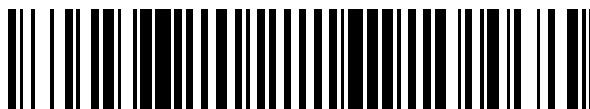


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 028**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)
C08H 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2013** **PCT/US2013/037865**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14143087**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2013** **E 13878092 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020** **EP 2968485**

54 Título: **Vacuna peptídica para la prevención e inmunoterapia de demencia del tipo Alzheimer**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201313843883

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.12.2020

73 Titular/es:

UNITED BIOMEDICAL INC. (100.0%)
25 Davids Drive
Hauppauge NY 11788, US

72 Inventor/es:

WANG, CHANG YI

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 800 028 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

Vacuna peptídica para la prevención e inmunoterapia de demencia del tipo Alzheimer

- 5 La presente solicitud reivindica la prioridad a la solicitud de patente de EE. UU. N° de serie 13/843.883, presentada el 15 de marzo de 2013.

Campo de la invención

- 10 La presente divulgación se refiere a una vacuna basada en péptido y a formulaciones de la misma para la prevención y la inmunoterapia de demencia del tipo Alzheimer.

Antecedentes de la invención

- 15 La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia, un trastorno neurodegenerativo crónico, caracterizada por una pérdida de capacidad cognitiva, anomalías graves del comportamiento y muerte. Afecta a aproximadamente el 10 % de la población mayor de 65 años de edad y al 40 % de los mayores de 85 años. A diferencia de otras causas principales de muerte tales como enfermedad cardíaca, cáncer y accidente cerebrovascular, la mortalidad de la enfermedad de Alzheimer se intensificará espectacularmente en las próximas
20 dos a tres décadas a medida que los avances en la tecnología médica permiten que más individuos lleguen a la edad de riesgo de las demencias. En los Estados Unidos, 7-8 % de todos los gastos médicos están relacionados con la demencia hoy en día. Actualmente hay 2,5 a 4,0 millones de pacientes que viven con EA en los EE. UU., y 17 a 25 millones en todo el mundo. No existe ni tratamiento definitivo ni cura para esta enfermedad devastadora.
- 25 Como se definió originalmente por Alois Alzheimer (1907), dos depósitos microscópicos, es decir, el ovillo neurofibrilar y la placa amiloide senil, siguen siendo los distintivos patológicos de la enfermedad. El diagnóstico definitivo de la enfermedad de Alzheimer ha requerido tradicionalmente o biopsia o histopatología cadavérica. Con la reciente introducción de ligandos que marcan placas amiloides con isótopos emisores de positrones, combinado con pruebas cognitivas y mediciones de moléculas específicas en el líquido cefalorraquídeo, ahora está disponible el
30 diagnóstico más definitivo de esta enfermedad sin histopatología.

- Se han acumulado pruebas considerables que sugieren que el péptido β -amiloide ($A\beta$), el principal componente de las placas amiloides seniles, desempeña una función importante en la EA. Está disponible una revisión actualizada sobre el péptido β -amiloide ($A\beta$) (a partir del 13 de febrero de 2013) de Wikipedia en
35 http://en.wikipedia.org/wiki/Beta_amiloid#cite_note-wales2010-41, enlace que se incluye aquí como referencia. Es probable que la terapia modificadora de la enfermedad satisfactoria para la EA incluya productos que afectan la deposición de β -amiloide en el cerebro. Se incluye por referencia como una revisión del campo una publicación reciente de Morgan, D. en "Immunotherapy for Alzheimer's Disease" (Morgan D. J Int Med 2011; 269:54-63), que es relevante para la presente invención.

- 40 El factor desencadenante, necesario pero no suficiente para la enfermedad de Alzheimer, es la acumulación de agregados de amiloide que consisten en el péptido $A\beta$. La genética de las formas familiares de la enfermedad de Alzheimer y los casos de síndrome de Down (que dan como resultado la patología precoz del Alzheimer) tienen producción en exceso de una forma más larga del extremo C del péptido $A\beta$ (42 aminoácidos de longitud) como
45 elemento común. Este péptido $A\beta_{1-42}$ es propenso a formar estructuras de lámina beta y agregarse en oligómeros y fibrillas. Estos depósitos de amiloide pueden estar presentes una década o más en el cerebro antes del inicio de los síntomas cognitivos del trastorno. Una segunda etapa en la patogénesis de la enfermedad es la formación de ovillos neurofibrilares intraneuronales de proteína tau de unión a microtúbulos hiperfosforilados. También se pueden formar otros trastornos neurodegenerativos por la patología tau en ausencia de depósitos de amiloide, pero se diferencian
50 del Alzheimer tanto en la presentación clínica como en la localización de la patología regionalmente en el cerebro. En modelos de ratón transgénico de tau, los depósitos de tau se pueden precipitar por inyección intracraneal de amiloide o sangrado, produciendo los ratones depósitos de $A\beta$. Además, la interrupción de la deposición de amiloide con inmunoterapia anti- $A\beta$ puede disminuir la progresión de la patología de tau en ratones que expresan múltiples transgenes. La patología tau parece estar mejor correlacionada con el estado cognitivo que la patología de amiloide,
55 estando de acuerdo con ello la causa más proximal de la disfunción mental. Por mecanismos inciertos, estas patologías dan como resultado la pérdida de la función sináptica, sinapsis, y por último lugar una pérdida de neuronas que conduce a una atrofia cerebral considerable.

- Existen múltiples hipótesis referentes a las etapas mecánicas implicadas. Agregados de tamaño intermedio de
60 amiloide y/o tau, denominados oligómeros, se consideran una causa más directa de toxicidad. Incluso en las primeras etapas del trastorno, la fase de "deterioro cognitivo leve" (DCL), parece haber una acumulación considerable de patología de placas y de ovillos, y pérdida de neuronas. Estas observaciones sugieren que el tratamiento del trastorno en las etapas más tempranas posibles, al igual que se hace con la enfermedad cardiovascular, será esencial para controlar la enfermedad de Alzheimer.

- 65 En 1999 se encontró un enfoque de vacuna para reducir los depósitos de amiloide en ratones transgénicos que

producían en exceso la proteína precursora del amiloide. A partir de entonces, se encontró que vacunas o inmunoterapia pasiva que se dirigía a A β rescataba los déficits de memoria en estos ratones. Los anticuerpos específicos de A β , generados activamente por el sistema inmunitario o administrados pasivamente, reducen coherentemente la carga de placas en diferentes modelos de ratón transgénico para amiloidosis de A β . Dado el éxito de la vacunación en modelos animales, y la ausencia de cualquier terapia modificadora de la enfermedad alternativa para la enfermedad de Alzheimer, se inició un primer intento clínico para estimular el sistema inmunitario de pacientes con EA para generar anticuerpo contra A β con una vacuna denominada AN1792, que consistió en el péptido A β ₁₋₄₂ de longitud completa que contenía tanto epítopes de linfocitos B como T, agregados en fibrillas. Se trataron aproximadamente 60 pacientes con una o más dosis de la vacuna en un ensayo de seguridad de fase 1. Una de las observaciones iniciales fue una respuesta de anticuerpos variable, dejando de generar muchas vacunas de los paciente títulos de anticuerpos detectables contra el antígeno del péptido A β diana. Esta ausencia de respuesta inmunitaria en muchos de los pacientes condujo a un cambio de la formulación de la vacuna para incluir QS-21 como adyuvante en un intento por potenciar la inmunogenicidad de la formulación de vacuna AN1792 en el ensayo de seguridad e inmunogenicidad de fase 2. El objetivo era inmunizar los pacientes a un título de anticuerpos predeterminado mediante múltiples inoculaciones. Sin embargo, se detuvieron las inmunizaciones en el plazo de un corto tiempo desde el inicio del ensayo debido a que un pequeño porcentaje de pacientes (~6 %) desarrolló meningoencefalopatía aséptica, una reacción inflamatoria en el sistema nervioso central (SNC). Murieron dos pacientes que desarrollaron estos síntomas de inflamación del SNC, revelando las autopsias posteriores una infiltración de linfocitos T del CNS, evidente con signos de inflamación de las meninges. Se llegó a la conclusión de que la respuesta adversa de la formulación de vacuna AN1792 era una reacción autoinmunitaria provocada por la vacuna (Orgogozo JM, et al., Neurology 2003; 61:46-54). Desde un punto de vista de la eficacia, no se observaron diferencias en la tasa de encogimiento cerebral por IRM o rendimiento cognitivo entre las vacunas y los que recibieron la vacuna de placebo.

A pesar del contratiempo de la vacuna AN1792, el desarrollo de novedosas estrategias de vacunas y adyuvantes contra el péptido A β para la inmunoterapia de la enfermedad de Alzheimer ha sido un área de intensa creatividad. En la mayoría de los casos, el objetivo ha sido desarrollar la activación de linfocitos B y la producción de anticuerpos, con participación mínima de linfocitos T (al menos contra A β), debido a los acontecimientos adversos encontrados en ensayos humanos con vacunas contra el péptido A β ₁₋₄₂ de longitud completa como se muestra en el caso de AN 1792.

Por ejemplo, los documentos de patente US2004/0247612 y WO2008/021296 describen composiciones que contienen un inmunógeno peptídico que comprende un epítipo de linfocitos B de A β y una secuencia de linfocitos T cooperadores.

Actualmente, aparte del producto de la presente invención gestionado por la inventora y su equipo, existen cuatro ensayos clínicos en fase I /II de inmunización activa empleando diversos diseños y formulaciones de vacuna que se dirigen a fragmentos de A β . Estos ensayos incluyen: ACC-001 (Elan Corporation Inc. y Wyeth) que usa como inmunógeno el fragmento peptídico del extremo amino de A β ₁₋₇ conjugado con una proteína de toxoide diftérico; CAD106 (ImmunodrugTM; Cytos Biotechnology AG y Novartis Pharma AG) que usa como inmunógeno el fragmento peptídico del extremo amino de A β ₁₋₅ acoplado con partícula de tipo virus Q β ; V950 (Merck) que usa como inmunógeno péptidos del extremo amino de A β conjugados con ISCO-MATRIX; y GSK/Affiris que usa como inmunógeno miméticos del péptido A β conjugado con moléculas de vehículo. Además, existen otros enfoques de vacuna que se dirigen a A β como se describe en una revisión por Tabira T (Tohoku J Exp Med 2010; 220:95-106).

Todos los diseños y formulaciones de vacuna que se dirigen a A β actualmente en ensayos humanos, como se ha descrito anteriormente, padecen una débil inmunogenicidad con respuesta de anticuerpos variable por que solo desde 30 % hasta aproximadamente 70 % a 80 % de los pacientes que recibieron estas vacunas desarrollaron anticuerpos hacia el péptido A β diana, que complica más cualquier análisis de eficacia adicional resultante de los anticuerpos anti-A β generados por la vacuna. La mayoría de los diseños de vacuna son complicados, requiriendo la conjugación de los fragmentos del péptido A β muy cortos con una proteína grande o vehículo de tipo partícula viral, dirigiendo así la mayoría de las respuestas de los anticuerpos hacia el vehículo no deseado en vez de a los péptidos diana cortos; los diseños de vacuna complicados imponen amplios procedimientos de fabricación, por lo que son de difícil control de calidad y no rentables. Estas vacunas son inciertas en sus características de seguridad debido a la posible propiedad de activación de Th1 del adyuvante y la formulación usada. Además, a partir de esta fecha, ninguna de estas vacunas ha mostrado eficacia clínica alguna, tal como mejoría en las funciones cognitivas en pacientes que reciben las vacunas.

En los países desarrollados, la EA es una de las enfermedades más caras para la sociedad. Se deben encontrar nuevas terapias para prevenir, retrasar la aparición o ralentizar la progresión de la EA. A pesar de los prometedores hallazgos de las intervenciones inmunológicas en ratones para EA, sigue siendo un reto una vacuna humana segura y eficaz que se dirija a A β para la prevención y el tratamiento de la demencia del tipo Alzheimer. En vista de las limitaciones de los diseños de vacuna y las formulaciones actualmente en ensayos preclínicos o clínicos como se trata anteriormente, existe una necesidad sin cumplir y urgente de desarrollar una formulación de vacuna segura y eficaz que proporcione inmunoterapia ampliamente sensible para la prevención y el tratamiento de demencia del tipo Alzheimer. Cuando dicha formulación de vacuna sea satisfactoria contra la patología de Alzheimer, llegará a estar

entre las estrategias comunes para prevenir la enfermedad.

Sumario de la invención

La presente divulgación se refiere a composiciones peptídicas que comprenden una combinación de construcciones de inmunógenos de péptidos A β , composiciones farmacéuticas que incluyen formulaciones de vacuna que comprenden estas composiciones de construcciones de inmunógenos de péptidos A β , teniendo las construcciones de inmunógenos de péptidos A β individuales el extremo N del péptido A β como los epítopes de linfocitos B (B) enlazados mediante resto(s) espaciador(es) a epítopes de linfocitos T cooperadores (Th) derivados de proteínas de patógenos que actúan juntas para estimular la generación de anticuerpos altamente específicos dirigidos contra el extremo N del péptido A β ofreciendo respuestas inmunitarias protectoras a pacientes en riesgo de, o con, enfermedad de Alzheimer. Los sujetos de la presente invención se definen en las reivindicaciones adjuntas.

En general, las construcciones de inmunógenos de péptidos A β pueden comprender péptido A β híbrido que tiene un sitio antigénico de linfocitos B de entre 10 y 14 aminoácidos de longitud desde el extremo amino del péptido A β ₁₋₄₂, por ejemplo A β ₁₋₁₀, A β ₁₋₁₂, A β ₁₋₁₄, que se enlaza a un epítipo Th heterólogo derivado de proteínas de patógenos tales como la proteína de la fusión del virus del sarampión (MVF) (SEQ ID NO: 34) que actúan juntas para estimular la generación de anticuerpos altamente específicos que reaccionan de forma cruzada con el péptido A β ₁₋₄₂ de longitud completa (SEQ ID NO: 1) en las placas seniles. Además, las construcciones de inmunógenos de péptidos A β pueden contener un péptido híbrido que tiene un péptido A β ₁₋₁₄ de sitio antigénico de linfocitos B enlazado a epítopes Th heterólogos derivados de diversas proteínas de patógenos (SEQ ID NOs: 33 a 47) capaces de generar anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con el péptido A β ₁₋₄₂ de longitud completa en las placas seniles. De los epítopes Th heterólogos empleados para potenciar el péptido A β ₁₋₁₄ del sitio antigénico de linfocitos B, los epítopes Th derivados de los patógenos naturales toxina diftérica (SEQ ID NO: 37), *Plasmodium falciparum* (SEQ ID NO: 38), toxina del cólera (SEQ ID NO: 40), y los epítopes Th artificiales idealizados derivados de la proteína de fusión del virus del sarampión (MVF 1 a 5) y el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg 1 a 3) en forma de o secuencia individual o secuencias combinatorias (por ejemplo, SEQ ID NOs: 34 y 41 a 47) se encuentran de uso particular en dicha mejoría de la antigenicidad de linfocitos B mediante pruebas de cribado de la inmunogenicidad. En otras realizaciones, se usan las composiciones peptídicas que comprenden una mezcla de construcciones de inmunógenos de péptidos A β con epítopes Th heterólogos derivados de diferentes patógenos para permitir la cobertura de un acervo genético tan amplio en pacientes que conduzca a un mayor porcentaje en la tasa de respondedores tras la inmunización con la vacuna para el tratamiento y la prevención de demencia del tipo Alzheimer. En una realización de la presente invención, las construcciones de inmunógenos de péptidos A β (SEQ ID NOs: 62 y 63) con epítopes Th heterólogos derivados de MVF y HBsAg en una forma combinatoria (SEQ ID NOs: 44 y 45) se mezclaron en una relación equimolar para su uso en una formulación de vacuna para permitir la máxima cobertura de la población receptora de la vacuna que tenía acervo genético distinto. Se observó mejoría sinérgica en las construcciones de inmunógenos de péptidos A β en las composiciones peptídicas de la presente invención y la respuesta de anticuerpos se centró principalmente (>90 %) en la reactividad cruzada deseada contra A β ₁₋₄₂ de longitud completa sin mucha, si alguna, dirigida a los epítopes Th heterólogos empleados para la mejoría de la inmunogenicidad. Esto contrasta fuertemente con la proteína convencional u otros vehículos biológicos usados para dicha mejoría de la antigenicidad peptídica. En otra realización de la presente invención, se mezclaron construcciones de inmunógenos de péptidos A β altamente purificadas (SEQ ID NOs: 64 y 65) con epítopes Th heterólogos derivados de MVF y HBsAg en una forma de secuencia única (SEQ ID NOs: 46 y 47) opcionalmente en una relación equimolar para su uso en una formulación de vacuna para permitir la máxima cobertura de la población receptora de la vacuna que tiene acervo genético distinto.

La presente divulgación también se refiere a composiciones farmacéuticas que incluyen formulaciones de vacuna para el tratamiento y la prevención de demencia del tipo Alzheimer. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden un complejo inmunoestimulante estabilizado, que se forma mediante la mezcla de un oligómero de CpG con una composición de péptido que contiene una mezcla de las construcciones de inmunógenos de péptidos A β mediante asociación electrostática, para mejorar adicionalmente la inmunogenicidad de los péptidos A β hacia la reactividad cruzada deseada con el A β ₁₋₄₂ de longitud completa presente en las placas seniles. En otra realización más, las composiciones farmacéuticas que comprenden una composición de péptido de una mezcla de las construcciones de inmunógenos de péptidos A β que forman un complejo inmunoestimulante estabilizado con oligómeros de CpG se mezclan, opcionalmente, con sales minerales, que incluyen gel de alumbre (Alhydrogel) o fosfato de aluminio (Adjuphos) como adyuvante con alto factor de seguridad, para formar una formulación de vacuna en suspensión para administración a receptores de la vacuna.

La presente divulgación también incluye métodos para el tratamiento y la prevención de demencia del tipo Alzheimer. Los métodos desvelados utilizan composiciones farmacéuticas que incluyen una formulación de vacuna en suspensión que comprende las construcciones de inmunógenos de péptidos A β de la presente invención, que forman un complejo inmunoestimulante estable con oligómeros de CpG, que se complementan adicionalmente, opcionalmente, con sales minerales como adyuvante, para la administración a pacientes en riesgo o con enfermedad de Alzheimer. En estas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden las construcciones de inmunógenos de péptidos A β y las formulaciones de vacuna derivadas de las mismas pueden generar anticuerpos contra el péptido A β ₁₋₄₂ de longitud completa para inhibir, *in vitro*, la formulación de fibrillas, y

reducir, *in vitro*, la citotoxicidad hacia las células neuronales, como se ilustra por las células de la línea celular PC12, mediada por los oligómeros de A β agregados. En algunas realizaciones, los animales o pacientes que reciben las formulaciones de vacuna derivadas de las construcciones de inmunógenos de péptidos A β desarrollaron anticuerpos significativos contra el péptido A β ₁₋₄₂ de longitud completa y se encontró que sacaban dicho péptido A β tóxico del sistema nervioso central a la periferia como se demuestra en los niveles elevados de A β ₁₋₄₀ en el plasma y el suero de los receptores de la vacuna.

En otro aspecto de la presente invención, se encontró sorprendentemente que las formulaciones de vacuna que comprendían construcciones de inmunógenos de péptidos A β pueden ser ventajosamente administradas por vía intramuscular a animales de sangre caliente, especialmente a seres humanos, que padecen demencia del tipo Alzheimer. En otro aspecto más de la presente invención, proporciona una forma farmacéutica para administración por vía intramuscular de dos construcciones de inmunógenos de péptidos A β (SEQ ID NOs: 64 y 65). La forma farmacéutica preferida para inyección intramuscular es una formulación de vacuna que contiene entre 30 μ g y 1000 μ g/0,5 ml de construcciones de inmunógenos peptídicos complejadas con oligómeros de CpG complementadas con 0,5 ml sales minerales como adyuvante, preferentemente entre 100 μ g y 400 μ g/0,5 ml, y más preferentemente 300 μ g/0,5 ml. La forma farmacéutica es estable durante más de 2 años y se puede mantener a 2 a 8 °C hasta poco antes de uso. La forma farmacéutica se administra preferentemente por inyección intramuscular con una jeringa al animal de sangre caliente, especialmente en el brazo. Para calentar la forma farmacéutica, la forma farmacéutica se puede mantener a temperatura ambiente durante aproximadamente entre 15 minutos y 45 minutos, por ejemplo 30 minutos. Preferentemente, antes de extraer el principio activo, los viales se invierten suavemente varias veces para la dispersión de posibles partículas subvisuales.

En otro aspecto de la presente invención, se encontró sorprendentemente que las formulaciones de vacuna que comprenden composiciones de construcciones de inmunógenos de péptidos A β de la presente invención se pueden administrar ventajosamente por vía intramuscular a animales de sangre caliente, especialmente a macacos de la India y seres humanos que padecen demencia del tipo Alzheimer para generar anticuerpos altamente específicos principalmente dirigidos contra el extremo N del péptido A β representado por el péptido A β ₁₋₁₀ con el aminoácido "Ácido aspártico (D)" expuesto en la parte externa de los oligómeros de péptidos A β ₁₋₄₂, agregados o en placas seniles como se demuestra por estudios de mapeo fino de epítopes. En otro aspecto más de la presente invención, se encontró sorprendentemente que las formulaciones de vacuna que comprenden construcciones de inmunógenos de péptidos A β se pueden administrar ventajosamente por vía intramuscular a animales de sangre caliente, especialmente a macacos de la India y seres humanos que padecen demencia del tipo Alzheimer, para generar anticuerpos altamente específicos principalmente dirigidos contra el extremo N del péptido A β ₁₋₄₂ en todos los animales y todos los pacientes que reciben dichas formulaciones de vacuna, alcanzando así una tasa del 100 % de respuesta de anticuerpos, extremadamente rara en la historia del desarrollo de vacunas. En otro aspecto más de la presente invención, se encontró sorprendentemente que las formulaciones de vacuna que comprenden composiciones de construcciones de inmunógenos de péptidos A β de la presente invención se pueden administrar ventajosamente por vía intramuscular a pacientes a la edad de 60 años o más y en la categoría leve de enfermedad de Alzheimer clínicamente, con mejora significativa en las puntuaciones de cognición (ADAS-Cog, ADCS-CGIC, MMSE), sin precedentes puesto que la inmunoterapia de pacientes con enfermedad de Alzheimer fue explorada por primera vez.

En otro aspecto más de la presente invención, se refiere a la prevención y el tratamiento de demencia del tipo Alzheimer en pacientes humanos que comprende administrar 30 μ g a 750 μ g, preferentemente 100 μ g a 400 μ g, más preferentemente aproximadamente 300 μ g, a pacientes humanos en necesidad del mismo aproximadamente una vez cada 12 semanas, preferentemente aproximadamente una vez cada 26 semanas, y en particular aproximadamente una vez cada 52 semanas, dependiendo de la respuesta de los anticuerpos del paciente dirigida al péptido A β de longitud completa, después de una sensibilización con tres inyecciones a las 0, 4 y 8 semanas después de la inmunización inicial.

La utilidad de las formulaciones de vacuna y las construcciones de inmunógenos de péptidos A β en el tratamiento de los trastornos anteriormente mencionados se puede confirmar adicionalmente en estudios clínicos adecuados, por ejemplo, aquellos descritos en los ejemplos, por ejemplo administrando un total de tres dosificaciones a las 0, 4 y 12 semanas administrando cada vez 300 μ g/0,5 ml/dosis de formulación de vacuna durante un periodo de más de 9 meses seguido. Puede haber inmunizaciones de seguimiento de una vez cada tres, seis o 12 meses según los títulos de anticuerpos.

Los estudios clínicos adecuados son estudios de etiqueta abierta o en particular estudios aleatorizados, de doble ciego, controlados por placebo, paralelos, en pacientes en riesgo de enfermedad de Alzheimer o con síntomas de enfermedad de Alzheimer.

La presente divulgación también proporciona un método para la fabricación a bajo coste y control de calidad de construcciones de inmunógenos de péptidos A β , así como un sistema de administración capaz de proteger los animales y pacientes en riesgo de o con enfermedad de Alzheimer.

Se desvelan además anticuerpos monoclonales humanos contra A β ₁₋₄₂ inducidos por pacientes que reciben las

formulaciones de vacuna de las construcciones de inmunógenos de péptidos A β de la presente invención. Un método eficiente de preparación de los anticuerpos monoclonales humanos a partir de linfocitos B aislados de la sangre de un paciente humano se describe por Elisabetta Traggiai et al, en Nature Medicine 10, 871-875 (2004).

5 Referencias:

Green RC, Schneider LS, Amato DA, et al., "Effect of Tarenflurbil on Cognitive Decline and Activities of Daily Living in Patients with Mild Alzheimer Disease." Journal of the American Medical Association 2009; 302(23):2557-2564.

Hardy J. Amyloid, "The Presenilins, and Alzheimer's Disease." Trends in Neurosciences 1997; 20(4):154-159.

Hartmann T, Bieger SC, Bruhl, et al. "Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease Abeta40/42 amyloid peptides." Nature Medicine 1997; 3(9):1016-1020.

Katial RK, Sachanandani D, Pinney C, Lieberman MM. "Cytokine production in cell culture by peripheral blood mononuclear cells from immunocompetent hosts." Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 1998; 5(1):78-81.

Lacor PN. "Advances on the understanding of the origins of synaptic pathology in Alzheimer's disease." Current Genomics 2007; 8(8):486-508.

Moore V, Capítulo 2. En: Synthetic Peptides: A Users Guide. Grant GA, ed. New York: WH Freeman and Company: 1992; 63-67.

Morgan D. "Immunotherapy for Alzheimer's Disease." Journal of Internal Medicine 2011; 269(1):54-63.

Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF, et al. "Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization." Neurology 2003; 61(1):46-54.

Rockenstein EM, McConlogue L, Tan H, et al. "Levels and alternative splicing of amyloid beta protein precursor (APP) transcripts in brains of APP transgenic mice and humans with Alzheimer's disease." Journal of Biological Chemistry. 1995; 270(47):28257-28267.

Rockenstein E, Mallory M, Mante M, et al. "Early formation of mature amyloid-beta protein deposits in a mutant APP transgenic model depends on levels of A-beta(1-42)." Journal of Neuroscience Research 2001; 66(4):573-582.

Sokoll KK. "Stabilized synthetic immunogen delivery system," en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. Nº US 2004/0009897 A1. United States: United Biomedical Inc.; 2004.

Solomon B, Koppel R, Frankel D, Hanan-Aharon E. "Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site directed mAb." Proceedings National Academy of Sciences USA. 1997; 94(8):4109-4112.

Tabira, T. "Immunization therapy for Alzheimer disease: a comprehensive review of active immunization strategies." Tohoku Journal of Experimental Medicine 2010; 220(2):95-106.

Traggiai E, Becker S, Subbarao K, et al. "An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells." Nature Medicine 2004; 10(8): 871-875.

Wang CY. "Artificial T helper epitopes as immune stimulators for synthetic peptide immunogens." Patente de EE. UU. Nº 6.713.301 B1. United States: United Biomedical Inc.; 2004.

Wang CY. "Immunogenic peptide composition comprising measles virus F protein T helper cell epitope (MVHThl-16) and N-terminus of beta-amyloid peptide." Patente de EE. UU. Nº 6.906.169, United States: United Biomedical Inc.; 2005.

Wang CY. "Immunogenic peptide composition comprising a promiscuous helper T cell epitope and an N-terminal fragment of Abeta(1-42) peptide." Patente de EE. UU. Nº 7.951.909, United States: United Biomedical Inc.; 2011.

Wang CY. "Immunogenic peptide composition for the prevention and treatment of Alzheimer's disease." Patente de EE. UU. Nº 8.232.373, United States: United Biomedical Inc.; 2012.

Wang CY, Finstad CL, Walfield AM, et al. "Site-specific UBITH amyloid-beta vaccine for immunotherapy of Alzheimer's disease." Vaccine 2007; 25(16):3041-3052.

Wang CY, Looney DJ, Li ML, et al. "Long-term high-titer neutralizing activity induced by octameric synthetic HIV-1 antigen." *Science* 1991; 254(5029):285-288.

Wang CY, Walfield AM. "Site-specific peptide vaccines for immunotherapy and immunization against chronic diseases, cancer, infectious diseases, and for veterinary applications." *Vaccine* 2005; 23(17-19):2049-2056.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** es un diagrama de flujo que identifica el proceso de desarrollo, desde el descubrimiento hasta la comercialización (industrialización), de una formulación de vacuna según una realización particular desvelada en el presente documento. La presente divulgación incluye el diseño de inmunógenos peptídicos, el diseño de composiciones peptídicas, el diseño de formulaciones de vacuna, el diseño de antigenicidad funcional *in vitro*, inmunogenicidad *in vivo* y el diseño del estudio de eficacia, el diseño de las pautas posológicas y el diseño de protocolos clínicos resumidos en este diagrama. Se describe además en el presente documento la evaluación detallada para cada una de las etapas, con sorpresas agradables y desagradables, que conducen al éxito final en la comercialización de una formulación de vacuna altamente segura y eficaz basada en diseños racionales.

La **Figura 2A** ilustra el perfil de HPLC de una construcción de inmunógenos de péptidos A β (SEQ ID NO: 65) altamente purificada con tiempo de elución de 20 minutos.

La **Figura 2B** ilustra el perfil de HPLC de una construcción de inmunógenos de péptidos A β (SEQ ID NO: 64) altamente purificada con tiempo de elución de 21 minutos.

La **Figura 2C** es un perfil de espectrometría de masas (MALDI-TOF) con un peso molecular medido a 3892,274 para la construcción de inmunógenos de péptidos A β (SEQ ID NO: 65), que tiene un peso molecular teórico de 3892,52, que muestra alta precisión de la naturaleza molecular usada como principio activo farmacéutico en la formulación de vacuna para EA de UBI (UB-311).

La **Figura 2D** es un perfil de espectrometría de masas (MALDI-TOF) con un peso molecular medido a 4374,568 para la construcción de inmunógenos de péptidos A β (SEQ ID NO: 64), que tiene un peso molecular teórico de 4374,07, que muestra alta precisión de la naturaleza molecular usada como principio activo farmacéutico en la formulación de vacuna para EA de UBI (UB-311).

La **Figura 2E** ilustra los perfiles de HPLC de construcciones de inmunógenos de péptidos A β (SEQ ID NOs: 65 y 64) altamente purificadas con tiempos de elución de 20 y 21 minutos, respectivamente. Las dos construcciones de inmunógenos de péptidos A β (SEQ ID NOs: 64 y 65) se extrajeron de una preparación de formulación de vacuna UB-311 después de un almacenamiento a 2-8 °C durante 3 años que muestra un perfil de HPLC esperado con el tiempo de elución a una relación molar igual como se mezcló previamente que ilustra la naturaleza de alta precisión de dicha formulación de vacuna de diseño racional.

La **Figura 3A** ilustra los motivos de unión de HLA de clase II del péptido Th de SEQ ID NO: 46 basado en una amplia búsqueda bibliográfica. Se tomó la decisión de usar una combinación de dos construcciones de inmunógenos de péptidos A β (SEQ ID NOs: 64 y 65) para ampliar las respuestas inmunitarias debido a la máxima cobertura del acervo genético de los pacientes que recibieron la vacuna.

La **Figura 3B** ilustra los motivos de unión de HLA de clase II del péptido Th de SEQ ID NO: 47 basado en una amplia búsqueda bibliográfica. Se tomó la decisión de usar una combinación de dos construcciones de inmunógenos de péptidos A β (SEQ ID NOs: 64 y 65) para ampliar las respuestas inmunitarias debido a la máxima cobertura del acervo genético de los pacientes que recibieron la vacuna.

La **Figura 4** ilustra la cinética de respuesta de anticuerpos durante un periodo de 26 semanas en cobayas a las formulaciones de vacuna que incorporan cantidades variables (desde 0, 10, 30, 100 hasta 300 μ g por 0,5 ml de dosis) de construcciones de inmunógenos de péptidos A β (SEQ ID NOs: 64 y 65) en combinación con una cantidad fija de sales minerales.

La **Figura 5A** es un esquema de la preparación de complejos inmunoestimulantes estables de péptidos/CpG mediante asociación/neutralización de electrocarga entre las construcciones de inmunógenos de péptidos A β y oligodesoxinucleótido (ODN) de CpG.

