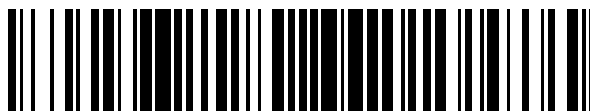


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 899**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 47/64 (2007.01)

A61K 38/03 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2017** **PCT/EP2017/053242**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.08.2017** **WO17140656**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2017** **E 17705112 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019** **EP 3390426**

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

30 Prioridad:

15.02.2016 ES 201630173

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

12.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SARASA BARRIO, MANUEL

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 747 899 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

Conjugado amiloide y usos y procedimientos del mismo

5 **Sector de la invención**

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

10

Antecedentes de la invención

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

15

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

20

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

25

La solicitud de Patente PCT con número de publicación WO 2005/072777 da a conocer conjugados para la inmunización activa o pasiva de pacientes, basados en el agente entrecruzante LPA del cual se destaca su capacidad de unir o presentar dos péptidos a la vez, haciéndolo conveniente para generar una respuesta inmune adecuada en pacientes. Dentro de la explicación general del conjugado basado en LPA se contempla que el péptido utilizado pueda ser un fragmento C-terminal de A β 42 o A β 40 y, de forma concreta, se mencionan y ejemplifican los fragmentos 33-42, 35-42, 36-42, 37-42, 38-42 y 39-42. Adicionalmente, dicho documento menciona que la proteína transportadora pueda ser KLH. En este mismo documento se describe la generación de otros conjugados, utilizando un agente entrecruzante diferente (N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato, comúnmente conocido SPDP por sus siglas en inglés).

30

El documento US2013/230545 A1 da a conocer una composición farmacéutica para uso en el tratamiento o prevención de enfermedades amiloides, la cual comprende un conjugado de al menos un péptido CisA β (33-40) (SEQ ID NO: 1) unido a la hemocianina de lapa californiana (KLH). El N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido butírico no se usa como agente entrecruzante.

35

El documento WO2015/01282287 A1 da a conocer que un péptido que contiene cisteína puede ser unido a KLH utilizando el agente entrecruzante N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido butírico. Sin embargo, dicho documento no menciona el uso del gel de hidróxido de aluminio como adyuvante.

40

50 **Breve descripción de la invención**

Los inventores, tras extensos y exhaustivos experimentos, han descubierto sorprendentemente que el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido butírico (en adelante, SM por sus siglas en inglés), un agente entrecruzante heterobifuncional, del que cada molécula del mismo une un péptido a la proteína transportadora, utilizado como agente entrecruzante para la preparación de conjugados del péptido CisA β (33-40) (SEQ ID NO: 1) y la KLH, produce conjugados que permiten generar una respuesta inmune muy superior a la producida por conjugados generados con otros agentes entrecruzantes homo o heterobifuncionales del estado de la técnica, tales como SPDP, que también permiten la unión de un péptido a la proteína transportadora. Dicha mejora se muestra claramente en los ejemplos 1 a 4 de la presente memoria descriptiva. Además, dichos ejemplos muestran que dichos nuevos conjugados o dichas composiciones farmacéuticas que comprenden dichos conjugados producen:

55

- una respuesta inmune lo más específica posible, con el fin de minimizar los efectos secundarios asociados al tratamiento de vacunación (preventivo o terapéutico);

60

- la mayor respuesta inmune posible, con el fin de asegurar una inmunización efectiva de los pacientes y

65

disminuir las dosis requeridas de conjugado inmunogénico.

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende un conjugado de al menos un péptido $\text{CisA}\beta(33-40)$ (SEQ ID NO: 1) unido a la hemocianina de lapa californiana (KLH), en el que el agente entrecruzante que conecta cada péptido $\text{CisA}\beta(33-40)$ a la hemocianina de lapa californiana (KLH) del conjugado, es el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido butírico (SM), en la que la composición comprende además gel de hidróxido de aluminio.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende i) un conjugado que comprende al menos un péptido $\text{CisA}\beta(33-40)$ (SEQ ID NO: 1) unido a la hemocianina de lapa californiana (KLH) y ii) gel de hidróxido de aluminio, en la que el agente entrecruzante que conecta cada péptido $\text{CisA}\beta(33-40)$ a la hemocianina de lapa californiana (KLH) del conjugado es el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido butírico (SM), y en la que el pH de la composición está en el intervalo entre 5,8 y 7,0.

