mezcla como se describe en la presente memoria puede comprender al menos otro compuesto biológicamente activo seleccionado del grupo que consiste en compuestos contra el estrés oxidativo, compuestos antispoptóticos, agentes quelantes metálicos, inhibidores de la reparación del DNA tales como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de secretasa, inhibidores de la  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasa, moduladores de la  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasa, proteínas tau, neurotransmisores, rompedores de láminas  $\beta$ , moléculas antiinflamatorias o inhibidores de la colinesterasa (ChEI) tales como tacrina, rivastigmina, donepezilo y/o galantamina y otros fármacos y suplementos nutritivos, junto con una vacuna terapéutica según la invención y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

25 Las mezclas como se describen en la presente memoria pueden comprender además niacina o mementina junto con una composición inmunogénica como se describe en la presente memoria y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 Las mezclas pueden comprender "antipsicóticos atípicos" tales como, por ejemplo, clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina para el tratamiento de síntomas psicóticos positivos y negativos que incluyen alucinaciones, delirios, trastornos del pensamiento (manifestados por una marcada incoherencia, descarrilamiento, tangencialidad) y comportamiento extraño o desorganizado, así como anhedonia, afecto aplanado, apatía y aislamiento social, junto con una composición inmunogénica y/o una vacuna terapéutica según la invención y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 Otros compuestos que se pueden utilizar adecuadamente en mezclas en combinación con la composición inmunogénica descrita en la presente memoria se describen, por ejemplo, en el documento WO2004/058258 (veánse especialmente las páginas 16 y 17), que incluyen dianas terapéuticas de fármacos (páginas 36-39), ácidos alcanosulfónicos y ácido alcanolsulfúrico (páginas 39-51), inhibidores de la colinesterasa (páginas 51-56), antagonistas del receptor de NMDA (páginas 56-58), estrógenos (páginas 58-59), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (páginas 60-61), antioxidantes (páginas 61-62), agonistas de receptores activados de proliferadores de peroxisoma (PPAR) (páginas 63-67), agentes de disminución del colesterol (páginas 68-75); inhibidores amiloides (páginas 75-77), inhibidores de la formación de amiloides (páginas 77-78), agentes quelantes metálicos (páginas 78-79), antipsicóticos y antidepresivos (páginas 80-82), suplementos nutricionales (páginas 83-89) y compuestos que aumentan la disponibilidad de sustancias biológicamente activas en el cerebro (veánse las páginas 89-93) y profármacos (páginas 93 y 94), pero especialmente los compuestos mencionados en las páginas anteriormente indicadas.

40 Se describe además en la presente memoria una construcción antigénica que comprende un péptido A $\beta$  que no contiene un epítipo de células T y, por lo tanto, está libre de efectos secundarios potenciales, tales como complicaciones neurológicas causadas por un sistema de complemento sobreactivado. Esto se puede conseguir administrando un antígeno de un péptido A $\beta$ , particularmente un antígeno de un péptido A $\beta$  palmitoilado, más particularmente el antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-15</sub> palmitoilado, pero especialmente el antígeno de péptido A $\beta$ <sub>1-15</sub> palmitoilado, A $\beta$ <sub>1-15</sub> en combinación con un inhibidor del complemento.

45 El inhibidor del complemento puede ser un compuesto seleccionado del grupo que consiste en el Receptor 1 del complemento humano soluble, anti-proteína C5 del complemento humano tal como, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humanizado anti C5 o un fragmento monocatenario de un anticuerpo monoclonal humanizado, inhibidor N de C1-esterasa e inhibidor natural de C1 humana.

El antígeno del péptido amiloide modificado tal como, por ejemplo, el antígeno de péptido beta 1-15 amiloide se puede sintetizar siguiendo el método descrito en (Nicolau et al. 2002). El enfoque descrito en Nicolau et al se puede modificar sintetizando primero el péptido antigénico que luego se modifica además por un injerto en resina de un resto lipófilo o hidrófobo, en los restos del aminoácido terminal del péptido previamente formado. En particular, un aminoácido protegido, particularmente un aminoácido protegido con Fmoc, se une a una resina utilizando la química de acoplamiento conocida. Se retira el grupo protector y se une un segundo resto de aminoácido protegido. Después, se utilizan la síntesis de péptidos automatizada estándar que utiliza la química de protección conocida, particularmente la química Fmoc/tBu, y grupos protectores de la cadena lateral estándar para sintetizar el péptido antigénico A $\beta$ , particularmente el péptido antigénico A $\beta$ <sub>1-15</sub> mediante el acoplamiento de los aminoácidos 1 a 15 de la proteína amiloide A $\beta$ <sub>1-42</sub> para producir el fragmento peptídico con una secuencia dada. En una etapa final, se unen dos aminoácidos protegidos adicionales al fragmento peptídico en crecimiento. Los grupos Mtt en las cadenas laterales de los dos primeros y los dos últimos aminoácidos se pueden escindir a continuación selectivamente y unir a ácido palmítico. Después del lavado de la resina, se retira el grupo protector y la resina se escinde de forma simultánea, seguido de las desprotecciones de cadenas laterales utilizando la metodología estándar. El producto final se puede obtener a continuación en alta pureza y confirmar su identidad mediante métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, la espectrometría de masas por electropulverización.

El péptido antigénico amiloide A $\beta$  modificado, particularmente el péptido antigénico A $\beta$ <sub>1-15</sub> modificado se puede reconstituir en una construcción que consiste en liposomas, particularmente liposomas preparados de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPEA), dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) y colesterol, que contienen opcionalmente lípido A monofosforilado.

También se contempla en la presente memoria utilizar como una sustitución para los lípidos catiónicos en la membrana liposomal, lípidos aniónicos seleccionados del grupo que consiste en:

a. diacil-fosfolípidos con grupos de cabeza de fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, L- $\alpha$ -fosfatidilinositol-4-fosfato o ácido fosfatídico;

b. liso-fosfolípidos con grupos de cabeza de fosfatidilglicerol, fosfatidilserina o ácido fosfatídico, y

c. cardiolipina, dilisocardiolipina, monolisocardiolipina

En un aspecto, se contempla utilizar como una sustitución para los lípidos aniónicos en la membrana liposomal, los lípidos catiónicos seleccionados del grupo que consiste en:

a. diacil-fosfolípidos con grupos de cabeza de 3-trimetilamonio-propano, 3-dimetilamonio-propano, 3-etilfosfocolina o 3-fosfatidiletanolamina;

b. D-eritro-esfingosina, bromuro de dimetilododecylamonio, bromuro de N-[1-(2,3-dimiristiloxi)propil]-N,N-dimetil-N-(2-hidroxiethyl) amonio, 1-propanamio N,N,N-trimetil-2bis[(1-oxo-9-octedecenil)oxi]-(Z,Z) metil sulfato o 3 $\beta$ -[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil] hidrocloreto de colesterol.

En particular, las cadenas lipídicas unidas a los grupos de cabeza anteriores pueden

a. ser saturadas o insaturadas,

b. variar en longitud desde (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> en donde n está entre 3 y 24, y

estar sustituidas simétricamente o asimétricamente.

Se pueden utilizar liposomas con lípido A como adyuvante para preparar la vacuna anti-amiloide. Se mezclan dimiristoilfosfatidilcolina, glicerol y colesterol, particularmente en una relación molar de 0,9:1,0:0,7. Se añade después un inmunomodulador fuerte tal como, por ejemplo, lípido A monofosforilado a una concentración adecuada, particularmente a una concentración de entre 30 y 50 mg por mmol, más particularmente de 40 mg por mmol de fosfolípidos. Se añade después el péptido antigénico A $\beta$  modificado en una relación molar de péptido a fosfolípidos de entre 1:30 y 1:200, particularmente a una relación molar de entre 1:50 y 1:120, más particularmente de 1:100. Los disolventes se retiran, por ejemplo, a través de la evaporación, y la película resultante se hidrata con una disolución tampón estéril como, por ejemplo, PBS.

También se pueden preparar liposomas mediante la técnica de inyección a contracorriente como se describe, por ejemplo, en (Wagner et al. 2002). Durante la inyección de disoluciones de lípidos en un sistema tampón acuoso, los lípidos tienden a formar "precipitados", seguidos de la autocolocación en vesículas. El tamaño de las vesículas obtenidas depende de factores tales como la concentración del lípido, la velocidad de agitación, la velocidad de inyección y la elección de lípidos. El sistema de preparación puede consistir en un módulo de inyección a contracorriente, recipientes para la fase polar (p. ej., una disolución tampón de PBS), un recipiente de disolución de etanol/lípido y un dispositivo de presión, pero particularmente un dispositivo de presión de nitrógeno. Mientras la disolución acuosa o polar se bombea a través del módulo de inyección a contracorriente, la disolución etanol/lípido se inyecta en la fase polar variando las presiones aplicadas. Se describen diversos métodos de producción de las

construcciones antigénicas de liposomas en el documento WO2007/068411.

Por consiguiente, la composición liposomal para uso en el método descrito en la presente memoria se puede preparar para comprender un A $\beta$ 1-15 palmitoilado, particularmente un A $\beta$ 1-15 tetrapalmitoilado junto con lípido A monofosforilado (MPLA) como un adyuvante.

5 Se pueden administrar por vía subcutánea de cuatro a diez, particularmente de cinco a seis dosis de la composición liposomal y semanalmente o cada dos semanas a un sujeto que se va a vacunar. Se pueden obtener y analizar las sondas de plasma periódicamente para los títulos de IgG.

10 La eficacia de la composición liposomal de la invención como un inmunógeno en sujetos niños y jóvenes o de mediana edad con síndrome de Down y el potencial terapéutico para tratar los déficits de memoria en dichos sujetos se podría demostrar en un modelo animal relevante para el síndrome de Down. En particular, se utilizaron ratones Ts65Dn que son ampliamente aceptados como un modelo animal para el DS. Los ratones Ts65Dn ejercen un triplicado del cromosoma 16 murino, que alberga el gen APP murino (Davissón et al. 1993; Netzer et al.2010). Estos ratones transgénicos muestran 1,5 veces aumentado el A $\beta$  murino (Hunter et al. 2004) y demuestran déficits de comportamiento en varias tareas de memoria (Belichenko et al. 2009).

15 Se pudo demostrar en la presente invención que la composición liposomal de la invención indujo títulos elevados de anticuerpos y que dichos anticuerpos permanecen elevados incluso 40 días después de la última inmunización. Por lo tanto, como se describe en la presente memoria la composición liposomal es capaz de inducir una respuesta inmunitaria fuerte y de romper la autotolerancia hacia A $\beta$  en sujetos tratados con síndrome de Down.

20 Se mostró además que la composición liposomal de la invención y como se describe en la presente memoria es capaz de inducir en ratones jóvenes o de mediana edad con síndrome de Down, títulos de IgG tan altos como en sujetos de un grupo control sin síndrome de Down. La composición liposomal como se describe en la presente memoria induce títulos aumentados de anticuerpos del isotipo IgG2a en comparación con el grupo control, mientras que los títulos de anticuerpos de los isotipos IgG1 e IgG2b son comparables en el tratamiento y el grupo control. Los títulos de anticuerpos de clase IgM son más bajos en el grupo de tratamiento en comparación con el grupo control. Este nivel de IgM ligeramente inferior puede ser causado por el sistema inmunitario alterado de ratones con síndrome de Down. La composición liposomal es, por lo tanto, capaz de superar el deterioro de la respuesta inmunitaria adaptativa hacia A $\beta$  descrito en personas con DS (Monsonogo et al. 2001).

30 La composición liposomal de la invención y como se describe en la presente memoria también es segura y no induce a efectos secundarios indeseados. En particular, el tratamiento con la composición liposomal no conduce a la activación celular del cerebro, tal como la activación de astrocitos o microglia.

Se mostró que la composición liposomal de la invención y como se describe en la presente memoria da como resultado una relación de discriminación más alta en el modelo animal que indica que el tratamiento condujo a una mejoría significativa de la memoria en los animales tratados.

35 La composición liposomal como se describe en la presente memoria se mostró además en un ensayo que consiste en sesiones de entrenamiento, nemotécnicas y contextuales para dar como resultado una congelación mejorada en el modelo animal que alcanza niveles comparables a los observados en los animales control. Esto sugiere que la inmunización fue eficiente y mejoró la capacidad de memoria de los animales modelo.

40 La composición liposomal como se describe en la presente memoria es así capaz de recuperar los déficits de memoria en sujetos niños y jóvenes o de mediana edad que padecen de síndrome de Down, en particular en sujetos niños y jóvenes o de mediana edad con síndrome de Down, que aún no han desarrollado placas asociadas de A $\beta$  en el cerebro. Los pacientes que padecen de síndrome de Down presentan anomalías cognitivas, tales como deterioro de la memoria y actividades anormales.

45 La composición liposomal como se describe en la presente memoria es además capaz de recuperar los déficits de memoria en sujetos niños y jóvenes o de mediana edad que padecen de síndrome de Down, en particular en sujetos niños y jóvenes o de mediana edad con síndrome de Down, que han desarrollado ya placas asociadas de A $\beta$  en el cerebro.