La **Figura 5B** es un esquema posterior a la Figura 5A para la preparación de la suspensión de vacuna basada en sal mineral que contiene dichos complejos inmunoestimulantes y sal mineral basada en aluminio.

La **Figura 6** ilustra la cinética de respuesta de anticuerpos durante un periodo de 10 semanas en babuinos de las formulaciones de vacuna a 300 μ g/0,5 ml/dosis de construcciones de inmunógenos de péptidos A β en presencia de diferentes adyuvantes (Alhydrogel/NaCl+ODN de CpG; Adjuphos/NaCl+ODN de CpG; y NaCl +ODN de CpG).

Figura 7: Estudio de inmunogenicidad en cobayas de la vacuna para EA de UBI que comprende construcciones de inmunógenos de péptidos A β (SEQ ID NOs: 64 y 65 en relación equimolar) después de un almacenamiento de 2 años a 2 a 8 °C. La vacuna para EA de UBI siguió siendo altamente inmunogénica y estable después de un protocolo estándar de sensibilización y refuerzo (3 wpi).

Figura 8A: Vasos cerebrales de un cerebro humano con EA no se tiñen inmunohistoquímicamente con fracciones de IgG de sueros preinmunes de babuino.

Figura 8B: Vasos cerebrales de un cerebro humano con EA muestran tinción inmunohistoquímica con IgG purificada de los sueros hiperinmunes de babuinos inmunizados con una relación equimolar de las construcciones de inmunógenos de péptidos A β SEQ ID NOs: 62 y 63.

Figura 8C: Vasos cerebrales de un cerebro humano con EA no se tiñen inmunohistoquímicamente con la IgG purificada de los sueros hiperinmunes descritos para la Figura 8B que se preincubó con péptido A β ₁₋₁₄. Esta figura muestra que la preincubación con el péptido A β ₁₋₁₄ absorbió toda la inmunorreactividad de vasos cerebrales por la IgG purificada de los sueros hiperinmunes, que demuestra la alta especificidad de los sueros hiperinmunes por la vacunación con una formulación de vacuna que comprende construcciones de inmunógenos de péptidos A β (SEQ ID NOs: 62 y 63).

Figura 8D: Vasos cerebrales de un cerebro humano con EA muestran tinción inmunohistoquímica con IgG purificada de los sueros hiperinmunes descritos para la Figura 8B que se preincubó con un péptido no relevante.

Figura 8E: Placas amiloides de un cerebro humano con EA no se tiñen inmunohistoquímicamente con fracciones de IgG de sueros preinmunes de babuino.

Figura 8F: Placas amiloides de un cerebro humano con EA muestran tinción inmunohistoquímica con IgG purificada de los sueros hiperinmunes de babuinos inmunizados con una relación equimolar de las construcciones de inmunógenos de péptidos A β SEQ ID NOs: 62 y 63.

Figura 8G: Placas amiloides de un cerebro humano con EA no se tiñen inmunohistoquímicamente con la IgG purificada de los sueros hiperinmunes descritos para la Figura 8B que se preincubó con el péptido A β ₁₋₁₄. Esta figura muestra que la preincubación con el péptido A β ₁₋₁₄ absorbió toda la inmunorreactividad de vasos cerebrales por la IgG purificada de los sueros hiperinmunes, que demuestra la alta especificidad de los sueros hiperinmunes por vacunación con una formulación de vacuna que comprende construcciones de inmunógenos de péptidos A β (SEQ ID NOs: 62 y 63).

Figura 8H: Placas amiloides de un cerebro humano con EA muestran tinción inmunohistoquímica con IgG purificada de los sueros hiperinmunes descritos para la Figura 8B que se preincubó con un péptido no relevante.

Figura 9: Estudio de inmunogenicidad de la vacuna para EA de UBI en babuinos adultos, *P. anubis*. **(Parte A)** Babuinos individuales inmunizados a las 0, 3, 6 semanas (flechas) con 300 μ g por dosis de la vacuna para EA de UBI formulada en sales minerales ($\blacklozenge$, $\blacktriangle$, $\bullet$, $\blacksquare$) y ensayada para títulos de anticuerpos anti-A β por ELISA. Obsérvese que tres de los cuatro babuinos generaron títulos de anticuerpos anti-A β después de la primera inmunización. **(Parte B)** Babuinos individuales inmunizados después de un periodo de descanso de 72 semanas, a las 78, 81 y 104 semanas (flechas), con 300 μ g (dosis baja, $\bullet$, $\blacksquare$) o 1200 μ g (dosis alta, $\blacklozenge$, $\blacktriangle$) de la vacuna para EA de UBI formulada en sales minerales y ensayada para títulos de anticuerpos anti-A β . Obsérvese que los cuatro babuinos desarrollaron fuertes respuestas de anticuerpos anti-A β después de un refuerzo con una única vacuna. Al final del periodo de estudio de 2 años, los cuatro babuinos siguieron sanos y activos.

Figura 10A: Efecto de la vacuna para EA de UBI en un modo de prevención sobre la morfología cerebral de la corteza de ratones transgénicos jóvenes que expresan en exceso hAPP751. Se analizaron muestras de cerebro obtenidas de ratones transgénicos tratados con adyuvante solo, respondedores de ratones tratados con la vacuna para EA de UBI y los ratones no tratados para la carga de placas de amiloide beta y se encontró un número reducido de placas y "menor tamaño medio de placas por μ m²" en ratones respondedores tratados para EA de UBI cuando se compararon con los no tratados y los tratados con adyuvante solo.

Figura 10B: Efecto de la vacuna para EA de UBI en un modo de prevención sobre la morfología cerebral del hipocampo de ratones transgénicos jóvenes que expresan en exceso hAPP751. Se analizaron muestras de cerebro obtenidas de ratones transgénicos tratados con adyuvante solo, respondedores de ratones tratados con la vacuna para EA de UBI y los ratones no tratados se analizaron para la carga de placas de amiloide beta y se encontró un número reducido de placas y "menor tamaño medio de placas por μ m²" en ratones respondedores tratados para EA de UBI cuando se compararon con los no tratados y los tratados con adyuvante solo.

Figura 11A: Efecto de la vacuna para EA de UBI en un modo preventivo sobre la concentración de péptido amiloide β (A β ₁₋₁₂) en extractos de tejido cerebral de ratones transgénicos jóvenes que expresan en exceso hAPP751. Se obtuvieron pequeñas protofibrillas de la fracción de Triton X-100 de las extracciones bioquímicas

de tejidos cerebrales. Se encontró que los ratones respondedores transgénicos tratados con la vacuna para EA de UBI tenían muchas menos protofibrillas cuando se compararon con las extracciones de tejido cerebral resultantes de las fracciones de Triton X-100 de ratones transgénicos no tratados.

Figura 11B: Efecto de la vacuna para EA de UBI en un modo preventivo sobre la concentración de péptido amiloide β ($A\beta_{1-42}$) en extractos de tejido cerebral de ratones transgénicos jóvenes que expresan en exceso hAPP751. Se obtuvieron grandes oligómeros y fibrillas de la fracción de detergente SDS de extracciones bioquímicas de tejidos cerebrales. Se encontró que los ratones respondedores transgénicos tratados con la vacuna para EA de UBI tenían muchos menos oligómeros grandes y fibrillas cuando se compararon con las extracciones de tejido cerebral resultantes de fracciones de SDS de ratones transgénicos no tratados.

Figura 12: Títulos medios de anticuerpos anti- $A\beta_{1-14}$ tras el tratamiento con vacunas para EA de UBI en pacientes. Se representaron dos conjuntos de datos con uno de los datos obtenidos entre las semanas 0 y 24/26 ($n = 17$, línea continua) durante el periodo de ensayo y el otro de los datos obtenidos que incluyen el periodo de observación de seguimiento ($n = 13$, línea discontinua) entre las semanas 0 y 48. El $\log_{10}$ títulos de anticuerpos anti- $A\beta_{1-14}$ disminuyó con el tiempo, pero siguió siendo positivo en todos los sujetos al final del estudio (semana 48).

Figura 13: Puntuaciones medias de ADAS-Cog (círculo relleno), MMSE (círculo blanco) y títulos de anticuerpos anti- $A\beta_{1-14}$ (barras rellenas) entre las semanas 0 y 48 en sujetos ≥ 60 años de edad y con puntuación de MMSE basal ≥ 20 que se someten al ensayo de la vacuna para EA de UBI.

Figura 14: Cambio en las puntuaciones medias de ADAS-Cog durante un periodo de 12 meses entre las vacunas para EA de UBI con EA leve y mayores de 60 años de edad (círculo relleno) y las de un grupo de placebo con EA leve en un ensayo de tarenflurbil (triángulo relleno). Seis sujetos ≥ 60 años de edad con EA leve mostraron mejoría con puntuaciones reducidas cuando se evaluaron a los 4, 6, 12 meses (cambio -3,00) después de la inmunización con la vacuna para EA de UBI en las semanas 0, 4, 12 en comparación con los sujetos con EA leve que recibieron un placebo en el ensayo de tarenflurbil (Green et al., JAMA 2009; 302(23):257-2564) y mostraron una mala respuesta con puntuaciones elevadas (cambio de 3,81) durante el mismo periodo de tiempo.

Figura 15A: Estudio de inmunogenicidad en pacientes que recibieron la vacuna para EA de UBI en un ensayo clínico de fase I. Se evaluaron antes del tratamiento muestras de suero de los 19 individuos con enfermedad de Alzheimer de leve a moderada (V1/V2; barras de color gris claro) y después de la inmunización en la semana 16 (V7; barras negras) para anticuerpos anti- $A\beta$. Se evaluaron los títulos de anticuerpos ($\log_{10}$) contra el monómero de $A\beta_{1-28}$ por la prueba de ELISA usando muestras de suero recogidas en la visita antes del tratamiento y en la semana 16, 4 semanas después de la última de las tres vacunaciones de la vacuna para EA de UBI administrada a las 0, 4 y 12 semanas. Se encontró poca o ninguna reactividad de los anticuerpos en las muestras antes del tratamiento (no observándose así barras en la mayor parte de la comparación de datos emparejados). Todos los individuos generaron anticuerpos anti- $A\beta$ de alto título después del tratamiento contra el monómero de $A\beta_{1-28}$ que están localizados en el extremo N de péptido $A\beta$ como se ilustra en la **Figura 16**.

Figura 15B: Estudio de inmunogenicidad en pacientes que recibieron la vacuna para EA de UBI en un ensayo clínico de fase I. Se evaluaron antes del tratamiento muestras de suero de los 19 individuos con enfermedad de Alzheimer de leve a moderada (V1/V2; barras de color gris claro) y después de la inmunización en la semana 16 (V7; barras negras) para anticuerpos anti- $A\beta$. Se evaluaron los títulos de anticuerpos ($\log_{10}$) contra el monómero de $A\beta_{1-42}$ por la prueba de ELISA usando muestras de suero recogidas en la visita antes del tratamiento y en la semana 16, 4 semanas después de la última de las tres vacunaciones de la vacuna para EA de UBI administrada a las 0, 4 y 12 semanas. Se encontró poca o ninguna reactividad de los anticuerpos en las muestras antes del tratamiento (no observándose así barras en la mayor parte de la comparación de datos emparejados). Todos los individuos generaron anticuerpos anti- $A\beta$ de alto título después del tratamiento contra el monómero de $A\beta_{1-42}$ que están localizados en el extremo N del péptido $A\beta$ como se ilustra en la **Figura 16**.

Figura 15C: Estudio de inmunogenicidad en pacientes que recibieron la vacuna para EA de UBI en un ensayo clínico de fase I. Se evaluaron antes del tratamiento muestras de suero de los 19 individuos con enfermedad de Alzheimer de leve a moderada (V1/V2; barras de color gris claro) y después de la inmunización en la semana 16 (V7; barras negras) para anticuerpos anti- $A\beta$. Se evaluaron los títulos de anticuerpos ($\log_{10}$) contra los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ por la prueba de ELISA usando muestras de suero recogidas en la visita antes del tratamiento y la semana 16, 4 semanas después de la última de las tres vacunaciones de la vacuna para EA de UBI administrada a las 0, 4 y 12 semanas. Se encontró poca o ninguna reactividad de anticuerpos en las muestras antes del tratamiento (no observándose así barras en la mayor parte de la comparación de datos emparejados). Todos los individuos generaron anticuerpos anti- $A\beta$ de alto título después del tratamiento contra los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ que están localizados en el extremo N del péptido $A\beta$ como se ilustra en la **Figura 16**.

Figura 16: Mapeo de epítopes para el análisis de especificidad fina en el extremo N de $A\beta_{1-42}$ por sueros de pacientes inmunizados con enfermedad de Alzheimer. El epítipo predominante reconocido por los anticuerpos

en las muestras de suero recogidas en la semana 16 de pacientes inmunizados con la vacuna para EA de UBI es específico para el péptido A β ₁₋₁₀. Este gráfico representa una respuesta positiva típica del mapeo de epítopes de un individuo (P210) que recibió tres dosis de la vacuna para EA de UBI y generó un log₁₀ título de anticuerpos anti-A β de 2,198 contra el péptido A β ₁₋₁₄. Se diluyó 1:50 el suero para el mapeo de epítopes. La altura de pico indica la concentración para inhibir el 50 % (CI₅₀) de la muestra del sujeto a diferentes péptidos A β 10-meros (SEQ ID NOs: 6, 8 a 30). Se observa un único pico principal, correspondiente a inmunorreactividad altamente específica por la secuencia de A β del extremo amino, SEQ ID NO: 6 (A β ₁₋₁₀: DAEFRHDSGY).

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se refiere a composiciones peptídicas que comprenden combinaciones de construcciones de inmunógenos de péptidos A β , composiciones farmacéuticas que comprenden estas composiciones peptídicas en una formulación de vacuna, teniendo las construcciones de inmunógenos de péptidos A β individuales el extremo N de péptido A β (A β ₁₋₁₄) como los epítopes de linfocitos B (B) enlazados mediante resto(s) espaciador(es) a epítopes de linfocitos T cooperadores (Th) heterólogos de proteínas de patógenos que actúan juntos para estimular la generación de anticuerpos específicos dirigidos contra el extremo N del péptido A β ₁₋₄₂ que ofrece respuestas inmunitarias protectoras a pacientes en riesgo de, o con, enfermedad de Alzheimer.

La presente divulgación también incluye métodos para el tratamiento y la prevención de enfermedad de Alzheimer. Los métodos desvelados utilizan composiciones farmacéuticas que incluyen una formulación de vacuna en suspensión que comprende las composiciones de construcciones de inmunógenos de péptidos A β que forman, opcionalmente, un complejo inmunoestimulante estable con oligonucleótido altamente negativamente cargado, tal como oligómeros de CpG mediante asociación electrostática, complejos que se complementan adicionalmente, opcionalmente, con sales minerales como adyuvante, para administración a pacientes en riesgo de, o con, enfermedad de Alzheimer. La presente divulgación también incluye métodos que utilizan formulaciones de vacuna, en particular a pautas posológicas, modos de y formas farmacéuticas para la administración de las formulaciones de vacuna que comprenden las construcciones de inmunógenos de péptidos A β para la prevención y el tratamiento de pacientes en riesgo de, o con, enfermedad de Alzheimer.

La presente divulgación también proporciona un método para la fabricación de bajo coste y el control de calidad de construcciones de inmunógenos de péptidos A β y una formulación de vacuna capaz de proteger animales y pacientes en riesgo de, o con, enfermedad de Alzheimer. La presente invención se refiere a un complejo inmunoestimulante estabilizado y a un método de preparación del complejo inmunoestimulante estabilizado. Más específicamente, la presente invención proporciona complejos inmunoestimulantes sintéticos estabilizados que comprenden las construcciones de inmunógenos de péptidos A β y oligonucleótido altamente negativamente cargado, tales como oligómeros de CpG, que son útiles en sistemas de administración de vacuna con respuestas inmunitarias mejoradas *in vivo*. Estos complejos inmunoestimulantes también son útiles para preparar formulaciones de vacuna diseñadas para servir de depósito para liberación controlada.

Se desvelan además anticuerpos monoclonales humanos contra A β ₁₋₄₂ inducidos por linfocitos B aislados de la sangre de un paciente que previamente recibió las formulaciones de vacuna de las construcciones de inmunógenos de péptidos A β de la presente invención.

(a) Péptido amiloide beta (A β)

El artículo en Wikipedia titulado "Beta amyloid" proporciona una revisión actualizada del objeto (http://en.wikipedia.org/wiki/Beta_amyloid). El enlace de internet a este artículo se proporciona aquí como una referencia.

Amiloide beta (A β o Abeta) es un péptido de 36-43 aminoácidos que se procesa a partir de la proteína precursora del amiloide. A β es el principal componente de los depósitos encontrados en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer. También se han encontrado pruebas de que A β es un péptido altamente multifuncional con una significativa actividad no patológica.

A β se forma después de la escisión secuencial de la proteína precursora del amiloide (APP), una glucoproteína transmembranaria de función indeterminada. La APP se puede procesar por α -, β -y γ -secretasas; la proteína A β se genera por la acción sucesiva de las β y γ secretasas. La γ secretasa, que produce el extremo C del péptido A β , se escinde dentro de la región transmembranaria de APP y puede generar varias isoformas de 36-43 restos de aminoácidos de longitud. Las isoformas más comunes son A β ₁₋₄₀ (SEQ ID NO: 2) y A β ₁₋₄₂ (SEQ ID NO: 1); la forma más larga se produce normalmente por escisión que ocurre en el retículo endoplásmico, mientras que la forma más corta se produce por escisión en la red del trans-Golgi red (Hartmann T, et al., 1997; Nature Medicine 3:1016-1020). La forma A β ₁₋₄₀ es la más común de las dos, pero A β ₁₋₄₂ (SEQ ID NO: 1) es la más fibrillogénica y así se asocia a estados de enfermedad.

Las mutaciones autosómicas-dominantes en APP provocan enfermedad de Alzheimer hereditaria de aparición temprana (AE familiar o EAF). Esta forma de EA solo explica no más del 10 % de todos los casos, y la gran mayoría

de la EA no va acompañada de dichas mutaciones. Sin embargo, es probable que la enfermedad de Alzheimer familiar resulte de procesamiento proteolítico alterado. Aumentos en o los niveles totales de A β o la concentración relativa de tanto A β_{1-40} como A β_{1-42} (donde el primero está más concentrado en las placas cerebrovasculares y el último en las placas neuríticas) participan en la patogénesis de tanto la enfermedad de Alzheimer familiar como esporádica.

Debido a su naturaleza más hidrófoba, A β_{1-42} es la forma más amiloidogénica del péptido. Sin embargo, se conoce que la secuencia central KLVFFAE (A β_{16-22}) (SEQ ID NOs: 31) forma amiloide por sí mismo, y probablemente forma el núcleo de la fibrilla.

La "hipótesis del amiloide" de que las placas son responsables de la patología de la enfermedad de Alzheimer es aceptada por la mayoría de los investigadores. Una hipótesis alternativa es que los oligómeros de amiloide son responsables de la enfermedad, en vez de las placas. Ratones que son genéticamente manipulados para expresar oligómeros pero no placas (APPE^{E693Q}) desarrollan la enfermedad. Es más, los ratones que son además manipulados para convertir oligómeros en placas (APPE^{E693Q} X PS1 Δ E9), no están más alterados que los ratones de solo oligómero. Se puede usar microscopía de fuerza atómica, que puede visualizar superficies moleculares a escala nanométrica, para determinar el estado de agregación (oligómeros) de péptido A β *in vitro*.

Existen muchas formas diferentes de medir el amiloide beta. Se puede medir semicuantitativamente con tinción inmunohistoquímica, que también permite la determinación de la localización. A β puede ser principalmente vascular, como en la angiopatía amiloide cerebral, o en placas seniles y áreas vasculares.

Un método altamente sensible para medir A β es mediante un ensayo inmunoanalítico de adsorción cuantitativo (qELISA), que utiliza un par de anticuerpos que reconocen A β .

Se pueden unir selectivamente compuestos de obtención de imágenes, en particular el compuesto B de Pittsburgh, (6-OH-BTA-1, una tioflavina) y florbetapir F18 (18F-AV-45), al amiloide beta *in vitro* e *in vivo*. Esta técnica, combinada con la obtención de imágenes por tomografía por emisión de positrones (PET), se ha usado para obtener imágenes de áreas de depósitos de placas en pacientes con enfermedad de Alzheimer.

(b) Epítopes de linfocitos B: extremo N del péptido A β

La presente invención se refiere a una novedosa composición peptídica para la generación de anticuerpos oligoclonales de alto título con especificidad por el extremo N del péptido A β , con reactividades cruzadas con A β_{1-42} soluble y las placas en el cerebro de pacientes con EA. La especificidad por sitio de la composición peptídica mediante intentos de diseños racionales minimiza la generación de anticuerpos que se dirigen a sitios irrelevantes sobre proteínas transportadoras.

La **Tabla 1** proporciona varios péptidos lineales cortos que incluyen fragmento(s) de péptidos desde el extremo N de A β_{1-42} . Los péptidos A β_{1-42} (SEQ ID NO: 1) y A β_{1-28} (SEQ ID NO: 3) son lo suficientemente largos como para provocar una respuesta inmunitaria sin la necesidad de una proteína transportadora. Sin embargo, los péptidos A β de extremo N más cortos, tales como A β_{1-14} , A β_{1-12} , A β_{1-10} (SEQ ID NOs: 4 a 6), no son inmunogénicos en sí mismos, como se muestra en la **Tabla 4** del **Ejemplo 7** (compárese el Grupo 3 con los Grupos 1 y 2 en el estudio de inmunogenicidad). Este resultado confirma la presencia de un epítipo de linfocitos T cooperadores (Th) autólogo entre los aminoácidos 15 y 28 que convierte el péptido A β_{1-28} en inmunogénico. Los fragmentos de A β más cortos pueden ser inmunopotenciados por acoplamiento químico con una proteína transportadora, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana (KLH) como se muestra en el Grupo 4 de la **Tabla 6** en el **Ejemplo 7**. Las principales deficiencias de dichas vacunas "péptido(s) A β -vehículo" es que la mayoría (>90 %) de los anticuerpos generados por las combinaciones son los anticuerpos no funcionales dirigidos contra la proteína transportadora KLH, como se muestra en la **Tabla 6**, Grupo 4 del **Ejemplo 7** y el potencial de supresión epítópica.

Los inmunógenos peptídicos desvelados en el presente documento incluyen 10 a 14 aminoácidos (10- a 14-mero) del fragmento del extremo N del péptido A β , empezando con el aminoácido Asp (D) en la posición 1. Los inmunógenos peptídicos completamente sintéticos que comprenden estos fragmentos del péptido A β también contienen epítopes de linfocitos T cooperadores (Th) seleccionados (por ejemplo SEQ ID NOs: 33-47) que tienen múltiples motivos de unión a MHC de clase II, que provocan una respuesta inmunitaria que se centra exclusivamente en los sitios diana del extremo N sobre el péptido A β_{1-42} con altas reactividades cruzadas por el péptido A β_{1-42} y las placas seniles en el cerebro de pacientes con EA.

(c) Epítopes de linfocitos T cooperadores (epítopes Th) heterólogos

Los epítopes de linfocitos T se presentan sobre la superficie de una célula presentadora de antígenos, donde se unen a moléculas de MHC. Los epítopes de linfocitos T presentados por moléculas de MHC de clase I normalmente son péptidos de entre 8 y 11 aminoácidos de longitud, mientras que las moléculas de MHC de clase II presentan péptidos más largos, 13-17 aminoácidos de longitud, y las moléculas de MHC no clásicas también presentan epítopes no peptídicos, tales como glucolípidos.

Los linfocitos T cooperadores (linfocitos Th) son un subgrupo de linfocitos, un tipo de glóbulo blanco, que desempeñan una función importante en el sistema inmunitario, particularmente en el sistema inmunitario adaptativo. Ayudan en la actividad de otras células inmunitarias liberando citocinas de linfocitos T. Son esenciales en el cambio de clase de anticuerpos de linfocitos B, en la activación y el crecimiento de linfocitos T citotóxicos, y en maximizar la actividad bactericida de fagocitos, tales como los macrófagos.

Los epítopes de linfocitos T cooperadores (epítopes Th) son los epítopes de linfocitos T que se presentan sobre la superficie de una célula presentadora de antígenos, donde se unen a moléculas de MHC de clase II y tienen 13 a 17 aminoácidos de longitud, que son específicamente reconocidos por linfocitos T cooperadores, como se ha descrito anteriormente.

Los péptidos que se unen a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II son cruciales para el inicio y la regulación de respuestas inmunitarias. La predicción de los péptidos que se unen a una molécula de MHC específica desempeña una función importante en la determinación de posibles candidatos para vacunas. El surco de unión en MHC de clase II está abierto en ambos extremos, permitiendo que se unan péptidos más largos de 9-meros. Es difícil encontrar el motivo consenso que facilita la unión de péptidos a una molécula de MHC de clase II, debido a las diferentes longitudes de péptidos de unión y la localización variable del núcleo de unión 9-mero. El nivel de dificultad aumenta cuando la molécula es promiscua y se une a un gran número de péptidos de baja afinidad.

Durante las dos últimas décadas, la presente inventora y su equipo han identificado muchos epítopes Th posibles con motivos de unión promiscuos a las moléculas de MHC de clase II de diferentes especies (por ejemplo, humana, cerdo, ganado vacuno, etc.) de proteínas de muchos patógenos para su uso como epítopes Th heterogéneos para el diseño de construcciones de inmunógenos peptídicos (Wang CY, 2004; patente de EE. UU. N° 6.713.301 B1 y Wang CY, 2005; patente de EE. UU. N° 6.906.169), donde epítopes de linfocitos B diana específicos (por ejemplo, fragmentos de péptidos A β) se enlazan en cualquiera del extremo N o C a dichos epítopes Th para inmunogenicidad potenciada que genera anticuerpos específicos de alto título dirigidos contra los epítopes de linfocitos B mediante diseño racional (5, 6). Se debe enfatizar que todos los inmunógenos racionalmente diseñados empleados en una vacuna se deben validar para la eficacia de dichos epítopes Th mediante inmunización experimental como parte de un proceso de cribado (por ejemplo, **Ejemplo 7, Tablas 4, 5, 6 y 7**) para seleccionar los epítopes Th óptimos para su uso en formulaciones de vacuna. Un epítope Th ideal comprenderá múltiples motivos de unión promiscuos a MHC de clase II para permitir la máxima activación de linfocitos T cooperadores conduciendo al inicio y a la regulación de respuestas inmunitarias, y normalmente son inmunosilenciosos en sí mismos, es decir, ninguno de los anticuerpos generados por las construcciones de inmunógenos se dirigirá hacia los epítopes Th (por ejemplo, Grupos 1, 2 y 3 de la **Tabla 6** del **Ejemplo 7**; y Grupo 1 de la **Tabla 7** en los **Ejemplos 8 y 9**), permitiendo así que respuestas inmunitarias muy centradas se dirijan principalmente hacia los epítopes de linfocito B dirigidos.

Th se refiere a una secuencia de aminoácidos (aminoácidos naturales o no naturales) que comprende un epítope Th. El dominio Th de los péptidos objeto tiene aproximadamente 9 a aproximadamente 25 aminoácidos, preferentemente desde aproximadamente 13 hasta aproximadamente 17 aminoácidos. Un segmento Th y análogos inmunológicos funcionales del mismo comprende una porción contigua de un epítope Th que es suficiente para potenciar o estimular una respuesta inmunitaria al fragmento del extremo N del péptido A β ₁₋₄₂ desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 14 restos de aminoácidos (SEQ ID NOs: 4 a 6).

Los epítopes Th descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, los derivados de patógenos extraños, como se ejemplifica en la **Tabla 2** (SEQ ID NOs: 33 - 41). Además, los epítopes Th incluyen Th artificial idealizado y Th combinatorio artificial idealizado (SEQ ID NOs: 42-47). Los péptidos que comprenden Th combinatorio se producen simultáneamente en una única síntesis de péptidos en fase sólida en tándem con las secuencias de péptido(s) A β del extremo N. Los sitios Th también incluyen análogos inmunológicos. Los análogos Th inmunológicos incluyen análogos inmunopotenciadores, análogos que reaccionan de forma cruzada y segmentos de cualquiera de estos epítopes Th. Los análogos Th inmunológicos funcionales incluyen sustituciones conservativas, adiciones, deleciones e inserciones desde uno hasta aproximadamente cinco restos de aminoácidos en el epítope Th que no modifican esencialmente la función estimulante de Th del epítope Th como se ilustra mejor en varias versiones del epítope Th derivado de Ths de la proteína de fusión del virus del sarampión MVF1-5 (SEQ ID NOs: 34, 41, 42, 44 y 46) y Ths del antígeno de superficie de la hepatitis B HBsAg 1-3 (SEQ ID NOs: 43, 45, 47).

Las construcciones de inmunógenos de los péptidos A β tienen el epítope Th desde aproximadamente 13 hasta aproximadamente 20 restos de aminoácidos covalentemente unidos mediante el "espaciador A" al extremo C del fragmento del extremo N del péptido A β ₁₋₄₂, así como análogos que reaccionan de forma cruzada o funcionales de las mismas. Los análogos que reaccionan de forma cruzada o funcionales de las construcciones de inmunógenos de péptidos A β (por ejemplo, SEQ ID NOs: 48 a 65) desveladas en el presente documento pueden comprender además sustituciones conservativas, adiciones, deleciones o inserciones de desde uno hasta aproximadamente cinco restos de aminoácidos, a condición de que los análogos peptídicos sean capaces de provocar respuestas inmunitarias que reaccionan de forma cruzada con los péptidos A β ₁₋₄₂. Las sustituciones conservativas, adiciones e inserciones se

pueden llevar a cabo con aminoácidos naturales o no naturales, como se define en el presente documento.

Los inmunógenos peptídicos de la presente invención son los péptidos que contienen el fragmento del extremo N del péptido A β ₁₋₄₂ (SEQ ID NO: 4); un espaciador (ϵ -Lys); y un epítipo Th que se selecciona de aquellos en la **Tabla 2** (SEQ ID NOs: 44-47) (véanse los resultados de la prueba de inmunogenicidad en la **Tabla 4** del **Ejemplo 7**).

También son eficaces los análogos inmunológicos funcionales (por ejemplo, diversas secuencias de Ths de MVF, SEQ ID NOs: 34, 41, 42, 44 y 46; y Ths de HBsAg, SEQ ID NOs: 43, 45, 47) de los péptidos de epítipo Th. Los análogos inmunológicos funcionales de las construcciones de inmunógenos de péptidos A β incluyen variantes de SEQ ID NOs: 49-51, 54-55, 57-65 y/u homólogos de SEQ ID NOs: 49-51, 54-55, 57-65 que retienen sustancialmente la misma inmunogenicidad que el péptido original de SEQ ID NOs: 51 y 60. Por ejemplo, las variantes que son análogos funcionales pueden tener una sustitución conservativa en una posición de aminoácido; un cambio en la carga global; una fijación covalente a otro resto; o adiciones, inserciones o deleciones de aminoácidos; y/o cualquier combinación de los mismos.

Sustituciones conservativas son cuando un resto de aminoácido se sustituye con otro resto de aminoácido con propiedades químicas similares. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; los aminoácidos positivamente cargados (básicos) incluyen arginina, lisina y histidina; y los aminoácidos negativamente cargados (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

El análogo funcional descrito tiene al menos 50 % de identidad con la secuencia de aminoácidos original. Alternativamente, el análogo funcional tiene al menos 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos original. El análogo funcional puede tener al menos 85 % o al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos original.

Se desvela además que el análogo inmunológico funcional de un péptido particular contiene la misma secuencia de aminoácidos que el péptido original e incluye además tres lisinas (Lys-Lys-Lys) añadidas al extremo amino del péptido. La inclusión de las tres lisinas a la secuencia de péptidos original cambia la carga global del péptido original, pero no altera la función del péptido original como se ilustra en la serie de péptidos Th de MVF (**Tablas 2 a 7**).

La **Tabla 2** identifica otra variación de un análogo funcional para el péptido de epítipo Th. En particular, SEQ ID NOs: 34 y 41 de Th de MVF1 y Th de MVF2 son análogos funcionales de SEQ ID NOs: 44 y 46 de Th de MVF4 y Th de MVF5 en que se diferencian en el marco de aminoácidos por la delección (SEQ ID NOs: 34 y 41) o la inclusión (SEQ ID NOs: 44 y 46) de dos aminoácidos cada uno en los extremos N y C. Las diferencias entre estas dos series de secuencias de análogos no afectaría la función de los epítipo Th contenidos dentro de estas secuencias (por ejemplo, Grupos 7, 8, 14 de la **Tabla 4** en el **Ejemplo 7** frente al **Grupo 1** de la **Tabla 5** en el **Ejemplo 7** y **Grupo 1** de la **Tabla 7** en el **Ejemplo 8**).