Preferentemente, la composición farmacéutica mencionada anteriormente tiene un pH desde 6,2 a 7,0. También preferentemente, la composición farmacéutica tiene un pH desde 5,8 a 6,2.

Preferentemente, la composición farmacéutica mencionada anteriormente tiene una cantidad de péptido $\text{CisA}\beta(33-40)$ (SEQ ID NO: 1) de al menos 100 μg . También preferentemente, la composición farmacéutica tiene una cantidad de péptido $\text{CisA}\beta(33-40)$ (SEQ ID NO: 1) de al menos 150 μg . Más preferentemente, la cantidad de péptido $\text{CisA}\beta(33-40)$ (SEQ ID NO: 1) en la composición farmacéutica es de entre 150 μg a 400 μg . Aún más preferentemente, la cantidad de péptido $\text{CisA}\beta(33-40)$ (SEQ ID NO: 1) en la composición farmacéutica es de entre 160 μg a 240 μg .

Preferentemente, los conjugados en la composición farmacéutica a su vez comprenden una relación de al menos 45 péptidos $\text{CisA}\beta(33-40)$ (SEQ ID NO: 1) unidos a cada hemocianina de lapa californiana (KLH).

En otro aspecto, la presente invención da a conocer una ampolla de vidrio que comprende la composición farmacéutica, tal como se describe anteriormente.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento de fabricación de la composición farmacéutica mencionada anteriormente, el cual comprende las siguientes etapas:

- a. Añadir éster de N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido butírico (SM) a una solución que comprende hemocianina de lapa californiana (KLH) en un tampón a un pH entre 7,0 y 9,0;
- b. Eliminar el exceso de éster de N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido butírico de la solución de la etapa a);
- c. Añadir péptidos $\text{CisA}\beta(33-40)$ (SEQ ID NO: 1) en DMSO a la solución de la etapa b) a un pH entre 6,6 y 7,0 para producir los conjugados;
- d. Eliminar los péptidos libres de la solución de la etapa c);
- e. Opcionalmente filtrar la solución de la etapa d);
- f. Ajustar el pH de la solución de la etapa d) o e) a un rango de pH de entre 5,8 y 6,2; y
- g. Añadir gel de hidróxido de aluminio a la solución de la etapa f) una vez el pH haya sido ajustado.

Preferentemente, en dicho procedimiento el exceso de éster de N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido butírico en la etapa b) se elimina utilizando tampón Na-fosfato a una concentración de 0,02 M y un pH de aproximadamente 6,6 a 7,0 o utilizando tampón PBS a una concentración de 0,01 M y un pH de 6,6 a 7,0.

Preferentemente, en el procedimiento de la presente invención la solución se filtra en la etapa e) utilizando un filtro de aproximadamente 0,2 μm .

Preferentemente, en el procedimiento de la presente invención el pH de la etapa f) se ajusta a un rango de pH de aproximadamente 6,0.

Preferentemente, la composición farmacéutica mencionada anteriormente o la ampolla de vidrio se utilizan en el tratamiento o prevención de una enfermedad amiloide. Más preferentemente, la enfermedad amiloide se selecciona de la lista que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, angiopatía cerebral amiloide, demencia vascular de origen amiloide, miositis por cuerpos de inclusión y demencia con Cuerpos de Lewy. Aún más preferentemente, la enfermedad amiloide es la enfermedad de Alzheimer.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Tal como se utiliza en el presente documento "enfermedad amiloide" y su plural, se refieren a enfermedades asociadas con la acumulación de β -amiloide. Dicha acumulación se puede dar fundamentalmente en el cerebro,

produciendo enfermedades entre las que encontramos la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la angiopatía cerebral amiloide, la demencia vascular de origen amiloide y la demencia con Cuerpos de Lewy. La acumulación de β -amiloide también se puede dar fundamentalmente en el músculo esquelético, produciendo la miositis por cuerpos de inclusión.