50 En una realización, el tratamiento con la composición liposomal puede mejorar o recuperar el déficit de memoria en un sujeto niño o en un joven a de edad mediana con síndrome de Down, particularmente deterioros de la memoria de reconocimiento y/o deterioros de la memoria asociativa contextual y/o deterioros del aprendizaje asociativo y/o deterioros de la memoria declarativa para hechos y eventos y/o deterioros de la memoria episódica y/o disfunción del lenguaje, tal como afasia y/o deterioros visuoespaciales, tal como la mala colocación de los artículos y la dificultad para navegar en un terreno desconocido y familiar y/o disminución de las funciones ejecutivas, tal como apatía, desinhibición, aislamiento social, falta de juicio, dificultades con la planificación y/o pobre razonamiento abstracto y/o cambios de personalidad y/o cambios emocionales tal como apatía, agitación y psicosis y/o apraxia y/o deterioros en la realización de tareas motoras aprendidas y/u otros signos neurológicos que incluyen signos piramidales y extrapiramidales, así como mioclonías o convulsiones

**Breve descripción de los dibujos**

Figura 1, muestra una presentación esquemática de la vacuna ACI-DS-01, que es una vacuna basada en liposomas con antígeno A $\beta$ 1-15 de ratón tetrapalmitoilado y MPLA como adyuvante. Están subrayados los tres aminoácidos diferentes entre el A $\beta$ 1-15 humano y de ratón.

5 Figura 2, muestra los niveles de anticuerpos anti-A $\beta$  de ratón en ratones Ts65Dn inmunizados con la vacuna ACI-DS-01. A y B) Se detectaron títulos de IgG anti-A $\beta$ 40 o 42 de ratón en el plasma de ratones inmunizados con ACI-DS-01. Los títulos inducidos se observaron después de la segunda inmunización y se mantuvieron altos incluso 40 días después de la 6ª inyección en comparación con ratones inmunizados con liposomas vacíos. No hubo diferencia entre los títulos medidos de ratones 2N y Ts65Dn. C a F) Se detectaron isotipos IgG después de la 4ª inmunización. G) Los títulos de IgM fueron escasamente más bajos en los ratones Ts65Dn. H) Se detectaron los mismos niveles de títulos de IgG anti-MPLA en todos los ratones inmunizados con ACI-DS-01. Las gráficas representan la media  $\pm$ SD. (n=20 2N-ACI-DS-01, n=15 Ts65Dn-ACI-DS-01, n=18 2N-Vacío y n=11 Ts65Dn-Vacío. Las gráficas representan la media  $\pm$ SD).

15 Figura 3, muestra la eficacia de la inmunización en el rendimiento de la memoria. La diferencia en la actividad locomotora espontánea entre los ratones 2N y Ts65Dn permaneció similar después de la inmunización. B) Los ratones inmunizados con ACI-DS-01 mostraron un significativo índice de reconocimiento mejorado (RI) en el reconocimiento de objetos nuevos en comparación con el grupo tratado con la vacuna vacía. C) En el condicionamiento del miedo, los ratones inmunizados mostraron una significación límite para un mayor nivel de congelación durante la sesión contextual. Las gráficas representan la media  $\pm$ SD. (n=20 2N-ACI-DS-01, n=13 Ts65Dn ACI-DS-01, n=18 2N-Vacío y n=11 Ts65Dn-Vacío).

20 Figura 4, muestra el nivel de A $\beta$ 40 en ratones tratados con la vacuna ACI-DS-01. A) En la corteza, el nivel de A $\beta$ 40 fue escasamente mayor en los ratones Ts65Dn en comparación con los 2N. La vacuna ACI-DS-01 mostró una tendencia a disminuir los niveles de A $\beta$ 42 y A $\beta$ 40 en la corteza y el hipocampo. Los niveles de A $\beta$ 42 y A $\beta$ 40 en el cerebelo mostraron una disminución estadísticamente significativa después del tratamiento con ACI-DS-01. Las gráficas representan la media  $\pm$ SD. (n=10 2N-ACI-DS-01, n=10 Ts65Dn ACI-DS-01, n=8 2N-Vacío y n=5 Ts65Dn-Vacío). B y C) Correlación entre la relación A $\beta$ -40/42 en la corteza o el cerebelo con el RI. D) El nivel de los títulos de IgG anti-A $\beta$  se correlaciona débilmente con el nivel de A $\beta$ 40 en el plasma de ratones Ts65Dn tratados con ACI-DS-01. E) Correlación significativa entre el nivel de IgG anti-A $\beta$  y el RI.

(n=19 2N ACI-DS-01, n=13 Ts65Dn ACI-DS-01, n=18 2N-Vacío y n=11 Ts65Dn-Vacío).

30 Figura 5, muestra estudios de la reacción inflamatoria. A) Peso corporal y cerebral. B) Imágenes confocales de inmunorreactividad de GFAP (izquierda) y CD45 (derecha) en ratones 2N y Ts65Dn tratados. Las flechas apuntan a células microgliales individuales positivas para CD45. La densidad óptica de la inmunorreactividad de GFAP se cuantificó y no reveló diferencias entre los grupos. n=4 de cada grupo.

35 Figura 6, muestra secciones de muestras de cerebro humano con DS inmuno-teñidas con sueros de ratones inmunizados con ACI-DS-02. El área positiva indica que el anticuerpo derivado de ACI-DS-02 se une a las placas amiloides en el cerebro de las personas con DS. La tinción fue similar a la tinción obtenida con 6E10, un anticuerpo anti-beta amiloide disponible comercialmente y con el anticuerpo derivado de ACI-24. La vacuna ACI-24 corresponde a la vacuna ACI-DS-01 con la diferencia de que el antígeno utilizado en ACI-24 es una secuencia humana de A $\beta$ 1-15, mientras que la vacuna ACI-DS-01 contiene como antígeno una secuencia de ratón de A $\beta$ 1-15 (para los tres aminoácidos diferentes en esos dos antígenos, véase la Figura 1). No se observó tinción cuando se incubó una sección con sueros de ratones inmunizados con PBS.

40 Figura 7, muestra el aprendizaje de ratones TS65Dn inmunizados con la vacuna ACI-DS-02 en el ensayo de condicionamiento del miedo. Los ratones TS65Dn inmunizados con ACI-DS-02 mostraron una mayor congelación durante la sesión de adquisición en comparación con los ratones TS65Dn inmunizados con PBS, particularmente después del tercer estímulo condicionado (CS).

Las gráficas representan la media  $\pm$ SD. (n=7 Ts65Dn-ACI-DS-02, n=7 2N-PBS y n=4 Ts65Dn-PBS. Las gráficas representan la media  $\pm$ SD).

45 Figura 8, muestra secciones de muestras de cerebro humano con DS inmuno-teñidas con sueros de ratones inmunizados con ACI-DS-03. El área positiva indica que el anticuerpo derivado de ACI-DS-03 se une a las placas amiloides en el cerebro de las personas con DS. La tinción fue similar a la tinción obtenida con 6E10, un anticuerpo anti-beta amiloide disponible comercialmente, y con el anticuerpo derivado de ACI-24. La vacuna ACI-24 corresponde a la vacuna ACI-DS-01 con la diferencia de que el antígeno utilizado en ACI-24 es una secuencia humana de A $\beta$ 1-15, mientras que la vacuna ACI-DS-01 contiene como antígeno una secuencia de ratón de A $\beta$ 1-15 (para los tres aminoácidos diferentes en esos dos antígenos, véase la Figura 1). No se observó tinción cuando se incubó la sección con sueros de ratones inmunizados con PBS.

50 Figura 9, muestra los análisis morfológicos de ratones Ts65Dn inmunizados con la vacuna ACI-DS-01. A) Número de células ChAT+ en el septum medio y B) las densidades ópticas fueron similares en todos los grupos. C) el área del

cuerpo celular para ChAT+ aumentó en ratones Ts65Dn inmunizados con ACI-DS-01 en comparación con los Ts65Dn tratados con la vacuna vacía. (n=4 2N-Vacío, n=4 Ts65Dn-Vacío, n=4 2N-ACI-DS-01 y n=4 Ts65Dn-ACI-DS-01. Las gráficas representan la media  $\pm$ SD).

## Ejemplos

### 5 Ejemplo 1 Metodología general

#### 1.1 Animales:

10 Se utilizaron ratones Ts65Dn (n=30) conocidos como un modelo de ratón DS (Davisson et al. 1993) y el control de edad similar 2N (n=40). En la fecha de inicio, los ratones utilizados tenían 5 meses de edad. Al final del estudio (inmunización y ensayos de comportamiento), los ratones tenían 9 meses de edad. Por lo tanto, todas las muestras recogidas en el sacrificio son de ratones de 9 meses de edad.

15 Los Ts65Dn recién nacidos tienen una letalidad elevada (alrededor del 6%) principalmente debido a malformaciones cardíacas congénitas (Randall 2006, Moore 2006). Sin embargo, los ratones pueden sobrevivir incluso hasta de 18 a 24 meses. En nuestro estudio, se observó una tasa de mortalidad del 15%. Los ratones supervivientes presentan una disminución de tamaño del 20% comparado con los compañeros de camada normales. Los ratones más gravemente afectados que murieron al nacer, no sobreviven para ser analizados, dando como resultado subestimaciones del impacto de los genes trisómicos en algunos fenotipos (es decir, defecto cardíaco). Sin embargo, para nuestra preocupación, los ratones supervivientes representan un modelo adecuado de DS para analizar patologías amiloides y semejantes a la AD.

20 En el modelo de ratón DS utilizado para estos estudios, los ratones muestran niveles aumentados de amiloide a la edad de 4 meses (Hunter 2004). A una edad de 9 meses, el nivel de beta amiloide alcanza 3 veces el nivel normal como se predice en vista de las tres copias del gen APP. Similar a las personas con DS, el envejecimiento es un factor importante para la deposición de amiloide en los cerebros Ts65Dn. A pesar de la acumulación de amiloide relacionada con la edad, los ratones TS65Dn no desarrollan placas. Sin embargo, replican fielmente la degeneración de las poblaciones neuronales que se ven en la AD y en las personas con síndrome de Down (Salehi et al., 2009)

25 Tomados en conjunto, las características del DS en el modelo de ratón utilizado comprenden la presencia de proteínas patológicas y aspectos fenotípicos; es decir, la carga de amiloide y el deterioro cognitivo. Por lo tanto, los ratones Ts65Dn pueden recapitular exactamente los procedimientos patógenos del DS. Dado que estos ratones comienzan a acumular amiloide a un nivel comparable a los humanos a los 6 meses de edad, la edad de los ratones modelo se compara con los pacientes humanos con DS en un rango de edades desde jóvenes o de mediana edad.

30 Los ratones utilizados para el estudio de inmunización con la vacuna ACI-DS-01 fueron la colonia de ratón Ts65Dn mantenida durante más de 10 generaciones cruzando hembras B6EiC3Sn-Ts(1716)65Dn (Laboratorio Jackson, Bar Harbor, ME) con machos B6EiC3SnF1/JA/a (Laboratorio Jackson). Este plan de reproducción se utilizó porque los ratones trisómicos se reproducen muy mal o nada en absoluto cuando son consanguíneos, los antecedentes de B6C3 han sido los más exitosos. Para distinguir ratones 2N de Ts65Dn, se extrajo ADN genómico de muestras de la cola.  
35 Se utilizó un protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa (proporcionado por el Laboratorio Jackson) para medir la expresión del gen Mx1, que está presente en tres copias en Ts65Dn. Se utilizaron ratones machos en todos los estudios. Eran de 4 +/- 0,3 meses de edad al inicio del estudio.

#### 1.2 Preparación de la vacuna-Preparación de una construcción antigénica basada en liposomas

Código de la vacuna	Secuencia peptídica antigénica <sup>a</sup>	Secuencia A $\beta$	Conformación del péptido antigénico en la vacuna (%) medida por ATR-IR
ACI-DS-01	H-Lys(Pal)-Lys (Pal) -Asp-Ala-Glu-Phe-Gly-His-Asp-Ser-Gly-Phe-Glu-Val-Arg-His-Gln-Lys(Pal)-Lys(Pal)-OH	Ratón A $\beta$ 1-15 <sup>b</sup> (SEQ ID NO:2)	73% lámina beta 19% espiral aleatoria 0% hélice alfa o bucles 8% hélices beta
ACI-DS-02	H-Lys(Pal)-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Lys(Pal)-OH	Ser humano A $\beta$ 22-35 (SEQ ID NO:4) y ratón A $\beta$ 22-35 (SEQ ID NO:5)	67% lámina beta 21% espiral aleatoria 0% hélice alfa o bucles 12% hélices beta
ACI-DS-03	H-Lys(Pal)-Lys(Pal)-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Lys(Pal)-Lys(Pal)-OH	Ser humano A $\beta$ 14-29 (SEQ ID NO:6) y ratón A $\beta$ 14-29 (SEQ ID NO:7)	57% lámina beta 19% espiral aleatoria 12% hélice alfa o bucles 11% hélices beta

Las secuencias de péptidos se presentan en códigos de tres letras; Pal significa resto palmitoilado;

<sup>b</sup>Están subrayados los tres aminoácidos diferentes entre el A $\beta$ 1-15 humano y de ratón y se muestran en la Figura 1.