En otras variaciones, los péptidos de epítipo Th heterólogos se pueden presentar como una secuencia combinatoria, que contiene una mezcla de restos de aminoácidos representados en posiciones específicas dentro de la región estructural del péptido basándose en los restos variables de homólogos para ese péptido particular. Se puede sintetizar un ensamblaje de péptidos combinatorios en un proceso añadiendo una mezcla de los aminoácidos protegidos diseñados, en lugar de un aminoácido particular, en una posición especificada durante el proceso de síntesis. Dichos ensamblajes de péptidos de epítipo Th heterólogos combinatorios pueden permitir la amplia cobertura de epítipo Th para animales que tienen un acervo genético distinto. Las secuencias combinatorias representativas de péptidos de epítipo Th heterólogos incluyen SEQ ID NOs: 42 a 45, que se muestran en la **Tabla 2**. Los péptidos de epítipo Th desvelados en el presente documento proporcionan una amplia reactividad e inmunogenicidad a los animales y pacientes de poblaciones genéticamente diversas.

En general, la construcción de inmunógenos de péptidos A β desvelada se representa por la siguiente fórmula: (fragmento del extremo N del péptido A β ₁₋₄₂)-(A)₀-(Th)-X

en donde (fragmento del extremo N del péptido A β ₁₋₄₂) es un epítipo de linfocitos B seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 4 a 6 desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 14 restos de aminoácidos; cada A es independientemente un aminoácido o un grupo de enlace elegido del grupo que consiste en un aminoácido, Lys-, Gly-, Lys-Lys-Lys-, (α , ϵ -N)Lys, o ϵ -N-Lys-Lys-Lys-Lys (SEQ ID NOs: 32);

cada Th comprende una secuencia de aminoácidos que constituye un epítipo de linfocitos T cooperadores seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 34, 37, 38, 40 a 47 y análogos inmunológicos funcionales de los mismos;

X es un α -COOH o α -CONH₂ de un aminoácido; y
o es desde 0 hasta aproximadamente 4.

La construcción de inmunógenos de péptidos A β de la presente invención comprende desde aproximadamente 20

hasta aproximadamente 50 restos de aminoácidos, preferentemente desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 40 restos de aminoácidos.

La separación conformacional proporcionada por un espaciador (A) permite interacciones más eficientes entre la construcción de inmunógenos de péptidos Aβ presentada y los linfocitos Th y linfocitos B apropiados y así potencia la inmunogenicidad de las construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ o análogos inmunológicos funcionales reactivos de forma cruzada de los mismos.

(d) Composiciones:

(i) Composiciones peptídicas:

Las composiciones de la presente divulgación contienen una combinación de construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ. Las composiciones peptídicas que comprenden una mezcla de las construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ con dos o más de los epítopes Th se pueden preparar en una formulación farmacéutica / de vacuna para permitir la mejoría sinérgica de la inmunoeficacia en una población genética más amplia debido a una cobertura más amplia del MHC de clase II. Dichas composiciones pueden proporcionar una respuesta inmunitaria mejorada a los fragmentos del péptido Aβ₁₋₄₂.

Más específicamente, las composiciones peptídicas contienen construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ que tienen la secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 62, 63, 64 y 65 (por ejemplo SEQ ID NOs: 62 y 63 como una mezcla equimolar como se muestra en el **Ejemplo 7** o SEQ ID NOs: 64 y 65 como otra mezcla equimolar en los **Ejemplos 8, 9 y 10**).

(ii) Composiciones farmacéuticas:

La presente divulgación también se refiere a composiciones que contienen una mezcla de construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ que son composiciones farmacéuticas para tratar y/o prevenir demencia del tipo Alzheimer en pacientes en riesgo de, o con, EA.

Las composiciones se pueden preparar en forma líquida (por ejemplo, disoluciones o suspensiones). Normalmente, las composiciones se preparan como inyectables, ya sea como disoluciones o suspensiones líquidas. También se pueden preparar vehículos líquidos antes de la inyección. Las formulaciones adecuadas adicionales para otros modos de administración incluyen aplicaciones orales e intranasales. Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de las afecciones anteriormente descritas, varían dependiendo de muchos factores diferentes, que incluyen medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otras medicaciones administradas y si tratamiento es profiláctico o terapéutico. Normalmente, el paciente es un humano, pero también se pueden tratar mamíferos no humanos que incluyen mamíferos transgénicos.

Las composiciones farmacéuticas se formulan para contener una cantidad eficaz de construcción de inmunógenos de péptidos Aβ y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas también se formulan en una forma unitaria de dosificación adecuada que contiene, en general, desde aproximadamente 0,5 µg hasta aproximadamente 1 mg del inmunógeno por kg de peso corporal. Cuando se administra en dosis múltiples, las composiciones farmacéuticas se pueden dividir convenientemente en una cantidad apropiada por forma unitaria de dosificación. La dosificación administrada dependerá de la edad, peso y salud general del sujeto, como se conoce bien en las ciencias de las vacunas y terapéuticas.

(iii) Formulaciones farmacéuticas de vacuna:

En ciertas realizaciones, se usa una composición farmacéutica que comprende construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ para provocar una respuesta inmunitaria al extremo N del péptido Aβ en un receptor de la vacuna. Las composiciones farmacéuticas que contienen construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ de la presente invención se pueden usar como una vacuna para la prevención y el tratamiento de demencia del tipo Alzheimer para los receptores de la vacuna o pacientes en riesgo de, o con, EA.

Además, las composiciones pueden contener vehículos y/u otros aditivos en un sistema de administración farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, una composición que contiene las construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ se puede formular como una formulación de vacuna farmacéutica usando adyuvantes, vehículos farmacéuticamente aceptables u otros componentes que incluyen adyuvantes inmunológicos rutinariamente proporcionados en las formulaciones de vacuna. Un adyuvante inmunológico se define como "cualquier sustancia que actúa acelerando, prolongando o potenciando las respuestas inmunitarias específicas de antígeno sin tener ningún efecto específico antigénico por sí misma cuando se usa en combinación con antígenos de vacuna específicos". Existen muchos adyuvantes conocidos en uso generalizado, que incluyen aceites, sales de aluminio y virosomas. Dos sales comunes que incluyen fosfato de aluminio (por ejemplo, Adjuphos) e hidróxido de aluminio (por ejemplo, Alhydrogel) son los adyuvantes más comunes en las vacunas humanas. Los expertos en la técnica

conocen bien los métodos de selección de las sales minerales y de determinación de la concentración preferida de sal mineral a emplear o combinaciones de la misma.

Entre otros componentes que también se pueden usar como adyuvantes en la presente invención se incluyen liposina, saponina, escualeno, L121, Emulsigen, monofosforil lípido A (MPL), QS21, ISA35, ISA206, ISA50V, ISA51 e ISA720 así como los otros adyuvantes y emulsionantes eficaces. En una realización particular, el vehículo de administración y adyuvante es Montanide™ ISA51 (una composición de adyuvante de vacuna de aceite que comprende aceite vegetal y oleato de manida para la producción de emulsiones de agua en aceite), Tween® 80 (también conocido como: Polisorbato 80 o monooleato de polioxietilen (20)-sorbitano), un oligonucleótido de CpG, y/o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, la composición farmacéutica es una emulsión de agua en aceite en agua (es decir, w/o/w) con Emulsigen o Emulsigen D como adyuvante.

Las composiciones farmacéuticas como vacunas se pueden formular como formulaciones de liberación inmediata o de liberación sostenida. Además, las composiciones farmacéuticas se pueden formular para la inducción de inmunidad mucosa sistémica o localizada, mediante atrapamiento de inmunógenos y administración conjunta con micropartículas. Dichos sistemas de administración son fácilmente determinados por un experto habitual en la técnica.

Diversas formulaciones de vacuna que contienen construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ de la presente divulgación son eficaces para la protección y el tratamiento de demencia del tipo Alzheimer en los receptores de la vacuna o pacientes en riesgo de, o con, EA.

(iv) Complejos inmunoestimulantes de péptidos Aβ:

Según la invención, las composiciones farmacéuticas contienen complejos inmunoestimulantes que comprenden (a) oligonucleótido de CpG y (b) construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ. Dichos complejos inmunoestimulantes se adaptan específicamente para actuar de adyuvante y como estabilizador de los inmunógenos peptídicos. Los complejos inmunoestimulantes están en forma de una partícula, que puede presentar eficientemente construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ a las células del sistema inmunitario para producir una respuesta inmunitaria. Los complejos inmunoestimulantes se pueden formular como una suspensión para administración parenteral. Los complejos inmunoestimulantes también se pueden formular en forma de emulsiones w/o, como una suspensión en combinación con una sal mineral o con un polímero de gelificación *in situ* para la eficiente administración de las construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ a las células del sistema inmunitario de un receptor de la vacuna tras la administración parenteral, para producir una respuesta inmunitaria anti-Aβ con beneficio protector. La presente invención se refiere a un complejo inmunoestimulante estabilizado que comprende una construcción catiónica de inmunógenos de péptidos Aβ y una molécula aniónica u oligonucleótido o polinucleótido y combinaciones de los mismos y un método estabilización de una construcción catiónica de inmunógenos de péptidos Aβ por complejación con una molécula aniónica u oligonucleótido o polinucleótido mediante asociación electrostática. El complejo inmunoestimulante estabilizado se puede incorporar en una composición farmacéutica como un sistema de administración de inmunógenos.

Una construcción de inmunógenos de péptidos Aβ que es un "péptido catiónico" como se describe en el presente documento se refiere a un péptido que está positivamente cargado a un pH en el intervalo de 5,0 a 8,0. La carga neta sobre el péptido o las mezclas de péptidos se calcula asignando una carga +1 a cada lisina (K), arginina (R) o histidina (H), una carga -1 a cada ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E) y una carga de 0 para el otro aminoácido dentro de la secuencia. Las contribuciones de carga de los grupos terminales de amina del extremo N (+1) y carboxilato del extremo C (-1) de cada péptido se cancelan eficazmente entre sí cuando no se sustituyen. Se suman las cargas para cada péptido y se expresan como la carga promedio neta. Un inmunógeno peptídico adecuado tiene una carga positiva promedio neta de +1. Preferentemente, el inmunógeno peptídico tiene una carga positiva neta en el intervalo que es mayor que +2.

Una "molécula aniónica" como se describe en el presente documento se refiere a una molécula que está negativamente cargada a un pH en el intervalo de 5,0-8,0. La carga negativa neta en el oligómero o polímero se calcula asignando una carga -1 para cada grupo fosfodiéster o fosforotioato en el oligómero. Un oligonucleótido aniónico adecuado es una molécula de ADN monocatenaria con 8 a 64 bases de nucleótidos, con el número de repeticiones del motivo CpG en el intervalo de 1 a 10. Preferentemente, las moléculas de ADN monocatenarias inmunoestimulantes de CpG contienen 18-48 bases de nucleótidos, con el número de repeticiones del motivo CpG en el intervalo de 3 a 8.

Más preferentemente, el oligonucleótido aniónico se representa por la fórmula: 5' X¹CGX² 3' en donde C y G no están metilados; y X¹ se selecciona del grupo que consiste en A (adenina), G (guanina) y T (timina); y X² es C (citósina) o T (timina). O, el oligonucleótido aniónico se representa por la fórmula: 5' (X³)₂CG(X⁴)₂ 3' en donde C y G no están metilados; y X³ se selecciona del grupo que consiste en A, T o G; y X⁴ es C o T.

El complejo inmunoestimulante resultante está en forma de partículas con un tamaño normalmente en el intervalo desde 1-50 micrómetros y es una función de muchos factores que incluyen la estequiometría de carga relativa y el

peso molecular de las especies que interaccionan. El complejo inmunoestimulante en partículas tiene la ventaja añadida de proporcionar adyuvanciación y regulación por incremento de respuestas inmunitarias específicas *in vivo*. Además, el complejo inmunoestimulante estabilizado es adecuado para preparar formulaciones de vacuna por diversos procesos que incluyen emulsiones de agua en aceite, suspensiones de sales minerales y geles poliméricos.

(e) Métodos de fabricación

La presente divulgación también se refiere a métodos para la fabricación de las construcciones de inmunógenos de péptidos A β , composiciones y composiciones farmacéuticas, formulaciones de vacuna para provocar respuestas inmunitarias y proteger los pacientes en riesgo de, o con, EA.

(i) Métodos de fabricación de las construcciones de inmunógenos de péptidos A β .

Los inmunógenos peptídicos de la presente invención se pueden preparar por métodos de síntesis química bien conocidos por el experto en la técnica. Véanse, por ejemplo, Moore V. Capítulo 2 en *Synthetic Peptides: A User's Guide*, ed. GA Grant, W. H. Freeman & Co., New York, NY, 1992, p. 63-67. Por tanto, los péptidos se pueden sintetizar usando las técnicas automatizadas de Merrifield de síntesis en fase sólida con el α -NH₂ protegido por o química de t-Boc o de F-moc usando aminoácidos protegidos en la cadena lateral en, por ejemplo, un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems modelo 430A o 431. La preparación de construcciones de péptidos que comprenden péptidos de bibliotecas combinatorias para epítopes Th se puede llevar a cabo proporcionando una mezcla de aminoácidos alternativos para acoplamiento en una posición variable dada.

Después del ensamblaje completo del inmunógeno peptídico deseado, la resina se trata según procedimientos convencionales para escindir el péptido de la resina y desbloquear los grupos funcionales en las cadenas laterales de aminoácidos. El péptido libre se purifica por HPLC y se caracteriza bioquímicamente, por ejemplo, por análisis de aminoácidos o por secuenciación. Un experto habitual en la técnica conoce bien los métodos de purificación y caracterización para péptidos.

El inmunógeno de la presente invención también se puede preparar como un polímero ramificado por síntesis de la construcción peptídica deseada directamente sobre una resina de núcleo de poli-lisilo ramificada (Wang, et al., *Science*, 1991; 254:285-288).

La calidad de los péptidos producidos por este proceso químico se puede controlar y definir y, como resultado, se puede asegurar la reproducibilidad de la antigenicidad, inmunogenicidad y rendimiento. La descripción detallada de la fabricación del péptido relacionado con A β o construcciones de inmunógeno peptídico mediante síntesis de péptidos en fase sólida se muestra en el **Ejemplo 1**.

Durante 25 años de experiencia en aplicaciones inmunológicas de péptidos sintéticos, el solicitante ha encontrado que el intervalo en variabilidad estructural que permite la retención de una actividad inmunológica prevista es mucho más complaciente que el intervalo en la variabilidad estructural permitida para la retención de una actividad de fármaco específica por un fármaco de molécula pequeña o las actividades deseadas y toxicidades no deseadas encontradas en grandes moléculas que son producidas conjuntamente con fármacos biológicamente obtenidos. Así, los análogos de péptidos, ya sea diseñados deliberadamente o producidos inevitablemente por errores del proceso sintético como una mezcla de subproductos de secuencias de delección que tienen propiedades cromatográficas e inmunológicas similares al péptido previsto, son frecuentemente tan eficaces como una preparación purificada del péptido deseado. Los análogos diseñados y las mezclas de análogos accidentales son eficaces en tanto que se desarrolle un procedimiento de QC exigente para monitorizar tanto el proceso de fabricación como el proceso de evaluación de los productos para garantizar la reproducibilidad y eficacia de los productos finales que emplean estos péptidos.

Los péptidos también se pueden preparar usando tecnología de ADN recombinante que incluye moléculas de ácidos nucleicos, vectores y/o células hospedadoras. Como tales, las moléculas de ácidos nucleicos que codifican las construcciones de inmunógenos de péptidos A β y análogos inmunológicamente funcionales de las construcciones de inmunógenos de péptidos A β y análogos/homólogos de las mismas también están englobadas por la presente divulgación como parte de la presente invención. Similarmente, también están englobados por la presente divulgación como parte de la presente invención vectores, que incluyen vectores de expresión, que comprenden moléculas de ácidos nucleicos, así como células hospedadoras que contienen los vectores.

Diversas realizaciones a modo de ejemplo también engloban métodos de producción de las construcciones de inmunógenos de péptidos A β y análogos inmunológicamente funcionales de las construcciones de inmunógenos de péptidos A β . Por ejemplo, los métodos pueden incluir una etapa de incubar una célula hospedadora que contiene un vector de expresión que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica construcciones de inmunógenos de péptidos A β y/o análogo inmunológicamente funcional de las mismas en dichas condiciones donde se expresa el péptido y/o análogo. Se pueden sintetizar inmunógenos peptídicos sintéticos más largos por técnicas de ADN recombinante bien conocidas. Se proporcionan dichas técnicas en manuales estándar bien conocidos con protocolos detallados. Para construir un gen que codifica un péptido de la presente invención, la secuencia de aminoácidos se

traduce de forma inversa para obtener una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos, preferentemente con codones que son óptimos para el organismo en el que el gen se va a expresar. A continuación, se prepara un gen sintético, normalmente sintetizando oligonucleótidos que codifican el péptido y cualquier elemento regulador, si fuera necesario. El gen sintético se inserta en un vector de clonación adecuado y se transfecta en una célula hospedadora. Entonces se expresa el péptido en condiciones adecuadas apropiadas para el sistema de expresión seleccionado y el hospedador. El péptido se purifica y se caracteriza por métodos convencionales.

(ii) Métodos para la fabricación de complejos inmunoestimulantes

Diversas realizaciones a modo de ejemplo también engloban los métodos de producción de complejos inmunoestimulantes (ISC) que comprenden construcciones de inmunógenos de péptidos A β y molécula de oligodesoxinucleótido (ODN) de CpG. En una realización, como se ilustra en la **Figura 5A**, los complejos inmunoestimulantes estabilizados se obtienen de péptidos catiónicos y una molécula de ODN de CpG polianiónica. La **Figura 5A** ilustra un sistema de autoensamblaje accionado por neutralización de carga electrostática. La estequiometría de la relación de carga molar entre el péptido catiónico y el oligómero aniónico determina el grado de asociación. La asociación electrostática no covalente de inmunógenos peptídicos y ODN de CpG es un proceso completamente reproducible. El complejo inmunoestimulante de péptidos/ODN de CpG se autoagrega y facilita la presentación a las células de procesamiento de antígenos (APC) "profesionales" del sistema inmunitario, potenciando así adicionalmente la inmunogenicidad de los complejos. Estos complejos se caracterizan fácilmente para control de calidad durante la fabricación. Los ISC de péptidos/CpG son bien tolerados *in vivo*.

En una realización, la formulación de vacuna (la vacuna para EA de UBI) emplea dos construcciones de inmunógenos de péptidos A β (SEQ ID NOs: 64 y 65), preparadas en una relación equimolar, mezcladas con un ODN de CpG patentado que da como resultado la formación espontánea de complejos inmunoestimulantes en disolución, como se describe en los **Ejemplos 8 y 9**. Este novedoso sistema de partículas, que comprende ODN de CpG y construcciones de inmunógenos de péptidos A β , se diseñó para aprovechar la mitogenicidad generalizada de linfocitos B asociada al uso de ODN de CpG, pero promueve respuestas equilibradas de tipo Th-1/Th-2.

El ODN de CpG en la formulación de vacuna desvelada se une 100 % al inmunógeno en un proceso mediado por la neutralización electrostática de carga opuesta, dando como resultado la formación de partículas de tamaño micrométrico. La forma en partículas permite una dosificación significativamente reducida de CpG del uso convencional de adyuvantes de CpG, tiene menos potencial de respuestas inmunitarias innatas adversas y facilita las vías alternativas de procesamiento de inmunógenos que incluyen células presentadoras de antígenos (APC). Por consiguiente, las formulaciones desveladas (las vacunas para EA de UBI) son conceptualmente novedosas y ofrecen ventajas que promueven la estimulación de respuestas inmunitarias por mecanismos alternativos.

(iii) Métodos para la fabricación de formulaciones de vacuna.

Diversas realizaciones a modo de ejemplo también engloban formulaciones de vacuna que emplean emulsiones de agua en aceite y en suspensión con sales minerales, como se muestra en la **Figura 5B**. Con el fin de una vacuna diseñada para ser usada por una gran población y siendo también la prevención parte del objetivo para administración, la seguridad llega a ser otro factor importante a tener en cuenta. A pesar del uso de emulsiones de agua en aceite en seres humanos para muchas formulaciones de vacuna en ensayos clínicos, el alumbre sigue siendo el principal adyuvante para su uso en formulaciones de vacuna debido a sus décadas de pruebas de seguridad. Se usaron alumbre o sus sales minerales Adjuvophos (fosfato de aluminio) como adyuvantes en la preparación para aplicaciones clínicas, como se ilustra en los **Ejemplos 8 y 9**.

(f) Métodos para el tratamiento y la prevención de enfermedad de Alzheimer

(i) Pautas de tratamiento

En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas se administran a un paciente susceptible a, o en riesgo de, enfermedad de Alzheimer en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, reducir la intensidad o retrasar la aparición de la enfermedad (bioquímica, histológica y/o conductual), que incluye sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad.

En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que se sospecha que, o que ya padece, dicha enfermedad en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad (bioquímica, histológica y/o conductual), que incluye sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad.

En algunos métodos, la administración de agente reduce o elimina el deterioro cognitivo leve en pacientes que todavía no han desarrollado la patología característica del Alzheimer. Una cantidad adecuada para realizar el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis terapéuticamente o profilácticamente eficaz. En tanto las pautas profilácticas como terapéuticas, normalmente se administran agentes en varias dosificaciones hasta que se haya logrado una respuesta inmunitaria suficiente. Normalmente, se monitoriza la respuesta inmunitaria y se

administran dosificaciones repetidas si la respuesta inmunitaria empieza a desvanecerse.

(ii) Pacientes susceptibles al tratamiento

- 5 Los pacientes susceptibles al tratamiento incluyen individuos que están en riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer, pero que no muestran síntomas, así como pacientes que están actualmente mostrando síntomas.

El término "tratamiento profiláctico", como se usa en el presente documento, se refiere a un tratamiento que tiene como objetivo detener los procesos patógenos que conducen a la enfermedad.

- 10 El término "tratamiento", como se usa en el presente documento, se refiere a un tratamiento que tiene como objetivo detener los procesos patógenos que conducen a la progresión de la enfermedad y/o tiene efectos sintomáticos.

- 15 Prácticamente todas las personas están en riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer si viven tiempo suficiente. Por tanto, los presentes métodos se pueden administrar profilácticamente a la población general sin necesidad de evaluación alguna del riesgo del paciente sujeto (es decir, cualquier persona viva pueden cumplir los requisitos como paciente). Los presentes métodos son especialmente útiles para individuos que tienen un riesgo genético conocido de enfermedad de Alzheimer. Dichos individuos incluyen los que tienen parientes que han padecido esta enfermedad, y aquellos cuyo riesgo se determina por análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo hacia la enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones en el gen APP, particularmente mutaciones en la posición 717 y posiciones 670 y 671 denominadas las mutaciones de Hardy y Swedish, respectivamente (véase Hardy J. Trends in Neurosciences 1997; 20:154-159). Otros marcadores de riesgo son mutaciones en los genes de presenilina, PS1 y PS2, y ApoE4, antecedentes familiares de EA, hipercolesterolemia o aterosclerosis.

- 25 En general, se seleccionan pacientes de un grupo en riesgo de sujetos que consiste en pacientes con deterioro cognitivo leve, pacientes con genotipos conocidos por estar asociados a enfermedad de Alzheimer, pacientes con trisomía 21 (es decir, posible paciente con síndrome de Down), pacientes con marcadores sustitutos que indican riesgo de enfermedad de Alzheimer.

- 30 En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede empezar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20, 30 años). No es necesario empezar el tratamiento hasta que un paciente llegue a los 40, 50, 60 o 70 años. En el caso de posibles pacientes con síndrome de Down, el tratamiento puede empezar prenatalmente administrando agente terapéutico a la madre o poco después del nacimiento.

- 35 Los individuos que actualmente padecen enfermedad de Alzheimer pueden ser reconocidos por la demencia característica, que, como se usa en el presente documento, se refiere en particular a una enfermedad como se define según los criterios del Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4ª edición (DSM-IV), así como la presencia de los factores de riesgo descritos anteriormente. Además, están disponibles varias pruebas diagnósticas para identificar individuos que tienen EA. Éstas incluyen medición de niveles de tau y $A\beta_{1-42}$ en LCR. Los elevados niveles de tau y reducidos de $A\beta_{1-42}$ significan la presencia de EA. Los individuos que padecen enfermedad de Alzheimer también se pueden diagnosticar por los criterios de Alzheimer de NINCDS-ADRDA.

- 45 El tratamiento conlleva normalmente múltiples dosificaciones durante un periodo de tiempo. El tratamiento se puede monitorizar ensayando las respuestas de anticuerpos, o linfocitos T o linfocitos B activados, al agente terapéutico (por ejemplo, ELISA de $A\beta_{1-42}$) con el tiempo. Si fracasa la respuesta, se indica una dosis de refuerzo.

- 50 Se han acumulado pruebas considerables que sugieren que el péptido β -amiloide, el principal componente de las placas amiloides seniles, desempeña una función causal en la EA. Es probable que la terapia modificadora de la enfermedad satisfactoria para la EA incluya productos que afectan la deposición de β -amiloide en el cerebro. Los anticuerpos específicos de $A\beta$, generados activamente por el sistema inmunitario o administrados pasivamente, reducen coherentemente la carga de placas en diferentes modelos de ratón transgénico. Se tuvo que suspender un primer intento clínico para estimular el sistema inmunitario de pacientes con EA para generar anticuerpos anti- $A\beta$, sin embargo, debido a efectos secundarios no aceptables (meningoencefalitis en 6 % de los pacientes tratados, Orgogozo JM, et al. Neurology 2003; 61: 46-54).

- 60 Sorprendentemente, no se observan reacciones inmunitarias adversas o incidencia de microhemorragias con la formulación actualmente desvelada (la vacuna para EA de UBI) empleando dos construcciones de inmunógenos de péptidos $A\beta_{1-14}$ (SEQ ID NOs: 64 y 65), a una relación equimolar, enlazadas a dos epítopes T cooperadores artificiales idealizados derivados de la proteína de fusión del virus del sarampión (MVF) y el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), respectivamente.

- 65 En un aspecto del método desvelado, se encontró sorprendentemente que las construcciones de inmunógenos de péptidos $A\beta$ se pueden administrar ventajosamente por vía intramuscular a animales de sangre caliente, especialmente seres humanos, que padecen demencia.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una forma farmacéutica para administración por vía intramuscular de las construcciones de inmunógenos de péptidos A β . La forma farmacéutica preferida para intramuscular de las construcciones de inmunógenos de péptidos A β es una formulación de vacuna que contiene entre 30 μ g y 1000 μ g/0,5 ml/dosis de construcciones de inmunógenos peptídicos complejadas con ODN de CpG en presencia de sales minerales como adyuvante, preferentemente entre 100 μ g y 400 μ g/0,5 ml/dosis, y más preferentemente 300 μ g/0,5 ml/dosis. La forma farmacéutica se puede mantener a 2 a 8 °C hasta poco antes de uso. La forma farmacéutica se administra preferentemente por inyección intramuscular con una jeringa al animal de sangre caliente, especialmente en el brazo. Para calentar la forma farmacéutica, la forma farmacéutica se puede mantener a temperatura ambiente durante aproximadamente entre 15 minutos y 45 minutos, por ejemplo 30 minutos. Preferentemente, antes de extraer el principio activo, los viales se invierten suavemente varias veces para la dispersión de posibles partículas subvisuales.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un método de prevención y tratamiento de demencia en pacientes humanos que comprende administrar 30 μ g y 1000 μ g/0,5 ml por dosis, preferentemente 100 μ g y 400 μ g/0,5 ml por dosis, más preferentemente aproximadamente 300 μ g/0,5 ml por dosis, a pacientes humanos en necesidad del mismo aproximadamente una vez cada 12 semanas, preferentemente aproximadamente una vez cada 26 semanas, en particular aproximadamente una vez 52 semanas, después de la sensibilización inicial a las 0, 4 y 8 semanas después de la inmunización inicial. La frecuencia de inyección puede variar dependiendo de la respuesta del paciente. Por ejemplo, la frecuencia de administración puede variar si la inyección se tiene que administrar según los títulos de anticuerpos.

La utilidad de las construcciones de inmunógenos de péptidos A β en el tratamiento de los trastornos anteriormente mencionados se puede confirmar en estudios clínicos adecuados, por ejemplo, administrando un total de tres dosificaciones a las 0, 4 y 12 semanas administrando cada vez 300 μ g/0,5 ml por dosis de la formulación de vacuna y luego seguido durante un periodo de más de 9 meses, tal como los descritos en los **Ejemplos**. Puede haber inmunizaciones de seguimiento de una vez cada tres, seis o 12 meses según los títulos de anticuerpos.

Los estudios clínicos adecuados son estudios de etiqueta abierta o en particular estudios aleatorizados, de doble ciego, controlados por placebo, paralelos, en pacientes en riesgo de enfermedad de Alzheimer o con síntomas de enfermedad de Alzheimer.

Una realización específica engloba la formulación de vacuna (la vacuna para EA de UBI) que contiene una mezcla de dos construcciones de inmunógenos de péptidos A β (SEQ ID NOs: 64 y 65) cada una con el extremo N (A β ₁₋₁₄, SEQ ID NO: 4) de péptido A β ₁₋₄₂ sintéticamente enlazado a epítopes T cooperadores (Th) (SEQ ID NOs: 46 y 47), que carecen de los efectos tóxicos observados con epítopes Th autólogos en pacientes que reciben la vacuna AN-1792 (A β ₁₋₄₂ agregado, Elan/Wyeth). Estudios *in vitro* y estudios *in vivo* en animales pequeños, babuinos y macacos muestran que se generan anticuerpos con la especificidad esperada por sitio del extremo N, y que estos anticuerpos tienen inmunogenicidades funcionales para neutralizar la actividad tóxica de A β y promover la eliminación de placa. Los anticuerpos parecen extraer A β ₁₋₄₀ del SNC a la circulación periférica. Los resultados indican que la vacuna no provocó respuestas celulares anti-A β ₁₋₄₂. La vacuna para EA de UBI fue bien tolerada en macacos cangrejeros durante un estudio de toxicidad aguda y crónica de dosis repetidas. Se probaron adicionalmente la seguridad e inmunogenicidad de la formulación de vacuna para EA de UBI integrada en los **Ejemplos 8 y 9** en un ensayo de fase I en pacientes con EA de leve a moderada y se encontró que generó anticuerpos con especificidad por el extremo N de péptido A β ₁₋₁₄ en los 19 pacientes, logrando así una tasa de respuesta sin precedentes del 100 %, después de la inmunización intramuscular a las 0, 4 y 12 semanas, sin causar acontecimientos adversos graves o intolerables. Un subconjunto de sujetos ancianos con EA leve (n = 6; edad $\geq$ 60 años con MMSE basal $\geq$ 20) mostró tanto altas respuestas de anticuerpos a la formulación de vacuna para EA de UBI como mejoró los desenlaces cognitivos y funcionales como se evaluó por las puntuaciones (i) ADAS-Cog (Escala de Evaluación de EA - Cognitiva); (ii) ADCS-CGIC (Estudio cooperativo de la enfermedad de Alzheimer - Impresiones globales clínicas de cambio); y (iii) MMSE (Mini-examen del estado mental) cuando se compararon con puntuaciones basales, durante el estudio principal de 6 meses y después del periodo de seguimiento de observación de 6 meses. ADAS-Cog es el instrumento de prueba cognitiva más popular usado en ensayos clínicos. ADAS-Cog consiste en 11 tareas (70-puntos) que mide las alteraciones de la memoria, lenguaje, práctica, atención y otras capacidades cognitivas, que se denominan frecuentemente los síntomas principales de la EA (*aumento en la puntuación indica deterioro*). ADCS-CGIC es una calificación global única de cambio desde el nivel inicial (*disminución en la puntuación indica deterioro*). MMSE es el instrumento más comúnmente usado para cribar la función cognitiva y proporciona una medida de la orientación, registro, memoria a corto plazo, funcionamiento del lenguaje (*disminución en la puntuación indica deterioro*). En el ensayo de fase IIa, se usan biomarcadores (diagnósticos moleculares, obtención de imágenes cerebrales, tipificación genética) para evaluar la eficacia de la formulación de vacuna en pacientes con EA leve que incluye la evaluación de la disminución en la progresión de la enfermedad aumentando, mediante inmunización activa, los anticuerpos anti-A β ₁₋₁₄ en circulación, supuestamente para reducir la concentración de oligómeros A β tóxicos en el cerebro.