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

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

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

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

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

Descripción

La invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende i) un conjugado que comprende al menos un péptido CisA β (33-40) (SEQ ID NO: 1) unido a la hemocianina de lapa californiana (KLH) y ii) gel de hidróxido de aluminio, en la que el agente entrecruzante que conecta cada péptido CisA β (33-40) a la hemocianina de lapa californiana (KLH) del conjugado es el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido butírico (SM).

Se observa que, tal como se muestra en el ejemplo 5, la tasa de adsorción del conjugado sobre el gel de hidróxido de aluminio de dicha composición preferente depende del pH. De hecho, la tasa de adsorción se incrementa a valores de pH más bajos. Una reducción del pH desde 7,4 a 7,2 o incluso a 7,0 no resulta en una tasa de adsorción significativamente más alta. A pH 6,8 se muestra una tasa de adsorción de alrededor del 90%. A pH 6,0 se observa la mayor tasa de adsorción. A una concentración de conjugado basada en 200 μ g/mL neto de péptido y pH 6,0, aún está libre un 7% del conjugado.

En base a dichos análisis, y para incrementar la capacidad inmunogénica de la composición farmacéutica, se debe utilizar un pH comprendido entre 5,8 y 7,0 para aumentar la tasa de adsorción del conjugado sobre el adyuvante y aumentar significativamente su capacidad inmunogénica.

Por lo tanto, otra realización preferente del segundo aspecto de la invención se refiere a una composición, preferentemente una composición farmacéutica, que comprende i) un conjugado que comprende al menos un péptido CisA β (33-40) (SEQ ID NO: 1) unido a la hemocianina de lapa californiana (KLH) y ii) gel de hidróxido de aluminio, en la que el agente entrecruzante que conecta cada péptido CisA β (33-40) a la hemocianina de lapa californiana (KLH) del conjugado es el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido butírico (SM), y en la que el pH de la composición está en el intervalo entre 5,8 y 7,0, preferentemente entre 6,2 y 7,0, más preferentemente entre 5,8 y 6,2.

En realizaciones preferentes adicionales del segundo aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferentes, la cantidad de péptido CisA β (33-40) (SEQ ID NO: 1) en la composición farmacéutica es de al menos 100 μ g, preferentemente al menos 150 μ g, más preferentemente desde 150 μ g a 400 μ g, aún más preferentemente desde 160 μ g a 240 μ g, aún más preferentemente aproximadamente 200 μ g.

En realizaciones aún preferentes adicionales del segundo aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferentes, los conjugados KLH-SM-CisA β (33-40) presentes en la composición farmacéutica comprenden una relación de al menos 45 péptido CisA β (33-40) (SEQ ID NO: 1) por cada proteína hemocianina de lapa californiana (KLH).

En otra realización preferente del segundo aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferentes, la composición farmacéutica está contenida en empollas de vidrio, preferiblemente de 1 o 1,2 ml.

Se observa también que, tal como se reflejó anteriormente, la tasa de adsorción de los conjugados sobre el gel de hidróxido de aluminio en la composición del segundo aspecto de la invención (cuando se utiliza el gel de

hidróxido de aluminio) depende del pH. Además, de manera sorprendente el pH aumenta durante el almacenaje de la composición farmacéutica una vez ésta ha sido fabricada, lo cual reduce la tasa de adsorción si tales aumentos de pH alcanzan valores superiores a 7,0, o preferentemente superiores a 6,8. Para disminuir dichos inconvenientes que claramente afecta la capacidad inmunogénica de la composición farmacéutica, es importante

ajustar el pH de la composición farmacéutica a un rango de entre 5,5 y 6,5, preferentemente 5,8 a 6,2, más preferentemente 5,9 a 6,1, en el momento de la fabricación de la composición farmacéutica de manera que el almacenaje no afecta la capacidad inmunogénica de la composición, o lo hace mínimamente.