La construcción antigénica del liposoma se produce según el método descrito en el documento WO2007/068411. Los péptidos palmitoilados se prepararon por los Laboratorios PolyPeptide (Strasbourg, Francia). En resumen, las vacunas liposomales se prepararon solubilizando dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatodilglicerol (DMPG), colesterol y lípido A monofosforilado (MPLA), (todos de Avanti Polar Lipids, AL, EE.UU.), en relaciones molares 9:1:7:0,05, respectivamente, en etanol a 60°C. La disolución de lípido/etanol se diluyó en PBS a pH 7,4, permitiendo la formación de vesículas multicapa. La preparación resultante se concentró después por ultrafiltración (Vivaflow 200-100000 MWCO, Poliétersulfona), con un caudal de 200 ml/min y el volumen de reacción se redujo con una etapa de ultrafiltración. La disolución concentrada se sometió además a diálisis en un dispositivo Vivaflow 200 donde se realizó un intercambio de volumen 10x con PBS a pH 7,4. Los liposomas multilamelares se sometieron después a homogeneización [7 ciclos a 1,034x10<sup>8</sup>-1,38x10<sup>8</sup> Pa (15000-20000 Psi)], seguidos de 3 ciclos de extrusión secuencial a través de filtros de policarbonato (Whatman) con un tamaño de poro de 0,2  $\mu$ m y un diámetro de 47 mm. Tanto las etapas de homogeneización como la de extrusión se realizaron en un EmulsiFlex-C5 (Avestin, Canadá). Los liposomas unilamelares resultantes sin antígeno se diluyeron en PBS a pH 7,4 y se calentaron a 60°C antes de la adición del péptido. El péptido palmitoilado se disolvió en PBS a pH 11,4 con 5,0% ( $\beta$ -OG). Para la preparación de las vacunas ACI-DS-01, ACI-DS-02 y ACI-DS-03, se utilizaron los péptidos antigénicos correspondientes a 1,33, 0,67 y 1,06 mg/ml, respectivamente. La disolución resultante comprendía una concentración de detergente por encima de su concentración micelar crítica (CMC) de 0,73% (peso/volumen). Esta disolución peptídica se inyectó después en las disoluciones de liposomas a 60°C y se agitó durante 30 minutos, dando como resultado una disolución que tiene una concentración final de  $\beta$ -OG muy por debajo de su concentración micelar crítica. La descomposición micelar del detergente induce la incorporación del antígeno palmitoilado en la superficie de los liposomas formados previamente. Esta disolución liposomal con antígeno se concentró después a través de ultrafiltración y se sometió a un intercambio de volumen 10x con PBS a pH 7,4 mediante diafiltración (ambas en una poliétersulfona de 100000 MWCO con un flujo de 200 ml/min). Los liposomas resultantes se filtraron después de forma estéril dos veces pasando a través de filtros de jeringa de policarbonato de 0,2  $\mu$ m y se almacenaron a 5°C. La relación molar de péptido a lípido en la vacuna fue de 1:100.

### 1.3 Inmunización con la vacuna ACI-DS-01

Todos los ratones recibieron inmunizaciones subcutáneas (s.c.) con 200  $\mu$ l de ACI-DS-01 (51,2  $\mu$ g por dosis de Pal1-15, péptido A $\beta$ 1-15 tetrapalmitoilado) o la vacuna de liposomas vacíos. Se realizaron un total de seis inyecciones los días 1, 14, 28, 42, 56, 70 y 110. En los mismos días, se realizaron sangrías en la cola justo antes de la primera inyección de la vacuna en el día -1 (antes de la sangría), día 56 (14 días después de la 4<sup>a</sup> inyección) y en el sacrificio, día 110 (40 días después de la 6<sup>a</sup> inyección). Los ratones se sacrificaron al final del estudio a la edad de 9 meses y se recogieron los cerebros.

### 1.4 Cuantificación de anticuerpos A $\beta$ específicos de ratón después de la inmunización con ACI-DS-01

Se determinaron mediante ELISA las respuestas de IgG específicas para A $\beta$ 1-42. Brevemente, las placas se recubrieron con 10  $\mu$ g/ml de A $\beta$ 1-42 de ratón (Bachem H5966, lote: 1013710, 1028321 o 1033165) o A $\beta$ 1-40 de ratón (Bachem H5638, lote: 1013645) durante la noche a 4°C. Después de lavar con PBS-Tween 20 al 0,05% y bloquear con BSA al 1%, se añadieron a las placas diluciones seriadas de plasma y se incubaron a 37°C durante dos horas.

Se utilizaron como control positivo el anticuerpo anti-A $\beta$  4G8 (Covance SIG-39220, lote: 08EC00905, 1 mg/ml diluido 4000) y suero de un C57BL/6J01aHsd (Harlan) inmunizado con tres inyecciones del mismo lote de ACI-DS-01. Después del lavado, las placas se incubaron con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (Jackson Immunoresearch West Grove, PA, EE.UU., Cat. N°115-055-164 Lote 87821, vial diluido a 1/4000) durante dos horas a 37°C. Después del lavado final, las placas se incubaron durante 2 horas y media con sustrato AP (pNPP) y se leyeron a 405 nm utilizando un lector de placas ELISA. Los resultados se expresan como densidad óptica (O.D).

#### 1.5 Ensayos de comportamiento después de la inmunización con ACI-DS-01

Todos los ratones se expusieron a la misma serie de ensayos de comportamiento comenzando alrededor de los 8 meses de edad. Cada ratón se manipuló durante 10 minutos, dos veces al día, durante los 7 días que precedieron a los ensayos y durante 3 días en medio de los ensayos. Los ensayos se realizaron en los días indicados (según la última inmunización) y en el siguiente orden: actividad locomotora (comenzando el día 11), tarea de reconocimiento de objetos nuevos con un retraso de 24h (comenzando el día 18), laberinto en T (comenzando el día 25), y el ensayo de condicionamiento del miedo contextual (comenzando el día 34). Todos los ensayos de comportamiento tuvieron lugar durante el ciclo de luz diurna entre las 7:00 a.m. y 7:00 p.m. y se realizaron a temperatura ambiente (22°C). El día del ensayo, los ratones se mantuvieron en sus jaulas hogar durante la fase de luz diurna en la misma sala experimental durante 2h para la habituación. Como un indicador de ansiedad durante cada ensayo, también se midió el número de sedimentos fecales y gotas de orina. Para minimizar las señales olfativas del experimento anterior, cada aparato se limpió a fondo con etanol al 10% después de cada ocupación del animal. El manejo y todos los ensayos de comportamiento se realizaron de una forma ciega, sin revelar el genotipo y el tratamiento al investigador que maneja los ratones.

##### 1.5.1 Ensayo de la actividad locomotora espontánea después de la inmunización con ACI-DS-01

La actividad locomotora espontánea se monitorizó utilizando cámaras de actividad de plexiglás (modelo MED-OFA-MS; Med Associates) (27,9x27,9x20 cm) y el software de monitoreo de actividad (Activity Monitor, versión 4.3.6). Como se describe en Belichenko et al., (Belichenko et al. 2009; Belichenko et al. 2007), los ratones se colocaron en el centro de la cámara bajo condiciones de luz ambiental brillante y la actividad se monitorizó durante 10 minutos en tres experimentos separados. Se determinaron las medias para la distancia total, velocidad, tiempo total de actividad, recuentos totales de actividad y actividad vertical.

##### 1.5.2 Tarea de reconocimiento de objetos nuevos después de la inmunización con ACI-DS-01

Utilizamos el protocolo de Bevins y Besheer (Bevins y Besheer, 2006; O'Doherty et al. 2005): una tarea de aprendizaje de un experimento que no coincide con la muestra para estudiar la memoria de reconocimiento de dos objetos de muestra en un entorno para estudiar la memoria y el aprendizaje con un retraso de 24h. Antes de la prueba, los ratones se habituaron en una cámara de plexiglás negro (31x24x20 cm) durante 10 minutos durante 2 días consecutivos bajo condiciones de luz ambiental tenue. La actividad de los ratones a la edad de 8 meses durante la tarea de reconocimiento de objetos se registró con una cámara de video. Primero, se colocaron dos objetos idénticos en la cámara, como describió anteriormente (Bevins y Besheer, 2006; O'Doherty et al. 2005). Se colocó un ratón en el punto medio de la pared opuesta a los objetos de muestra. Después de 10 minutos de explorar los objetos, el ratón se devolvió a la colonia durante 24h. Para analizar el reconocimiento de objetos, se colocaron en la cámara un objeto familiar y un objeto nuevo y el ratón se colocó de nuevo en la cámara durante 3 minutos para explorar los objetos. El reconocimiento de objetos se midió en un solo experimento. Los datos se determinaron utilizando observaciones directas de grabaciones de video. Los resultados fueron: 1) tiempo medio de exploración total de los objetos de la muestra, tanto nuevos como familiares, y 2) relación de discriminación (interacción del objeto nuevo/interacción total con ambos objetos).

##### 1.5.3 Ensayo del laberinto en T después de la inmunización con ACI-DS-01

Se utilizaron ratones a la edad de 8 meses. Utilizamos un protocolo modificado de Deacon y Rawlins (Deacon y Rawlins, 2006) y una tarea de alternancia continua en un laberinto en T para evaluar la función hipocampal. El laberinto estaba hecho de vidrio acrílico opaco (Plexiglas) como se describe (Deacon y Rawlins, 2006) con una puerta corredera adicional al comienzo del brazo de partida. Durante el ensayo, se colocó un ratón al comienzo del brazo de partida, con su parte trasera hacia la puerta corredera cerrada. Después se abrieron todas las puertas, el ratón corrió hacia abajo por el brazo de partida para elegir o el brazo objetivo derecho o el izquierdo. Después de que las cuatro patas del ratón hubieran entrado en un brazo objetivo, la puerta corredera del otro brazo objetivo se cerró durante 5s, y después todas las puertas correderas se abrieron de nuevo, permitiendo que los ratones volvieran al brazo de partida. La actividad del laberinto en T se monitoreó hasta que los ratones terminaron 10 alternancias. Este procedimiento se repitió durante 3 días consecutivos, para un total de 30 experimentos. La puntuación de la alternancia espontánea se definió como el número de alternancias de izquierda a derecha y de derecha a izquierda, expresado como un porcentaje del número total de posibles alternancias durante la sesión. Los resultados se promediaron tanto para las puntuaciones de alternancia como para el tiempo empleado.

##### 1.5.4 Ensayo de condicionamiento del miedo contextual después de la inmunización con ACI-DS-01

El condicionamiento del miedo contextual y nemotécnico se llevó a cabo para la evaluación del aprendizaje y la

recuperación dependientes del miedo. El ensayo se realizó utilizando cámaras de Coulbourn Instruments (Whitehall, PA, EE.UU.). En el primer día, los animales se colocaron en una cámara (Contexto A) durante 3 minutos para el registro de base, seguido de cinco emparejamientos de tono-choque. El choque (0,5 mA, 2 segundos) se administró después del tono (70 dB, 2 kHz, 20 segundos) en cada emparejamiento de estímulo condicionado/incondicionado. En el segundo día, se utilizó una cámara nueva (Contexto B; nueva sala, nuevo entorno olfativo, nueva textura de suelo, inserciones de plástico azul para paredes, fuente adicional de luz azul y señales visuales) para el ensayo nemotécnico. Después de un período de tono previo de 3 minutos, se presentaron tres tonos sin choques a los animales durante un período de ensayo de 3 minutos. En el último día del experimento, los ratones se colocaron en el Contexto A durante 5 minutos sin ningún estímulo condicionado o incondicionado (Saxe et al. 2006). Se definió la congelación como la falta total de movimiento durante un mínimo de 0,75 segundos, medido mediante el software FreezeFrame (Actimetrics, Evanston, IL). Se describió el porcentaje de congelación en cada periodo.

#### 1.6 Medición de pesos corporales y cerebrales después de la inmunización con ACI-DS-01

Después de todos los ensayos de comportamiento, los ratones se anestesiaron profundamente con pentobarbital sódico (200 mg/kg, i.p.) (Laboratorios Abbott), se pesaron y se perfundieron transcardialmente durante 1 minuto con cloruro sódico al 0,9% (10 ml) y después durante 10 minutos con paraformaldehído al 4% en PBS 0,1 M, pH 7,4 (100 ml). Después de la perfusión, se retiró el cerebro inmediatamente. Se registró el peso del cerebro (incluidos los bulbos olfativos, corteza, hipocampo, cerebelo, tronco encefálico y la médula espinal cervical a través de C1-C2). El cerebro se colocó después en fijador hasta su uso posterior.

#### 1.7 Inmunofluorescencia para la reacción inflamatoria después de la inmunización con ACI-DS-01

Se preincubaron las secciones del cerebro con leche desnatada al 5% en PBS 0,1 M con Triton X-100 al 0,3%. Después, se incubaron las secciones durante la noche a 4°C con el anticuerpo de conejo anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP) de vaca (DAKO, Glostrup, Dinamarca) a una dilución de 1:500, o con el anticuerpo policlonal anti-CD45 de rata (Pharmingen) a una dilución de 1:5000. Se realizaron las siguientes incubaciones (1h cada una y a temperatura ambiente); con un anticuerpo secundario anti-conejo de burro biotinilado (1:200; Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA, EE.UU.) y con estreptavidina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:500; Jackson ImmunoResearch Labs). Se realizó un enjuague con PBS (3 veces, cada 20 min) entre las incubaciones descritas anteriormente. Las secciones se montaron en el portaobjetos de vidrio de microscopio y se cubrieron con un cubreobjetos utilizando glicerol al 90% en tampón de fosfato 0,1 M, pH 7,4. Para controlar la especificidad de la tinción de anticuerpos, las secciones seleccionadas se sometieron al mismo protocolo pero sin incluir los anticuerpos primarios. No se observó inmunofluorescencia en las secciones control. Se examinaron y se escanearon las rodajas en un microscopio confocal Radiance 2000 (Bio-Rad, Hertfordshire, Reino Unido) unido a un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E800. El láser era un láser de gas mixto de argón/criptón con longitudes de onda de excitación para FITC a 488 nm( $\lambda$ ). Se utilizó el software LaserSharp (Bio-Rad) para establecer condiciones óptimas para la recolección de imágenes. Las condiciones óptimas para las imágenes confocales de GFAP-inmunoreactividad (IR) o CD45-IR fueron las siguientes: la lente era un objetivo 20x (Nikon; Plan Apo 20x/0,75); la potencia del láser era del 10% o 20%; el aumento fue de 34,7; el desfase fue de 0,0; el factor de zoom fue 3; la velocidad de escaneo fue de 500 líneas/s; cada sección óptica fue escaneada tres veces y después se empleó el filtrado de Kalman para reducir el ruido; el tamaño de la imagen fue de 512x512 píxeles y el tamaño del pixel fue de 0,48x0,48  $\mu$ m.