(g) Divulgación específica

La divulgación comprende:

(1) Una construcción de inmunógenos de péptidos A β que comprende la siguiente fórmula:

(fragmento del extremo N del péptido A β_{1-42})-(A) $_o$ -(Th)-X

en donde (fragmento del extremo N del péptido A β_{1-42}) es un epítipo de linfocitos B de A β que comprende aproximadamente 10 a aproximadamente 14 restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 4, 5 y 6;

cada A es independientemente un aminoácido o un grupo de enlace seleccionado del grupo que consiste en un aminoácido, Lys-, Gly-, Lys-Lys-Lys-, (α , ϵ -N)Lys y ϵ -N-Lys-Lys-Lys-Lys (SEQ ID NOs: 32);

cada Th comprende una secuencia de aminoácidos que constituye un epítipo de linfocitos T cooperadores seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 34, 37, 38, 40 a 47 y análogos inmunológicos funcionales del mismo;

X es un α -COOH o α -CONH $_2$ de un aminoácido; y

o es desde 0 hasta aproximadamente 4.

(2) La construcción de inmunógenos de péptidos A β de (1), en donde el (fragmento del extremo N del péptido A β_{1-42}) es A β_{1-14} (SEQ ID NO: 4).

(3) La construcción de inmunógenos de péptidos A β de (1), en donde A es ϵ -N-Lys-Lys-Lys-Lys (SEQ ID NOs: 32).

(4) La construcción de inmunógenos de péptidos A β de (1), en donde el epítipo Th es SEQ ID NOs: 45 o 46.

(5) La construcción de inmunógenos de péptidos A β de (1), que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 48 - 65.

(6) La construcción de inmunógenos de péptidos A β de (1), que consiste esencialmente en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 62 - 65.

(7) La construcción de inmunógenos de péptidos A β de (1) que es SEQ ID NOs: 62, 63, 64 y/o 65.

(8) Una composición que comprende la construcción de inmunógenos de péptidos A β de la reivindicación 1.

(9) Una composición farmacéutica que comprende

a. la construcción de inmunógenos de péptidos A β de (1); y

b. un vehículo de administración y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

(10) Una composición de vacuna para enfermedad de Alzheimer que comprende

a. la construcción de inmunógenos de péptidos A β de (1); y

b. un vehículo de administración y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

(11) Una composición de vacuna para enfermedad de Alzheimer que comprende

a. la construcción de inmunógenos de péptidos A β de (7); y

b. un vehículo de administración y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

(12) La composición de vacuna para enfermedad de Alzheimer de (10), en donde el adyuvante en (b) es una sal mineral de aluminio seleccionada del grupo que consiste en Alhydrogel (Al(OH) $_3$) o Adjuphos (AlPO $_4$).

(13) La composición de vacuna para enfermedad de Alzheimer de (10), en donde el péptido antígeno en (a) se mezcla con un oligodesoxinucleótido (ODN) de CpG para formar un complejo inmunoestimulante estabilizado.

(14) Un anticuerpo aislado o fragmento de unión al epítipo del mismo que se une al componente (fragmento del extremo N del péptido A β_{1-42}) de la construcción de inmunógenos de péptidos A β de (1).

(15) El anticuerpo aislado o fragmento de unión al epítipo del mismo de (14), que se une específicamente a A β_{1-10} (SEQ ID NO: 6).

(16) El anticuerpo aislado o fragmento de unión al epítipo del mismo de (14), unido a la construcción de inmunógenos de péptidos A β de la reivindicación 1.

(17) El anticuerpo aislado o fragmento de unión al epítipo del mismo de (15), unido a SEQ ID NO: 6.

(18) Una composición que comprende el anticuerpo aislado o fragmento de unión al epítipo del mismo de (14).

(19) Un método de reducción de la intensidad o retraso de la aparición de la demencia en pacientes humanos que comprende administrar una formulación de vacuna según (10).

(20) El método de (19), en donde dicha formulación de vacuna se administra en una disolución acuosa que comprende entre 10 ug y 1000 ug por dosis a pacientes en riesgo de, o con, EA.

(h) Divulgación adicional

(1) Una construcción de inmunógenos de péptidos A β de la presente invención se representa por la siguiente fórmula:

(fragmento del extremo N del péptido A β_{1-42})-(A) $_o$ -(Th)-X

en donde (fragmento del extremo N del péptido A β_{1-42}) es un epítipo de linfocitos B seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 4 a 6 desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 14 restos de aminoácidos;

cada A es independientemente un aminoácido o un grupo de enlace elegido del grupo que consiste en un

aminoácido, Lys-, Gly-, Lys-Lys-Lys-, (α , ϵ -N)Lys o ϵ -N-Lys-Lys-Lys-Lys (SEQ ID NO: 32); cada Th comprende una secuencia de aminoácidos que constituye un epítoto de linfocitos T cooperadores seleccionado del grupo que comprende SEQ ID NOs: 34, 37, 38, 40 a 47 y análogos inmunológicos funcionales del mismo;

5 X es un α -COOH o α -CONH₂ de un aminoácido; y
o es desde 0 hasta aproximadamente 4.

(2) Una composición de vacuna para la enfermedad de Alzheimer (EA), que comprende

- 10 a. una construcción de inmunógenos de péptidos A β según (1);
b. un análogo inmunológico funcional de (a);
c. cualquier combinación de (a) o (b); y
d. un vehículo de administración o adyuvante aceptable.

15 (3) La vacuna para EA según (2), en donde el adyuvante en (d) es una sal mineral de aluminio que es Alhydrogel (Al(OH)₃) o Adjuphos (AlPO₄).

(4) La vacuna para EA según (2), en donde el antígeno peptídico en (a) se mezcla con un oligodesoxinucleótido (ODN) de CpG para formar un complejo inmunoestimulante estabilizado.

20 (5) Una composición de vacuna para enfermedad de Alzheimer (EA), que comprende

- a. una construcción de inmunógenos de péptidos A β seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NOs: 49-51, 54, 55, y 57-65;
b. un análogo inmunológico funcional de (a);
c. cualquier combinación de (a) o (b); y
25 d. un vehículo de administración o adyuvante aceptable.

(6) Una composición de vacuna para enfermedad de Alzheimer (EA), que comprende

- 30 a. una construcción de inmunógenos de péptidos A β según (5);
b. un análogo inmunológico funcional de (a);
c. cualquier combinación de (a) o (b); y
d. un vehículo de administración o adyuvante aceptable.

35 (7) La vacuna para EA según (5), en donde el adyuvante en (d) es una sal mineral de aluminio que es Alhydrogel (Al(OH)₃) o Adjuphos (AlPO₄).

(8) La vacuna para EA según (5), en donde el antígeno peptídico en (a), (b) o (c) se mezcla con un oligodesoxinucleótido (ODN) de CpG para formar un complejo inmunoestimulante estabilizado.

40 (9) La vacuna para EA según (5), en donde el antígeno peptídico en (a), (b) o (c) se mezcla con un oligodesoxinucleótido (ODN) de CpG para formar un complejo inmunoestimulante estabilizado y, en donde el adyuvante en (d) es una sal mineral de aluminio que es Alhydrogel (Al(OH)₃) o Adjuphos (AlPO₄).

(10) Una composición de vacuna para enfermedad de Alzheimer (EA), que comprende

- a. una construcción de inmunógenos de péptidos A β seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NOs: 62+63, 64+65;
45 b. un análogo inmunológico funcional de (a);
c. cualquier combinación de (a) o (b); y
d. un vehículo de administración o adyuvante aceptable.

(11) Una composición que comprende:

- 50 a. una construcción de inmunógenos de péptidos A β que comprende una mezcla de SEQ ID NO: 64 y SEQ ID NO: 65; y
b. la mezcla de (a) mezclada adicionalmente con ODN de CpG.

55 (12) Una composición farmacéutica que comprende:

- a. una construcción de inmunógenos de péptidos A β que comprende una mezcla de SEQ ID NO: 64 y SEQ ID NO: 65;
b. la mezcla de (a) mezclada adicionalmente con ODN de CpG; y
60 c. Adjuphos.

(13) Una composición farmacéutica que comprende:

- 65 a. una construcción de inmunógenos de péptidos A β que comprende una mezcla de SEQ ID NO: 64 y SEQ ID NO: 65;
b. la mezcla de (a) mezclada adicionalmente con ODN de CpG; y

c. Alhydrogel.

(14) Un método de reducción de la intensidad o retraso de la aparición de la demencia en seres humanos que comprende administrar la composición farmacéutica de (13) al ser humano.

(15) Un método de reducción de la intensidad o retraso de la aparición de la demencia en seres humanos que comprende administrar la composición farmacéutica de (13) al ser humano a una dosis de 300 µg/0,5 ml/dosis.

(16) Un método de reducción de la intensidad o retraso de la aparición de la demencia en seres humanos que comprende:

- a. administrar la composición farmacéutica de (13) al ser humano a una dosis de 300 µg/0,5 ml/dosis; y
- b. dosificar a las 0, 4 y 12 semanas como sensibilización.

(17) Un método de reducción de la intensidad o retraso de la aparición de la demencia en seres humanos que comprende:

- a. administrar la composición farmacéutica de (13) al ser humano a una dosis de 300 µg/0,5 ml/dosis;
- b. dosificar a las 0, 4 y 12 semanas como sensibilización; y
- c. reforzar después de la etapa en (b) una vez cada 3 meses, y/o una vez cada 6 meses, y/o una vez cada 12 meses.

(18) El método de cualquiera de (14) - (17), en donde la administración es por inyección intramuscular.

(19) El método de cualquiera de (14) - (18), en donde el ser humano tiene EA leve, DCL, o no muestra signos o síntomas de EA pero tiene más de 60 años de edad.

(20) El método de (19), en donde la administración al ser humano es del siguiente modo:

- a. si el ser humano tiene EA leve, la administración es para el tratamiento de EA;
- b. si el ser humano tiene DCL, la administración es para la prevención y/o la reducción de la intensidad y/o el retraso en la aparición de la demencia; y
- c. si el ser humano no muestra signos o síntomas de EA, pero tiene más de 60 años de edad, la administración es para la prevención y/o reducción de la intensidad y/o el retraso en la aparición de la demencia.

(21) La vacuna para EA según cualquiera de (2) - (10), en donde el antígeno peptídico en (a) se mezcla con un oligonucleótido de CpG para formar un complejo inmunoestimulante estabilizado.

(22) La vacuna para EA según lo anterior, en donde la construcción de inmunógenos de péptidos Aβ en (a) comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 17 a 20.

(23) La vacuna para EA según lo anterior, en donde la construcción de inmunógenos de péptidos Aβ en (a) comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 19 y 20.

(24) La vacuna para EA según lo anterior, en donde la cantidad total de antígeno peptídico en (a) es entre aproximadamente 10 µg y aproximadamente 1 mg por dosis.

(25) La vacuna para EA según lo anterior, en donde el vehículo de administración o adyuvante se selecciona del grupo que consiste en Montanide ISA50V, monooleato de polioxietilen (20)-sorbitano, Emulsigen, Emulsigen D y un oligonucleótido de CpG.

(26) Un método de reducción de la intensidad o retraso de la aparición de la demencia en pacientes humanos que comprende administrar una formulación de vacuna según cualquiera de lo anterior.

(27) El método según cualquiera de lo anterior, en donde la demencia es demencia del tipo Alzheimer o demencia vascular con angiopatía amiloide.

(28) El método según cualquiera de lo anterior, en donde la demencia es demencia asociada a enfermedad de Parkinson o demencia con cuerpos de Lewy.

(29) El método según cualquiera de lo anterior, en donde dicha formulación de vacuna se administra en una disolución acuosa que comprende entre 10 µg y 1000 µg por dosis a pacientes en riesgo de, o con, EA. También es aceptable 100 a 750 µg por dosis o 300 µg por dosis. 300 µg puede ser la dosis diana usada en el ensayo clínico con eficacia.

(30) La administración puede ser una vez cada 3 meses y/o una vez cada 6 meses y/o una vez cada 12 meses.

(31) La administración se puede basar en el título de anticuerpos para decidir la frecuencia de la administración de la vacuna.

(32) El método según cualquiera de lo anterior, en donde los pacientes están en riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer y además en donde los pacientes se seleccionan del grupo que consiste en pacientes con deterioro cognitivo leve, pacientes con genotipos conocidos por estar asociados a enfermedad de Alzheimer, pacientes con trisomía 21 y pacientes con marcadores sustitutos que indican riesgo de enfermedad de Alzheimer.

(33) El método según cualquiera de lo anterior, en donde los pacientes con genotipos conocidos por estar asociados a enfermedad de Alzheimer comprenden pacientes con el genotipo ApoE4.

(34) El método según cualquiera de lo anterior, en donde la formulación de vacuna que comprende la construcción de inmunógenos de péptidos Aβ en (a) y la combinación de la misma se administra para la sensibilización inicial de tres dosis a las 0, 4 y 12 semanas a 300 µg/0,5 ml por dosis.

(35) El método según cualquiera de lo anterior, en donde la formulación de vacuna se administra aproximadamente una vez cada tres meses, luego una vez cada 6 meses y luego una vez cada 12 meses.

(36) El método según cualquiera de lo anterior, en donde los linfocitos B de la sangre de pacientes que recibieron previamente la formulación de vacuna se usan para la preparación y selección de anticuerpos monoclonales humanos que se dirigen al extremo N del péptido A β para la prevención y el tratamiento de EA.

(37) Un método de provocación de una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende proporcionar una inmunización sensibilizante a las 0, 4 y 12 semanas desde la inyección inicial, seguido por inmunización de refuerzo una vez cada 3 meses, una vez cada 6 meses y lo más preferentemente una vez cada 12 meses.

(38) La dosificación se puede realizar a 10 μ g y 1000 μ g por dosis, preferentemente 100 μ g y 750 μ g, incluso más preferentemente 300 μ g por dosis.

(39) La vía para administración de cualquiera de lo anterior puede ser por cualquier vía estándar conocida en la técnica, tal como vía intramuscular, subcutánea, oral, etc.

Una composición farmacéutica que es útil como formulación de vacuna de construcción de inmunógenos de péptidos A β contiene una construcción de inmunógenos de péptidos A β y un vehículo de administración o adyuvante aceptable, en donde la construcción de inmunógenos de péptidos A β tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

a) SEQ ID NOs: 49-51, 54, 55, y 57 a 65;

b) un homólogo de (a);

c) un análogo antigénico e inmunológicamente funcional de (a) o (b),

d) (a), (b) o (c) que tienen al menos una sustitución de aminoácidos conservativa, adición de aminoácidos y/o delección de aminoácidos; y

e) cualquier combinación de (a)-(d).

En una formulación específica, la construcción de inmunógenos de péptidos A β se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 62 y 63 y mezclas de las mismas.

En otra formulación específica, la construcción de inmunógenos de péptidos A β se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 64 y 65 y mezclas de las mismas.

Otras formulaciones adicionales contienen una mezcla equimolar de una formulación específica, la construcción de inmunógenos de péptidos A β se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 62 y 63. Otras formulaciones adicionales contienen una mezcla equimolar de una formulación específica, la construcción de inmunógenos de péptidos A β se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 64 y 65.

En una formulación específica, la cantidad de la mezcla equimolar de SEQ ID NOs: 62 y 63 (o 64 y 65) es entre aproximadamente 1 μ g y aproximadamente 1000 μ g por dosis.

En una formulación específica, la cantidad de la mezcla equimolar de SEQ ID NOs: 62 y 63 (o 64 y 65) es entre aproximadamente 100 μ g y aproximadamente 750 μ g por dosis.

En una formulación específica, la cantidad de la mezcla equimolar de SEQ ID NOs: 62 y 63 (o 64 y 65) es entre aproximadamente 300 μ g por dosis.

La eficacia de la composición de péptido de la presente invención se puede establecer inyectando un animal, por ejemplo, cobayas, babuinos, macacos cangrejeros o seres humanos, con una composición inmunogénica que comprende péptidos de la invención. Véanse las Tablas 4, 5, 6, 7 y 8 SEQ ID NOs: 48 a 65. La respuesta inmunitaria humoral se refiere al fragmento del extremo N del péptido A β ₁₋₄₂ desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 14 restos de aminoácidos. Una descripción detallada de los procedimientos usados se proporciona en los ejemplos.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención y no se deben usar para limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

SÍNTESIS DE PÉPTIDOS RELACIONADOS CON AMILOIDE BETA (AB)

Se describen métodos de síntesis de construcciones de péptidos relacionadas con A β de diseño que se incluyeron en el intento de desarrollo de un diseño y formulación de vacuna de A β de direccionamiento eficaz. Los péptidos se pueden sintetizar en cantidades a pequeña escala, que son útiles para estudios piloto de laboratorio y de campo, así como cantidades a gran escala (kilogramo), que son útiles para la producción comercial industrial de formulaciones de vacuna y ensayos serológicos.

Se diseñó un gran repertorio de péptidos antigénicos relacionados con A β que tenían secuencias con longitudes

desde aproximadamente 10 hasta 40 aminoácidos para el cribado y la selección de las construcciones peptídicas más óptimas para su uso en una vacuna para EA eficaz. Péptidos A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂ representativos, fragmentos de péptidos A β del extremo N A β ₁₋₂₈, A β ₁₋₁₄, A β ₁₋₁₀, A β ₁₅₋₄₂ y péptido 10-mero empleado para el mapeo de epítopes en diversos ensayos serológicos se identifican en la **Tabla 1** (SEQ ID NOs: 1 a 32). Cada construcción contiene un fragmento de péptido A β (A β ₁₋₁₀ a A β ₁₋₁₄) que se enlaza sintéticamente con un epítipo de linfocitos T cooperadores (Th) cuidadosamente diseñado derivado de proteínas de patógenos que incluyen proteína de fusión del virus del sarampión (MVF) y proteína del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), identificadas en la **Tabla 2** (SEQ ID NOs: 33 a 47) bien en una única secuencia (SEQ ID NOs: 33 a 41, 46, 47) o una biblioteca combinatoria (SEQ ID NOs: 42 a 45) para potenciar la inmunogenicidad de sus construcciones de inmunógenos de péptidos A β respectivas. Se identifican dieciocho construcciones de inmunógenos de péptidos A β representativas seleccionadas de más de 100 construcciones de péptidos en la **Tabla 3** (SEQ ID NOs: 48 a 65).

Todos los péptidos usados para los estudios de inmunogenicidad o pruebas serológicas relacionadas para la detección y/o medición de anticuerpos anti-A β se sintetizaron a pequeña escala usando química de Fmoc por los sintetizadores de péptidos de Applied Biosystems modelos 430A, 431 y/o 433. Cada péptido se produjo por una síntesis independiente sobre un soporte de fase sólida, con protección de Fmoc en el extremo N y grupos protectores de la cadena lateral de aminoácidos trifuncionales. Se escindieron los péptidos completados del soporte sólido y se retiraron los grupos protectores de cadenas laterales por 90 % de ácido trifluoroacético (TFA). Se evaluaron las preparaciones de péptidos sintéticos por espectrometría de masas con desorción/ionización mediante láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF) para garantizar el correcto contenido de aminoácidos. Cada péptido sintético también se evaluó por HPLC de fase inversa (RP-HPLC) para confirmar el perfil de síntesis y la concentración de la preparación.

A pesar del riguroso control del proceso de síntesis (incluyendo la monitorización escalonada de la eficiencia de acoplamiento), también se produjeron análogos peptídicos debido a acontecimientos involuntarios durante los ciclos de elongación, que incluyen la inserción, delección, sustitución de aminoácidos y terminación prematura. Así, las preparaciones sintetizadas incluyeron normalmente múltiples análogos peptídicos junto con el péptido diana. A pesar de la inclusión de dichos análogos peptídicos involuntarios, las preparaciones peptídicas sintetizadas resultantes fueron, sin embargo, adecuadas para su uso en aplicaciones inmunológicas, que incluyen el inmunodiagnóstico (como antígenos de captura de anticuerpos) y la vacunación (como inmunógenos peptídicos). Normalmente, dichos análogos peptídicos, ya sea intencionadamente diseñados o generados mediante el proceso sintético como una mezcla de subproductos, son frecuentemente tan eficaces como una preparación purificada del péptido deseado, en tanto que se desarrolle un procedimiento de QC exigente para monitorizar tanto el proceso de fabricación como el proceso de evaluación de productos para garantizar la reproducibilidad y eficacia del producto final empleando estos péptidos. Las síntesis de péptidos a gran escala en las cantidades de varios cientos a kilogramos se realizaron en un sintetizador de péptidos automatizado personalizado UBI2003 a una escala de 15 mmoles a 50 mmoles.

Para los principios activos usados en la formulación de vacuna final para ensayos clínicos, se purificaron las construcciones de péptidos A β por RP-HPLC preparativa en un gradiente de elución poco profundo y se caracterizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF, análisis de aminoácidos y RP-HPLC para pureza e identidad.

Ejemplo 2

ENSAYOS SEROLÓGICOS Y REACTIVOS

A continuación se describen con detalles ensayos serológicos y reactivos para evaluar la inmunogenicidad funcional de las construcciones de péptidos sintéticos y las formulaciones de las mismas.

a. Pruebas de ELISA basadas en péptidos A β ₁₋₄₂, A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₂₈ o A β ₁₋₁₄ para el análisis de especificidad de anticuerpos

Se desarrollaron y se describen a continuación ensayos de ELISA para evaluar las muestras de suero inmune descritas en los siguientes ejemplos.

Se recubrieron individualmente los pocillos de placas de 96 pocillos durante 1 hora a 37 °C con 100 μ l del péptido diana A β ₁₋₄₂, A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₂₈ o A β ₁₋₁₄ (SEQ ID NOs: 1 a 4), a 2 μ g/ml (a menos que se indicara de otro modo), en tampón NaHCO₃ 10 mM, pH 9,5 (a menos que se indicara de otro modo).

Se incubaron los pocillos recubiertos de péptido con 250 μ l de 3 % en peso de gelatina en PBS en 37 °C durante 1 hora para bloquear los sitios de unión específicos no de proteína, seguido por tres lavados con PBS que contenía 0,05 % en volumen de TWEEN® 20 y se secaron. Se diluyeron los sueros a analizar 1:20 (a menos que se indicara de otro modo) con PBS que contenía 20 % en volumen de suero de cabra normal, 1 % en peso de gelatina y 0,05 % en volumen TWEEN® 20. Se añadieron cien microlitros (100 μ l) de los especímenes diluidos (por ejemplo, suero, plasma) a cada uno de los pocillos y se dejó que reaccionaran durante 60 minutos a 37 °C.

Entonces se lavaron seis veces los pocillos con 0,05 % en volumen de TWEEN® 20 en PBS para retirar los anticuerpos no unidos. Se usó anti-IgG de cabra específica de especie conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (por ejemplo, ratón, cobaya o humano) como un trazador marcado para la unión con el complejo anticuerpo/antígeno peptídico formado en pocillos positivos. Se añadieron cien microlitros de anti-IgG de cabra marcada con peroxidasa, a una dilución óptima previamente valorada y en 1 % en volumen de suero de cabra normal con 0,05 % en volumen de TWEEN® 20 en PBS, a cada pocillo y se incubaron a 37 °C durante otros 30 minutos. Los pocillos se lavaron seis veces con 0,05 % en volumen de TWEEN® 20 en PBS para retirar anticuerpo sin unir y se hicieron reaccionar con 100 µl de la mezcla de sustrato que contenía 0,04 % en peso de 3',3',5',5'-tetrametilbencidina (TMB) y 0,12 % en volumen de peróxido de hidrógeno en tampón citrato de sodio durante otros 15 minutos. Esta mezcla de sustrato se usó para detectar la marca de peroxidasa formando un producto coloreado. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 100 µl de H₂SO₄ 1,0 M y se determinó la absorbancia a 450 nm (A₄₅₀). Para la detección de Ig/IgG de babuino y macaco, se usaron reactivos de cabra anti-IgG humana de cabra conjugado con HRP con alta reactividad cruzada por IgG de primate como trazador. Para muestras clínicas de pacientes que entran en los ensayos, se usaron reactivos de proteína A/G conjugados con HRP, óptimamente valorados en kits de prueba de ELISA previamente validados, para la determinación del título del suero. Para la determinación de títulos de anticuerpos de los animales vacunados que recibieron las diversas formulaciones de vacuna de péptido Aβ, se probaron diluciones sucesivas con un factor de dilución de 10 de sueros desde 1:100 hasta 1:10.000, y se calculó el título de un suero probado, expresado como log₁₀, por análisis de regresión lineal de A₄₅₀ con la A₄₅₀ de corte establecida en 0,5.

b. Evaluación de la reactividad de anticuerpos hacia epítopes de linfocitos T cooperadores sobre la proteína transportadora, péptido Th o biblioteca combinatoria de péptidos Th por pruebas de ELISA basadas en proteína transportadora específica, péptido Th o biblioteca combinatoria Th

Se recubrieron individualmente los pocillos de placas de ELISA de 96 pocillos durante 1 hora a 37 °C con 100 µl de proteína transportadora tal como KLH (hemocianina de lapa californiana), péptido Th o biblioteca combinatoria de péptidos Th (SEQ ID NOs: 44 a 47), a 2 µg/ml (a menos que se indicara de otro modo), en tampón NaHCO₃ 10 mM, pH 9,5 (a menos que se indicara de otro modo) en ELISAs similares y se realizaron como se ha descrito anteriormente. Para la determinación de los títulos de anticuerpos de los animales vacunados que recibieron las diversas formulaciones de vacuna de péptido Aβ, se probaron diluciones sucesivas con un factor de dilución de 10 de sueros desde 1:100 hasta 1:10.000, y se calculó el título de un suero probado, expresado como log₁₀, por análisis de regresión lineal de la A₄₅₀ con la A₄₅₀ de corte establecida en 0,5.

c. Evaluación del análisis de especificidad fina y mapeo de epítopes hacia Aβ y hAPP (proteína precursora del amiloide humana) por pruebas de ELISA basadas en péptidos 10-meros de clústeres de epítopes de linfocitos B

Se determinaron análisis de especificidad fina de anticuerpos anti-Aβ en hospedadores inmunizados o vacunas por mapeo de epítopes. Brevemente, se recubrieron los pocillos de placas de 96 pocillos con péptidos 10-meros de hAPP individuales (SEQ ID NOs: 6, 8 a 30) a 0,5 µg por 0,1 ml por pocillo y luego se incubaron por duplicado muestras de 100 µl de suero (dilución 1:100 en PBS) en pocillos de placas 10-meras siguiendo las etapas del método de ELISA de anticuerpos descrito anteriormente. El epítipo de linfocitos B de la vacuna y los análisis de especificidad fina relacionados de anticuerpos anti-Aβ de babuino, macaco y humano en hospedadores inmunizados también se absorbieron previamente con péptido Aβ₁₋₁₀ (DAEFRHDSGY, SEQ ID NO: 6), péptidos sintéticos modificados con Aβ con sustituciones en el extremo N, o con péptido de control no relevante y luego se probaron por prueba de ELISA anti-Aβ₁₋₂₈ para la confirmación adicional de especificidad.

d. Evaluación de la inmunogenicidad

Se recogieron muestras de suero preinmune e inmune de sujetos humanos o animales según protocolos de vacunación experimental y se calentaron a 56 °C durante 30 minutos para inactivar los factores del complemento del suero. Tras la administración de las formulaciones de vacuna, se obtuvieron muestras de sangre según los protocolos y se evaluó su inmunogenicidad contra sitio(s) diana específico(s). Se probaron sueros diluidos sucesivamente y los títulos positivos se expresaron como log₁₀ de la dilución recíproca. La inmunogenicidad de una formulación de vacuna particular se evalúa por su capacidad para provocar la respuesta de anticuerpos de linfocitos B de alto título dirigidos contra la especificidad de epítipo deseada dentro del antígeno diana mientras se mantiene una reactividad de anticuerpos de baja a despreciable hacia los "epítopes de linfocitos T cooperadores" empleados para proporcionar la mejoría de las respuestas deseadas de linfocitos B.

e. Enzimoinmunoanálisis en fase sólida para la detección de antígenos peptídicos relacionados con Aβ en sangre y líquido cefalorraquídeo (LCR)

Se usó un inmunoensayo de Aβ₁₋₄₀ de alta sensibilidad (Invitrogen™ - BioSource™ Cytokines & Signaling, Camarillo, CA, EE. UU.) para determinar la concentración de Aβ₁₋₄₀ en suero, plasma y LCR en macacos cangrejeros siguiendo las instrucciones del kit. Los niveles de Aβ₁₋₄₂ estuvieron por debajo de los límites de detección en macacos normales. Se determinaron los niveles de Aβ₁₋₄₀ y Aβ₁₋₄₂ en plasma, LCR y extracciones químicas de tejido cerebral

de ratones transgénicos hAPP751 siguiendo las instrucciones del inmunoensayo de $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ (The Genetics Company Inc., Zurich-Schlieren, Suiza). Se determinó la cuantificación de los niveles de $A\beta_{1-40}$ en plasma de individuos con enfermedad de Alzheimer de leve a moderada siguiendo las instrucciones del kit (kit de ensayo de amiloide β (1-40) humano, IBL, 27714). Los niveles de $A\beta_{1-42}$ en plasma humano estuvieron por debajo de los límites de detección.

EJEMPLO 3

ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

Se obtuvieron tejidos humanos adultos normales (FenoPath Laboratories Inc., Seattle, WA, EE. UU.) y especímenes cerebrales de casos con enfermedad de Alzheimer (Dr. Felicia Gaskin, Universidad de Virginia, Charlottesville, VA, EE. UU.) de especímenes de patología cadavérica y/o quirúrgica. Se obtuvieron especímenes de tejido de macaco cangrejero (Beijing Jo-Inn New Drug Research Center, Beijing, China) y especímenes de cerebro de ratón transgénico hAPP (JSW-Research GmbH, Graz, Austria) en la autopsia. Los tejidos o se ultracongelaron en nitrógeno líquido, se sumergieron en compuesto de incorporación de OCT frío y se crioseccionaron, o se fijaron en formol, se incorporaron en parafina y se prepararon las secciones mediante procedimientos convencionales.

Se realizaron análisis de inmunofluorescencia indirecta de secciones de tejido criopreservadas con suero preinmune e hiperinmune o IgG purificada de cobayas, ratones transgénicos hAPP, babuinos y macacos o con anticuerpos monoclonales murinos comercialmente disponibles y anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromo. Se realizó tinción de inmunoperoxidasa indirecta usando un kit comercialmente disponible potenciado con avidina-biotina en secciones de tejido criopreservadas de tejidos adultos normales usando IgG anti- $A\beta$ de cobaya purificada o en secciones de cerebro de macacos tratados con control y la vacuna para EA de UBI (UB-311) usando anticuerpos monoclonales comercialmente disponibles que detectan CD3, CD4, CD8 (subconjuntos de linfocitos T), CD11b (marcador de activación celular de la microglía), GFAP (astrocitos) y epítopes de $A\beta$ específicos. Los análisis inmunohistoquímicos se realizaron según procedimientos de laboratorio de patología estándar.