Por lo tanto, aún otra realización preferente del segundo aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de fabricación de una composición farmacéutica, el cual comprende las siguientes etapas:

- a. Añadir éster de N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido butírico (SM) a una solución que comprende hemocianina de lapa californiana (KLH) en un tampón a un pH entre 7,0 y 9,0;
- b. Eliminar el exceso de éster de N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido butírico de la solución de la etapa a), preferentemente utilizando un tampón Na-fosfato a una concentración de 0,02 M y un pH de aproximadamente 6,6 a 7,0;
- c. Añadir péptidos $\text{CisA}\beta(33-40)$ (SEQ ID NO: 1) en DMSO a la solución de la etapa b) a un pH entre 6,6 y 7,0 para producir los conjugados;
- d. Eliminar los péptidos libres de la solución de la etapa c), preferentemente utilizando un tampón PBS a una concentración de 0,01 M y un pH de 6,6 a 7,0;
- e. Opcionalmente filtrar la solución de la etapa d), preferentemente utilizando un filtro de aproximadamente 0,2 μm ;
- f. Ajustar el pH de la solución de la etapa d) o e) a un rango de pH de entre 5,5 a 6,5, preferentemente 5,8 a 6,2, más preferentemente 5,9 a 6,1, aún más preferentemente aproximadamente 6,0; y
- g. Añadir gel de hidróxido de aluminio a la solución de la etapa f) una vez el pH haya sido ajustado.

En un tercer aspecto, la presente invención da a conocer el uso de una composición que comprende el conjugado de la presente invención para preparar un medicamento. Preferentemente dicha composición es la composición identificada en el segundo aspecto de la invención o en cualquiera de sus realizaciones preferente. También en una realización preferente, dicho medicamento se utiliza para el tratamiento o la prevención de una enfermedad amiloide, más preferentemente de una enfermedad amiloide seleccionada de entre la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la angiopatía cerebral amiloide, la demencia vascular de origen amiloide, la miositis por cuerpos de inclusión y la demencia con Cuerpos de Lewy. En la realización más preferente, dicho medicamento se utiliza para la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método de tratamiento o de prevención de una enfermedad amiloide en un paciente en necesidad del mismo que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende el conjugado de la presente invención. Preferentemente, dicha composición es la composición identificada en el segundo aspecto de la invención o en cualquiera de sus realizaciones preferente. También en una realización preferente, dicha enfermedad amiloide es una enfermedad amiloide seleccionada de entre la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la angiopatía cerebral amiloide, la demencia vascular de origen amiloide, la miositis por cuerpos de inclusión y la demencia con Cuerpos de Lewy, aún más preferentemente la enfermedad de Alzheimer.

En un último aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento de fabricación de anticuerpos caracterizado porque comprende una etapa de inmunización de mamíferos o aves con una composición que comprende el conjugado de la presente invención. Preferentemente, dicha composición es la composición identificada en el segundo aspecto de la invención o en cualquiera de sus realizaciones preferente. Se contempla que los mamíferos utilizados en el procedimiento de la presente invención sean rumiantes, équidos, lagomorfos, primates (preferentemente humanos) o cualquier otro mamífero que permita la obtención de cantidades de suero adecuadas para la extracción u obtención de cantidades suficientes de anticuerpos. Se contempla que las aves utilizadas en el procedimiento de la presente invención sean cualquiera de las galliformes, las anseriformes, las columbiformes o cualquier otra ave que permita la obtención de cantidades de suero adecuadas para la extracción u obtención de cantidades suficientes de anticuerpos. Se contempla además la protección de los anticuerpos obtenidos u obtenibles mediante el procedimiento del aspecto final de la invención así como su utilización en la fabricación de una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de una enfermedad amiloide seleccionada de entre la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la angiopatía cerebral amiloide, la demencia vascular de origen amiloide, la miositis por cuerpos de inclusión y la demencia con Cuerpos de Lewy, aún más preferentemente la enfermedad de Alzheimer.