#### 1.8 Análisis estadístico después de la inmunización con ACI-DS-01.

Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estándar (SD) o error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t desapareada de dos colas. Se consideró significativa una probabilidad de  $p < 0,05$ .

#### Ejemplo 2 La inmunización con ACI-DS-01 produjo anticuerpos anti-A $\beta$ de ratón

La vacuna liposomal ACI-DS-01 se preparó según la metodología SupraAntigen™ (WO 2005/081872, WO2007/068411) con péptido A $\beta$ 1-15 tetrapalmitoilado de ratón (Palm1-15), H-Lys(Pal)-Lys(Pal)-Asp-Ala-Glu-Phe-Gly-His-Asp-Ser-Gly-Phe-Glu-Val-Arg-His-Gln-Lys(Pal)-Lys(Pal)-OH incrustado en liposomas junto con lípido A monofosforilado (MPLA), (Figura 1). Se administraron seis dosis de ACI-DS-01 por vía subcutánea y cada dos semanas a ratones machos Ts65Dn y ratones control de la misma edad (2N). El análisis del plasma recogido después de la 4ª dosis, mostró títulos robustos de IgG contra A $\beta$ 40 o A $\beta$ 42 de ratón en los ratones inmunizados de los grupos tanto Ts65Dn como 2N (Figura 2A y 2B). Los anticuerpos inducidos por la vacuna permanecieron elevados incluso 40 días después de la última inmunización. No se detectaron títulos en ratones inmunizados con liposomas vacíos sin el antígeno (Figura 2A y 2B). Por lo tanto, ACI-DS-01 fue capaz de romper la autotolerancia hacia A $\beta$  en el modelo de ratón DS.

Se analizaron las subclases de IgG en plasma de ratones inmunizados con ACI-DS-01 después de la 4ª inmunización. El ELISA realizado con A $\beta$ 40 mostró que el grupo Ts65Dn tenía títulos de IgG2a más altos que el grupo 2N (Figura 2D), mientras que no hubo diferencia entre los dos grupos para los títulos de IgG1 e IgG2b (Figura 2C y 2E) (ANOVA de una vía, post hoc de Tukey;  $P=0,05$ ). Los títulos de IgG3 fueron más bajos en el grupo Ts65Dn (Figura 2F) (ANOVA de una vía, post hoc de Tukey;  $P < 0,001$ ). Los títulos de IgM fueron ligeramente más bajos, pero significativos, en los

ratones Ts65Dn en comparación con los ratones 2N (Figura 2G). Allí (ANOVA de una vía, post hoc de Tukey;  $P=0,05$ ). Se obtuvieron resultados similares en el ELISA realizado con A $\beta$ 42 (datos no mostrados).

Es poco probable que los niveles más bajos de algunos de los títulos mencionados anteriormente en ratones Ts65Dn se deban a la capacidad de respuesta inmunitaria de Ts65Dn, ya que el nivel de IgG anti-MPLA fue comparable en todos los ratones (Figura 2H).

Ejemplo 3 La inmunización con ACI-DS-01 recuperó el déficit de memoria de los ratones Ts65Dn

Los ratones Ts65Dn presentan muchas características de anomalías cognitivas del DS, tal como deterioro de la memoria y actividades anormales. Para investigar la eficacia de la vacuna ACI-DS-01, se llevó a cabo una serie de ensayos de comportamiento dos semanas después de la última inmunización. Los ratones realizaron los ensayos en el siguiente orden; campo abierto, reconocimiento de objetos, laberinto en T y condicionamiento del miedo.

El análisis del ensayo de campo abierto mostró que los ratones Ts65Dn tienen una actividad locomotora espontánea significativamente mayor en comparación con los ratones 2N (datos no mostrados). Después de la inmunización con ACI-DS-01, los ratones Ts65Dn continuaron siendo significativamente más activos que los ratones 2N tratados con ACI-DS-01 (Fig. 3A, prueba t desapareada de una cola;  $p=0,0004$ ). En el laberinto en T, los ratones 2N y Ts65Dn no mostraron diferencias significativas en la relación de la alteración o en la duración de la alteración, ni antes del tratamiento ni después del tratamiento (datos no mostrados).

Se midió la capacidad de memoria espacial en el reconocimiento de objetos (ORT). Los ratones Ts65Dn ejercen una relación de discriminación débil y, por lo tanto, reconocen mal el objeto nuevo. Los ratones Ts65Dn tratados con ACI-DS-01 mostraron una relación de discriminación más alta que indica que el tratamiento condujo a una mejoría significativa de la memoria (Fig. 3B, prueba t desapareada de una cola;  $p=0,03$ . ANOVA de una vía, genotipo,  $P=0,12$ , vacuna,  $P=0,002$ . Interacción  $P=0,54$ ). Curiosamente, se observaron los mismos resultados en el grupo 2N.

El ensayo de condicionamiento del miedo consiste en sesiones de entrenamiento, nemotécnicas y contextuales. Se observó el mismo nivel de congelación en todos los grupos durante el entrenamiento o la sesión nemotécnica (Figura 3C). Durante la sesión contextual, los ratones Ts65Dn tratados con la vacuna vacía (solo el liposoma, sin antígeno) mostraron un porcentaje de congelación menor que los ratones 2N control. Por el contrario, después de la inmunización, los ratones Ts65Dn demostraron una congelación mejorada y alcanzaron un nivel comparable a los ratones 2N (prueba t desapareada de una cola;  $P=0,04$ . (ANOVA de una vía, genotipo,  $P=0,01$ , vacuna,  $P=0,16$ . Interacción  $P=0,33$ ). Esto sugiere que la inmunización fue eficiente y mejoró la capacidad de memoria de los ratones Ts65Dn.

En resumen, estos resultados indican que el tratamiento con ACI-DS-01 puede recuperar el déficit de memoria de los ratones Ts65Dn.

Ejemplo 4 Mecanismo de la vacuna ACI-DS-01 para mejorar la deficiencia cognitiva.

Para abordar la pregunta sobre el efecto de los anticuerpos inducidos por ACI-DS-01 en el nivel de A $\beta$ , se realizó ELISA utilizando extractos de proteínas del hipocampo, la corteza y el cerebelo. Ninguna de estas regiones mostró una diferencia significativa en los niveles de A $\beta$  después del tratamiento con ACI-DS-01; ni para A $\beta$ 40 ni para A $\beta$ 42 (Figura 4A). Vale la pena señalar que la relación A $\beta$ -40/42 en la corteza y el cerebelo está correlacionado significativamente con un índice de reconocimiento más alto (RI) (Figura 4B y 4C. Corteza; correlación de Pearson  $r=-0,3248$ ,  $P=0,003$ . Cerebelo; correlación de Pearson  $r=-0,4127$ ,  $P=0,009$ ). Estos resultados sugieren que la A $\beta$ -40/42 podría ser responsable del déficit cognitivo. Un análisis adicional mostró que A $\beta$ 42 era detectable en el plasma. Por el contrario, un aumento del nivel de A $\beta$ 40 en el plasma pareció estar asociado con los valores más altos de IgG anti-A $\beta$  medidos en el grupo de ratones Ts65Dn tratados con ACI-DS-01 (Figura 4D; correlación de Pearson  $r=0,51$ ,  $P=0,09$ ). Además, el RI está correlacionado con los títulos de IgG anti-A $\beta$  (Figura 4E; correlación de Pearson  $r=0,3154$ ,  $P=0,007$ ).

Estos resultados sugieren que los anticuerpos inducidos por ACI-DS-01 pueden eliminar el A $\beta$  del cerebro al plasma, que puede conducir después a una mejora de la memoria.

Ejemplo 5 Morfología de las neuronas en modelos de ratón del síndrome de Down

Se analizaron el tamaño, el número y la densidad óptica de la neurona colinérgica en el cerebro anterior basal (BFCN). Se tiñeron dos secciones del nivel del BFCN con el anticuerpo ChAT (Millipore, Cat#AB144P, lote#2010060). Se escaneó el área del septum medio (MS) en un microscopio confocal para la evaluación cuantitativa. Se calcularon los siguientes parámetros 1) densidad de células ChAT+ en el MS; 2) área de las neuronas individuales ChAT+, y 3) media de la densidad óptica de ChAT en neuronas individuales. Se capturaron imágenes de las neuronas colinérgicas en el septum medio y se utilizó el software ImageJ para contar el número de neuronas, revelar la densidad óptica de la tinción y delinear el área del cuerpo celular.

Resultados: El número de células ChAT+ en el septum medio y la densidad óptica fue similar en los ratones 2N y Ts65Dn tratados con la vacuna vacía (Figura 9A y 9B).

El número de células ChAT+ en el septum medio fue similar en ratones 2N y Ts65Dn tratados con ACI-DS-01 (Figura 9A) (2N-Vacío=27,5±7,2 por 100 micrómetros de sección; Ts65Dn-Vacío=23,9±7,0; 2N-ACI-DS-01=36,6±4,6; Ts65Dn-ACI-DS-01=20,9±6,6). La densidad óptica de la tinción en células individuales ChAT+ en el septum medio también fue similar en ratones 2N y Ts65Dn tratados con ACI-DS-01 (Figura 9B) (2N-Vacío=79,9±3,5 unidad arbitraria; Ts65Dn-Vacío=74,7±2,6; 2N-ACI-DS-01=71,9±2,6; Ts65Dn-ACI-DS-01=75,8±4,5). El área del cuerpo celular ChAT+ en el septum medio fue más baja en ratones Ts65Dn que en 2N (Figura 9C). El área del cuerpo celular ChAT+ en el septum medio de los ratones tratados con Ts65Dn-ACI-DS-01 aumentó significativamente en comparación con los Ts65Dn vacíos tratados con vehículo (Ts65Dn-Vacío=179±6 microm<sup>2</sup>; Ts65Dn-ACI-DS-01=201±8, p=0,031). Los ratones 2N y Ts65Dn tratados con ACI-DS-01, tenían un área similar del cuerpo celular (2N-ACI-DS-01=208±8 microm<sup>2</sup>; Ts65Dn-ACI-DS-01=201±8, p=0,55) (Figura 9C). Esto señala la recuperación del área del cuerpo celular en células ChAT+ en el septum medio tras el tratamiento con ACI-DS-01. De manera equivalente, estos resultados son una indicación de la seguridad de la vacuna ACI-DS-01 ya que el número de células ChAT+ no cambió después de la inmunización con la vacuna. Estos estudios morfológicos mostraron una menor atrofia de las neuronas después de la inmunización con ACI-DS-01, que indica que esta vacuna se podría utilizar para la prevención de la neurodegeneración.

Ejemplo 6 La seguridad de la vacuna liposomal ACI-DS-01.

Para determinar si la inmunización con ACI-DS-01 puede inducir problemas de seguridad, se registraron el peso corporal, la observación general y los marcadores de inflamación en los ratones. Antes del tratamiento, los ratones Ts65Dn tenían un peso corporal significativamente menor que los ratones 2N (ANOVA, post hoc de Tukey, p=0,001). La inmunización no alteró significativamente el peso corporal (Figura 5A). Los pesos cerebrales fueron similares en los cuatro grupos de ratones (Figura 5A). Los resultados de la inmunohistoquímica no mostraron diferencias en el número de células astrogiales positivas para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) o de células microgliales positivas para CD45. Los resultados obtenidos fueron similares en la corteza y el hipocampo (Figura 5). Estos resultados indican que la vacunación con ACI-DS-01 no indujo una respuesta inflamatoria.

Para verificar la especificidad de los anticuerpos inducidos por ACI-DS-01, se llevó a cabo un estudio de reacción cruzada. Se tiñeron las secciones del cerebro de 2N y Ts65Dn con el antisuero de ratones 2N tratados con ACI-DS-01.

En resumen, estos signos indican que ACI-DS-01 es una vacuna segura.

Ejemplo 7: Metodología general para experimentos con las vacunas ACI-DS-02 y ACI-DS-03

7.1 Inmunización con la vacuna ACI-DS-02 y ACI-DS-03

Los ratones macho Ts65Dn (Jax laboratory B6EiC3Sn.BLiA-Ts(1716)65Dn/DnJ) de 4±0,3 meses de edad al inicio del estudio, recibieron inmunizaciones subcutáneas (s.c.) con 200 µl de ACI-DS-02 (18,6 µg por dosis de péptido Aβ22-39 dipalmitoilado) (n=6, ratones Ts65Dn) o PBS (n=4, ratones Ts65Dn). Se realizaron un total de cuatro inyecciones los días 1, 14, 28 y 42. Se realizaron las sangrías en la cola una semana después de cada inmunización; día 7, 21, 35 y 49.