Ejemplo 4

ENSAYOS FUNCIONALES DE LINFOCITOS T PARA LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS Y LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS

A continuación se describen con detalle los procedimientos para los ensayos funcionales de linfocitos T que incluyen proliferación de linfocitos y producción de citocinas para la evaluación de la activación de linfocitos T.

a. Aislamiento, congelación y descongelación de células mononucleares de sangre periférica (CMSPs)

Se recogió sangre heparinizada y se aislaron CMSPs por centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll-Hypaque. Después de dos lavados en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se resuspendieron las CMSPs en medio de cultivo celular que consistía en RPMI 1640 complementado con 10 % de suero de ternero fetal (FCS). Para algunos experimentos, se congelaron las CMSPs aisladas, se guardaron en N_2 líquido y se descongelaron para el posterior cultivo *in vitro*.

b. Ensayo de proliferación de linfocitos T y células mononucleares de sangre periférica (CMSPs)

Se cultivaron CMSPs de animales vacunados a $2,5 \times 10^6$ células/ml en pocillos individuales de una placa de cultivo de 24 pocillos (Nunc) en presencia de $10,0 \mu g$ de la composición seleccionada de inmunógenos de vacuna. También se incluyeron cultivos de control negativo que contenían CMSPs solas sin antígeno estimulante. Todos los cultivos se mantuvieron a $37^\circ C$ durante 3 días en una estufa de incubación con 5,0 % de CO_2 . Se recogieron los sobrenadantes 3 días después del inicio del cultivo, y se midieron citocinas individuales usando el ensayo cuantitativo descrito anteriormente.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSPs) de babuinos y de macacos cangrejeros por centrifugación en gradiente en Ficoll-hypaque. Para la proliferación inducida por péptido y la producción de citocinas, se cultivaron células (2×10^5 células por pocillo) solas o con dominios peptídicos individuales añadidos (incluyendo péptidos $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{1-14}$, $A\beta_{15-42}$, Th y péptido no relevante como control negativo). Se usaron mitógenos (PHA, PWM, Con A) como controles positivos. En el día 6, se añadió $1 \mu Ci$ de 3H -timidina (3H -TdR) a cada uno de los pocillos de cultivo celular duplicados. Después de 18 horas de incubación, se recogieron las células y se determinó la incorporación de 3H -TdR. El índice de estimulación (IE) representa las cuentas por minuto (cpm) en presencia de antígeno divididas entre las cpm en ausencia de antígeno; se consideró significativo un $IE > 3,0$.

c. Evaluación de citocinas producidas por cultivos de CMSPs pre- y pos-inmunización con la vacuna para EA de UBI

Se realizaron análisis de citocinas (IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, TNF- α , IFN- γ) de cultivos de CMSPs de macacos

cangrejeros en alícuotas de medio de cultivo solo o en presencia de diversos dominios de péptidos A β o mitógenos. Se usaron kit de prueba de ELISA de sándwich de citocinas mono-específicas (U-CyTech Biosciences, Utrecht, Países Bajos) para determinar la concentración de citocinas individuales siguiendo las instrucciones del kit.

5 Ejemplo 5

ANIMALES USADOS EN ESTUDIOS DE SEGURIDAD, INMUNOGENICIDAD, TOXICIDAD Y EFICACIA

Cobayas: Se realizaron estudios de inmunogenicidad en cobayas Duncan-Hartley maduras, intactas, macho y hembra adultas (300-350 g/BW). Los experimentos utilizaron al menos 3 cobayas por grupo. Los protocolos que implican cobayas Duncan-Hartley (8-12 semanas de edad; Covance Research Laboratories, Denver, PA, EE. UU.), se realizaron en solicitudes de IACUC autorizadas en el animalario contratado, así como en UBI, como patrocinador.

Babuinos Anubis: Se realizaron estudios de inmunogenicidad en babuinos macho adultos (*Papio anubis*, 8 a 10 años de edad; Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Oklahoma, Oklahoma City, OK, EE. UU.) en solicitudes de IACUC autorizadas en el animalario contratado, así como en UBI, como patrocinador.

Macacos cangrejeros: Se realizaron estudios de inmunogenicidad y de toxicidad por dosis repetidas en monos macho y hembra adultos (*Macaca fascicularis*, aproximadamente 4 años de edad; Beijing Jo-Inn New Drug Research Center, Beijing, China) en solicitudes de IACUC autorizadas en el animalario contratado, así como en UBI, como patrocinador.

Ratones transgénicos hAPP751: Se realizaron estudios de inmunogenicidad y de eficacia en ratones transgénicos (tg+) jóvenes hAPP751 y se usaron sus compañeros de camada (14 $\pm$ 2 semanas de edad) en un modelo de prevención para enfermedad de Alzheimer y ratones tg+ envejecidos y se usaron sus compañeros de camada (52 $\pm$ 2 semanas de edad) en un modelo terapéutico. Ambos estudios se realizaron en solicitudes de IACUC autorizadas en el animalario contratado (JSW Research GmbH, Graz, Austria), así como en UBI, como patrocinador.

Los ratones tg+ hAPP751 expresan constitutivamente en exceso la proteína precursora del amiloide humana (hAPP) que contiene las mutaciones dobles London (V717I) y Swedish (K670M/N671L), bajo el control regulador del promotor Thy-1 murino (Rockenstein, E, et al., 1995 y 2001). La deposición de A β ₁₋₄₂ ocurre ya a los 3 a 4 meses de edad con la aparición de placas maduras en la corteza frontal y a los 5 a 7 meses de edad la formación de placas se extiende al hipocampo, tálamo y la región olfativa en los ratones tg+ hAPP751. Se observaron los efectos de las vacunaciones intramusculares durante un periodo de 16 semanas para la respuesta de anticuerpos por ensayo de ELISA de suero, y para la deposición de amiloide del cerebro y carga de placas del cerebro, así como para pruebas de elevados niveles de reactividad celular (por ejemplo, infiltración de linfocitos T, activación celular de la microglía) en el cerebro por inmunotinción y por extracciones bioquímicas.

Antes de la inmunización, se probaron muestras de suero y/o de plasma de animales individuales para la presencia de péptidos diana A β según los métodos descritos anteriormente en este ejemplo. Cada animal se inmunizó con construcciones de péptidos A β diana por dosis de las formulaciones de vacuna, dependiendo de la especie y el protocolo.

Ejemplo 6

FORMULACIÓN DE VACUNA GENERAL PARA LA CLASIFICACIÓN INICIAL DE LA INMUNOGENICIDAD DE CONSTRUCCIONES DE PÉPTIDOS AB EN COBAYAS Y BABUINOS

Se describen en mayor detalle en los Ejemplos descritos a continuación las composiciones farmacéuticas y formulaciones de vacuna usadas en cada experimento. Brevemente, las formulaciones especificadas en cada uno de los grupos de estudio contuvieron, en general, todos los tipos de construcciones de péptidos A β de diseño con un fragmento del péptido A β enlazado mediante diferentes tipos de espaciadores (por ejemplo, ϵ K o κ K con KKK para potenciar la solubilidad de las construcciones peptídicas) y variaciones de epítopes promiscuos de linfocitos T cooperadores que incluyen dos conjuntos de epítopes T cooperadores artificiales derivados de la proteína de fusión del virus del sarampión y el antígeno de superficie de la hepatitis B con el (los) fragmento(s) del péptido A β enlazados en el extremo N de las construcciones peptídicas de diseño. Se evaluaron inicialmente más de 100 construcciones de péptidos A β de diseño en cobayas para su inmunogenicidad relativa con A β ₁₋₄₂ de longitud completa y además su reactividad cruzada con las placas nativas de las secciones de cerebro de pacientes con EA. Las construcciones de péptidos A β se prepararon en una emulsión de agua en aceite con Seppic Montanide™ ISA51 como el aceite autorizado para uso en vacunas humanas, mezclado con sales minerales o Alhydrogel (alumbre) en cantidades variables de construcciones peptídicas como se especifica. Las vacunas se prepararon normalmente disolviendo las construcciones de péptidos A β en agua a aproximadamente 20 a 800 μ g/ml y se formularon con Montanide™ ISA51 en emulsiones de agua en aceite (1:1 en volumen) o con sales minerales o Alhydrogel (alumbre) (1:1 en volumen). Las formulaciones de vacuna se mantuvieron a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos y se mezclaron por vórtex durante aproximadamente 10 a 15 segundos antes de la inmunización.

Algunos animales se inmunizaron con 2 a 3 dosis de una formulación específica de vacuna, que se administraron en el tiempo 0 (sensibilización) y 3 semanas después de la inmunización inicial (wpi) (refuerzo), opcionalmente 5 o 6 wpi para un segundo refuerzo, por vía intramuscular. Estos animales inmunizados se probaron entonces para evaluar la inmunogenicidad de los diversos inmunógenos de péptidos A β sintéticos presentes en la formulación de vacuna, así como su reactividad cruzada con A β ₁₋₂₈ y A β ₁₋₄₂ de longitud completa. Entonces se probaron adicionalmente los inmunógenos de péptidos A β con potente inmunogenicidad en el cribado inicial en cobayas en tanto emulsión de agua en aceite, sales minerales como formulaciones basadas en alumbre en babuinos, especie que ha sido calibrada por tener un perfil de respuesta inmunitaria similar al de los seres humanos, para pautas posológicas durante un periodo especificado impuesto por los protocolos de inmunizaciones.

Solo los candidatos más prometedores a inmunógenos de péptidos A β se evaluaron adicionalmente ampliamente antes de ser incorporados en formulaciones de vacuna finales para estudios de inmunogenicidad, duración, toxicidad y eficacia en estudios preclínicos guiados por GLP en la preparación para la presentación de una solicitud de nuevo fármaco en fase de investigación y ensayos clínicos en pacientes con enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo 7

FUNDAMENTO DEL DISEÑO, SELECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE FORMULACIONES DE VACUNA MULTICOMPONENTE QUE INCORPORAN CONSTRUCCIONES DE INMUNÓGENOS DE PÉPTIDOS AB₁₋₁₄ PARA LA PREVENCIÓN Y EL TRATAMIENTO DE DEMENCIA DEL TIPO ALZHEIMER

Historia del diseño: Cada vacuna o producto inmunoterapéutico requiere su propio foco y enfoque de diseño basado en el mecanismo de la enfermedad específica y la(s) proteína(s) diana requerida(s) para la intervención. Las dianas de las que después se modelan los diseños pueden incluir proteínas celulares implicadas en una vía de enfermedad o un agente infeccioso en el que pueden estar implicados varias proteínas del patógeno. El proceso desde la investigación hasta la comercialización es un proceso muy largo que normalmente requiere una o más décadas para realizarse.

Se requiere un amplio proceso de validación serológica una vez se selecciona la molécula diana. La identificación y distribución de epítopes de linfocitos B y de linfocitos T dentro de la molécula diana es importante para el diseño de vacunas moleculares. Una vez se reconoce el linfocito B diana, se realizan estudios de inmunogenicidad consecutivos piloto en animales pequeños para evaluar las propiedades funcionales de los anticuerpos generados por las formulaciones de vacuna de los péptidos de diseño. Dicha aplicación serológica se lleva entonces a cabo en animales de las especies diana para validación adicional de la inmunogenicidad de la vacuna y las propiedades funcionales de los anticuerpos generados. Todos los estudios se realizan en múltiples grupos paralelos con sueros recogidos de los hospedadores inmunizados para la evaluación. También se llevan a cabo estudios de inmunogenicidad previos en la especie diana o en primate no humano en el caso de vacunas humanas para la validación adicional de la inmunogenicidad y dirección del diseño. Entonces se preparan los péptidos diana en mezclas variables para evaluar la sutil diferencia en la propiedad funcional relacionada con las interacciones respectivas entre construcciones de péptidos cuando se usan en combinaciones para preparar los diseños de formulación respectivos. Después de las evaluaciones adicionales, se establecen construcciones peptídicas finales, composiciones peptídicas y formulaciones de las mismas, junto con los parámetros físicos respectivos de las formulaciones, que conducen al proceso de desarrollo del producto final.

La amplia experiencia en el diseño permite el desarrollo de productos de vacuna de nueva generación desde el descubrimiento hasta la comercialización como se muestra en la **Figura 1** a un ritmo acelerado.

a. Diseño y validación de construcciones peptídicas adecuadas derivadas de AB₁₋₁₄ para formulaciones de vacuna con potencial para tratar pacientes con enfermedad de Alzheimer

Como continuación de la invención previa desvelada por el presente inventor (Wang CY. Patente de EE. UU. N° 6.906.169, United States: United Biomedical Inc.; 2005; Wang CY. Patente de EE. UU. N° 7.951.909, United States: United Biomedical Inc.; 2011; Wang CY. Patente de EE. UU. N° 8.232.373, United States: United Biomedical Inc.; 2012).), se seleccionó el refinado adicional del epítipo de linfocitos B de la molécula A β establecida en un péptido A β ₁₋₁₄ que carece del dominio del extremo C de la secuencia que expresa epítipes T cooperadores autólogos frecuentemente presentes en pacientes de enfermedad de Alzheimer que podrían provocar un efecto secundario intenso, tal como meningoencefalitis, como el epítipo diana de linfocitos B en el diseño para la incorporación en las formulaciones de vacuna.

Para generar las construcciones peptídicas más potentes para incorporación en las formulaciones de vacuna, se transformó en estudios de inmunogenicidad en cobayas un gran repertorio de epítipes T cooperadores promiscuos derivados de diversos patógenos o epítipes T cooperadores artificiales diseñados adicionalmente a partir de la secuencia de la proteína de fusión del virus del sarampión (MVF) o proteína del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg). Un estudio representativo de 16 construcciones peptídicas derivadas de A β ₁₋₁₄ como se muestra en la **Tabla 3** (SEQ ID NOS: 48, 51 a 65) donde el péptido A β ₁₋₁₄ se enlazó mediante ϵ K como espaciador con epítipes T cooperadores promiscuos individuales. Las construcciones de inmunógenos peptídicos se formularon en emulsiones

de agua en aceite Montanide™ ISA51 y se probaron en cobayas para su respectiva inmunogenicidad administrando las formulaciones de vacuna respectivas preparadas a 100 µg/0,5 ml en una emulsión estándar ISA51 para un sensibilización en 0 wpi y un refuerzo en 3 wpi. El análisis de inmunogenicidad preliminar confirmó la presencia de una estructura de epítipo de linfocitos T cooperadores característica del extremo C de Aβ₁₋₄₂ donde la delección de la secuencia de péptidos desde los aminoácidos 15 hasta 28 de la secuencia de Aβ convirtió la secuencia de Aβ₁₋₁₄ en no inmunogénica por sí misma (**Tabla 4**, Grupos 1 a 3). La clasificación preliminar de los epítopes T cooperadores usados para restaurar y potenciar la inmunogenicidad de la inmunogenicidad de los péptido Aβ₁₋₁₄ en orden creciente se muestra en la **Tabla 4** con la construcción de péptidos más débil enumerada primero: Th de *Schistosoma mansoni* (SEQ ID NO: 56) < Th de *Clostridium tetani*1 (SEQ ID NO: 48) < Th de *Bordetella pertussis* (SEQ ID NO: 52) < Th de *Clostridium tetani*2 (SEQ ID NO: 53) < Th de difteria (SEQ ID NO: 54) < Th de *Plasmodium falciparum* (SEQ ID NO: 55), estando clasificada Th de la toxina del cólera (SEQ ID NO: 57) entre la del epítipo T cooperador artificial derivado de MVF (SEQ ID NOs: 51, 58, 59) y HBsAg (SEQ ID NO: 60). La construcción peptídica derivada de Aβ₁₋₁₄ (SEQ ID NO: 51) también se puede diseñar como una estructura tetrámera ramificada como se muestra en (SEQ ID NO: 61) como una potente construcción de inmunógenos peptídicos. En resumen, el estudio de inmunogenicidad anterior validó la idoneidad de construcciones específicas derivadas de Aβ₁₋₁₄ (SEQ ID NOs: 51, 57 a 61) como inmunógeno para su uso en el diseño de la formulación de vacuna final para generar anticuerpos dirigidos al extremo N del péptido Aβ₁₋₄₂ de longitud completa, un componente bioquímico principal de las placas seniles de pacientes con EA.

b. Ampliación de la cobertura del MHC usando construcciones derivadas de Aβ₁₋₁₄ con diferentes epítopes T cooperadores promiscuos

Cuando se diseña una vacuna para tratar pacientes de acervo genético distinto, es importante permitir que el diseño cubra la máxima población con acervo genético distinto. Por tanto, se exploró el efecto de la inmunogenicidad sinérgica de construcciones de inmunógenos peptídicos derivados de Aβ₁₋₁₄ para dicha combinación. Puesto que los epítopes T cooperadores promiscuos derivados de MVF y HBsAg representan, entre los más potentes, aquellos que proporcionan dicha mejoría de la inmunogenicidad, la combinación de construcciones de péptidos que contienen estos dos epítopes T cooperadores se diseñaron, por tanto, para dicha exploración. Se diseñaron formas de bibliotecas combinatorias de epítopes T cooperadores para tanto MVF como HBsAg (SEQ ID NOs: 44 y 45) como se muestra en la **Tabla 2**, con cobertura del motivo de unión de MHC máxima en mente, en construcciones derivadas de Aβ₁₋₁₄ (SEQ ID NOs: 62 y 63) y se evaluaron, individualmente o en combinación, para la inmunogenicidad en cobayas tras un programa de sensibilización (0 wpi) y dos refuerzos (3 y 5 wpi) a 100 µg/0,5 ml por dosis. Como se muestra en la **Tabla 5**, una mezcla de los dos inmunógenos a igual relación en peso provocó una respuesta inmunitaria respetable cuando se comparó con la provocada por la construcción de péptidos individual respectiva.

c. Diseño de inmunógenos simples que incorporan el epítipo B diana enlazado a epítopes T cooperadores cuidadosamente seleccionados con múltiples motivos de unión a MHC generan una respuesta inmunitaria centrada y limpia dirigida solo al epítipo de linfocitos B

Se recogieron sueros hiperinmunes 8 semanas después de la inmunización inicial (wpi) de los hospedadores inmunizados para probar los epítopes T cooperadores respectivos usados para la mejoría de la inmunogenicidad de epítopes B. Sueros hiperinmunes de hospedadores inmunizados similares que se administraron con un programa de inmunización por sensibilización y refuerzo similar al péptido Aβ₁₋₁₄ enlazado a KLH que se preparó mediante acoplamiento químico con un resto de cisteína añadido en el extremo N del péptido Aβ₁₋₁₄. Como se puede apreciar de la **Tabla 6**, todos los hospedadores inmunizados con las construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ₁₋₁₄ de diseño (SEQ ID NOs: 62 y 63) tanto solos como en combinación generaron los altos títulos deseados de reactividad cruzada de anticuerpos anti-Aβ₁₋₁₄ hacia la reactividad cruzada de Aβ₁₋₄₂ dirigida, mientras que se generó poca o ninguna reactividad contra los dos epítopes T cooperadores (SEQ ID NOs: 44 y 45). A diferencia, a pesar de la inmunogenicidad relativa generada por la proteína transportadora convencional KLH al epítipo de Aβ₁₋₁₄ (log₁₀ títulos desde 2,2 hasta 3,9), se generó una respuesta de anticuerpos muy alta dirigida al vehículo de proteína KLH por todos los animales con títulos muy altos (media geométrica del log₁₀ título a 6,2), nuevamente validado antes de la observación anterior en que una única respuesta "centrada" dirigida al "epítipo de linfocitos B dirigido" fue el resultado de la inmunización con estas construcciones de inmunógenos peptídicos racionalmente diseñadas basadas en el entendimiento de la estructura y la función de los epítopes de linfocitos B y de linfocitos T.

d. Evaluación de la inmunogenicidad en babuinos después de la sensibilización (0 wpi) y refuerzos (3 y 6 wpi) de formulaciones de vacuna que contienen cantidades variables de construcciones de Aβ₁₋₁₄ (SEQ ID NOs: 62 y 63) en emulsión de agua en aceite ISA 51 y en alumbre

Antes de avanzar en el trabajo de desarrollo adicional para explorar las propiedades funcionales de los anticuerpos generados por estas construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ₁₋₁₄, se evaluó en babuinos, la especie de animal que genera respuestas inmunitarias más parecidas a las de los seres humanos en escala, una evaluación de la inmunogenicidad relativa de las formulaciones de vacuna que incorporan estas construcciones peptídicas (SEQ ID NOs: 62 y 63 en una relación equimolar) en cantidades variables en dos formulaciones diferentes lo más frecuentemente usadas en ensayos humanos. Todas las formulaciones de vacuna se administraron a los animales en 0,5 ml por dosis. La dosis dirigida original para uso futuro era a 100 µg/ml, así se administraron tres animales a

esta dosis. También se evaluó una evaluación de la inmunogenicidad relativa entre la formulación de agua en aceite ISA51 más potente frente al adyuvante alumbre más débil pero el más frecuentemente usado a los mismos 100 µg. En el sistema de emulsión de agua en aceite probado, se evaluó un estudio de aumento de dosis con 25 µg, 100 µg y 400 µg por dosis. La primera observación de este estudio fueron las respuestas inmunitarias reducidas (por más de un log₁₀ en títulos de anticuerpos) generadas por la formulación basada en alumbre cuando se comparó con la formulación de emulsión de agua en aceite ISA con el mismo contenido de inmunógeno peptídico dado a 100 µg en 0,5 ml por dosis. Aunque 100 µg por dosis fue la cantidad originalmente dirigida para la futura formulación de la administración de vacuna en hospedadores inmunizados, se observó un aumento de la respuesta inmunitaria con un aumento de dosis desde 25 µg, hasta 100 µg y 400 µg, respectivamente, como se muestra en la **Tabla 7**. Por tanto, para las construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ₁₋₁₄ de diseño (SEQ ID NOs: 62 y 63) o construcciones de inmunógenos de péptidos de sus análogos, se explorarían adicionalmente las dosis más allá de 100 µg.

Ejemplo 8

CRITERIOS PARA EL DESARROLLO DE UNA VACUNA INMUNOTERAPÉUTICA SATISFACTORIA PARA EL TRATAMIENTO DE DEMENCIA DEL TIPO ALZHEIMER

La estrategia de UBI para desarrollar una vacuna inmunoterapéutica incluye el diseño de epítopes Th promiscuos patentados que enlazan con la secuencia B diana basándose en la tecnología de plataforma para vencer la "auto"-barrera y limitación de la diversidad genética y el desarrollo de la formulación de vacuna óptima basada en péptidos que son Seguras, Únicas, Caracterizables, Rentables, Eficaces, Estable y Escalables (acuñado como ÉXITO de la palabra inglesa SUCCESS) (Wang CY, et al., 2005; Sokoll KK, 2004). Se prestó especial atención a la fase de diseño inicial para permitir que los inmunógenos peptídicos seleccionados que entrarían en la fase de desarrollo del programa para la formulación de vacuna fueran caracterizables desde el punto de vista de la autorización de una especialidad farmacéutica ya que esta vacuna, cuando demuestre ser eficaz en pacientes después del ensayo de fase III, sería la primera vacuna completa basada en péptidos sintéticos administrada a pacientes en dosis de múltiples millones en la historia humana. Se prestó especial atención en el diseño de calidad de los péptidos, seleccionados de los muchos que ya se demostró que daban respuestas inmunitarias deseadas respetables, a la "solubilidad" de los péptidos individuales a emplear, el rendimiento de química sintética y las trabas de purificación inherentes en el diseño de secuencias cuando se llega a los detalles finos. Un adyuvante bien aceptado con alto factor de seguridad también sería un factor importante a considerar, de las muchas elecciones aceptables. Se debe considerar un equilibrio entre el factor de seguridad y la escala de inmunogenicidad. Y cuando la inmunogenicidad se comprometa debido al factor de seguridad, qué otras características de formulación de vacuna se pueden incorporar para aumentar más la respuesta inmunitaria. Nuevamente, el éxito de una vacuna reside en su capacidad para generar la respuesta inmunitaria deseada en una población tan grande y amplia con acervo genético distinto como sea posible, por consiguiente una amplia cobertura del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) también debe ser un factor muy importante a considerar.

En vista de la consideración anterior, para lograr una vacuna ÉXITO que se dirige al extremo N de la molécula de Aβ, se elegirán péptidos de secuencia única en lugar de en forma combinatoria a pesar de su inmunogenicidad relativamente más débil cuando se compara con su homólogo en un formato de biblioteca combinatoria. La solubilidad de los péptidos también es un factor clave a probar, puesto que los epítopes T cooperadores que potencian la inmunogenicidad altamente potente normalmente comprenden una extensión larga de restos de aminoácidos hidrófobos, que los convierte en péptidos correspondientes no solubles. Se debe prestar cuidado especial en cuanto a si los restos altamente cargados, tales como Asp, Glu, Lys y Arg, se añadirían a posiciones específicas para potenciar la solubilidad del péptido. Para lograr un alto rendimiento en la síntesis, la química implicada en todos los procesos sintéticos junto con los productos intermedios generados fueron todos ampliamente evaluados para llegar a las secuencias óptimas que asumirían el péptido final como componente clave de la formulación de vacuna. Después de una consideración equilibrada de todos los candidatos a péptido altamente cualificados desde los aspectos de inmunogenicidad, se seleccionaron dos construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ₁₋₁₄ (SEQ ID NOs: 64 y 65), siendo el péptido con SEQ ID NO: 64 de la serie de MVF y siendo el péptido con SEQ ID NO: 65 de la serie de HBsAg, y se analizaron adicionalmente para exploración adicional en formulaciones de vacuna.

Estos péptidos se sintetizaron y se purificaron hasta alta pureza como se muestra en las **Figuras 2A, 2B, 2E**. Los perfiles de HPLC para ambos péptidos de SEQ ID NOs: 65 y 64 en el análisis de fase inversa con gradiente poco profundo mostraron el tiempo de elución de 20 y 21 minutos, respectivamente. El análisis de MALDI-TOF de estos péptidos purificados dio un peso molecular de 3892,274 (con un valor teórico de 3892,52) para el péptido con SEQ ID NO: 65 y 4374,568 (con valor teórico de 4374,04) para el péptido SEQ ID NO: 64, ambos con alta precisión, como se muestra en las **Figuras 2C y 2D**.

Los péptidos "Th" de SEQ ID NOs: 46 y 47, ambos usados para potenciar la inmunogenicidad de Aβ₁₋₁₄, fueron ampliamente evaluados por sus motivos de unión en las diversas poblaciones como se muestra en las **Figuras 3A y 3B**. Es seguro incorporar dos epítopes T cooperadores promiscuos en el diseño de vacuna para permitir la máxima cobertura del acervo genético de todos los pacientes. A partir del porcentaje de cobertura analizado, esta vacuna tendrá una probabilidad muy razonable de cubrir una gran población, si no toda, de pacientes que reciben la vacuna,

un factor importante para justificar extensas pruebas e intentos de desarrollo extendidos a una vacuna de alto valor clínico.

Con el fin de una vacuna diseñada para ser usada por una gran población y también siendo la prevención parte del objetivo de la administración, la seguridad se convierte en otro factor importante a considerar. A pesar del uso de emulsiones de agua en aceite en seres humanos para muchas formulaciones de vacuna en ensayos clínicos, el alumbre sigue siendo el principal adyuvante para su uso en las formulaciones de vacuna debido a sus décadas de pruebas de seguridad. Se consideraron el alumbre o sus sales minerales Adjuphos (fosfato de aluminio) para su uso como adyuvantes en la preparación de aplicaciones clínicas.

a. Evaluación de la inmunogenicidad en cobayas después de la sensibilización (0 wpi) y los refuerzos (3 y 5 wpi) de formulaciones de vacuna que contienen cantidades variables de construcciones de inmunógenos de péptidos A β ₁₋₁₄ (SEQ ID NOs: 64 y 65) altamente purificadas con una cantidad fija de sales minerales

Después de la selección de las dos construcciones de inmunógenos de péptidos A β ₁₋₁₄ (SEQ ID NOs: 64 y 65) altamente purificadas de los muchos candidatos a inmunógenos para el desarrollo de una vacuna para EA de UBI para la prueba preclínica y clínica, se probó una mezcla de estos dos péptidos en una relación equimolar para su inmunogenicidad en presencia de una cantidad fija (0,5 ml) de alumbre/sales minerales en un estudio de dosis en cobayas como se muestra en la **Figura 4**. Se probaron cantidades variables de la mezcla de péptidos que contenía las dos construcciones de inmunógenos de péptidos A β ₁₋₁₄ (SEQ ID NOs: 64 y 65) anteriormente mencionadas desde 0 μ g, 10 μ g, 30 μ g, 100 μ g y 300 μ g en 0,5 ml de sales minerales (fosfato de aluminio, Adjuphos) en cobayas basándose en un programa de inmunización de 0, 3 y 5 wpi (semanas después de la inmunización inicial) con la inmunogenicidad observada durante un periodo de más de 26 semanas. En el pico de la respuesta inmunitaria que es aproximadamente 5 semanas después de la inmunización inicial, los animales que recibieron 300 μ g por dosis dieron la respuesta inmunitaria más alta, seguido por los que recibieron 100 μ g y 30 μ g, luego por 10 μ g de dosis, con clasificación de respuesta inmunitaria similar durante el siguiente periodo de 26 semanas. La dosis más alta a 300 μ g por 0,5 ml de Adjuphos se considera, por tanto, una condición óptima para la inmunización y se usará como guía para explorar la inmunogenicidad en otras formulaciones relacionadas en diferentes especies.

b. Medios para elevar más la inmunogenicidad de las formulaciones de vacuna mediante la formación de complejos inmunoestimulantes (ISC) entre péptidos y oligonucleótidos

Inherente al uso de alumbre o sus sales minerales asociadas como adyuvante, la inmunogenicidad de la formulación de vacuna asociada también se reduciría en aproximadamente un log₁₀ en el título para sus epítopes de linfocitos B de A β ₁₋₁₄ diana (como se estimó en un estudio similar en el **Ejemplo 7**). Por tanto, se exploran medios para elevar más la inmunogenicidad de la formulación de vacuna.

Más específicamente, en la formulación de UBI como se muestra en la **Figura 5A**, un complejo inmunoestimulante estabilizado (ISC) deriva de péptidos catiónicos y una molécula de oligodesoxinucleótido (ODN) de CpG polianiónico (panel superior) (Sokoll KK, 2004). Es un sistema de autoensamblaje accionado por neutralización de carga electrostática. La estequiometría de la relación de carga molar entre el péptido catiónico y el oligómero aniónico determina el grado de la asociación. La asociación electrostática no covalente de inmunógenos peptídicos y ODN de CpG es un proceso completamente reproducible. Se agrega el complejo inmunoestimulante de péptidos / ODN de CpG, que facilita la presentación a las células de procesamiento de antígenos (APC) "profesionales" del sistema inmunitario, mejorando así además la inmunogenicidad de los complejos. Estos complejos se caracterizan fácilmente por el control de calidad durante la fabricación. El ISC de péptidos / CpG es bien tolerado *in vivo*.

Los complejos inmunoestimulantes se pueden combinar entonces con el adyuvante de sal mineral / de aluminio que forma una suspensión acuosa como se muestra en el panel inferior de la **Figura 5B**.

Se han caracterizado motivos de CpG como agonistas de receptor del tipo toll 9 (TLR9), encontrados en un subconjunto de células dendríticas (pDC) y linfocitos B. Los receptores del tipo toll tienen la capacidad de reconocer patrones moleculares distintos característicos de invasores extraños comunes, tales como bacterias, virus y parásitos. Las secuencias de CpG sintético, específicamente no metiladas, son capaces de unirse y activar TLR9. Como potentes mitógenos de linfocitos B, los agonistas de TLR9 son eficaces en inducir fuertes respuestas inmunitarias de anticuerpos. El mecanismo de acción de CpG implica, entre ellos, el desarrollo de anticuerpos específicos de antígeno de larga duración.

En vista del ensayo clínico de vacunas de péptido A β ₁₋₄₂ AN 1792 que fracasaron en tanto su inmunogenicidad en generar en solo 30 % de los pacientes anticuerpos dirigidos hacia la vacuna agregada de A β ₁₋₄₂ dirigida como causaron en el 6 % de los pacientes efectos secundarios de tipo meningoencefalitis, los adyuvantes basados en aluminio empleados en la presente invención para la vacuna para EA de UBI se conocen por estimular el tipo Th-2 de respuestas inmunitarias (es decir, citocinas IL-4 y IL-5). Además, los complejos inmunoestimulantes de construcción de inmunógenos de péptidos A β / ODN de CpG están en partículas. El procesamiento de inmunógenos en partículas se facilita por APC que sesga un tipo Th-2 de respuesta.

En resumen, los oligonucleótidos de CpG han sido usados con Seguridad en varios ensayos clínicos humanos (>1.000 pacientes). Los complejos inmunoestimulantes derivados de péptidos / ODN de CpG se Caracterizan fácilmente. Son Estables en condiciones fisiológicas y bien tolerados *in vivo*. Los complejos basados en CpG derivados de numerosos inmunógenos peptídicos solos o en combinación con sales minerales han demostrado ser Eficaces en ratones, cobayas, cerdos, perros, ganado vacuno, babuinos y macacos con acontecimientos adversos mínimos informados. Las sales minerales basadas en aluminio son los únicos adyuvantes incluidos en las vacunas actualmente autorizadas en los EE. UU. Las composiciones de vacuna que emplean estos adyuvantes son Rentables y se sabe que se pueden cambiar de Escala eficientemente. Las formulaciones específicas de vacuna / adyuvante están autorizadas frente al adyuvante solo. UBI ha explorado y desarrollado composiciones Únicas. Las características anteriormente descritas de la vacuna para EA de UBI para el tratamiento de demencia tiene todos los elementos requerida para ser un ÉXITO.