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

Adicionalmente, la respuesta inmune generada por dichos conjugados de la presente invención o las composiciones que comprenden dichos conjugados es específica para A β 40, es decir, permite generar

anticuerpos específicos para Aβ40 sin generar anticuerpos frente a Aβ42.

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

Ejemplo 1. Preparación de conjugados KLH-SM-CisAβ(33-40).

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

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

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

- Se preparó una solución stock 250 mM de SM disolviendo 100 mg de SM en 680 µL de DMSO seco. Se hicieron alícuotas de dicha solución stock y se guardaron a -20°C.
- Se disolvió la KLH a una concentración de 5 mg/mL en PBS/5mM EDTA pH 7,4.
- Se añadieron 16 µL de solución stock de SM por cada mililitro de KLH que se conjugó.
- Dicha solución se dejó reaccionar durante 2 horas y 30 minutos a temperatura ambiente en agitación suave.
- A continuación, se cambió el tampón de la reacción para eliminar los subproductos de la misma y el exceso de SM que no había reaccionado. Para esto, se utilizó una columna PD10 (GE Healthcare; referencia 17-0851-01) de la siguiente manera:

- Etapa a): Se equilibró la columna con 25 mL (5 mL, 5 veces) PBS (80mM hidrogenofosfato de sodio dihidrato, 20mM dihidrogenofosfato de sodio monohidrato, 100mM cloruro de sodio) /5mM EDTA pH 7,4.
- Etapa b): Se añadieron en la columna 2,5 mL de la solución ya reaccionada y se dejó que dicha solución penetrara desechando el eluido.
- Etapa c): Se añadieron 3,5 mL de PBS en la columna y se recogió el eluido.
- Etapa d): Se volvió a equilibrar la columna con 25 mL (5 mL, 5 veces) de /5mM EDTA pH 7,4, tal y como se ha explicado anteriormente en la etapa a).
- Se repitieron las etapas b) a d) las veces necesarias en función del volumen de solución reaccionada. Al terminar, se dejó la columna equilibrada.
- Etapa e): Se guardó la columna a 4°C para utilizarla otras veces con el mismo péptido conjugado de la misma forma. protocolo anterior.

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

$10/6725000$ (peso molecular medio de la KLH) = $1,48 \times 10^{-6}$ mmoles de KLH
 $1,48 \times 10^{-6}$ mmoles de KLH x 1724 sitios activos = $2,55 \times 10^{-3}$ mmoles de péptido necesarios para cubrir todos los sitios activos.

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

$2,55 \times 10^{-3} \times 3 = 7,65 \times 10^{-3}$ mmoles de péptido necesarios.
 $7,65 \times 10^{-3} \times$ peso molecular del péptido (834,4 Da) = mg de péptido necesarios (6,38 mg de péptido) (aplicando los factores de conversión necesarios)

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

- La solución se dejó reaccionar a temperatura ambiente y en agitación entre 18 y 24 horas.
- Finalmente, se almacenaron a 4°C las soluciones obtenidas. Antes de dicho almacenamiento se puede proceder a eliminar el péptido que no se haya conjugado con la KLH y, por tanto, haya quedado libre, o no. En caso de que no se elimine dicho péptido libre, la concentración de péptido en el producto final viene dada por el péptido total utilizado en la reacción, no solo el unido a la KLH nativa, y el volumen final de la reacción.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Grupo	Dosis total de péptido (suma del péptido libre y el unido a KLH) (en μ g)	Dosis de péptido unido a KLH (en μ g)
1	120	40
2	120	40
3	120	40
4	120	40
5	120	40
6	60	60

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

GraphPad Prism 3.02. Para el análisis se utilizó la ecuación “One Site Competition”:

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

- 5 Del análisis mencionado anteriormente se obtuvo el dato de la EC_{50} que es el punto de inflexión de la curva, es decir, el punto en el que se produjo el 50 % del máximo efecto observado. En el presente caso, se interpretó como la dilución del suero a la que el 50 % del péptido presente en el pocillo se unió al anticuerpo presente en el suero.