Se realizó el mismo procedimiento para la inmunización con la vacuna ACI-DS-03 (38,6 µg por dosis de Pal14-29, péptido Aβ14-29 tetrapalmitoilado) (n=7, ratones Ts65Dn) o PBS (n=4, ratones Ts65Dn).

Los ratones de la camada control (n=7, ratones 2N) recibieron inyecciones similares pero con PBS.

7.2 Cuantificación de anticuerpos Aβ específicos de ratón

Se determinaron mediante ELISA las respuestas de IgG específicas para Aβ1-42. Brevemente, las placas se recubrieron con 10 µg/ml de Aβ1-42 humano (Bachem H1368, lote: 1000255) durante la noche a 4°C. Después de lavar con PBS-Tween 20 al 0,05% y bloquear con BSA al 1%, se añadieron a las placas diluciones seriadas de plasma y se incubaron a 37°C durante dos horas. Se utilizó como control positivo el anticuerpo anti-Aβ 6E10 (6E10 de Covance SIG-39320, lote: 09GC01254, un vial, 1 mg/ml diluido 1000x). Después del lavado, las placas se incubaron con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (Jackson ImmunoResearch West Grove, PA, EE.UU., Cat. N°115-055-164 Lote 87821, vial diluido a 1/4000) durante dos horas a 37°C. Después del lavado final, las placas se incubaron durante 2 horas y media con sustrato AP (pNPP) y se leyeron a 405 nm utilizando un lector de placas ELISA. Los resultados se expresan como densidad óptica (O.D).

7.3 Ensayos de comportamiento

Todos los ratones fueron expuestos a la misma serie de ensayos de comportamiento comenzando alrededor de los 6±0,3 meses de edad. Todos los ensayos de comportamiento tuvieron lugar durante el ciclo de luz diurna entre las 7:00 a.m. y 7:00 p.m. y se realizaron a temperatura ambiente (22°C).

7.3.1 Tarea de reconocimiento espacial de objetos

Antes del ensayo, los ratones se habituaron en una cámara de polipropileno gris (diámetro 40 cm, altura 32,4 cm) durante 10 minutos sin ningún objeto bajo condiciones de luz ambiental tenue. Al día siguiente, y durante la sesión de

aprendizaje, se presentaron (10 minutos) dos objetos idénticos (cubo de Lego o botella de vidrio negro) en un lado del laberinto. El ensayo de retención se realizó 3 horas después del aprendizaje, uno de los objetos idénticos se mueve al lado opuesto del laberinto y se presenta durante 10 min. Todas las sesiones se grabaron con el software de seguimiento de video Ethovision XT 8.0. Los parámetros medidos incluyeron el tiempo medio de exploración total de los objetos de la muestra, tanto nuevos como familiares, y la relación de discriminación (interacción del objeto nuevo/interacción total con ambos objetos).

### 7.3.2 Tarea de memoria del Laberinto de agua

Se llevó a cabo el laberinto de agua para analizar la memoria a largo plazo. Como un ensayo de habituación, los ratones se sometieron en el primer día a un laberinto de agua (diámetro: 165 cm, altura: 64 cm) con una plataforma visible nemotécnica (diámetro 11 cm, altura: 37 cm). Este ensayo consistió en 5 experimentos de 120 segundos cada uno con 30 minutos de intervalo entre ensayos. El 6º experimento final se llevó a cabo sin la plataforma visible nemotécnica. Al día siguiente, los ratones se sometieron a 4 días de entrenamiento con una plataforma oculta. En cada día, los ratones realizaron 6 experimentos cada uno de 120 segundos y con un intervalo entre experimento de 30 minutos. Al comienzo de un experimento, se coloca un ratón en el agua frente al borde del tanque, en uno de los 4 puntos de inicio (noreste, sureste, suroeste y noroeste). Se cambian los puntos de partida de experimento a experimento, mientras que la plataforma de escape está fija (cuadrante oeste) a lo largo del experimento. Si el ratón encuentra la plataforma en 120 segundos, se le permite permanecer en la plataforma durante 15 segundos. Si no logra encontrar la plataforma en 120 segundos, se detiene el experimento y el ratón se guía cuidadosamente a la plataforma y se deja allí durante 15 segundos. Los parámetros medidos incluyeron el tiempo de latencia de escape (sg) empleado en las diferentes partes del laberinto, número de entradas en cada cuadrante del laberinto, distancia recorrida (cm) en cada cuadrante del laberinto, distancia al área objetivo (cm), % de tiempo en cada cuadrante, % de tiempo en la plataforma objetivo extendida en forma de corona circular durante el experimento de sonda, número de cruces de la plataforma objetivo extendida en forma de corona circular durante el experimento de sonda y la velocidad (cm/s).

### 7.3.3 Ensayo de condicionamiento del miedo contextual

Se llevó a cabo el condicionamiento del miedo contextual y nemotécnico para la evaluación del aprendizaje y la recuperación dependientes del miedo. El ensayo se realizó utilizando cámaras de Med Associates Instruments. En el primer día, los ratones se colocaron en una cámara (Contexto A) durante 2 minutos para el registro de base, seguido de cuatro emparejamientos de tono-choque (estímulos condicionados, CS). El estímulo de choque a 30 segundos del estímulo de tono (5000 Hz, 80 dB) co-terminó con 2 segundos de descarga en la pata (0,7 mA) en cada emparejamiento de estímulo condicionado/incondicionado. En el segundo día, los ratones se colocaron en el contexto A durante 5 minutos sin ningún estímulo condicionado o incondicionado. En el último día del experimento, se utilizó una cámara nueva (Contexto B; nueva sala, nuevo entorno olfativo, nueva textura de suelo, inserciones de plástico azul para paredes, fuente adicional de luz azul y señales visuales) para los ensayos nemotécnicos. Después de un período de tono previo de 2 minutos, se presentaron tres tonos sin choques a los animales durante el período de ensayo de 8 minutos. Se definió la congelación como la falta total de movimiento durante un mínimo de 0,75 segundos. Se describió el porcentaje de congelación en cada periodo.

### 7.4 Inmuno-tinción de placas amiloides en muestras de cerebro humano con DS con anticuerpos anti-A $\beta$ inducidos por las vacunas ACI-DS-02 y ACI-DS-03.

Se tiñeron secciones de cerebro de personas con DS con anticuerpos anti-A $\beta$  derivados de la vacuna en sueros obtenidos de ratones inmunizados con la vacuna ACI-DS-02. Se utilizó un conjunto de sueros de cinco ratones c57BL/6 inmunizados con la vacuna ACI-DS-02 a una dilución de 1/100 para el procedimiento de inmuno-tinción. Brevemente, se incubaron criosecciones de 10  $\mu$ m de un individuo con DS de 59 años de edad en paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich, 252549) durante 20 minutos. Después de la incubación en ácido fórmico al 70% (Merck, 1.00264.1000) y Triton X-100 al 10% (Sigma, 234729) cada una durante 15 minutos, se bloquearon las secciones durante 2 horas en suero de cabra normal al 10% (NGS, Invitrogen, 6210072) en PBST (PBS más Triton X-100 al 0,5%). La incubación con el anticuerpo primario (sueros de ratones inmunizados) en PBST con NGS al 10% se realizó durante la noche. Al día siguiente, y después de lavar en PBSA, se incubaron las secciones con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón AffiniPure conjugada con Alexa Fluor 488 (Jackson ImmunoResearch, 115-545-146). Las secciones se montaron en ProLong Gold (Invitrogen, P36931). Como control positivo, se utilizó el anticuerpo primario anti-A $\beta$  6E10 (Covance, SIG-39320, anti-A $\beta$  contra el extremo N-terminal de A $\beta$  utilizando una dilución de 1:10000). Se utilizaron sueros de ratones c57BL/6 inmunizados con PBS como control negativo. Se utilizaron sueros de ratones c57BL/6 inmunizados con ACI-24 como un control. La vacuna ACI-24 corresponde a la vacuna ACI-DS-01 con la diferencia de que el antígeno utilizado en ACI-24 es una secuencia A $\beta$ 1-15 humana, mientras que la vacuna ACI-DS-01 contiene la secuencia A $\beta$ 1-15 de ratón como el antígeno (para los tres aminoácidos diferentes en esos dos antígenos, véase la Figura 1).

### 7.5 Análisis estadístico

Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estándar (SD) o error estándar de la media (SEM). Se realizó el análisis estadístico mediante una prueba t desapareada de dos colas o ANOVA utilizando GraphPad Prism versión 5. Se consideró significativa una probabilidad de  $p < 0,05$ .

Ejemplo 8 La inmunización con ACI-DS-02 produjo anticuerpos anti-A $\beta$  humanos

Se administraron cuatro dosis de ACI-DS-02 por vía subcutánea y cada dos semanas a ratones machos Ts65Dn y ratones control 2N de la misma edad. El análisis del plasma recogido 7 días después de cada dosis, mostró títulos de IgG contra A $\beta$ 42 humano en los ratones inmunizados de los grupos tanto Ts65Dn como 2N (datos no mostrados). Los títulos de IgG de ratones Ts65Dn inmunizados con ACI-DS-02 fueron significativamente diferentes de los inmunizados con PBS en los días 21 y 35 (ANOVA de una vía, post hoc de Tukey, P=0,01 y 0,05 respectivamente). Por lo tanto, ACI-DS-02 fue capaz de romper la autotolerancia hacia A $\beta$  en el modelo de ratón DS.

Se analizaron los títulos de IgM en plasma de ratones inmunizados con la vacuna ACI-DS-02. El ELISA realizado con A $\beta$ 42 mostró que el grupo Ts65Dn inmunizado tenía títulos de IgM más altos que el grupo inmunizado con PBS el día 7, el día 35 y el día 49 (ANOVA de una vía, post hoc de Tukey, P<0,01, P<0,05 y P<0,01 respectivamente, datos no mostrados.)

Ejemplo 8 Los anticuerpos anti-A $\beta$  humanos derivados de ACI-DS-02 reconocen las placas amiloides del DS

El experimento de inmuno-tinción mostró que los anticuerpos derivados de ACI-DS-02 se unen a las placas amiloides en las muestras del cerebro de personas con DS (Figura 6). La tinción fue similar a la tinción obtenida con 6E10, un anticuerpo anti-beta amiloide disponible comercialmente, y con anticuerpo derivado de ACI-24. La vacuna ACI-24 corresponde a la vacuna ACI-DS-01 con la diferencia de que el antígeno utilizado en ACI-24 es una secuencia A $\beta$ 1-15 humana, mientras que la vacuna ACI-DS-01 contiene la secuencia A $\beta$ 1-15 de ratón como el antígeno (para los tres aminoácidos diferentes en esos dos antígenos, véase la Figura 1). No se observó tinción cuando se incubó una sección con sueros de ratones inmunizados con PBS. Este resultado indica que la inmunización con la vacuna ACI-DS-02 induce anticuerpos que reconocen las placas amiloides en el cerebro de las personas con DS.

Ejemplo 9 ACI-DS-02 mejora el aprendizaje asociativo en el ensayo de condicionamiento del miedo

Durante el ensayo de acondicionamiento, los ratones Ts65Dn inmunizados con la vacuna ACI-DS-02 mostraron una tendencia a niveles más altos de congelación después de recibir cada estímulo condicionado (Figura 7A). Fue significativamente diferente la congelación mejorada del grupo Ts65Dn inmunizado con PBS, solo en el tercer estímulo condicionado (CS3) (ANOVA bidireccional, tiempo, P<0,0001, una tendencia para la vacuna (P=0,09), los ensayos posteriores de Bonferroni mostraron P=0,05 en el CS3).

Se sabe que la sesión de aprendizaje está mediada por un mecanismo dependiente de la plasticidad sináptica (Johansen 2011). Sin embargo, se sabe que la memoria del miedo previamente adquirida (sesiones de contexto, nemotécnicas y de extinción) está mediada por un mecanismo neuronal diferente. Este resultado sugiere que la inmunización con ACI-DS-02 mejoró la fase de adquisición/entrenamiento de condicionamiento del miedo durante el cual se produce el aprendizaje.

Ejemplo 10 La inmunización con ACI-DS-03 produjo anticuerpos anti-A $\beta$  humanos.

Se administraron cuatro dosis de ACI-DS-03 por vía subcutánea y cada dos semanas a ratones machos Ts65Dn y ratones control 2N de la misma edad. El análisis del plasma recogido 7 días después de cada dosis, mostró títulos de IgG contra A $\beta$ 42 humano en los ratones inmunizados de los grupos tanto Ts65Dn como 2N (datos no mostrados). Los títulos de IgG de ratones Ts65Dn inmunizados con ACI-DS-03 fueron significativamente diferentes de los inmunizados con PBS en el día 21 (ANOVA de una vía, post hoc de Tukey, P=0,05). Por lo tanto, ACI-DS-03 fue capaz de romper la autotolerancia hacia A $\beta$  en el modelo de ratón DS.