Ejemplo 9

FORMULACIÓN DE VACUNA PARA EA DE UBI PARA INYECCIÓN INTRAMUSCULAR

La construcción de inmunógenos de péptidos A β ₁₋₁₄- ϵ K-KKK-MvF5 Th (SEQ ID NO: 64) y la construcción de inmunógenos de péptidos A β ₁₋₁₄- ϵ K-HBsAg3 Th (SEQ ID NO: 65) son catiónicas a pH fisiológico. Las Figuras 2A, 2B, 2C (lado izquierdo) ilustran los perfiles de HPLC de los dos péptidos solos y en una mezcla de relación molar igual. Las Figuras 2D y 2E (lado derecho) ilustran los perfiles caracterizados por espectrometría de masas de MALDI-TOF de los dos péptidos con un peso molecular (Da) de 3892 y 4374, respectivamente. La adición de ODN de CpG polianiónico da como resultado la neutralización de carga y el inmediato "autoensamblaje" de complejos inmunoestimulantes (ISC) en disolución. La estequiometría de las relaciones de carga molar de péptido catiónico: CpG aniónico determina el grado de asociación. La vacuna para EA de UBI se preparó en las etapas: El ISC se preparó en agua para inyección con una mezcla equimolar de las dos construcciones de inmunógenos de péptidos A β con una relación de carga molar con respecto a ODN de CpG aproximadamente igual.

a. Evaluación de la inmunogenicidad durante un periodo de 10 semanas en babuinos después de la sensibilización (0 wpi) y los refuerzos (3 y 6 wpi) de formulaciones de vacuna que contienen 300 μ g/0,5 ml de construcciones de inmunógenos de péptidos A β ₁₋₁₄ (SEQ ID NOs: 64 y 65) altamente purificados que forman complejos inmunoestimulantes con oligómeros de CpG en ausencia o presencia de alumbre o Adjuphos como adyuvante

Basándose en el primer nivel de inmunogenicidad y el estudio de dosis en cobayas con las construcciones de inmunógenos de péptidos A β ₁₋₁₄ (SEQ ID NOs: 64 y 65) altamente purificadas, se preparó una mezcla de 300 μ g que contenía las dos construcciones de inmunógenos de péptidos A β ₁₋₁₄ (SEQ ID NOs: 64 y 65) a una relación equimolar como complejos inmunoestimulantes con oligómeros de CpG como se ha descrito anteriormente. Entonces se formularon o con alumbre o Adjuphos, o sin adyuvante, para la inmunización en babuinos a 300 μ g de péptido por dosis para inyección intramuscular basada en un protocolo de inmunización de 0, 3, 6 semanas con los niveles de anticuerpo específico observados durante un periodo de 10 semanas. Se usaron babuinos para dicha evaluación de inmunogenicidad y evaluación de la formulación final antes de entrar en ensayos humanos puesto que esta especie de animal genera respuestas inmunitarias que se parecen mucho a las de los seres humanos en escala. Todas las formulaciones de vacuna se administraron a los animales en 0,5 ml por dosis y dos animales por grupo. Como se muestra en la Figura 6, a 300 μ g en 0,5 ml por dosis, las tres formulaciones, en presencia o ausencia de alumbre o Adjuphos como adyuvante, demostraron inmunogenicidad a aproximadamente el mismo nivel, dentro de la escala de 0,5 log₁₀, como se demuestra por ELISA hacia el péptido A β ₁₋₁₄. La formulación de ISC potenció significativamente la inmunogenicidad ejercida por el péptido solo. Sin embargo, después de la observación durante un periodo de 8 a 10 semanas, la formulación soportada por Adjuphos mantuvo una respuesta inmunitaria significativamente más alta cuando se comparó con los otros dos grupos, ampliando desde 0,5 hasta log₁₀ en la escala de respuesta (es decir, aproximadamente 3 a 10 veces más potente). A través de esta cuidadosa calibración de la inmunogenicidad en babuinos con tres formulaciones estrechamente relacionadas, diseñada para ser de factores de alta de seguridad usando péptidos racionalmente diseñados altamente purificados que generan respuestas inmunitarias muy centradas y deseadas sin ningún factor de complicación del adyuvante, la formulación de vacuna para EA de UBI se finaliza, por tanto, para exploración adicional en primates y seres humanos para inmunogenicidad, especificidad, propiedades funcionales relacionadas con los anticuerpos generados, toxicidad aguda y crónica, y finalmente eficacia clínica como se ilustra en los siguientes ejemplos.

b. Preparación de la formulación de vacuna para EA de UBI para estudios de inmunogenicidad, toxicidad aguda, toxicidad crónica, eficacia y seguridad clínica, tolerabilidad y eficacia.

Se preparó el ISC en agua para inyección con una mezcla equimolar de las dos construcciones de inmunógenos de péptidos A β (SEQ ID NOs: 64 y 65) que se mezcla además con CpG a una relación de carga molar entre péptidos y ODN de CpG aproximadamente igual. El ODN de CpG en las formulaciones de vacuna para EA de UBI se une 100 % a las construcciones de inmunógenos de péptidos en un proceso mediado por la neutralización electrostática de carga opuesta, dando como resultado la formación de partículas del tamaño de micrómetros. La forma de la partícula permite una dosificación significativamente reducida de ODN de CpG del uso convencional de adyuvantes

de CpG, menos posibilidades de respuestas inmunitarias innatas adversas, y facilita las vías alternativas de procesamiento de inmunógenos que incluyen células presentadoras de antígenos (APC) profesionales. Al ISC previamente formado se añadió secuencialmente la sal mineral de aluminio, una solución salina para tonicidad y un conservante. De las sales minerales de aluminio, se usó fosfato de aluminio en lugar del gel de alumbre basándose en los resultados del estudio de inmunogenicidad en babuinos para el mejor sustento de la inmunogenicidad.

c. Estudio de estabilidad y de inmunogenicidad de la formulación de vacuna para EA de UBI

Se preparó la formulación de vacuna para EA de UBI preparada a 300 µg en 0,5 ml por dosis con fosfato de aluminio (Adjuphos) como adyuvante con una cobertura de 20 % como se ha descrito anteriormente y se envasó en un vial de vidrio estéril de 1 ml y se guardó a 2-8 °C durante 2 años. Se recuperaron las muestras según un protocolo de pruebas de estabilidad. Todos los parámetros físicos cumplieron las especificaciones de control de calidad (QC). Las construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ₁₋₁₄ se descomplejaron del oligodesoxinucleótido (ODN) de CpG y el adyuvante Adjuphos y se analizaron por HPLC según las especificaciones analíticas para cada uno de los péptidos. Como se muestra en el panel más bajo a la izquierda de la **Figura 2C**, las dos construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ₁₋₁₄ (SEQ ID NOs: 64 y 65) revelaron una mezcla equimolar de los dos péptidos respectivos en el tiempo de elución esperado tras el análisis de HPLC.

Se recuperaron los viales que contenían la formulación de vacuna para EA de UBI para el estudio de inmunogenicidad en cobayas. Se probaron dos grupos, cada uno de los cuales tenía seis animales, siendo uno el grupo de vacuna donde se administraron 300 µg por dosis a las 0 y 3 wpi, mientras que el otro grupo se administró con la formulación de vacuna de placebo (es decir, la misma formulación sin las dos construcciones de inmunógenos de péptidos). Como se muestra en la **Figura 7**, se logró inmunogenicidad significativa por todos los animales tras la administración única que alcanzó una respuesta pico 5 wpi después de un refuerzo 3 wpi. Se probaron adicionalmente los sueros inmunes tomados de 8 wpi para su reactividad con los péptidos Th respectivos empleados para proporcionar la mejora de la inmunogenicidad. Como se muestra en la **Tabla 8**, poca reactividad, si alguna, se dirigió a los péptidos Th para confirmar adicionalmente la naturaleza "inmunosilenciosa" de estos dos péptidos Th, permitiendo así una respuesta inmunitaria muy centrada dirigida exclusivamente hacia el extremo N del péptido Aβ. La formulación de vacuna para EA de UBI está comprendida, por tanto, de productos químicos bien definidos, alejado de la industria histórica de las vacunas que trata exclusivamente con materiales biológicos no bien caracterizados, que generan respuesta inmunitaria enfocada como se diseñó, y es más ampliamente reactiva que los anticuerpos monoclonales, así más efectivas en eficacia, pero mucho más limpias que el tipo conjugado de péptido-vehículo convencional de vacunas, dominando así un alto factor de seguridad.

Ejemplo 10

TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE CEREBRO HUMANO CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER PARA EVALUAR LA ESPECIFICIDAD SEROLÓGICA Y SEGURIDAD DE LA VACUNA PARA EA DE UBI

Sueros hiperinmunes de los babuinos de los Grupos 3 y 4 inmunizados con las construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ (SEQ ID NOs: 62 y 63) en la relación equimolar descrita en el Ejemplo 7 se reunieron con fracción de IgG purificada y se probaron para su reactividad con cerebro humano con EA. Como se muestra en la **Figura 8**, se encontró la tinción con tanto vasos cerebrales como placas amiloides por IgG purificada de sueros hiperinmunes, pero no de fracciones de IgG similares de los sueros preinmunes. La preincubación de los sueros inmunes con péptido Aβ₁₋₁₄ absorbió toda la inmunorreactividad con tanto vasos cerebrales como placas de amiloide, pero no por un péptido no relevante, que demuestra la alta especificidad de la reactividad de anticuerpos anti-Aβ en los sueros inmunes por vacunación con una formulación de vacuna que comprende construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ (SEQ ID NOs: 62 y 63).

Se realizó otro estudio de inmunohistopatología usando IgG de cobaya preinmune e hiperinmune en secciones de criostato de tejidos humanos normales adultos para monitorizar la especificidad y autorreactividades de anticuerpos no deseables. Se cribó el panel de tejidos humanos (N = 32) para inmunorreactividad con IgG anti-Aβ₁₋₁₄ purificada de cobayas inmunizadas con la vacuna inmunoterapéutica para EA de UBI y se comparó con IgG preinmune purificada de los mismos animales. Se revisaron los patrones de inmunotinción observados en secciones de tejidos normales adultos por patólogos clínicos certificados en PhenoPath Laboratories. Excepto por la inmunorreactividad positiva débil de algunos tejidos musculares (por ejemplo, endometrio), todos los tejidos humanos adultos probados dieron negativo, además de la fuerte reactividad positiva en placas seniles en uno de los tres especímenes de cerebro adulto e inmunotinción positiva de fluido cerebral dentro de muestras de médula espinal.

Ejemplo 11

ESTUDIOS DE INMUNOGENICIDAD DE LAS FORMULACIONES PROTOTIPO DE VACUNA PARA EA DE UBI EN BABUINOS ADULTOS

En la Parte A del protocolo, se inmunizaron cuatro babuinos macho adultos a las 0, 3 y 6 semanas con inmunógenos de péptidos Aβ₁₋₁₄ (300 µg de péptido total por dosis) complejados en complejos inmunoestimulantes (ISC)

patentados y se formularon con adyuvantes de sal mineral de aluminio. Las formulaciones de ISC/sal mineral produjeron fuertes respuestas de anticuerpos anti-A β en todos los animales (**Figura 9A**). No se observaron reacciones adversas del sitio de inyección.

Los objetivos para la Parte B del protocolo fueron: (1) monitorizar la seguridad y la reactogenicidad del sitio de inyección de exposición repetida a las dosis clínicas diana y a una dosis cuatro veces más alta, (2) monitorizar la inmunogenicidad en un estudio de aumento de dosis y (3) evaluar la cinética de la respuesta de memoria de los anticuerpos. Entonces se dejó que los animales descansaran durante 72 semanas. Mientras tanto, los niveles en suero de anticuerpos anti-A β habían disminuido 10-100 veces. A las 78 y 81 semanas después de la inyección inicial (**Figura 9B**), se administraron cuatro animales con vacunas en o dosis de 300 μ g de péptido a los números de animal 564 y 565 o dosis de 1200 μ g a los números de animal 556 y 561. Las respuestas de memoria restauraron rápidamente los títulos pico de anticuerpos en los cuatro babuinos. En la semana 104, los títulos de anticuerpos habían empezado a disminuir y los animales fueron nuevamente restaurados a los títulos pico por dosis de refuerzo en la semana 104. Se determinó la cinética de las respuestas de anticuerpos anti-A β en suero en las semanas 0, 2, 5, 6, 8, 10, 78, 81, 84, 88, 92, 96, 100, 104, 107 y 111 por ELISA de péptidos anti-A β ₁₋₂₈. No se observaron reacciones del sitio de inyección en los animales que recibieron la dosis de 300 μ g. Sin embargo, se observó cierta rojez e inflamación en los sitios de inyección para los babuinos que recibieron la dosis alta (1200 μ g) en la semana 78 solo; esta reacción transitoria fue completamente resuelta en el plazo de una semana. No se informaron otros acontecimientos adversos o problemas de seguridad durante los 2 años que se evaluaron los babuinos.

Ejemplo 12

ENSAYO DE NEUROTOXICIDAD *IN VITRO* PARA LA INHIBICIÓN DE LA FIBRILOGÉNESIS Y PROTECCIÓN DE LA TOXICIDAD MEDIADA POR AB₁₋₄₀ POR ANTICUERPO ANTI-AB

Los ensayos de neurotoxicidad emplearon la línea celular de feocromocitoma de rata, PC-12, y disoluciones envejecidas del péptido A β ₁₋₄₀, como se describe previamente por Solomon B, et al. (Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94:4109-4112). La disolución de péptido se caracterizó por formación fibrilar por unión a rojo Congo. En los días 6 y 9, la disolución unió cantidades equivalentes del colorante como se muestra por la absorbancia, A_{540nm}. Esta observación proporcionó pruebas de la formación de agregados tóxicos de A β ₁₋₄₀; se probó la preparación del día 9 para la toxicidad para células PC-12.

Se cultivaron las células PC-12 en cultivo de tejido y se suspendieron en medio de ensayo y se dispusieron en los pocillos de una placa de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 pocillos, 5×10^3 células/pocillo en 100 μ l. Se probó la toxicidad del péptido incubado a 37 °C (es decir, A β ₁₋₄₀ agregado) y un péptido recién preparado (es decir, no agregado) a 25 y 6,5 μ M por duplicado. Los controles fueron células PC-12 con medio de ensayo solo. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C en una estufa de incubación con CO₂. Se determinó la toxicidad para las células por el ensayo de citotoxicidad CytoTox 96® de Promega. La lisis se determinó por absorbancia, A_{492nm}, y los resultados se presentaron como el porcentaje de citotoxicidad en comparación con 100 % de lisis.

Evaluación *in vitro* de la vacuna para EA de UBI para inmunogenicidad funcional

Se usaron el ensayo de neurotoxicidad usando la línea celular de feocromocitoma de rata, PC-12, y disoluciones envejecidas del péptido A β ₁₋₄₀ caracterizadas por ser tóxicas para evaluar la eficacia funcional de la respuesta de anticuerpos a la vacuna para EA de UBI. Se probó la disolución envejecida de péptido A β ₁₋₄₀ para toxicidad en células PC-12 siguiendo una pre-incubación de una hora en presencia de sueros anti-A β de cobaya o babuino de los protocolos de inmunización de animales. Se probaron los sueros anti-A β a diluciones 1:30 y 1:90. Los resultados finales se presentaron como el porcentaje de inhibición de la agregación de fibrillas de A β ₁₋₄₀ y el porcentaje de protección de células PC-12 de la citotoxicidad mediada por fibrillas de A β ₁₋₄₀. Se incluyeron los sueros preinmunes desde la semana 0 de ambos experimentos de inmunización como controles. Los sueros de cobaya inmunes y los sueros de babuino de las semanas 5 y 8, ambos a las diluciones de 1:30 y 1:90, proporcionaron una inhibición significativa (50 a 70 % para los sueros de cobaya de sangrados recogidos en tanto las semanas 5 como 8 a tanto las diluciones 1:30 como 1:90, respectivamente) cuando se compararon con el 5 a 10 % de inhibición de fondo para los sueros preinmunes a diluciones correspondientes; y (75 y 50 % para los sueros de babuino para sangrados recogidos en tanto las semanas 5 como 8 a las diluciones 1:30 y 1:90, respectivamente) cuando se compararon con el 15 % de inhibición de fondo para los sueros preinmunes de babuino en el ensayo de inhibición de fibrillogénesis. Similarmente, se encontró que la protección de células PC-12 de la toxicidad mediada por A β ₁₋₄₀ en el intervalo de 60 a 80 % para estas condiciones, en comparación con los resultados de fondo obtenidos de los sueros preinmunes de tanto las cobayas como los babuinos. Estos resultados establecen actividad de neutralización funcional contra el péptido A β ₁₋₄₀ tóxico para los anticuerpos provocados por la inmunización con inmunógenos de péptidos de amiloide- β UBITH®.

Ejemplo 13

EFFECTOS DE LA VACUNA PARA EA DE UBI EN UN MODO PREVENTIVO SOBRE LA MORFOLOGÍA CEREBRAL Y CONCENTRACIÓN DE PÉPTIDO AMILOIDE-B (AB₁₋₄₂) EN MUESTRAS DE CEREBRO DE

RATONES TRANSGÉNICOS JÓVENES QUE EXPRESAN EN EXCESO hAPP751

Los presentes inventores evaluaron los efectos de la vacuna para EA de UBI en un modo preventivo sobre la morfología cerebral y la concentración de péptido amiloide- β ($A\beta_{1-42}$) en muestras de cerebro de ratones transgénicos (tg+) jóvenes que expresan en exceso hAPP751 con las mutaciones Swedish y London y en sus compañeros de camada no transgénicos (ntg) (Rockenstein EM, et al., 1995 y 2001).

Se inmunizaron ratones transgénicos (tg+) jóvenes con la vacuna para EA de UBI a ~14 semanas de edad en un modo de prevención. Cuando se tiñeron inmunohistoquímicamente tejido cerebrales con anticuerpos anti- $A\beta_{1-42}$ para la determinación de placas de amiloide, los resultados para estos ratones tg+ jóvenes sensibles mostraron que se redujo la carga de placas. Cuando se extrajeron bioquímicamente los tejidos cerebrales de ratones tg+ jóvenes vacunados y se evaluaron para niveles de $A\beta_{1-42}$ por ensayo cuantitativo, los resultados de los ratones respondedores tg+ jóvenes indicaron una reducción en la deposición de $A\beta$. Ambos de estos parámetros indican que la reducción de la carga de $A\beta_{1-42}$ se correlaciona con la respuesta de los anticuerpos a la vacuna para EA de UBI.

Además, las determinaciones del porcentaje de activación celular de la microglía relativa usando anticuerpo anti-CD11b y de infiltración de linfocitos T usando anticuerpo anti-CD3 no revelaron pruebas de elevada activación celular inmune en los cerebros de los animales tg+ jóvenes tratados con vacuna para EA cuando se comparó con los animales de control tg+ no tratados.

a. Fin global:

Evaluar los efectos de las vacunaciones intramusculares durante un periodo de 12 a 16 semanas con la vacuna inmunoterapéutica para EA de UBI sobre la deposición de amiloide cerebral y la carga de placas cerebrales, así como los niveles de péptido de amiloide- β ($A\beta_{1-42}$) humano en plasma.

Los animales transgénicos expresan constitutivamente en exceso proteína precursora del amiloide humana (hAPP) con las mutaciones London (717) y Swedish (670/671) bajo el control regulador del promotor Thy-1 murino (Rockenstein EM, et al., 1995, y 2001). La deposición de $A\beta_{1-42}$ ocurre ya a los 3 a 4 meses de edad con la aparición de placas maduras en la corteza frontal y a los 5 a 7 meses de edad la formación de placas se extiende al hipocampo, tálamo y áreas de proyecciones corticales de la corriente olfativa en los ratones tg+ hAPP751.

b. Resumen del protocolo para el modo de prevención

Se seleccionaron los ratones transgénicos (tg+) hAPP751 y sus compañeros de camada no transgénicos (ntg) (14 + 2 semanas) para evaluar los efectos de la vacuna para EA de UBI sobre la deposición de $A\beta$ cerebral, y carga de placas de $A\beta$ cerebral. Se separaron un total de 33 ratones tg+ y 10 ratones ntg en 4 grupos: ratones de control tg+ con placebo (n = 10) se inyectaron con el adyuvante solo; ratones tg+ experimentales (n = 13) se inyectaron con la vacuna para EA de UBI (90 μ g por dosis de 150 μ l); ratones de control tg+ no tratados (n = 10); y ratones de control ntg no tratados (n = 10). Se administraron un total de tres dosis en las semanas 0, 3, 12 y se administró una dosis adicional en la semana 16. En la semana 25,5, todos los ratones se monitorizaron para el aprendizaje espacial por la prueba del laberinto de agua de Morris. Los ratones se siguieron durante 4 semanas adicionales y luego se sacrificaron.

c. Determinación del título de anticuerpos anti- $A\beta_{1-28}$

Todos los ratones tg+ y ntg se sangraron en las semanas 0, 3, 6, 9, 12, 16, 19, 22 y 29. Se separó el suero para la determinación de títulos de anticuerpos anti- $A\beta_{1-28}$ usando el ELISA de $A\beta_{1-28}$. Ninguno de los ratones tg+ tratados con placebo y ratones tg+ no tratados tuvo títulos de anticuerpos anti- $A\beta_{1-28}$ detectables. Sin embargo, los ratones tg+ jóvenes que recibieron al menos dos inyecciones de la vacuna para EA de UBI tuvieron títulos de anticuerpos detectables.

d. Morfología cerebral y análisis de deposición de amiloide y carga de placas

Al final del estudio en vida, en el sacrificio, los ratones se perfundieron transcárdicamente con solución salina fisiológica (0,9 %), se extirparon rápidamente los cerebros, se hemiseccionaron y se prepararon para el análisis posterior. Se congelaron los hemisferios izquierdos y después se analizaron como se describe en la **Sección e** a continuación. Se fijaron por inmersión los hemisferios derechos en 4 % de paraformaldehído nuevo en PBS, pH 7,4, durante una hora. Entonces se transfirieron los hemisferios a una disolución al 15 % de sacarosa para crioprotección. Al día siguiente, los cerebros se congelaron sobre nieve carbónica y se guardaron a -80 °C hasta que se usaron para investigaciones histológicas. Se tiñeron las secciones de criostato (10 nm de espesor) con H&E, se registraron y se evaluaron para la integridad de la capa neuronal y morfología macroscópica. Se evaluaron secciones de tejido criocortadas usando anticuerpo monoclonal 4G8 (anti- $A\beta_{17-24}$) para determinar la deposición de $A\beta$ y la carga de placas en la corteza y el hipocampo. Se cuantificaron el número de placas y el área cubierta por las placas y el valor medio de nueve rebanadas de tejido de 5 capas diferentes a través del cerebro sagital de cada animal formó el valor estadísticamente relevante para un animal. Se evaluaron siete ratones tg+ en el grupo tratado

con vacuna para EA de UBI y siete ratones tg+ en el grupo de control no tratado. Los resultados se expresan como porcentaje de la carga de placas de $A\beta_{1-28}$ de los animales tratados con la vacuna para EA de UBI ($n = 7$) frente a los no tratados ($n = 7$) (**Figuras 10A, 10B**) y representan la carga de placas relativa promedio detectada en 9 secciones de tejido por inmunohistoquímica. Una comparación de los ratones tg+ que responden a la vacuna para EA de UBI frente a los animales sin tratar también está incluida en la corteza cerebral (0,22 % frente a 0,32 %) y en el hipocampo (0,20 % frente a 0,29 %); la carga de placas media reducida se indica en los animales tratados con vacuna altamente sensibles.

e. Determinación de $A\beta_{1-42}$ por fraccionamiento bioquímico de tejido cerebral

Se sacrificaron los animales y se prepararon los cerebros como se describen en la siguiente sección. Se congeló el hemisferio izquierdo del cerebro por separado y después se evaluaron las fracciones solubles de cuatro extracciones de cerebro para los niveles de péptido $A\beta_{1-42}$ usando kits de ELISA de $A\beta_{1-42}$ de alta sensibilidad para la detección de antígenos fabricados por The GENETICS Company, Suiza; se determinaron los niveles de $A\beta_{1-42}$ en comparación con la norma proporcionada por el fabricante. Los resultados obtenidos en las cuatro fracciones de cerebro se dan como ng/g de cerebro húmedo. Se extrajo el hemisferio izquierdo del cerebro (incluyendo el *bulbus olfactorius*) de cada animal con solución salina tamponada con TRIS (TBS), detergente Triton X-100, detergente SDS y ácido fórmico (FA) para la caracterización y evaluación de $A\beta_{1-42}$ y las fracciones se probaron por duplicado. Brevemente, el extracto de TBS contiene la fracción de $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ soluble en agua del tejido cerebral. Para disolver los restantes péptidos de beta amiloide, son necesarios detergentes y ácidos. Triton X-100 es un derivado de oligo-etilenglicol con dos propiedades; el resto de iso-octilo con el anillo de benceno destruye las fuerzas apolares de van der Waals y los restos -O-CH₂-CH₂- repetidos desintegran los enlaces de hidrógeno. SDS tienen un efecto bilateral similar, pero es más fuerte y altera toda la estructura secundaria; el péptido $A\beta$ se volverá lineal y se estirará la cadena peptídica. El ácido fórmico es el disolvente más fuerte y rompe principalmente los enlaces de hidrógeno. Se puede asumir que TBS solubiliza las estructuras oligoméricas. Triton solubiliza polímeros más pequeños, como protofibrillas. SDS rompe las estructuras restantes completas y la proporción restante que comprende fibrillas insolubles fuertemente complejadas se puede separar en FA, principalmente como monómeros. Por tanto, para evaluar el estado de polimerización de beta amiloide y la eficacia de un compuesto de prueba anti-amiloidogénico, se investigan las cuatro fracciones.

El ELISA cuantitativo de $A\beta$ y las extracciones bioquímicas prueban si la respuesta de anticuerpos anti- $A\beta$ de los ratones tg+ respondedores tratados con vacuna (la vacuna para EA de UBI) está asociada con una carga de $A\beta$ reducida cuando se compara con los ratones tg+ no tratados. Cabe destacar los reducidos niveles globales de $A\beta_{1-42}$ en los ratones tg+ que responden a la vacuna para EA de UBI cuando los niveles de $A\beta_{1-42}$ en cada una de las cuatro extracciones bioquímicas de tejido cerebral se comparan con los resultados de los animales de control tg+ no tratados (**Figuras 11A, 11B**).

f. Determinación de la activación celular de la microglía

Se evaluaron secciones de tejido criocortadas para las células activadas de la microglía usando el anticuerpo CD11b; se evaluó el tamaño de objeto medio como un cociente del área a través del número de objetos en cada rebanada como una medida media de la agrupación de células de la microglía; el valor medio de 9 rebanadas de 5 capas diferentes a través del cerebro sagital de cada animal formó el valor estadísticamente relevante para un animal.

Los resultados de los ratones tg+ tratados con vacuna ($n = 7$) frente a ratones tg+ no tratados ($n = 7$), expresados como el porcentaje de áreas de células CD11b-positivas teñidas en la corteza cerebral y el hipocampo, mostraron que los animales tratados tenían menor porcentaje promedio de áreas teñidas cuando se compararon con los animales de control tg+ no tratados. Estos resultados indican que los animales tratados con vacuna no muestran elevados números de células activadas de la microglía cuando se comparan con los ratones transgénicos no tratados.

g. Determinación de la infiltración de linfocitos T en tejido cerebral

Se evaluaron secciones de tejido criocortadas para detectar el número de linfocitos T en la corteza cerebral, el hipocampo y dentro de vasos sanguíneos y se contaron exclusivamente las células. El valor medio de nueve rebanadas de tejido de 5 capas diferentes a través del cerebro sagital de cada animal formó el valor estadísticamente relevante para un animal. Los resultados de los ratones tg+ tratados con vacuna ($n = 7$) frente a ratones de control tg+ no tratados ($n = 7$), expresados como el número de linfocitos T CD3-positivos teñidos en corteza cerebral e hipocampo y el número de linfocitos T teñidos dentro de los vasos sanguíneos, indican que los animales tratados con vacuna muestran una ligera disminución en los linfocitos T inmunoteñidos contados en la corteza cerebral, el hipocampo y los vasos sanguíneos cuando se comparan con los animales tg+ de control no tratados.

h. Conclusiones

Se inyectaron los ratones transgénicos hAPP751 3 o 4 veces por vía intramuscular durante un periodo de 16 semanas con la vacuna para EA de UBI o una vacuna de placebo. Los animales tuvieron buena tolerabilidad global a la vacuna para EA de UBI, considerando especialmente la alta concentración de las construcciones de inmunógenos de péptidos A β ₁₋₁₄ de UBI administradas por dosis (90 µg/150 µl) a estos animales. En los respondedores, se observaron carga de placas de A β reducida y niveles de A β ₁₋₄₂ reducidos en las 4 extracciones de tejido cerebral de estos animales. También se mostraron deposición y placas de A β reducida por inmunohistoquímica. No hubo evidencia de activación celular de la microglía o infiltración de linfocitos T en los cerebros de ratones tg+ hAPP751 tratados con vacuna.

Ejemplo 14

MAPEO DE EPÍTOPES DE RESPUESTA DE ANTICUERPOS A VACUNA PARA EA DE UBI PARA SEGURIDAD

Se evaluaron pruebas de ELISA usando placas recubiertas con péptidos A β ₁₋₁₄ (SEQ ID NO: 4), A β ₁₋₂₈ (SEQ ID NO: 3), A β ₁₇₋₄₂ (SEQ ID NO: 67), Th de MvF5 (SEQ ID NO: 46), Th de HBsAg3 (SEQ ID NO: 47) como los antígenos de fase sólida para la especificidad de la respuesta de anticuerpos a la vacuna para EA de UBI en los sueros de las cobayas y babuinos inmunizados. Se detectaron anticuerpos anti-A β de alto título generados por la vacuna con los antígenos A β ₁₋₁₄ y A β ₁₋₂₈ (**Tabla 1**); sin embargo, existió la preocupación de que el péptido A β ₁₋₂₈ también estuviera detectando anticuerpos adicionales debido a la "extensión de epítopes de linfocitos B" más allá del aminoácido 14, una fuente de reactividades cruzadas posiblemente adversas.

Para tratar esta preocupación, también se probaron antisueros hiperinmunes de cobaya y antisueros hiperinmunes de babuino con péptido A β ₁₇₋₄₂ por ELISA. Los títulos de ELISA indican que la diseminación de epítopes no se detectó en las muestras hiperinmunes probadas. Los sueros hiperinmunes mostraron una unión mejorada al péptido A β ₁₋₂₈, pero no reaccionaron con A β ₁₇₋₄₂. Los sueros hiperinmunes no reaccionaron ni con los dominios del péptido Th de MvF5 (SEQ ID NO: 46) ni Th de HBsAg3 (SEQ ID NO: 47). En un método de mapeo fino de epítopes para localizar el (los) sitio(s) de unión del anticuerpo predominante en restos específicos dentro de la región diana, se sintetizaron 24 péptidos 10-meros solapantes alrededor del resto ácido aspártico "D" del extremo N de la secuencia de péptidos de A β ₁₋₁₄ y la región adyacente de la proteína precursora del péptido amiloide- β humano (hAPP), para cubrir la longitud entera de A β ₁₋₁₄ más las posiciones de hAPP adyacentes (**Tabla 9**). Estos péptidos anidados se usaron individualmente para recubrir pocillos de microtitulación como inmunoabsorbentes de fase sólida para pruebas de ELISA. Se recubrió la placa de ELISA de control positivo con A β ₁₋₂₈. Se probaron para la unión de anticuerpos con los sueros de los cuatro babuinos inmunizados, desde las semanas 0, 10, 84 y 111. Se diluyeron sucesivamente los sueros de babuino y se ensayaron en placas recubiertas con un péptido 10-mero a 5 µg/ml. Como era de esperar, el péptido (DAEFRHDSGY) con SEQ ID NO: 6 que representa el 10-mero del extremo N de A β ₁₋₁₄ (SEQ ID NO: 4) reaccionó fuertemente con sueros inmunes de los cuatro babuinos. "D" en la posición 1 de A β ₁₋₁₄ fue clave para la especificidad del anticuerpo. La delección de "D" o la modificación de la posición 1 a "E" (ácido glutámico) produjo la unión intensamente reducida a los péptidos 10-meros, que indica la alta especificidad de los anticuerpos de babuino por A β ₁₋₁₀ (SEQ ID NO: 6) y la baja probabilidad de la aparición de sitios de reconocimiento de anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con las construcciones de inmunógenos de péptidos A β en cualquier parte sobre el péptido A β ₁₋₄₂ o su precursor. Además, el mapeo de epítopes para especificidad fina reconocido por los sueros inmunes se confirmó además por el ELISA de inhibición competitivo como se muestra en la **Tabla 10**. En resumen, estos hallazgos de epítopes de anticuerpos demostraron que los anticuerpos inducidos por el candidato a vacuna inmunoterapéutica para EA de UBI fueron específicamente dirigidos al dominio del extremo N de A β , no a sitios más allá del resto 14 ni a los dominios Th de MvF5 ni Th de HBsAg3.