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

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

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

- Las diferentes KLHs utilizadas como proteínas transportadoras (de diferentes fabricantes), pese a tener cierta influencia en la respuesta inmune, no se han mostrado relevantes a la hora de determinar la magnitud de la respuesta inmune (respuesta inmune elevada en los grupos 1, 3, 4 y 6, es decir, grupos con un incremento de EC_{50} de 50 o más, frente a una respuesta inmune débil o inexistente en los grupos 2 y 5, es decir, grupos con un incremento de EC_{50} menor de 50).
- Las diferencias entre obtener una respuesta inmune elevada y una respuesta inmune débil o inexistente radica en el agente entrecruzante utilizado. De los resultados experimentales obtenidos se deduce que los conjugados en los que se ha utilizado SM producen una respuesta inmune significativamente superior a la observada para los conjugados en los que se ha utilizado SPDP. De hecho, los grupos tratados con conjugados con el agente entrecruzante SM permiten generar una respuesta inmune elevada mientras que los grupos tratados con conjugados en los que se ha utilizado SPDP mostraron una respuesta inmune mucho más débil o inexistente.
- Además de lo anterior, cabe destacar los resultados obtenidos para el grupo 4, que ponen de manifiesto que la respuesta de los conjugados generados utilizando SM sigue siendo superior a la observada para los conjugados generados utilizando SPDP aún sin la utilización de adyuvante.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La titulación de los anticuerpos generados y el análisis de su especificidad se llevaron a cabo mediante ELISA, según el protocolo conocido en el estado de la técnica e indicado brevemente en el Ejemplo 2, con las siguientes diferencias:

- Las placas de ELISA se tamizaron con péptido A β 40 o A β 42 (incluido como SEQ ID NO: 3), en función de si se desea detectar anticuerpos específicos o que se unan a A β 40 o a A β 42, respectivamente.
- El anticuerpo utilizado para detectar la presencia de anticuerpos en los sueros analizados fue HRP Anti-Conejo IgG (H+L) (Invitrogen; referencia: 65-6120) (la dilución del anticuerpo secundario fue la 1:2000 en solución vehículo a pH 8).

Los reactivos de revelación fueron los indicados en el Ejemplo 2 y, por tanto, la lectura de las placas se hizo también a 405nm y a los resultados se les aplicó la misma ecuación. Del análisis se obtuvo el dato de la EC₅₀ que es el punto de inflexión de la curva, es decir, el punto en el que se produjo el 50 % del máximo efecto observado. Tal y como se ha indicado en el Ejemplo 2, dicho resultado se interpretó como la dilución del suero a la que el 50 % del péptido presente en el pocillo se unió al anticuerpo presente en el suero.

De acuerdo con el protocolo de titulación mencionado anteriormente, todas las muestras obtenidas fueron tituladas para detectar anticuerpos frente al péptido A β 40 y A β 42. Los resultados obtenidos aparecen resumidos en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5. Cantidad de anticuerpos específicos para A β 40 en los conejos antes del protocolo de vacunación y tras el mismo. También se incluye una columna relativa al incremento observado como consecuencia del tratamiento.

Identificación Conejo	EC ₅₀ preinmune	EC ₅₀ post 3 inoculaciones	Incremento de EC ₅₀ (número de veces)
71	36,17	47406	1310,64
72	7,483	4021	537,35
73	14,07	73421	5218,27
74	4,482	12467	2781,57

Identificación Conejo	EC ₅₀ preinmune	EC ₅₀ post 3 inoculaciones	Incremento de EC ₅₀ (número de veces)
75	45,48	5173	113,74
76	20,5	98381	4799,07

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

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

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

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

20 **Ejemplo 5.** Estudios de adsorción de los conjugados KLH-SM-CisA β (33-40) sobre el gel de hidróxido de aluminio.