Se analizaron los títulos de IgM en plasma de ratones inmunizados con la vacuna ACI-DS-03. El ELISA realizado con A $\beta$ 42 mostró que el grupo Ts65Dn inmunizado tenía títulos de IgM más altos que el grupo inmunizado con PBS en los días 7 y 49 (ANOVA de una vía, post hoc de Tukey, P<0,001 y P<0,01 respectivamente (datos no mostrados).

Ejemplo 11 Los anticuerpos anti-A $\beta$  humanos derivados de ACI-DS-03 reconocen las placas amiloides del DS

El experimento de inmuno-tinción mostró que los anticuerpos derivados de ACI-DS-03 se unen a las placas amiloides en el cerebro de las personas con DS (Figura 8). La tinción fue similar a la tinción obtenida con 6E10, un anticuerpo anti-beta amiloide disponible comercialmente, y con anticuerpo derivado de ACI-24. La vacuna ACI-24 corresponde a la vacuna ACI-DS-01 con la diferencia de que el antígeno utilizado en ACI-24 es una secuencia A $\beta$ 1-15 humana, mientras que la vacuna ACI-DS-01 contiene la secuencia A $\beta$ 1-15 de ratón como el antígeno (para los tres aminoácidos diferentes en esos dos antígenos, véase la Figura 1). No se observó tinción cuando se incubó la sección con sueros de ratones inmunizados con PBS. Este resultado indica que la inmunización mediante la vacuna ACI-DS-03 induce anticuerpos que reconocen las placas amiloides en el cerebro de las personas con DS.

Ejemplo 12 Espectroscopía infrarroja de reflectancia total atenuada

Se analizaron las muestras liposomales en el cristal de ZnSe con una película delgada hidratada con D<sub>2</sub>O de 15  $\mu$ l. Se obtuvieron los espectros con un espectrómetro BRUKER TENSOR 27 FTIR equipado con un detector de telururo de mercurio-cadmio enfriado con nitrógeno líquido y unido a un dispositivo BioATR-II. Para cada espectro, se

recogieron 2000 escaneos utilizando el cristal de ATR limpio como espectro de fondo con una resolución de  $2\text{ cm}^{-1}$ , promediado y procesado por FT. Los límites de plegado de frecuencia superior e inferior fueron  $4000\text{ cm}^{-1}$  y  $900\text{ cm}^{-1}$ . Se purgó continuamente la cámara de la muestra con aire seco y todas las medidas se realizaron a  $25^\circ\text{C}$ . Después, los espectros adquiridos se cortaron en la región amida I, la línea base se corrigió y se marcó. Se aplicaron técnicas de estrechamiento [segunda derivada y autodesconvolución de Fourier (FSD)] para revelar los componentes superpuestos de la banda ancha de la amida I. Se realizó una asignación cualitativa de la conformación secundaria principal desde las bandas principales detectadas utilizando los siguientes rangos de frecuencia en  $\text{D}_2\text{O}$ : lámina b  $1613\text{-}1637\text{ cm}^{-1}$ , espiral aleatoria  $1637\text{-}1646\text{ cm}^{-1}$ , a-hélice/bucles  $1646\text{-}1662\text{ cm}^{-1}$ , hélices b  $1662\text{-}1682\text{ cm}^{-1}$ , lámina b antiparalela  $1682\text{-}1698\text{ cm}^{-1}$ . Se realizó un análisis cuantitativo por ajuste de curvas con la aplicación correspondiente en el software OPUS, que utiliza las bandas identificadas en la 2ª derivada y los espectros FSD como valores iniciales para los componentes individuales. Se supuso que los picos de los componentes tenían una forma mixta gaussiana-loretziana. El procedimiento de repetición se llevó a cabo fijando las frecuencias y permitiendo variar las anchuras de pico, las intensidades y las formas y después, para el segundo procedimiento de repetición, también se permitió variar las frecuencias. Las estimaciones de la estructura secundaria se hicieron calculando el % del área de la región amida I total para cada banda de la estructura secundaria, suponiendo absorptividades molares iguales de los diferentes componentes.

### Lista de Referencias

1. Antonarakis, S.E., Lyle, R., Dermizakis, E.T., Reymond, A., Deutsch, S., 2004. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat. Rev. Genet.* 5, 725-738.
2. Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., Jones, E., 2011. Alzheimer's disease. *Lancet.* 377, 1019-1031.
3. Belichenko, N.P., Belichenko, P.V., Kleschevnikov, A.M., Salehi, A., Reeves, R.H., Mobley, W.C., 2009. The "Down syndrome critical region" is sufficient in the mouse model to confer behavioral, neurophysiological, and synaptic phenotypes characteristic of Down syndrome. *J Neurosci.* 29, 5938-5948.
4. Belichenko, P.V., Kleschevnikov, A.M., Salehi, A., Epstein, C.J., Mobley, W.C., 2007. Synaptic and cognitive abnormalities in mouse models of Down syndrome: exploring genotype-phenotype relationships. *J Comp. Neurol.* 504, 329-345.
5. Bevins, R.A., Besheer, J., 2006. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat. Protoc.* 1, 1306-1311.
6. Davisson, M.T., Schmidt, C., Reeves, R.H., Irving, N.G., Akeson, E.C., Harris, B.S., Bronson, R.T., 1993. Segmental trisomy as a mouse model for Down syndrome. *Prog. Clin. Biol. Res.* 384, 117-133.
7. Deacon, R.M., Rawlins, J.N., 2006. T-maze alternation in the rodent. *Nat. Protoc.* 1, 7-12.
8. Gilman, S., Koller, M., Black, R.S., Jenkins, L., Griffith, S.G., Fox, N.C., Eisner, L., Kirby, L., Boada, R.M., Forette, F., Orgogozo, J.M., 2005. Clinical effects of A $\beta$  immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology.*
9. Hunter, C.L., Bimonte-Nelson, H.A., Nelson, M., Eckman, C.B., Granholm, A.C., 2004. Behavioral and neurobiological markers of Alzheimer's disease in Ts65Dn mice: effects of estrogen. *Neurobiol. Aging.* 25, 873-884.
10. Johansen I.P., Cain C.K., Ostroff L.E. and LeDoux J.E., 2011. Molecular Mechanisms of Fear Learning and Memory. *Cell* 147
11. Lee, M., Bard, F., Johnson-Wood, K., Lee, C., Hu, K., Griffith, S.G., Black, R.S., Schenk, D., Seubert, P., 2005. A $\beta$ 42 immunization in Alzheimer's disease generates A $\beta$  N-terminal antibodies. *Ann. Neurol.* 58, 430-435.
12. Lemere, C.A., Blusztajn, J.K., Yamaguchi, H., Wisniewski, T., Saido, T.C., Selkoe, D.J., 1996. Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiol Dis.* 3, 16-32.
13. Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Oda, Y., Tomizawa, K., Gong, C.X., 2005. Truncation and activation of calcineurin a by calpain I in Alzheimer disease brain. *J. Biol. Chem.* 280, 37755-37762.
14. Liu, F., Liang, Z., Wegiel, J., Hwang, Y.W., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Ramakrishna, N., Gong, C.X., 2008. Overexpression of Dyrk1A contributes to neurofibrillary degeneration in Down syndrome. *FASEB J.* 22, 3224-3233.
15. Moncaster, J.A., Pineda, R., Moir, R.D., Lu, S., Burton, M.A., Ghosh, J.G., Ericsson, M., Soscia, S.J., Mocofanescu, A., Folkerth, R.D., Robb, R.M., Kuszak, J.R., Clark, J.I., Tanzi, R.E., Hunter, D.G., Goldstein, L.E., 2010. Alzheimer's disease amyloid-beta links lens and brain pathology in Down syndrome. *PLoS One* 5, e10659.
16. Monsonego, A., Maron, R., Zota, V., Selkoe, D.J., Weiner, H.L., 2001. Immune hyporesponsiveness to amyloid beta-

peptide in amyloid precursor protein transgenic mice: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 10273-10278.

17. Netzer,W.J., Powell,C., Nong,Y., Blundell,J., Wong,L., Duff,K., Flajolet,M., Greengard,P., 2010. Lowering beta-amyloid levels rescues learning and memory in a Down syndrome mouse model. *PLoS One* 5, e10943.

5 18. Nicolau,C., Greferath,R., Balaban,T.S., Lazarte,J.E., Hopkins,R.J., 2002. A liposome-based therapeutic vaccine against beta -amyloid plaques on the pancreas of transgenic NORBA mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 2332-2337.

10 19. O'Doherty,A., Ruf,S., Mulligan,C., Hildreth,V., Errington,M.L., Cooke,S., Sesay,A., Modino,S., Vanes,L., Hernandez,D., Linehan,J.M., Sharpe,P.T., Brandner,S., Bliss,T.V., Henderson,D.J., Nizetic,D., Tybulewicz,V.L., Fisher,E.M., 2005. An aneuploid mouse strain carrying human chromosome 21 with Down syndrome phenotypes. *Science*. 309, 2033-2037.

20. Prasher,V.P., 1993. Down's syndrome, longevity, and Alzheimer's disease. *Br. J Psychiatry*. 162, 711.

15 21. Prasher,V.P., 2004. Review of donepezil, rivastigmine, galantamine and memantine for the treatment of dementia in Alzheimer's disease in adults with Down syndrome: implications for the intellectual disability population. *Int. J Geriatr. Psychiatry*. 19, 509-515.

22. Rafii,M.S., 2010. The pulse of drug development for Alzheimer's disease. *Rev. Recent. Clin. Trials*. 5, 57-62.

23. Saxe,M.D., Battaglia,F., Wang,J.W., Malleret,G., David,D.J., Monckton,J.E., Garcia,A.D., Sofroniew,M.V., Kandel,E.R., Santarelli,L., Hen,R., Drew,M.R., 2006. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 103, 17501-17506.

20 24. Stanton L.R, Coetzee R.H . Down's syndrome and dementia. 10, 50-58. 2004. *Advances in Psychiatric Treatment*. Ref Type: Generic

25. Stoltzner,S.E., Grenfell, T.J., Mori,C., Wisniewski,K.E., Wisniewski,T.M., Selkoe,D.J., Lemere,C.A., 2000. Temporal accrual of complement proteins in amyloid plaques in Down's syndrome with Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol*. 156, 489-499.

26. Tapiola,T., Soininen,H., Pirttila,T., 2001. CSF tau and Abeta42 levels in patients with Down's syndrome. *Neurology*. 56, 979-980.

27. Weiner,H.L., Frenkel,D., 2006. Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Immunol*. 6, 404-416.

28. Fernandez F, Morishita W, Zuniga E, Nguyen J, Blank M, Malenka RC and Garner CC (2007)

30 29. Hanney M, Prasher V, Williams N, Jones EL, Aarsland D, Corbett A, Lawrence D, Yu LM, Tyrer S, Francis PT, Johnson T, Bullock R and Ballard C (2012) Memantine for Dementia in Adults Older Than 40 Years With Down's Syndrome (MEADOWS): a Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Lancet* 379:528-536.

35 30. Salehi A, Delcroix J-D, Belichenko P.V., Zhan K; Wu C., Valletta J C, Takimoto-Kimura R, Kleschevnikov A M, Sambamurti K, Chung PP, Xia W, VillarA, Campbell AW, Kulnane LS, Nixon RA, Lamb BT, Epstein CJ, Stokin GB, Goldstein L.S.B, Mobley W.C. (2006) Increased App Expression in a Mouse Model of Down's Syndrome Disrupts NGF Transport and Causes Cholinergic Neuron Degeneration, *Neuron*, 51, 29-42.

31. Salehi A, Faizi M, Colas D, Valletta J, Laguna J, Takimoto-Kimura R., Kleschevnikov A., Wagner S. L., Aisen P., Shamloo M., MobleyW. C (2009) Restoration of Norepinephrine-Modulated Contextual Memory in a Mouse Model of Down Syndrome, *Sci Transl Med* 1, 7ra17.