Ejemplo 15

RESPUESTA DE ANTICUERPOS Y NIVELES DE AB1-40 EN SUERO Y LCR DE MACACOS CANGREJEROS QUE RECIBIERON MÚLTIPLES INMUNIZACIONES CON VACUNA PARA EA DE UBI

La cinética de la respuesta a la vacuna mostró que cuatro de los seis macacos en el Grupo 2 de baja dosis (150 µg por 0,25 ml) y los seis macacos en el Grupo 3 de alta dosis (750 µg por 1,25 ml) generaron anticuerpo contra las construcciones de inmunógenos de péptidos A β ₁₋₁₄ que reaccionan de forma cruzada con A β ₁₋₄₂ después de la primera inmunización.

Como se muestra en la **Tabla 11**, tanto los animales con dosis baja como con dosis alta sostuvieron un anticuerpo de alto título durante la duración del estudio (hasta la semana 27). La especificidad fina de la respuesta de anticuerpos mediante mapeo de epítopes (**Tabla 12**) con sueros de cuatro macacos por grupo, inmunizados tres veces (9 WPI) y cinco veces (15 WPI) con o dosis alta (750 µg) o baja (150 µg) de la vacuna para EA de UBI, indicó una fuerte especificidad por el péptido A β ₁₋₁₀ del extremo N (DAEFRHDSGY) (SEQ ID NO: 6) en los cuatro animales por grupo, similar a la observada con sueros inmunes del estudio anterior en babuinos (**Tabla 9**). A diferencia del patrón de reactividad observado en babuinos, se observaron algunas reactividades modestas con los cuatro animales para péptidos con SEQ ID NOs: 20 a 22 que rodeaban los restos RHD en las posiciones 4, 5 y 6 del extremo N del péptido A β ₁₋₄₂. No se indican reactividades adicionales con otros péptidos 10-meros fuera de los cuatro mencionados anteriormente para ninguna de las muestras de macaco probadas.

Se determinaron los efectos de la vacuna para EA de UBI sobre los niveles de A β ₁₋₄₀ en sueros y LCR usando kits de inmunoensayo comercialmente disponibles. Como se muestra en la **Tabla 13**, la concentración de A β ₁₋₄₀ después de la vacunación se determinó en suero a las 0, 15, 21 y 25,5 semanas y en LCR en el momento del sacrificio (semana 15 + 1 día o semana 27). Los niveles de A β ₁₋₄₀ en suero fueron elevados en macacos que recibieron la vacuna para EA de UBI, pero se observaron niveles normales en animales que recibieron la vacuna de placebo. A diferencia, los niveles de A β ₁₋₄₀ mantuvieron un estado estacionario en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de macacos que recibieron o la vacuna de placebo o para EA de UBI. Estos resultados respaldan la "Hipótesis del sumidero periférico" como el modo de acción para anticuerpos anti-A β por el cual los anticuerpos promueven la salida de péptidos A β del cerebro al sistema circulatorio periférico.

Ejemplo 16

RESPUESTA INMUNITARIA CELULAR DE MACACOS CANGREJEROS QUE RECIBIERON MÚLTIPLES INMUNIZACIONES CON VACUNA PARA EA DE UBI

Se aislaron muestras de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de sangre completa recogida a las 15, 21 y 25,5 semanas y luego se cultivaron en presencia de diversos péptidos A β . Como se muestra en la **Tabla 14**, no se observaron respuestas de proliferación por linfocitos cuando se añadió el péptido A β ₁₋₁₄ a medio de cultivo. Sin embargo, se observaron respuestas de proliferación positivas cuando el péptido A β ₁₋₄₂ o A β ₁₇₋₄₂ (SEQ ID NO: 67) se añadió a algunos cultivos de CMSPs.

También se probaron las muestras de CMSPs recogidas a las 15, 21 y 25,5 semanas para la secreción de citocinas en presencia de péptidos A β o el mitógeno PHA. Como se muestra en la **Tabla 15**, tres citocinas (IL-2, IL-6, TNF- α) mostraron secreción detectable en respuesta al péptido A β ₁₋₄₂ de longitud completa, pero no al péptido A β ₁₋₁₄; no se detectó la regulación por incremento de la secreción de citocinas en las muestras tratadas con la vacuna para EA de UBI cuando se comparó con las muestra de vacuna de placebo. Otras tres citocinas (IL-10, IL-13, IFN- γ) probadas en presencia de los péptidos A β estuvieron por debajo del límite de detección del ensayo en todos los cultivos de CMSPs.

Los macacos se inmunizaron con la vacuna para EA de UBI que solo tenía inmunógenos de péptidos A β ₁₋₁₄ del extremo N con epítopes T cooperadores extraños, sin el dominio del péptido A β ₁₇₋₄₂, que indica que los resultados de proliferación positivos indicados en los cultivos de CMSPs en presencia de péptido A β ₁₋₄₂ no estuvieron relacionados con la respuesta a la vacuna para EA de UBI, sino que fueron una respuesta de fondo a A β nativo.

Estos resultados respaldan la seguridad de la vacuna para EA de UBI que solo tiene A β ₁₋₁₄ y epítopes T cooperadores extraños, que muestran que no genera anti-autorrespuestas inmunitarias celulares posiblemente inflamatorias a péptidos A β en los macacos normales. A diferencia, los acontecimientos adversos asociados a la encefalitis en los estudios de ensayo clínico de la vacuna AN-1792 se atribuyeron en parte a la inclusión de epítopes de linfocitos T dentro del inmunógeno de A β ₁₋₄₂ fibrilar/agregado de esa vacuna.

Ejemplo 17

COMPARACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE VACUNA PARA EA DE UBI A DIFERENTES NIVELES EN COBAYAS, MACACOS Y BABUINOS

Después de extensas pruebas de las diversas construcciones de inmunógenos de péptidos A β para su idoneidad como componentes clave de la vacuna de EA, se seleccionaron construcciones peptídicas con SEQ ID NOs: 64 y 65 para idear y diseñar formulaciones de vacuna. Se probó ampliamente la formulación de vacuna seleccionada que comprendía las dos construcciones de inmunógenos de péptidos que forman complejos inmunoestimulantes con oligómeros de CpG y complementados con sales minerales de Adjuvophos (la vacuna para EA de UBI), como se describe en los **Ejemplos 8 a 15**, para calibrar su inmunogenicidad en múltiples especies (cobayas, macacos y babuinos) y pautas posológicas en la preparación para su uso en ensayos clínicos. La **Tabla 16** resume la dosis de péptidos frente a la tasa de respondedores (número de animales con títulos positivos / número total de animales probados) después de una o más dosis, y peso corporal de cada especie para la evaluación de los programas de dosis de la vacuna para EA de UBI. A partir del análisis, es preferible establecer el nivel de dosis en más de 100 μ g, basado en datos de todas las especies en cuestión, para llegar a una tasa de respuesta respetable después de una dosis única que, tras el refuerzo, permitiría una tasa de respuesta alta o casi plena. Se seleccionaron los 300 μ g por dosis de 0,5 ml de la vacuna para EA de UBI para estudios en sujetos humanos. En los estudios clínicos de fase I, los individuos se inmunizaron a las 0, 4, 12 semanas. Cuatro semanas después de una dosis, 2 de los 19 sujetos reclutados tuvieron títulos positivos de anticuerpos anti-A β ; cuatro semanas después de dos dosis a las 8 semanas, 17 de los 19 sujetos dieron positivo; y cuatro semanas después de las tres dosis a las 16 semanas, los 19 sujetos dieron positivo y siguieron dando positivo hasta el fin del estudio de fase I en las semanas 24-26.

Ejemplo 18

ENSAYO CLÍNICO DE FASE I SUGIERE EL EFECTO TERAPÉUTICO POR LA VACUNA PARA EA DE UBI (UB-311)

El péptido A β es una diana terapéutica importante en la EA basada en la evidencia patológica, bioquímica y genética que respalda su función en el proceso de enfermedad. El objetivo de una inmunoterapia activa de A β , tal como la vacuna para EA de UBI (UB-311), es estimular una respuesta inmunitaria para generar anticuerpos anti-A β robustos que capturen el exceso de péptidos A β de la circulación y prevengan o ralenticen el deterioro cognitivo.

Se realizó el ensayo clínico de fase I de UB-311 titulado "Un estudio de etiqueta abierta de fase I para evaluar la seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad de la vacuna inmunoterapéutica para EA de UBI (UB-311) en pacientes con enfermedad de Alzheimer de leve a moderada" basándose en el protocolo clínico final autorizado. Se reclutaron un total de 19 pacientes con EA de leve a moderada. Cada paciente recibió tres inyecciones intramusculares del fármaco del estudio (UB-311) en las semanas 0, 4 y 12. La duración total del estudio fue 24-26 semanas.

Además de la evaluación de los datos de seguridad, tolerabilidad, inmunogenicidad y eficacia recogidos del ensayo clínico de fase I UB-311, se describen los análisis de investigación del epítipo de unión al anticuerpo, niveles de péptidos A β y funciones inmunes de los sujetos del estudio sujetos para fines exploratorios. Los resultados de la sangre recogida antes y después de la inmunización con UB-311 en las semanas 0, 4, 8, 12, 16 y 24/26 para el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y muestras de suero/plasma para el análisis serológico y de inmunogenicidad incluyen (1) títulos de anticuerpos anti-A β , (2) mapeo de epítopes, (3) niveles de A β_{1-40} en plasma y (4) proliferación de linfocitos *in vitro* y análisis de citocinas.

Se reclutaron en el estudio un total de 19 sujetos con enfermedad de Alzheimer (EA) de leve a moderada y recibieron tres inyecciones intramusculares de la vacuna inmunoterapéutica para EA de UBI (UB-311) en las semanas 0, 4 y 12.

UB-311 demostró que cumplía los perfiles de seguridad y tolerabilidad cuando se administraba a pacientes con EA de leve a moderada clínicamente documentada. La incidencia de acontecimientos adversos (AEs), que estuvieron definitivamente, probablemente o posiblemente relacionados con UB-311, se diseñó como un criterio principal de valoración para evaluar la seguridad del tratamiento con UB-311. Durante el periodo del estudio, se informaron 16 episodios de AEs relacionados con el tratamiento en 9 de los 19 sujetos. Entre los AEs relacionados con el tratamiento estuvieron reacciones leves del sitio de inyección (5 sujetos), agitación moderada (2 sujetos) y un leve aumento de la tasa de sedimentación de glóbulos rojos (2 sujetos). Todos los AEs relacionados con el tratamiento se clasificaron como grado 1 (leve) o 2 (moderado) de intensidad y no se tomó ninguna acción para estos episodios. Un sujeto con antecedentes personales de espondilitis anquilosante y diabetes mellitus informó un acontecimiento adverso grave (SAE) de herpes zóster durante el periodo de seguimiento. El sujeto fue inmediatamente hospitalizado al ocurrir el acontecimiento y se le proporcionaron tratamientos apropiados. El SAE se evaluó como de causalidad poco probable y el sujeto recibió el alta dos semanas después debido a la mejoría de su afección.

Se evaluó la tolerabilidad de UB-311. Los 19 sujetos completaron el tratamiento y ninguno se retiró antes del estudio a pesar de las manifestaciones de AE. Así, la tolerabilidad fue del 100 %.

Ejemplo 19**LA ADMINISTRACIÓN DE LA VACUNA UB-311 GENERÓ ANTICUERPOS CON ESPECIFICIDAD POR EL EXTREMO N DEL DOMINIO DE AB₁₋₁₄ EN TODOS LOS SUJETOS**

Como se muestra en la **Figura 12**, se midió el cambio en los niveles de anticuerpos anti-A β_{1-14} en las semanas 0, 4, 8, 12, 16 y 24-26 para evaluar la inmunogenicidad de la vacuna UB-311. El valor medio de los niveles de anticuerpos anti-A β_{1-14} transformado en log₁₀ para todos los sujetos en la semana 0 (pre-tratamiento) fue 1,14, aumentó ligeramente hasta 1,21 en la semana 4, aumentó notablemente hasta 2,00 y 1,91 en las semanas 8 y 12, alcanzó el máximo a 2,70 en la semana 16 (4 semanas después de la tercera inmunización) y disminuyó hasta 2,28 en las semanas 24-26.

Los títulos de anticuerpos se transformaron en log₁₀ y se usaron sus valores en la semana 0 como el nivel inicial. Se observó una tendencia comparable para los tres títulos anticuerpos específicos. El valor medio de cambio de los títulos de anticuerpos aumentó ligeramente en la semana 4, excepto para los anticuerpos de monómeros anti-A β_{1-42} , en el momento cuando los sujetos ya habían recibido la primera dosis de UB-311 en la semana 0, pero antes de la segunda dosis. Los títulos de anticuerpos también aumentaron en la semana 8 después de que se administrara la segunda dosis a los sujetos en la semana 4. Después de la administración de la tercera dosis en la semana 12, se detectó en la semana 16 el cambio medio pico de los títulos de anticuerpos.

Ejemplo 20**LAS PRUEBAS NEUROLÓGICAS, COGNITIVAS Y FUNCIONALES EVALÚAN LA EFICACIA DE LA VACUNA UB-311 EN ENFERMEDAD DE ALZHEIMER DE LEVE A MODERADA**

Se evaluó la eficacia de UB-311 mediante la medición de los cambios de la puntuación ADAS-Cog, puntuación MMSE y ADCS-CGIC en 19 pacientes. Se evaluaron la puntuación ADAS-Cog y ADCS-CGIC en la semana 0 (V2), semana 16 (V7) y semanas 24-26. Se midió la puntuación MMSE en la preselección (V1), semana 16 y semanas 24-26. Entre los sujetos, se observaron aumentos de 1,42 y 0,79 en la puntuación ADAS-Cog desde la semana 0 hasta la semana 16 y desde la semana 16 hasta las semanas 24-26, respectivamente. La puntuación ADAS-Cog media en el nivel inicial fue 26,26 entre los sujetos, aumentó hasta 27,68 en la semana 16 y aumentó ligeramente hasta 28,47 en las semanas 24-26. Además, se encontraron reducciones de 0,32 y 0,79 en la puntuación MMSE desde la visita de preselección hasta la semana 16 y desde la semana 16 hasta las semanas 24-26 (**Figura 13**).

La puntuación media de MMSE de los sujetos en la visita de selección fue 19,16. La puntuación disminuyó hasta 18,84 en la semana 16, y hasta 18,05 en las semanas 24-26, la última visita. En particular, a pesar de las puntuaciones medias de las dos escalas alteradas, la distribución de las puntuaciones para sujetos individuales estuvo bastante dispersa y, por tanto, pareció que las tendencias de las dos escalas fue estable.

En cuanto a la clasificación ADCS-CGOC, más del 35 % de los sujetos demostraron mejorías en la semana 16, 4 semanas después del último tratamiento (tercera dosis). Estas tasas de mejoría disminuyeron hasta no más de 18 % en la población de pacientes después de un cese más largo del tratamiento en las semanas 24-26. En la semana 16, ligeramente menos de la mitad de los sujetos no tuvieron cambio en ADCS-CGIC, y esta categoría de sujetos aumentó ligeramente hasta más del 50 % de los sujetos totales después de otro periodo de seguimiento sin tratamiento de 8 a 10 semanas después de la semana 16. Comparando la proporción de sujetos con mejoría frente a empeoramiento, se mostraron resultados positivos en la semana 16 en favor del producto en fase de investigación, pero no en la semana 24-26 (12 semanas después de la última dosis de vacuna).

En los análisis de subgrupo, los resultados demostraron que sujetos ancianos con EA leve (edad > 60 años y MMSE basal > 20) tuvieron una mejor respuesta a la vacuna UB-311 mostrando (1) una disminución de 3 puntos en ADAS-Cog media (en comparación con un aumento de 3,81 puntos en el grupo de placebo del ensayo de fase II de tarenflurbil durante un periodo de 12 meses), (2) una puntuación de MMSE promedio estable (en comparación con una disminución de 2,04 puntos en el grupo de placebo del ensayo de fase II de tarenflurbil durante un periodo de 12 meses), como se muestra en la **Figura 14**, y (3) una mayor proporción con mejoría y sin cambio de tasa en ADCS-CGIC. Dicha mejoría en tres de las tres puntuaciones de cognición en pacientes con EA leve con edad >60 años nunca ha sido informada y se recibe con gran entusiasmo.

Ejemplo 21

ENZIMOINMUNOANÁLISIS (ELISA) PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS HUMANOS CONTRA MONÓMEROS DE A β ₁₋₂₈, MONÓMEROS DE A β ₁₋₄₂ U OLIGÓMEROS DE A β ₁₋₄₂

El estudio de la enfermedad de Alzheimer ha demostrado que agregados de A β y oligómeros derivados de A β desempeñan una función central en la patogénesis de la EA. Se ha informado de la unión de oligómeros de A β a neuronas que expresan las subunidades NR1 y NR2B del receptor de glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (NMDA-R) por Lacor PN en Current Genomics 2007; 8:486-508. Cuando los oligómeros de A β se unen a NR1 y NR2B en células neuronales hipocámpicas, esta unión ligando-receptor da como resultado una disminución significativa en el número de terminales sinápticas, que está asociado con los déficits de memoria y cognitivos y demencia. Recientemente, resultados de estudios *in vitro* en células y ensayos clínicos indicaron que los anticuerpos de oligómeros anti-A β son capaces de bloquear esta unión y proteger las neuronas de la toxicidad de oligómeros de A β . La vacuna para EA de UBI (UB-311) contiene dos inmunógenos peptídicos, incluyendo cada péptido un péptido corto del extremo N A β (A β ₁₋₁₄) sintéticamente enlazado a un epítopo de péptidos del extremo N sesgado hacia Th2 diferente. Para evaluar la inmunogenicidad de la respuesta a la vacuna para EA de UBI, se desarrolló una prueba de enzimoinmunoanálisis (ELISA) de anticuerpos anti-A β para la detección *in vitro* de anticuerpos contra monómeros de A β ₁₋₂₈, monómeros de A β ₁₋₄₂ y oligómeros de A β ₁₋₄₂.

Los monómeros de A β ₁₋₂₈, monómeros de A β ₁₋₄₂ u oligómeros de A β ₁₋₄₂ se recubrieron previamente sobre los pocillos de microplacas como antígenos inmóviles. Durante el transcurso del ensayo, la muestra de suero se diluyó sucesivamente 1:10 desde 1:100 hasta 1:100.000 y se añadió a las microplacas previamente recubiertas. Los anticuerpos de monómeros u oligómeros anti-A β ₁₋₂₈, anti-A β ₁₋₄₂, si están presentes, se unen a los antígenos inmóviles. Después de lavar los pocillos para retirar los anticuerpos no unidos y otros componentes del suero, se añadió una preparación normalizada de proteína recombinante A/G conjugada con peroxidasa de rábano picante a cada pocillo y se dejó que reaccionara con los anticuerpos unidos. Se retiró el conjugado no unido lavando los pocillos y se añadió a cada pocillo una disolución de sustrato que contenía 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno. Se desarrolló un color amarillo en proporción a la cantidad de anticuerpos específicos de A β presentes, si estaban presentes, en las muestras de suero probadas. Se terminó la reacción enzima-sustrato mediante la adición de una disolución diluida de ácido sulfúrico. Entonces se determinaron los cambios de color que ocurren en cada pocillo por medición espectrofotométrica de la absorbancia en un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm (A₄₅₀). Se usó el programa de cálculo de títulos de ELISA UBI® para calcular el título relativo de anticuerpos.

Se muestra que los oligómeros de A β son los más tóxicos para las neuronas en comparación con los monómeros de A β o placas de amiloide. El objetivo de la inmunoterapia activa es no solo inducir la producción de anticuerpos específicos para monómeros de A β , sino también para oligómeros de A β . Se analizaron muestras de suero recogidas de 19 pacientes con EA de leve a moderada en las semanas 0 (nivel), 4 y 12 antes de cada inyección de UB 311 y en las semanas 8, 16 y 24 para títulos de anticuerpos anti-A β . La **Figura 15** representa los títulos de anticuerpos de monómero anti-A β_{1-28} , monómero anti-A β_{1-42} y oligómero anti-A β_{1-42} en la visita de selección (V1/V2) y en la semana 16 (V7), cuatro semanas después de la última inmunización con UB-311 para cada uno de los 19 sujetos reclutados.

Ejemplo 22

MAPEO DE EPÍTOPES: ENZIMOINMUNOANÁLISIS (EIA) DE INHIBICIÓN DE LA UNIÓN COMPETITIVA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS HUMANOS CONTRA EL PÉPTIDO DEL EXTREMO N

Se usó mapeo de epítopes para identificar los sitios de unión o epítopes de anticuerpos anti-A β_{1-14} en secuencias de aminoácidos 10-meros solapantes lineales del péptido A β (entre los restos -9 y 24 en A β) por pruebas de ELISA. Se evaluaron muestras clínicas de suero de los 19 sujetos. Los resultados en la semana 16, después de 3 inmunizaciones en las semanas 0, 4 y 12, se muestran a continuación (**Figura 16**).

Se eligió el péptido A β_{1-28} sintético como antígeno inmóvil y se recubrió previamente a la concentración de 2 μ g/ml sobre los pocillos de microplacas. Antes del experimento, cada muestra de suero se diluyó a 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400 y se probó para determinar la dilución óptima. Se mezclaron las muestras de suero anti-A β óptimamente diluidas con péptidos 10-meros diseñados individualmente como un inmunosorbente de fase líquida. La mezcla se diluyó sucesivamente 1:5 con suero óptimo diluido antes de la transferencia a un placa previamente recubierta con A β_{1-28} . El suero anti-A β óptimamente diluido solo se usó como control. Durante el transcurso del ensayo, se unieron específicamente péptidos 10-meros al sitio de unión del anticuerpo predominante, e inhibieron competitivamente la unión del anticuerpo anti-A β y el antígeno inmóvil. Después de lavar los pocillos para retirar anticuerpos no unidos y otros componentes del suero, se añadió a cada pocillo una preparación normalizada de proteína recombinante A/G conjugada con peroxidasa de rábano picante y se dejó que reaccionara con anticuerpos unidos. Después de lavar los pocillos para retirar el conjugado no unido, se añadió a cada pocillo una disolución de sustrato que contenía peróxido de hidrógeno y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). Se desarrolló un color amarillo en proporción a la cantidad de anticuerpos específicos de A β presentes, si estaba alguno, en las muestras de suero probadas. Se terminó la reacción enzima-sustrato mediante la adición de una disolución diluida de ácido sulfúrico. Entonces se midieron espectrofotométricamente los cambios de color que ocurrieron en cada pocillo en un lector de microplacas a la longitud de onda de 450 nm (A_{450}) usando el programa IC₅₀ 5X (Molecular Devices). La unión de anticuerpos anti-A β y el antígeno inmóvil en el pocillo de control representó la máxima unión (100 %) y se usó la concentración inhibidora al 50 % (CI_{50}) de péptido 10-mero como una indicación de la especificidad del epítipo.

Ejemplo 23

EL EPÍTOPE PREDOMINANTE RECONOCIDO POR ANTICUERPOS EN MUESTRAS DE SUERO DE PACIENTES INMUNIZADOS CON UB-311 FUE ESPECÍFICO PARA EL PÉPTIDO AB₁₋₁₀

En un método de mapeo fino de epítopes para localizar los sitios de unión al anticuerpo predominantes en restos específicos dentro de la región diana (**Tabla 17**), se sintetizaron 24 péptidos 10-meros solapantes (SEQ ID NOs: 6, 8 a 30) a lo largo de la secuencia de péptidos A β_{1-14} (SEQ ID No 4) y la región adyacente de la proteína precursora del amiloide- β humana (hAPP), para cubrir la longitud entera de A β_{1-14} que empieza en el resto de ácido aspártico "D" del extremo N más las posiciones de hAPP contiguas (**Figura 16**). Se probaron las muestras de suero recogidas de los 19 sujetos antes de la inmunización y en la semana 16 después de recibir tres dosis de UB-311. Las muestras de pretratamiento estuvieron en los niveles basales de anticuerpos anti-A β (datos no mostrados). Como era de esperar, la respuesta predominante de anticuerpos en las 19 muestras para las que se generaron mapas de epítopes positivos se dirigió al extremo amino libre de A β (SEQ ID No 6), como se muestra en la **Figura 16** y la **Tabla 17**. Más específicamente, el péptido DAEFRHDSGY, que representa el 10-mero del extremo N de A β_{1-14} , reaccionó lo más fuertemente con sueros inmunizados de los 19 pacientes. Se detectaron respuestas adicionales de anticuerpos con débil reactividad por otros péptidos 10-meros de A β en 8 de los 19 sujetos. También se probaron las muestras de suero recogidas en las semanas 4, 8, 12 y 24-26 de algunos, pero no todos, los sujetos y mostraron resultados coherentes (datos no mostrados). En resumen, estos datos demuestran que la mayoría de los anticuerpos inducidos por UB-311 se dirigieron específicamente al dominio del extremo N de A β , y no a los sitios más allá del resto 14.

Ejemplo 24

EL PÉPTIDO AB₁₋₄₀ SE ELEVÓ EN PLASMA DESPUÉS DE TRES INMUNIZACIONES DE VACUNA PARA EA DE UBI (UB-311)

Actualmente, no se ha encontrado que el cambio en la concentración plasmática de A β_{1-40} (SEQ ID NO: 2), A β_{1-42}

(SEQ ID No: 1), o la relación $A\beta_{1-42}$: $A\beta_{1-40}$, esté significativamente asociada a la respuesta al tratamiento ya sea en el ámbito de ensayos clínicos de tratamientos modificadores de la enfermedad o en pacientes con EA tratados con inhibidores de la colinesterasa. Sin embargo, se han propuesto niveles de $A\beta$ en plasma como un posible biomarcador de EA.

En el estudio previo de los presentes inventores, los niveles de $A\beta_{1-40}$ en suero se elevaron en macacos que recibieron la vacuna para EA de UBI, pero se observaron niveles normales en animales que recibieron la vacuna de placebo. Estos resultados indicaron que la "Hipótesis del sumidero periférico" podría ser el modo de acción para los anticuerpos anti- $A\beta$. Este fenómeno también se observó en el presente estudio, aunque los títulos de anticuerpos anti- $A\beta$ fueron mucho más altos en los macacos después de seis inmunizaciones con UB-311 que los títulos de anticuerpos en sujetos humanos después de tres inmunizaciones. Como se muestra en la **Tabla 18**, se compararon los niveles plasmáticos de $A\beta_{1-40}$ de 12 casos emparejados con muestras plasmáticas de $A\beta_{1-40}$ probadas antes del tratamiento con UB-311 y en la semana 16 (cuatro semanas después de la tercera inmunización) con las concentraciones de anticuerpo contra $A\beta_{1-28}$ en suero en la semana 16. Todos los títulos de anticuerpos fueron negativos antes de la inmunización con UB-311. Ocho individuos con títulos de anticuerpos anti- $A\beta_{1-28}$ por encima de $\log_{10}$ 2,4 tuvieron elevados títulos de $A\beta_{1-40}$ después de que recibieran la vacuna para EA de UBI (UB-311); mientras que tres de los 4 individuos con niveles de anticuerpo inferiores a $\log_{10}$ 2,0 no se elevaron después del tratamiento. El aumento de niveles de $A\beta_{1-40}$ fue pequeño en la mayoría de los casos, con una excepción (Sujeto P109), que mostró un nivel de $A\beta_{1-40}$ en plasma inusualmente alto antes de la inmunización y un nivel significativamente más alto (1031,9 pg/ml) después de la inmunización. El motivo para $A\beta_{1-40}$ muy alto sigue sin estar claro. Ninguno de los sujetos tuvo niveles medibles del péptido $A\beta_{1-42}$ en el plasma.

Ejemplo 25

LA INMUNIZACIÓN CON UB-311 NO ESTIMULA LOS LINFOCITOS HUMANOS (CMSPS) EN PRESENCIA DE PÉPTIDOS AB_{1-14} O AB_{1-42}

La llegada de nuevas vacunas y el número cada vez mayor de informes muy publicitados que reivindican una conexión entre ciertas inmunizaciones y enfermedad autoinmunitaria han conducido a la preocupación pública sobre el riesgo de la inmunización. Se puede usar la proliferación de linfocitos y la producción de citocinas en respuesta a la estimulación de antígenos para evaluar si el sistema inmunitario se hiperactiva tras una vacunación, y qué vía(s), si las hay, están implicadas. El fin del presente estudio fue evaluar la seguridad del inmunógeno ($A\beta_{1-14}$) de UB-311 midiendo el índice de estimulación (IE) de la proliferación de linfocitos en ausencia o presencia de péptidos $A\beta$ o el mitógeno PHA como control positivo, así como la concentración de citocinas en linfocitos cultivados de pacientes con EA antes y después de tres inmunizaciones con UB 311 en la semana 16.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSPs) de pacientes con EA por centrifugación en gradiente en Ficoll-hypaque. Para la proliferación inducida por péptidos y la producción de citocinas, se cultivaron por triplicado células ($2,5 \times 10^5$ por pocillo) solas o con dominios de péptidos individuales añadidos (a una concentración final de 10 μ g/ml), que incluye $A\beta_{1-14}$ (SEQ ID NO: 4), $A\beta_{1-16}$ (SEQ ID NO: no incluida), $A\beta_{1-28}$ (SEQ ID NO: 3), $A\beta_{17-42}$ (SEQ IDN NO: no incluida), $A\beta_{1-42}$ (SEQ ID NO: 1) y un péptido 38-mero no relevante (p1412). Los cultivos se incubaron a 37 °C con 5 % de CO_2 durante 72 horas, y luego se retiraron 100 μ l de sobrenadante de cada pocillo y se congelaron a -70 °C para el análisis de citocinas. Se añadieron diez μ l de medio de cultivo que contenía 0,5 μ Ci de 3H -timidina (3H -TdR, Amersham, Cat N° TRK637) a cada pocillo y se incubaron durante 18 h, seguido por la detección de la incorporación de radioisótopos por recuento de centelleo líquido. Se usó el mitógeno fitohemaglutinina (PHA) como control positivo para la proliferación de linfocitos. Se usaron células cultivadas solas sin péptido $A\beta$ o mitógeno PHA como controles negativos y positivos. Se calculó el índice de estimulación (IE) como las cuentas medias por min (cpm) de cultivos experimentales triplicados con péptido $A\beta$ divididas entre las cpm medias de cultivos de control negativo triplicados; un IE > 3,0 se consideró una respuesta de proliferación significativa.

Se aislaron muestras de células mononucleares de sangre periférica de sangre completa recogida en la semana 0 (nivel inicial) y la semana 16 (4 semanas después de la tercera dosis) y luego se cultivaron en ausencia o presencia de diversos péptidos $A\beta$. Como se muestra en la **Tabla 19**, no se observó respuesta de proliferación significativa por linfocitos cuando $A\beta_{1-14}$, otros péptidos $A\beta$ o p1412 (un péptido de control no relevante) se añadieron al medio de cultivo. Como era de esperar, se observaron respuestas de proliferación positivas cuando el mitógeno PHA se añadió al medio de cultivo. La observación de respuestas similares a PHA antes y después de la inmunización con UB 311 ($p=0,87$) no sugiere alteración significativa en las funciones inmunitarias de los sujetos del estudio (**Tabla 19**).