1,35 mg/mL de péptido es equivalente a 14,4 mg/mL de conjugado KLH-SM-CisA β (33-40)

25 Tabla 7.

μ g/mL basado en péptido neto	μ g/mL sobrenadante de péptido neto	Equivalente a sobrenadante de A β -X40-KLH [mg/mL]	% conjugado libre en solución	% adsorbido
100	12	0,128	12	88
125	15	0,160	12	88
150	19	0,203	13	87
175	25	0,267	14	86
200	35	0,373	18	83

Dependencia de la adsorción del pH a concentraciones definidas				
Estudio 2:				
Test 1: 220 µg péptido neto /mL				
pH	µg/mL sobrenadante de péptido neto	Equivalente a sobrenadante de Aβ-X40-KLH [mg/mL]	% conjugado libre en solución	% adsorbido
7,4	38	0,41	17	83
7,2	37	0,39	17	83
7,0	33	0,35	15	85
6,8	25	0,27	11	89
6,5	21	0,22	10	90
6,0	15	0,16	7	93
Test 2: 150 µg péptido neto/mL				
pH	µg/mL sobrenadante de péptido neto	Equivalente a sobrenadante de Aβ-X40-KLH [mg/mL]	% conjugado libre en solución	% adsorbido
7,4	18	0,19	12	88
7,2	18	0,19	12	88
7,0	15	0,16	10	90
6,8	10	0,11	7	93
6,5	11	0,12	7	93
6,0	0	0,00	0	100
Test 3: 100 µg péptido neto/mL				
pH	µg/mL sobrenadante de péptido neto	Equivalente a sobrenadante de Aβ-40-KLH [mg/mL]	% conjugado libre en solución	% adsorbido
7,4	13	0,14	13	87
7,2	13	0,14	13	87
7,0	12	0,13	12	88
6,8	9	0,10	9	91
6,5	0	0,00	0	100
6,0	0	0,00	0	100

En estos estudios se determinó tanto la influencia de la concentración del conjugado como la del pH en la tasa de adsorción. En el primer experimento, se evaluó la tasa de adsorción de diferentes concentraciones de conjugado para una cantidad definida de hidróxido de aluminio (0,35% corresponde a la dosis permitida de 1,25 mg de Al por dosis única) y se probó el pH definido 7,4 (pH fisiológico). En las condiciones de prueba fisiológica (pH 7,4) se detectó 12 a 18% de conjugado libre en el sobrenadante. Una reducción de la cantidad de péptido a 100 µg de péptido no produce mayores tasas de adsorción.

En un segundo estudio se determinó la influencia del pH sobre la tasa de adsorción. El pH se modificó (de pH 6,0 a pH 7,4) a concentraciones conjugadas definidas (basadas en 100 µg, 150 µg y 220 µg de péptido neto / ml). Como se ilustra en los resultados mostrados anteriormente, la tasa de adsorción depende del pH. De hecho, la tasa de adsorción aumenta a valores de pH más bajos (ver tablas): una reducción de pH 7,4 a pH 7,2 o incluso 7,0 no da como resultado tasas de adsorción significativamente más altas. Una adsorción a pH 6,8 muestra una tasa de adsorción de alrededor del 90%. A pH 6,0, la tasa de adsorción es la más alta. A una concentración de conjugado basada en 200 µg/ml de péptido neto y pH 6, aún está libre el 7% del conjugado.

En base a estos análisis, para aumentar la capacidad inmunogénica de la composición farmacéutica de la invención, se debe usar preferentemente un valor de pH entre 5,8 y 7,0 para aumentar la tasa de adsorción del conjugado sobre el adyuvante.

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

LISTADOS DE SECUENCIAS

<110> ARACLON BIOTECH, S.L.

<120> Conjugado amiloide y usos y procedimientos del mismo

<130> 1500077

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Fragmento Abeta con una cisteína añadida al extremo N-terminal