40 **Listado de Secuencias**

<110> AC Immune S.A.  
 PFEIFER, Andrea  
 MUHS, Andreas  
 45 MADANI, Rime  
 VASILYEVICH, Pavel Belichenko  
 MOBLEY, William

50 <120> Vacunoterapia

<130> T2817 PCT BS

<150> PCT/US2011/052992

<151> 2011-09-23

<160> 7

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

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

15

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

20

<400> 2

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

25

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 3

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

35

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40

<400> 4

Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met  
1 5 10 15

45

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met  
1 5 10 15

50

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

55

<400> 6

His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly  
1 5 10 15

60

ES 2 712 951 T3

<210> 7  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

5

<400> 7

His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly  
1                    5                    10                    15

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un péptido antigénico derivado de la proteína beta amiloide para uso en el tratamiento y/o alivio y/o prevención de deterioros o anomalías cognitivas y/o de la memoria en sujetos con síndrome de Down, en donde el péptido antigénico consiste en los restos A $\beta$ 1-15 y está modificado por un ácido palmítico unido al extremo N- y/o C-terminal del péptido y está reconstituido en un liposoma y dichos sujetos con síndrome de Down aún no han desarrollado placas asociadas a proteínas amiloides en el cerebro.
2. El péptido antigénico de la reivindicación 1, en donde el péptido A $\beta$ 1-15 está modificado con cuatro ácidos palmíticos unidos al extremo N- y/o C-terminal del péptido.
- 10 3. El péptido antigénico de la reivindicación 1, en donde el péptido A $\beta$ 1-15 está modificado con dos ácidos palmíticos unidos al extremo N- y/o C-terminal del péptido.
- 15 4. El péptido antigénico para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho deterioro o anomalía se refiere a un deterioro de la memoria de reconocimiento, un deterioro de la memoria asociativa contextual, un deterioro del aprendizaje asociativo, un deterioro de la memoria declarativa para hechos y eventos, deterioros de la memoria episódica, una disfunción del lenguaje, un deterioro visoespacial, una disminución de las funciones ejecutivas, cambios de personalidad, cambios emocionales, apraxia, deterioros para realizar tareas motoras aprendidas, signos piramidales y extrapiramidales, así como mioclonías o convulsiones, o una combinación de los mismos.
- 20 5. El péptido antigénico para uso según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4, en donde dicho sujeto con síndrome de Down es
- (a) un sujeto joven o de mediana edad; o
- (b) un sujeto de mediana edad; o
- (c) un sujeto joven; o
- (d) un sujeto de edad infantil, o,
- (e) un sujeto menor de 65 años.
- 25 6. El péptido antigénico para uso según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5, en donde dicho uso
- a) conduce a una mejora y/o recuperación de la memoria; y/o
- b) conduce a un aumento de la retención o una recuperación completa de la capacidad cognitiva en el sujeto tratado; y/o
- c) conduce a mejorar o recuperar la memoria y/o la capacidad cognitiva; y/o
- d) no induce efectos secundarios indeseados.
- 30 7. El péptido antigénico para uso según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6 para la prevención del desarrollo de placas asociadas a A $\beta$  en el cerebro.
- 35 8. Una composición que comprende el péptido antigénico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 7 en una cantidad terapéuticamente eficaz junto con un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento y/o alivio y/o prevención de deterioros o anomalías cognitivas y/o de la memoria en sujetos con síndrome de Down, en donde dichos sujetos con síndrome de Down aún no han desarrollado placas asociadas a proteínas amiloides en el cerebro.
9. La composición para uso según la reivindicación 8, que comprende un adyuvante.
10. La composición para uso según la reivindicación 9, en donde el adyuvante es el lípido A.
11. La composición para uso según la reivindicación 10, en donde el adyuvante es un lípido A destoxificado.
- 40 12. La composición para uso según la reivindicación 9, en donde el adyuvante es lípido A monofosforilado o difosforilado, alumbre, fosfato de calcio, interleucina 1 y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas.
13. El péptido antigénico para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, para la prevención de la neurodegeneración en un sujeto con síndrome de Down.
- 45 14. El péptido antigénico para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, para inducir una respuesta inmunitaria contra la proteína beta amiloide en un sujeto con síndrome de Down.

A $\beta$  humano: Asp- Ala- Glu- Phe- Arg- His- Asp- Ser- Gly- Tyr- Glu- Val- His- His- Gln  
A $\beta$  de ratón: Asp- Ala- Glu- Phe- Gly- His- Asp- Ser- Gly- Phe- Glu- Val- Arg- His- Gln

A $\beta$ 1-15 palmitoilado



Figura 1

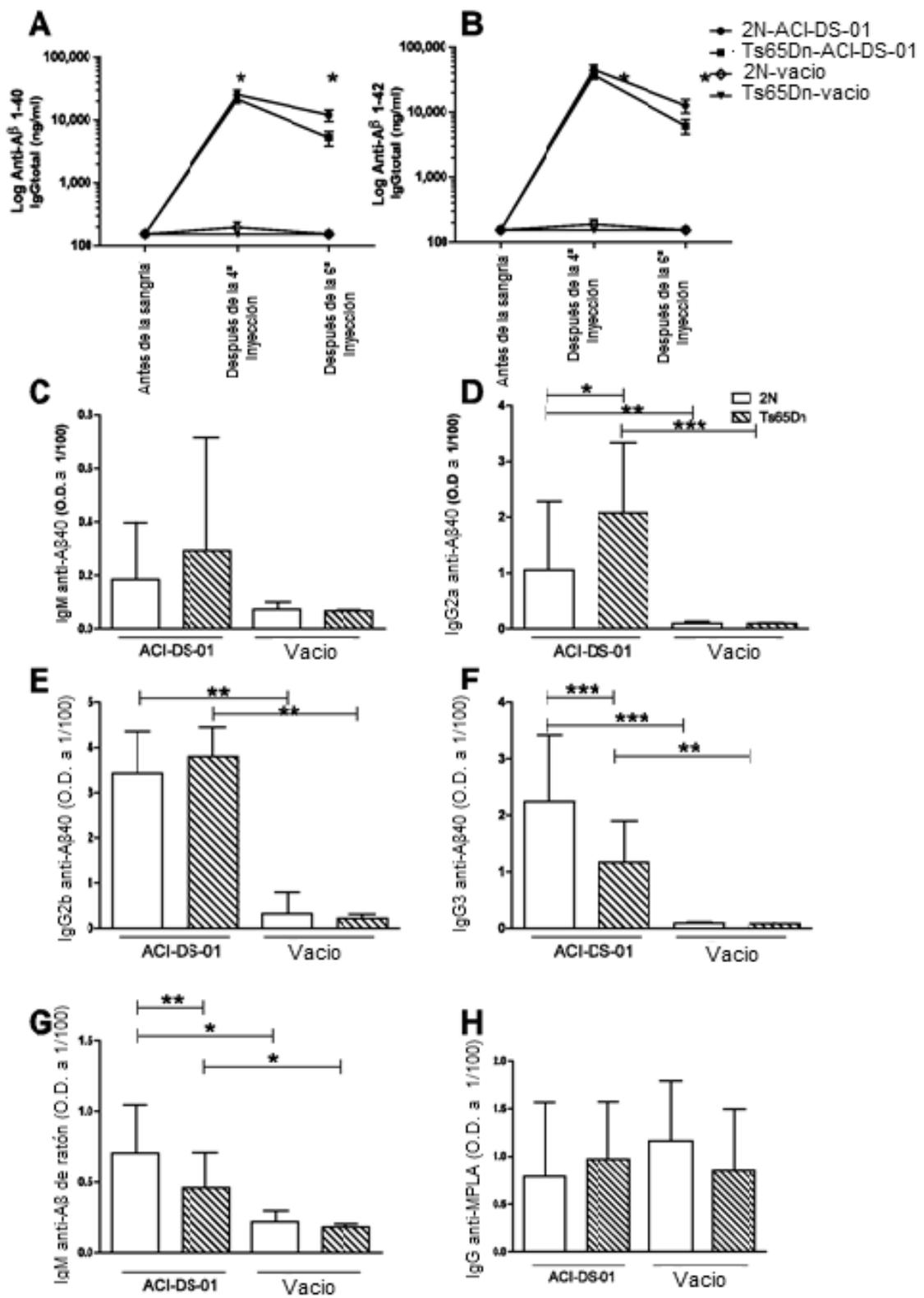


Figura 2

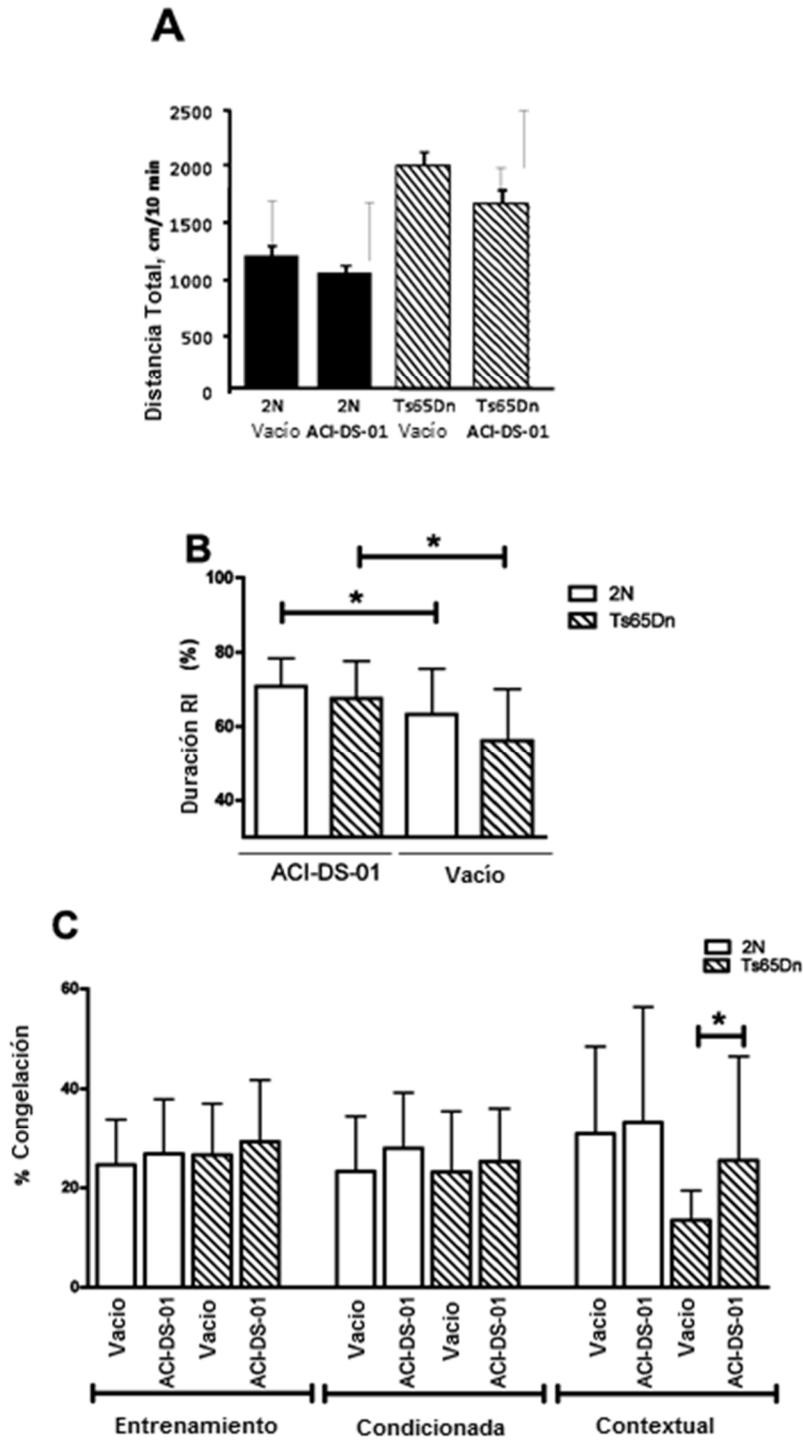


Figura 3

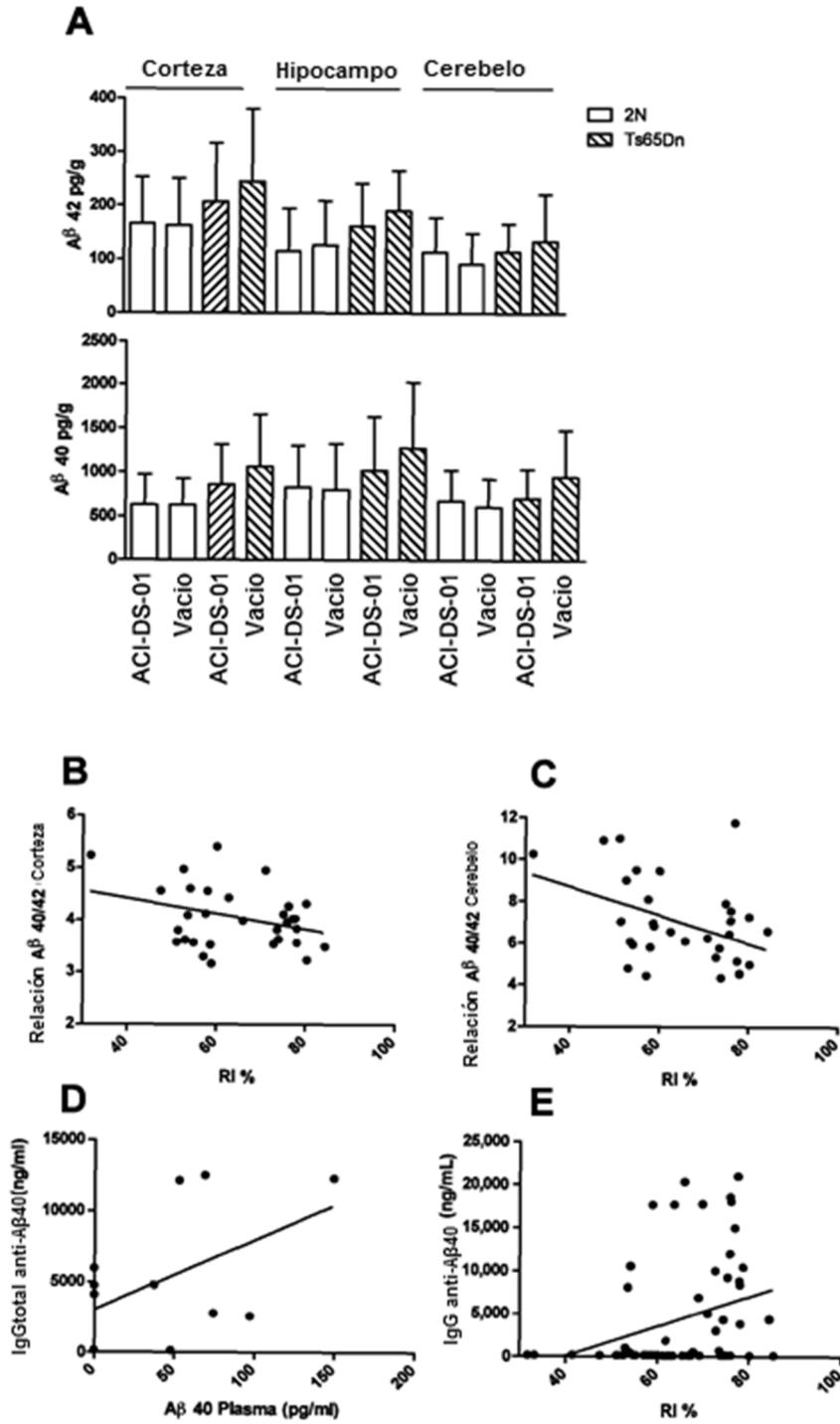
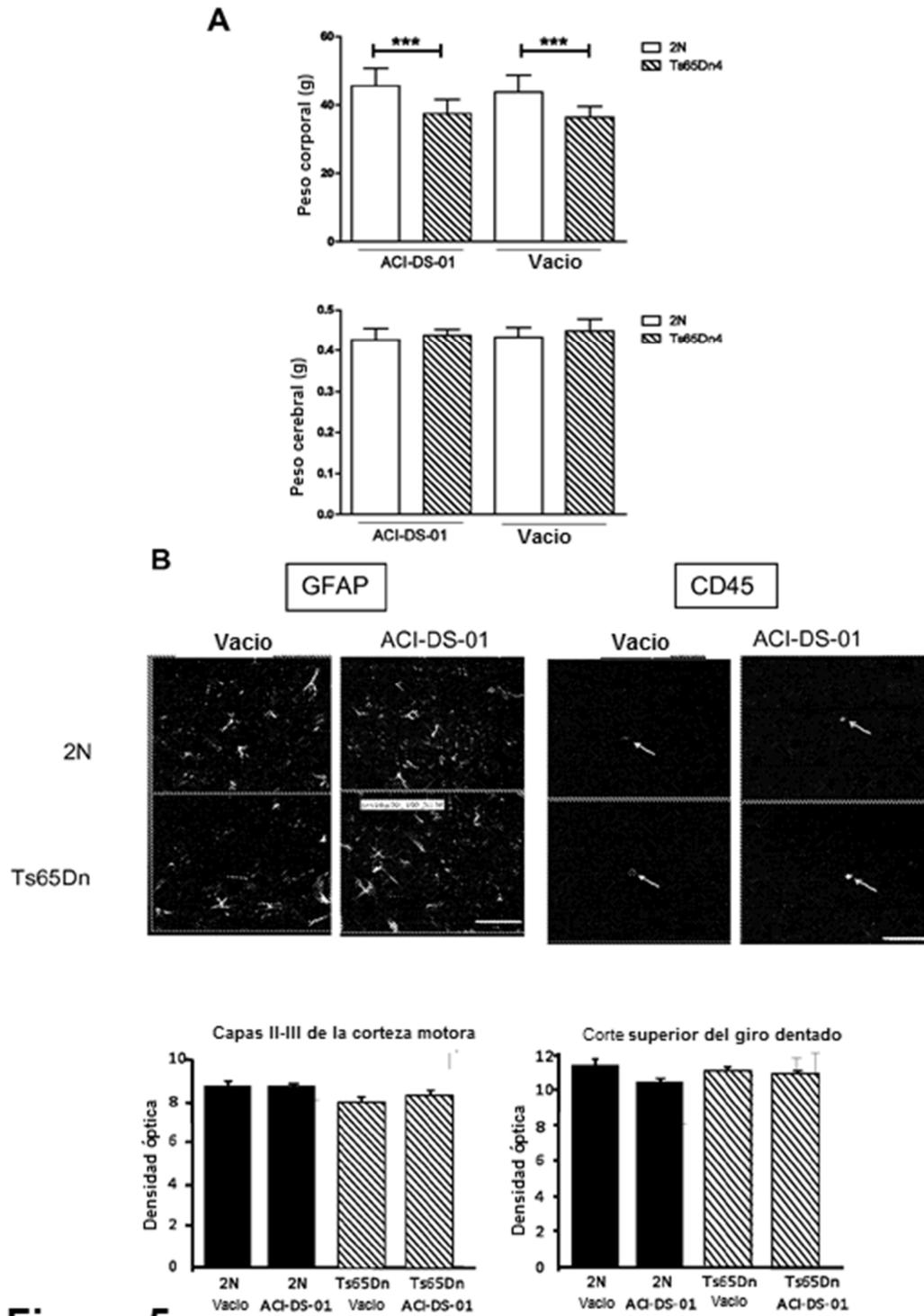


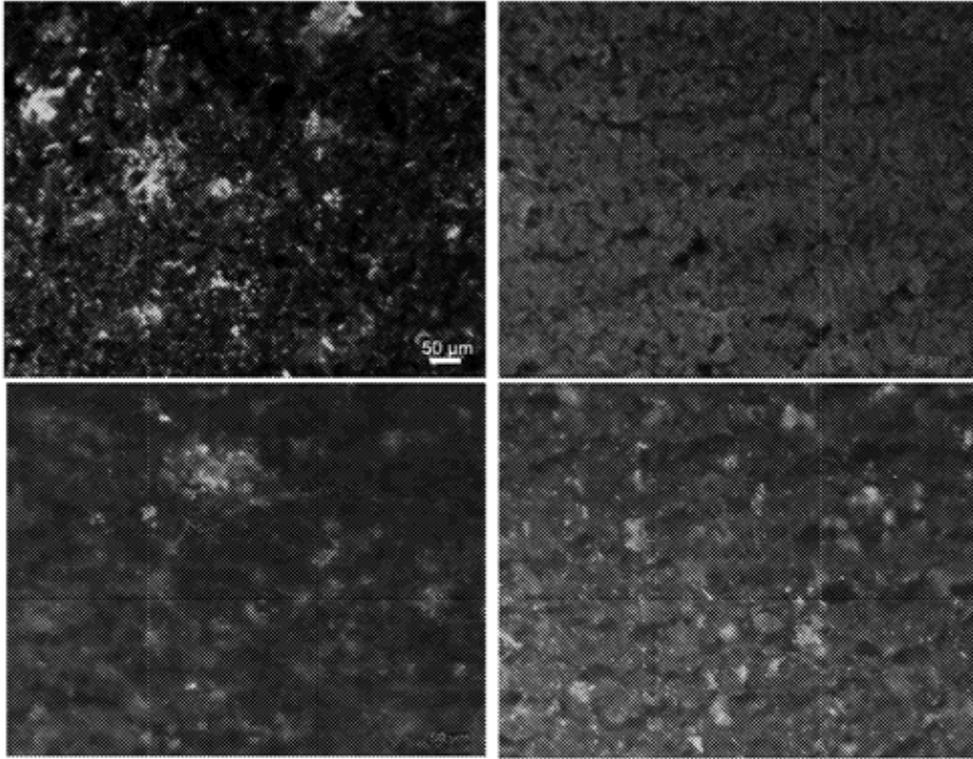
Figura 4



**Figura 5**

6E10

PBS



ACI-24

ACI-DS-02

Figura 6

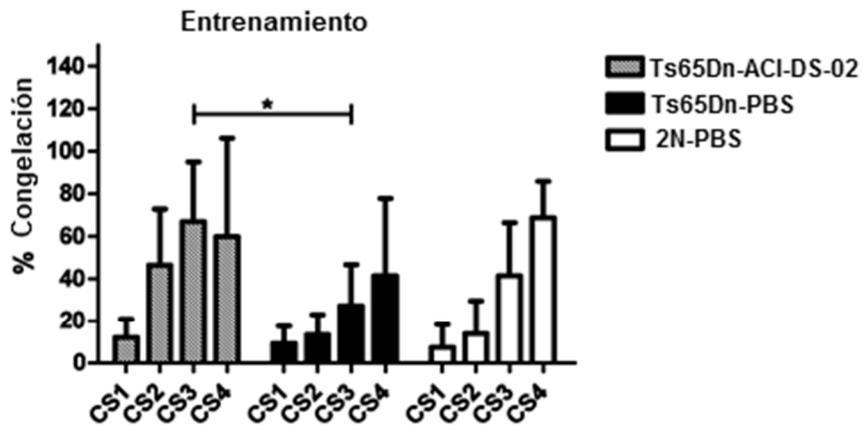
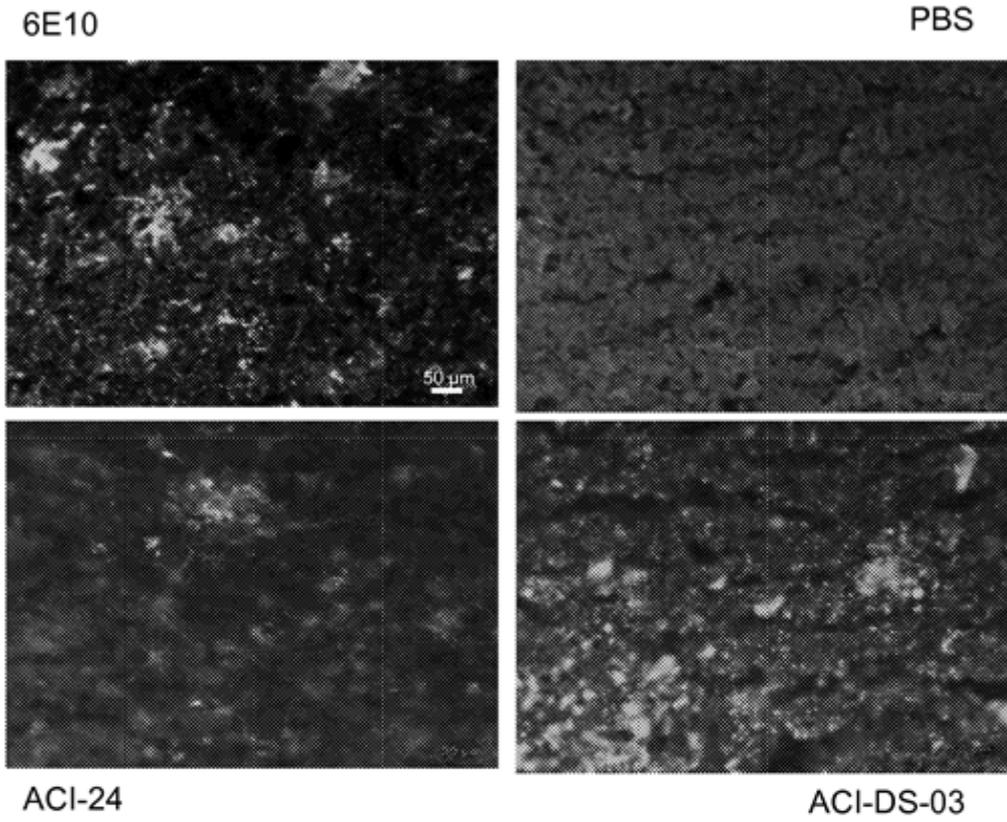


Figura 7



**Figura 8**

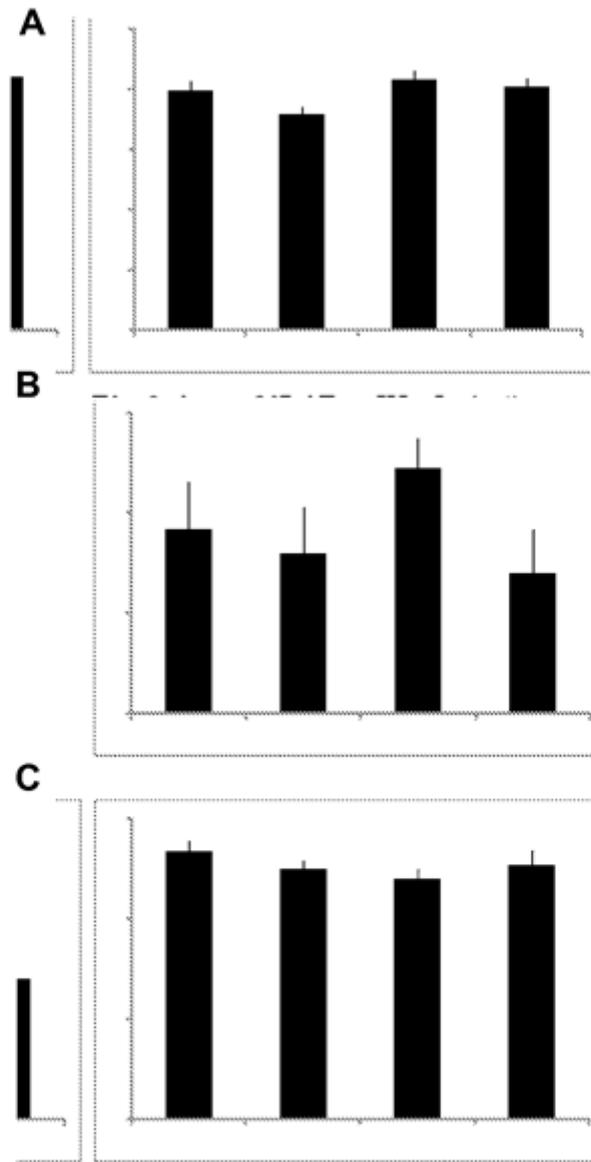


Figura 9