 10 <400> 1

 Cys Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 1 5

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

 <400> 2
 20
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

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

 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 35 40

 <210> 3
 <211> 42
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 3

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

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

 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 4
 30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende un conjugado de al menos un péptido CisA β (33-40) (SEQ ID NO: 1) unido a la hemocianina de lapa californiana (KLH), caracterizado por que el agente entrecruzante que conecta cada péptido CisA β (33-40) a la hemocianina de lapa californiana (KLH) del conjugado es el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido butírico (SM), caracterizada por que dicha composición adicionalmente comprende gel de hidróxido de aluminio.
- 10 2. Composición farmacéutica que comprende i) un conjugado que comprende al menos un péptido CisA β (33-40) (SEQ ID NO: 1) unido a la hemocianina de lapa californiana (KLH) y ii) gel de hidróxido de aluminio, caracterizada por que el agente entrecruzante que conecta cada péptido CisA β (33-40) a la hemocianina de lapa californiana (KLH) del conjugado es el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido butírico (SM), y en la que el pH de la composición está en el intervalo entre 5,8 y 7,0.
- 15 3. Composición farmacéutica, según la reivindicación 2, caracterizada por que el pH de la composición está en el intervalo entre 6,2 y 7,0.
- 20 4. Composición farmacéutica, según la reivindicación 2, caracterizada por que el pH de la composición está en el intervalo entre 5,8 y 6,2.
- 5 5. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizada por que la cantidad de péptido CisA β (33-40) (SEQ ID NO: 1) en la composición farmacéutica es de al menos 100 μ g.
- 25 6. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizada por que la cantidad de péptido CisA β (33-40) (SEQ ID NO: 1) en la composición farmacéutica es de al menos 150 μ g.
- 7 7. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizada por que la cantidad de péptido CisA β (33-40) (SEQ ID NO: 1) en la composición farmacéutica es de entre 150 μ g a 400 μ g.
- 30 8. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizada por que la cantidad de péptido CisA β (33-40) (SEQ ID NO: 1) en la composición farmacéutica es de entre 160 μ g a 240 μ g.
- 35 9. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, caracterizada por que a su vez comprende una relación de al menos 45 péptidos CisA β (33-40) (SEQ ID NO: 1) unidos a cada hemocianina de lapa californiana (KLH).
- 40 10. Ampolla de vidrio que comprende la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9.
- 45 11. Procedimiento de fabricación de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, el cual comprende las siguientes etapas:
 - a. Añadir éster de N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido butírico (SM) a una solución que comprende hemocianina de lapa californiana (KLH) en un tampón a un pH entre 7,0 y 9,0;
 - b. Eliminar el exceso de éster de N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido butírico de la solución de la etapa a);
 - c. Añadir péptidos CisA β (33-40) (SEQ ID NO: 1) en DMSO a la solución de la etapa b) a un pH entre 6,6 y 7,0 para producir los conjugados;
 - d. Eliminar los péptidos libres de la solución de la etapa c);
 - e. Opcionalmente filtrar la solución de la etapa d);
 - f. Ajustar el pH de la solución de la etapa d) o e) a un rango de pH de entre 5,8 y 6,2; y
 - 50 g. Añadir gel de hidróxido de aluminio a la solución de la etapa f) una vez el pH haya sido ajustado.
- 55 12. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado por que el exceso de la etapa b) se elimina utilizando tampón Na-fosfato a una concentración de 0,02 M y un pH de aproximadamente 6,6 a 7,0.
- 60 13. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, caracterizado por que el exceso de la etapa d) se elimina utilizando tampón PBS a una concentración de 0,01 M y un pH de 6,6 a 7,0.
- 65 14. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizado por que la solución es filtrada en la etapa e) utilizando un filtro de 0,2 μ m.
15. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, caracterizado por que el pH de la etapa f) se ajusta a un pH en el rango de 6,0.
16. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9 o ampolla de vidrio según la

reivindicación 10, para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad amiloide.

5 17. Composición farmacéutica para su uso, según la reivindicación 16, caracterizada por que la enfermedad amiloide se selecciona de la lista que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, angiopatía cerebral amiloide, demencia vascular de origen amiloide, miositis por cuerpos de inclusión y demencia con Cuerpos de Lewy.

10 18. Composición farmacéutica para su uso, según la reivindicación 17, caracterizada por que la enfermedad amiloide es la enfermedad de Alzheimer.

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

5

Documentos de patentes citados en la descripción

- ES 2246105
- WO 2005072777 PCT
- US 2013230545 A1
- WO 201501282287 A1