Ejemplo 26

LA INMUNIZACIÓN CON UB-311 NO ESTIMULA CITOCINAS HUMANAS EN PRESENCIA DE PÉPTIDO AB_{1-14}

Se realizaron análisis de citocinas (IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ) de los cultivos de CMSPs en alícuotas de medio de cultivo con células solas o en presencia de dominios del péptido $A\beta$ o PHA. Se usaron kits de ELISA de sándwich

de citocinas específicas de humano (U-CyTech Biosciences, Utrecht, Países Bajos) para determinar las concentraciones (pg/ml) de citocinas individuales siguiendo las instrucciones del fabricante. También se probaron las muestras de CMSPs recogidas en la semana 0 y semana 16 para la secreción de citocinas ya fuera con células solas (control negativo) o en presencia de péptidos A β , p1412 (péptido no relevante) o el mitógeno PHA (control positivo) después de cultivarse durante 3 días. El intervalo cuantificable del kit está entre 5 y 320 pg/ml. Cualquier concentración medida por debajo de 5 pg/ml o por encima de 320 pg/ml se indicó como por debajo del límite de cuantificación (BQL) o por encima del límite de cuantificación (AQL), respectivamente. Sin embargo, para consideraciones estadísticas, se sustituyó BQL o AQL con el nivel cuantificable más bajo (5 pg/ml) o más alto (320 pg/ml), respectivamente. Las concentraciones medias de cada citocina en la semana 0 y semana 16 se muestran en la **Tabla 20**. Como era de esperar, hubo aumentos significativos en la producción de citocinas en presencia de PHA, el control positivo, excepto para IL-2. La producción de citocinas en respuesta a la estimulación con A β ₁₋₁₄, u otros péptidos A β , se observó en el nivel inicial (semana 0) y la semana 16, pero la mayoría de los valores parecieron similares a los controles negativos correspondientes (células solo).

Para evaluar el cambio de la respuesta inmunitaria celular después de la inmunización, se comparó el cambio de las concentraciones medias de citocinas desde el nivel inicial hasta semana 16 con el de los controles negativos y se examinó por la prueba del orden con signo de Wilcoxon para datos emparejados. Cuatro citocinas (IFN- γ , IL-6, IL-10, TNF- α) mostraron un aumento notable en la secreción en respuesta al péptido A β ₁₋₄₂ de longitud completa; esta observación puede ser debida a los epítopes conformacionales de agregados A β ₁₋₄₂. No se detectó la regulación por incremento de la secreción de citocinas en A β ₁₋₁₄ u otros péptidos A β .

Sumario: la vacuna para EA de UBI contiene dos inmunógenos peptídicos cada uno con un péptido A β ₁₋₁₄ del extremo N libre sintéticamente enlazado con epítopes Th de MvF5 y Th de HBsAg3, respectivamente. Se usaron la proliferación de linfocitos *in vitro* y el análisis de citocinas para evaluar el impacto de la inmunización de la vacuna para EA de UBI sobre la respuesta inmunitaria celular. No se observaron respuestas de proliferación por linfocitos cuando se añadió el péptido A β ₁₋₁₄ o cualquier otro péptido A β al medio de cultivo como se muestra en la **Tabla 19**. No se detectó la regulación por incremento de la secreción de citocinas por linfocitos de los pacientes inmunizados con la vacuna para EA de UBI tras el tratamiento con el péptido A β ₁₋₁₄ y otros péptidos A β , excepto A β ₁₋₄₂, que provocó un aumento apreciable de cuatro citocinas (IFN- γ , IL-6, IL-10, TNF- α) después de la inmunización con UB 311 en la semana 16 cuando se comparó con los niveles de la semana 0 antes del tratamiento (**Tabla 20**). Es más probable que el aumento de la liberación de citocinas mediante respuesta de linfocitos T de tipo Th2 no esté relacionado con la respuesta a la vacuna para EA de UBI, puesto que no se detectó regulación por incremento con A β ₁₋₁₄ solo. Se sospecha que la respuesta a A β ₁₋₄₂ es una respuesta de fondo a A β nativo que se puede relacionar con epítopes T cooperadores nativos identificados en A β ₁₋₄₂. Se observó la ausencia de producción de IL-2 en respuesta a PHA, que está de acuerdo con los hallazgos informados por Katial RK, et al. en Clin Diagn Lab Immunol 1998; 5:78-81, en condiciones experimentales similares con CMSPs humanas normales. En conclusión, estos resultados mostraron que la vacuna para EA de UBI no generó anti-autorrespuestas inmunitarias celulares posiblemente inflamatorias en pacientes con enfermedad de Alzheimer de leve a moderada que participaron en el ensayo clínico de fase I, demostrando así además la seguridad de la vacuna para EA de UBI (UB-311).

Tabla 1

Péptido A β ₁₋₄₂ y segmentos del mismo empleados en ensayos serológicos		
Posiciones de aminoácidos dentro de A β ₁₋₄₂ o APP	SEQ ID NO:	Secuencia
A β ₁₋₄₂ o APP 770 (D672-A713)	1	DAEFR HDSGY EVHHQ KLVFF AEDVG SNKGA IIGLM VGGVV IA
A β ₁₋₄₀ o APP 770 (D672-V711)	2	DAEFR HDSGY EVHHQ KLVFF AEDVG SNKGA IIGLM VGGVV
A β ₁₋₂₈ o APP 770 (D672-K699)	3	DAEFR HDSGY EVHHQ KLVFF AEDVG SNK
A β ₁₋₁₄ o APP 770 (D672-H685)	4	DAEFR HDSGY EVHH
A β ₁₋₁₂ o APP 770 (D672-Y683)	5	DAEFR HDSGY EV
A β ₁₋₁₀ o APP 770 (D672-Y681)	6	DAEFR HDSGY
A β ₁₅₋₄₂ o APP 770 (Q686-A711)	7	QKLVF FAEDV GSNKG AIIGL MVGGV VIA
A β ₉₋₁ o APP 770 (T663-D672)	8	TEEIS EVKMD
A β ₈₋₂ o APP 770 (E664-A673)	9	EEISE VKMDA
A β ₇₋₃ o APP 770 (E665-E674)	10	EISEV KMDAE
A β ₆₋₄ o APP 770 (I666-F675)	11	ISEVK MDAEF
A β ₅₋₅ o APP 770 (S667-R676)	12	SEVKM DAEFR
A β ₄₋₆ o APP 770 (E668-H677)	13	EVKMD AEFRRH
A β ₃₋₇ o APP 770 (V669-D678)	14	VKMDA EFRHD
A β ₂₋₈ o APP 770 (K670-S679)	15	KMDAE FRHDS
A β ₁₋₉ o APP 770 (M671-R680)	16	MDAEF RHDSG
A β ₁₋₁₀ o APP 770 (D672-Y681)	6	DAEFR HDSGY
A β ₂₋₁₁ o APP 770 (A673-E682)	17	AEFRH DSGYE
A β ₃₋₁₂ o APP 770 (E674-V683)	18	EFRHD SGYEV
A β ₄₋₁₃ o APP 770 (F675-H684)	19	FRHDS GYEVH
A β ₅₋₁₄ o APP 770 (R676-H685)	20	RHDSG YEVHH

(continuación)

Péptido A β ₁₋₄₂ y segmentos del mismo empleados en ensayos serológicos		
Posiciones de aminoácidos dentro de A β ₁₋₄₂ o APP	SEQ ID NO:	Secuencia
A β ₆₋₁₅ o APP 770 (H677-Q686)	21	HDSGY EVHHQ
A β ₇₋₁₆ o APP 770 (D678-K687)	22	DSGYE VHHQK
A β ₈₋₁₇ o APP 770 (S679-L688)	23	SGYEV HHQKL
A β ₉₋₁₈ o APP 770 (G680-V689)	24	GYEVH HQKLV
A β ₁₀₋₁₉ o APP 770 (Y681-F690)	25	YEVHH QKLVF
A β ₁₁₋₂₀ o APP 770 (E682-F691)	26	EVHHQ KLVFF
A β ₁₂₋₂₁ o APP 770 (V683-A692)	27	VHHQK LVFFA
A β ₁₃₋₂₂ o APP 770 (H684-E693)	28	HHQKL VFFAE
A β ₁₄₋₂₃ o APP 770 (H685-D694)	29	HQKLV FFAED
A β ₁₅₋₂₄ o APP 770 (Q686-V695)	30	QKLVF FAEDV
A β ₁₆₋₂₂ o APP 770 (D687-E693)	31	KLVFFAE
Espaciador A	32	ϵ K-KKK
A β ₁₋₁₆ o APP 770 (D672-K687)	66	DAEFR HDSGY EVHHQ K
A β ₁₇₋₄₂ o APP 770 (L688-A713)	67	LVFF AEDVG SNKGA IIGLM VGGVV IA

Tabla 2

Epítopes T cooperadores promiscuos seleccionados para su empleo en el diseño de construcciones de inmunógenos peptídicos derivados de A β ₁₋₄₂		
Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
Th de Clostridium tetani1	33	KKQYIKANSKFIGITEL
Th de MvF1	34	LSEIKGVIVHRLEGV
Th de Bordetella pertussis	35	GAYARCPNGTRALTVAELRGNAEL
Th de Clostridium tetani2	36	WVRDIIDFTNESSQKT
Th de difteria Th	37	DSETADNLEKTVAALSILPGHGC
Th de Plasmodium falciparum	38	DHEKKHAKMEKASSVFNVNS
Th de Schistosoma mansoni	39	KWFKTNAPNGVDEKHRH
Th de toxina del cólera	40	ALNIWDRFDVFCITLGGTGYLKGNS
Th de MvF2	41	ISEIKGVIVHKIEGI
Th de KKKMvF3	42	KKKISISEIKGVIVHKIEGILF T RT TR T
Th de HBsAg1	43	KKKLLFTLTKLLTLPQSLD RRRIKII RII I L IR VRVV VV V I V F FF FF F V F F
Th de MvF4	44	ISISEIKGVIVHKIETILF T RT TR
Th de HBsAg2	45	KKKIITITRIITIPQSLD FFLL L ITTI
Th de MvF5	46	ISITEIKGVIVHRIETILF
Th de HBsAg3	47	KKKIITITRIITITID

Tabla 3

Mejora de la inmunogenicidad del péptido A β ₁₋₁₄ por epítopes Th derivados de proteína de patógeno que incluyen epítopes Th artificiales idealizados para la generación de anticuerpos específicos hacia el extremo N del péptido A β ₁₋₄₂ en el diseño de construcciones de inmunógenos de péptidos A β		
Descripción	SEQ ID No:	Secuencia
A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de Clostridium tetani1	48	DAEFRHDSGYEVHH- ϵ K-KKQYIKANSKFIGITEL
A β ₁₋₁₀ - ϵ K-Th de MvF1	49	DAEFRHDSGY- ϵ K-LSEIKGVIVHRLEGV
A β ₁₋₁₂ - ϵ K-Th de MvF1	50	DAEFRHDSGYEV- ϵ K-LSEIKGVIVHRLEGV
A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de MvF1	51	DAEFRHDSGYEVHH- ϵ K-LSEIKGVIVHRLEGV
A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de Bordetella pertussis	52	DAEFRHDSGYEVHH- ϵ K-GAYARCPNGTRALTVAELRGNAEL
A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de Clostridium tetani2	53	DAEFRHDSGYEVHH- ϵ K-WVRDIIDFTNESSQKT
A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de difteria	54	DAEFRHDSGYEVHH- ϵ K-DSETADNLEKTVAALSILPGHGC
A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de Plasmodium falciparum	55	DAEFRHDSGYEVHH- ϵ K-DHEKKHAKMEKASSVFNVNS
A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de Schistosoma mansoni	56	DAEFRHDSGYEVHH- ϵ K-KWFKTNAPNGVDEKHRH

(continuación)

Mejora de la inmunogenicidad del péptido A β ₁₋₁₄ por epítopes Th derivados de proteína de patógeno que incluyen epítopes Th artificiales idealizados para la generación de anticuerpos específicos hacia el extremo N del péptido A β ₁₋₄₂ en el diseño de construcciones de inmunógenos de péptidos A β		
Descripción	SEQ ID No:	Secuencia
A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de toxina del cólera	57	DAEFRHDSGYEVHH- ϵ K-ALNIWDRFDVCTLGATTGYLKGN
A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de MvF2	58	DAEFRHDSGYEVHH- ϵ K-ISEIKGVIVHKIEGI
A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de KKKMvF3	59	DAEFRHDSGYEVHH- ϵ K-KKK- <u>ISISEIKGVIVHKIEGILF</u> T RT TR T
A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de HBsAg1	60	DAEFRHDSGYEVHH- ϵ K-KKKLFLLT KL LTLPQSLD RRRIKII RII I L IR VRVV VV V I V F FF FF F V F F
(A β ₁₋₁₄) ₄ (ϵ K) ₂ - ϵ K-Th de MvF1	61	(DAEFRHDSGYEVHH) ₄ - ϵ K ₂ - ϵ K-LSEIKGVIVHRLEGV
A β ₁₋₁₄ - ϵ K-KKK-Th de MvP4 *	62	DAEFRHDSGYEVHH- ϵ K-KKK- <u>ISISEIKGVIVHKIETILF</u> T RT TR
A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de HBsAg2 *	63	DAEFRHDSGYEVHH- ϵ K-KKK-IITITRIITIPQSLD FFLL L ITTI
A β ₁₋₁₄ - ϵ K-KKK-Th de MvF5 *	64	DAEFRHDSGYEVHH- ϵ K-KKK-ISITEIKGVIVHRIETILF
A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de HBsAg3 *	65	DAEFRHDSGYEVHH- ϵ K-KKK-IITITRIITITID
* Construcciones de inmunógenos contenidas en las composiciones y composiciones farmacéuticas de la invención		

Tabla 4

Evaluación de la inmunogenicidad en cobayas tras la sensibilización (0 wpi) y refuerzo (4 wpi) con formulaciones de vacuna que comprenden diversas construcciones de inmunógenos peptídicos derivados de A β							
Grupo N°	Descripción de la construcción de inmunógenos peptídicos derivados de A β en la formulación de vacuna	SEQ ID NO:	Animal ID	0 wpi	4 wpi	6 wpi	8 wpi
				ELISA de A β ₁₋₄₂	ELISA de A β ₁₋₄₂	ELISA de A β ₁₋₄₂	ELISA de A β ₁₋₄₂
				Log ₁₀ Título	Log ₁₀ Título	Log ₁₀ Título	Log ₁₀ Título
1	Péptido A β ₁₋₄₂	1	2723	0,438	3,574	3,460	3,744
			2724	0,570	2,582	2,684	2,649
			2725	0,630	3,232	3,279	2,958
			Media geométrica	0,540	3,101	3,123	3,084
2	Péptido A β ₁₋₂₈	3	2726	0,330	3,768	3,572	3,369
			2727	0,440	3,690	3,688	3,759
			2728	0,350	3,683	3,879	3,960
			Media geométrica	0,370	3,713	3,711	3,688
3	Péptido A β ₁₋₁₄	4	2729	0,620	1,235	1,212	1,241
			2730	0,570	1,142	1,113	1,151
			2731	0,420	1,211	1,114	1,189
			Media geométrica	0,529	1,195	1,145	1,193
4	A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de Clostridium tetani1	48	2763	0,591	1,736	2,532	2,920
			2764	0,582	1,943	0,968	1,511
			2765	0,514	0,890	1,591	2,435
			Media geométrica	0,561	1,443	1,574	2,207
6	A β ₁₋₁₀ - ϵ K-Th de MVF1	49	2757	0,424	4,124	4,622	4,523
			2758	0,649	4,034	4,322	4,372
			2759	0,753	4,275	4,555	4,364
			Media geométrica	0,592	4,143	4,498	4,419
7	A β ₁₋₁₂ - ϵ K-Th de MVF1	50	2760	0,342	4,356	4,732	4,534
			2761	0,563	4,574	4,352	4,623
			2762	0,733	4,356	4,623	4,733
			Media geométrica	0,521	4,427	4,566	4,629
5	A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de MVF1	51	2766	0,342	4,744	4,854	4,878
			2767	0,647	4,500	5,337	4,777
			2768	0,182	5,074	4,791	4,601
			Media geométrica	0,343	4,767	4,988	4,751

(continuación)

Evaluación de la inmunogenicidad en cobayas tras la sensibilización (0 wpi) y refuerzo (4 wpi) con formulaciones de vacuna que comprenden diversas construcciones de inmunógenos peptídicos derivados de A β							
Grupo N°	Descripción de la construcción de inmunógenos peptídicos derivados de A β en la formulación de vacuna	SEQ ID NO:	Animal ID	0 wpi	4 wpi	6 wpi	8 wpi
				ELISA de A β ₁₋₄₂	ELISA de A β ₁₋₄₂	ELISA de A β ₁₋₄₂	ELISA de A β ₁₋₄₂
				ELISA Log ₁₀ Título	ELISA Log ₁₀ Título	ELISA Log ₁₀ Título	ELISA Log ₁₀ Título
8	A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de Bordetella pertussis	52	2769	0,648	2,235	3,571	2,686
			2770	0,415	2,284	4,203	3,799
			2771	0,488	1,331	2,541	2,202
			Media geométrica	0,508	1,894	3,366	2,822
9	A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de Clostridium tetani 2	53	2772	0,714	1,843	2,818	2,761
			2773	1,165	3,370	1,297	1,828
			2774	0,886	1,398	3,112	3,165
			Media geométrica	0,903	2,055	2,249	2,518
10	A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de difteria	54	2775	0,314	3,674	4,675	4,358
			2776	0,233	0,780	1,587	1,695
			2777	0,780	3,629	4,473	3,718
			Media geométrica	0,385	2,183	3,214	3,017
11	A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de Plasmodium falciparum	55	2778	0,868	3,941	3,856	3,382
			2779	0,464	1,926	2,549	2,633
			2780	0,627	4,350	3,723	3,218
			Media geométrica	0,632	3,208	3,320	3,060
12	A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de Schistosoma mansoni	56	2781	0,968	0,395	2,475	2,583
			2782	0,754	1,101	2,554	2,692
			2783	0,680	1,882	0,881	1,250
			Media geométrica	0,792	0,935	1,773	2,056
13	A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de toxina del cólera	57	2784	0,836	4,218	4,735	4,287
			2785	1,111	4,704	5,357	5,347
			2786	0,497	4,252	4,698	4,600
			Media geométrica	0,773	4,386	4,921	4,724
14	A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de MVF2	58	2787	1,333	5,347	5,398	4,791
			2788	0,546	5,495	5,409	4,931
			2789	0,705	5,658	5,745	4,822
			Media geométrica	0,801	5,498	5,515	4,848
15	A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de MVF3	59	2790	0,701	4,943	5,678	5,569
			2791	0,360	3,468	5,745	5,658
			2792	0,494	4,759	5,319	5,347
			Media geométrica	0,500	4,337	5,577	5,523
16	A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de HBsAg1	60	2793	0,880	3,199	4,561	4,431
			2794	0,911	4,817	4,303	4,788
			2795	0,761	4,567	5,328	5,495
			Media geométrica	0,848	4,129	4,711	4,885
17	(A β ₁₋₁₄) ₄ -(ϵ K) ₂ - ϵ K-Th de MVF1	61	2796	0,479	5,041	5,585	4,696
			2797	0,973	4,385	4,831	4,751
			2798	0,345	3,919	4,698	3,922
			Media geométrica	0,544	4,425	5,023	4,439

Tabla 5

Evaluación de la inmunogenicidad en cobayas tras la sensibilización (0 wpi) y refuerzo (4 wpi) con formulaciones de vacuna que comprenden dos construcciones de inmunógenos peptídicos derivados de A β ₁₋₁₄ y combinación de las mismas							
Grupo N°	Descripción de la construcción de inmunógenos de péptidos A β ₁₋₁₄ en la formulación de la vacuna	SEQ ID NO:	Animal ID	0 wpi	3 wpi	5 wpi	8 wpi
				ELISA de A β ₁₋₄₂	ELISA de A β ₁₋₄₂	ELISA de A β ₁₋₄₂	ELISA de A β ₁₋₄₂
				Log ₁₀ Título	Log ₁₀ Título	Log ₁₀ Título	Log ₁₀ Título
1	A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de KKKMvF4 *	62	1935	0,587	4,362	4,579	4,447
			1936	0,414	3,684	4,543	4,217
			1937	0,390	4,393	3,652	4,358
			1938	0,179	3,768	3,648	4,283
			1939	0,331	3,726	3,673	4,163
			1940	0,350	3,732	4,787	3,813
			Media geométrica	0,354	3,932	4,117	4,208
2	A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de HBsAg2 *	63	1929	0,288	2,720	3,502	3,596
			1930	0,507	2,817	3,559	3,653
			1931	0,721	2,860	3,575	3,696
			1932	0,548	2,315	3,776	3,681
			1933	0,619	2,322	3,742	3,836
			1934	0,234	2,687	3,459	3,744
			Media geométrica	0,450	2,610	3,600	3,700
3	A β ₁₋₁₄ - ϵ K-KKKMvF4 Th + A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de HBsAg2 en la relación molar igual **	62+63	1923	0,298	4,759	4,880	4,803
			1924	0,554	4,619	4,979	4,702
			1925	0,299	4,835	4,791	4,955
			1926	0,635	4,831	4,710	5,150
			1927	0,911	5,097	4,278	4,313
			1928	0,890	5,188	4,721	5,206
			Media geométrica	0,542	4,884	4,721	4,845

* Construcciones de inmunógenos contenidas en las composiciones y composiciones farmacéuticas de la invención

** Composición según la invención

Tabla 6

Evaluación de anticuerpos dirigidos contra los péptidos Th o elemento de proteína transportadora de los inmunógenos tras la sensibilización (0 wpi) y refuerzo (4 wpi) con las formulaciones de vacuna que comprenden dos construcciones de inmunógenos peptídicos derivados de A β ₁₋₁₄ y combinación de las mismas en cobayas							
Grupo N°	Descripción de la construcción de péptidos A β ₁₋₁₄ en la formulación de vacuna	SEQ ID NO:	Animal ID	8 wpi			
				ELISA de A β ₁₋₄₂ (SEQ ID NO: 1)	ELISA de Th de MvF4 (SEQ ID NO: 44)	ELISA de Th de HBsAg2 (SEQ ID NO: 45)	ELISA de KLH
				ELISA Log ₁₀ Título	ELISA Log ₁₀ Título	ELISA Log ₁₀ Título	ELISA Log ₁₀ Título
1	A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de KKK-MvF4 *	62	1935	4,447	0,268	0,288	N/A
			1936	4,217	0,216	0,504	N/A
			1937	4,358	0,196	0,621	N/A
			1938	4,283	0,179	0,360	N/A
			1939	4,163	0,332	0,519	N/A
			1940	3,813	0,286	0,233	N/A
			Media geométrica	4,208	0,240	0,397	N/A
2	A β ₁₋₁₄ - ϵ K-Th de HBsAg2 *	63	1929	3,596	0,575	0,431	N/A
			1930	3,653	0,423	0,257	N/A
			1931	3,696	0,380	0,345	N/A
			1932	3,681	0,279	0,563	N/A
			1933	3,836	0,336	0,365	N/A
			1934	3,744	0,425	0,354	N/A
			Media geométrica	3,700	0,393	0,375	N/A

(continuación)

Evaluación de anticuerpos dirigidos contra los péptidos Th o elemento de proteína transportadora de los inmunógenos tras la sensibilización (0 wpi) y refuerzo (4 wpi) con las formulaciones de vacuna que comprenden dos construcciones de inmunógenos peptídicos derivados de Aβ₁₋₁₄ y combinación de las mismas en cobayas

Grupo N°	Descripción de la construcción de péptidos Aβ ₁₋₁₄ en la formulación de vacuna	SEQ ID NO:	Animal ID	8 wpi			
				ELISA de Aβ ₁₋₄₂ (SEQ ID NO: 1)	ELISA de Th de MvF4 (SEQ ID NO: 44)	ELISA de Th de HBsAg2 (SEQ ID NO: 45)	ELISA de KLH
				ELISA Log ₁₀ Título	ELISA Log ₁₀ Título	ELISA Log ₁₀ Título	ELISA Log ₁₀ Título
3	Aβ ₁₋₁₄ -εK-KKK-Th de MvF4 + Aβ ₁₋₁₄ - εK-Th de HBsAg2 a igual relación en peso **	62+63	1923	4,803	0,350	0,631	N/A
			1924	4,702	0,724	0,350	N/A
			1925	4,955	0,324	0,391	N/A
			1926	5,150	0,394	0,452	N/A
			1927	4,313	0,520	0,368	N/A
			1928	5,206	0,528	0,364	N/A
			Media geométrica	4,845	0,455	0,417	N/A
4	KLH-(C)-Aβ ₁₋₁₄	4	1968	3,626	N/A	N/A	7,006
			1969	3,981	N/A	N/A	7,167
			1970	2,227	N/A	N/A	4,658
			1971	3,005	N/A	N/A	5,593
			1974	2,527	N/A	N/A	7,000
			1975	2,599	N/A	N/A	7,000
			Media geométrica	2,931	N/A	N/A	6,326

* Construcciones de inmunógenos contenidas en composiciones y composiciones farmacéuticas de la invención

** Composición según la invención

Tabla 7

Evaluación de la inmunogenicidad en babuinos tras la sensibilización (0 wpi) y refuerzos (3 y 6 wpi) con formulaciones de vacuna que comprenden cantidades variables de construcciones de inmunógenos peptídicos derivados de A β ₁₋₁₄ (SEQ ID NOS: 62+63) en emulsión w/o ISA51 y en alumbre							
Grupo N°	Descripción de la formulación de vacuna	Animal ID	0 wpi	5 wpi	8 wpi	10 wpi	14 wpi
			ELISA de A β ₁₋₄₂ Log ₁₀ Título	ELISA de A β ₁₋₄₂ Log ₁₀ Título	ELISA de A β ₁₋₄₂ Log ₁₀ Título	ELISA de A β ₁₋₄₂ Log ₁₀ Título	ELISA de A β ₁₋₄₂ Log ₁₀ Título
1	SEQ ID NO:62+SEQ ID NO:63 en la relación molar igual a 100 μ g en 0,5 ml de alumbre (Alhydrogel)	X798	1,397	2,463	2,985	2,337	1,478
2	SEQ ID NO:62+SEQ ID NO:63 en la relación molar igual a 25 μ g en 0,5 ml de emulsión ISA51 (w/o)	X1498	1,394	3,462	3,236	2,422	1,774
3	SEQ ID NO:62+SEQ ID NO:63 en la relación molar igual a 100 μ g en 0,5 ml de emulsión ISA51 (w/o)	X299	1,140	3,038	3,427	3,345	2,205
		X1098	1,610	3,987	4,460	4,662	3,666
		X398	1,541	3,926	4,353	4,095	2,972
		Media geométrica	1,414	3,623	4,052	3,997	2,885
4	SEQ ID NO:62+SEQ ID NO:63 en la relación molar igual a 400 μ g en 0,5 ml de emulsión ISA51 (w/o)	X1198	1,696	3,696	5,051	5,115	4,531
Composiciones 1 a 4: según la invención							

Tabla 8

Evaluación de anticuerpos (de sueros de 8 wpi en cobayas) dirigidos contra los péptidos Th de las construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ tras la sensibilización (0 wpi) y refuerzo (4 wpi) con la formulación de vacuna que comprende dos construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ ₁₋₁₄						
Grupo N°	Descripción de la construcción de péptidos Aβ ₁₋₁₄ en la formulación de vacuna	SEQ ID No:	Animal ID	8 wpi		
				ELISA de Aβ ₁₋₄₂ (SEQ ID NO: 1)	ELISA de Th de MvF 5 (SEQ ID NO: 46)	ELISA de Th de HBsAg3 (SEQ ID NO: 47)
				ELISA Log ₁₀ Título	ELISA Log ₁₀ Título	ELISA Log ₁₀ Título
1	Aβ ₁₋₁₄ -εK-KKK-Th de MvF5 + Aβ ₁₋₁₄ -εK-Th de HBsAg3 en la relación equimolar	64+65	2123	4,683	0,210	0,314
			2124	3,884	0,325	0,421
			2125	3,923	0,433	0,311
			2126	3,578	0,542	0,554
			2127	3,348	0,520	0,381
			2128	3,482	0,403	0,415
			Media geométrica	3,792	0,387	0,392
Composición 1: según la invención						

Tabla 9

Mapeo de epítopes para análisis de especificidad fina en el extremo N de A β_{1-42} por sueros de babuinos vacunados recogidos durante el periodo de inmunización (desde 0 hasta 111 wpi)					
Péptido SEQ ID NO:	Secuencia de péptidos	Títulos título de ELISA (Log ₁₀) Semanas después de la inmunización			
		0	10	84	111
8	TEEISEVKMD	0,23	0,26	0,16	0,15
9	EEISEVKMDA	0,24	0,30	0,21	0,22
10	EISEVKMDAE	0,23	0,25	0,16	0,14
11	ISEVKMDAEF	0,20	0,20	0,15	0,13
12	SEVKMDAEFR	0,21	0,24	0,16	0,13
13	EVKMDAEFRH	0,19	0,23	0,16	0,14
14	VKMDAEFRHD	0,27	0,46	0,48	0,55
15	KMDAEFRHDS	0,26	0,36	0,41	0,51
16	MDAEFRHDSG	0,26	0,32	0,16	0,17
6	DAEFRHDSGY	0,26	3,26	3,65	3,21
17	AEFRHDSGYE	0,25	0,35	0,25	0,19
18	EFRHDSGYEV	0,24	0,30	0,18	0,18
19	FRHDSGYEVH	0,20	0,40	0,22	0,30
20	RHDSGYEVHH	0,23	0,34	0,27	0,41
21	HDSGYEVHHQ	0,21	0,40	0,18	1,14
22	DSGYEVHHQK	0,32	0,78	0,64	0,76
23	SGYEVHHQKL	0,13	0,49	0,51	0,78
24	GYEVHHQKLV	0,13	0,27	0,19	0,12
25	YEVHHQKLVF	0,16	0,43	0,15	0,22
26	EVHHQKLVFF	0,17	0,26	0,13	0,13
27	VHHQKLVFFA	0,16	0,23	0,12	0,11
28	HHQKLVFFAE	0,19	0,22	0,13	0,12
29	HQKLVFFAED	0,18	0,21	0,13	0,13
3	A β_{1-28} DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK	0,12	3,26	3,57	3,32

Tabla 10

Mapeo de epítopes por ELISA de inhibición competitiva con sueros hiperinmunes de babuinos						
Concentración de péptido (µg/ml)	Porcentaje (%) de ELISA de inhibición después de la preabsorción de péptidos de sueros					
	Aβ ₁₋₂₈ (SEQ ID NO: 3)	Aβ ₁₋₁₀ (SEQ ID NO: 6)	Aβ _[1-9] (SEQ ID NO: 16)	Aβ ₂₋₁₁ (SEQ ID NO: 17)	Aβ ₃₋₁₂ (SEQ ID NO: 18)	Aβ ₁₇₋₄₃ (SEQ ID NO: 67)
32	99	97	39	19	3	7
8	93	93	17	6	0	0
2	72	82	8	0	0	5
1	63	72	4	0	0	10
0,5	50	55	9	0	1	9
0,25	34	37	8	3	1	5
0	0	0	0	0	0	0

El 50 % de inhibición de péptido Aβ₁₋₁₀ es aproximadamente 0,3 µg/ml. La especificidad de anticuerpo anti-Aβ de babuino se dirige predominantemente al ácido aspártico (D) del extremo N.

El mapeo de epítopes usando péptidos Aβ 10-meros de proteína precursora del amiloide humana (hAPP) detectada por muestras de suero inmune de babuino muestra especificidad por el péptido Aβ₁₋₁₀ del extremo N.

Tabla 11

Efecto de dosis repetidas de vacuna para EA de UBI sobre los títulos de anticuerpos (Log ₁₀) en macacos cangrejeros								
Grupo µg/dosis	Tiempo (Semana)							
	0	3	6	9	12	15	21	Después de 27
0	0,838 ±0,410	1,249 ±0,190	1,169 ±0,206	1,790 ±0,408	1,382 ±0,392	1,199 ±0,261	1,068 ±0,142	0,860 ±0,257
150	1,056 ±0,186	2,252 ±0,702	3,507 ±0,493	3,714 ±0,461	3,287 ±0,577	3,905 ±0,669	3,580 ±0,315	3,644 ±1,403
750	0,829 ±0,185	3,169 ±0,487	4,217 ±0,415	4,316 ±0,416	3,784 ±0,278	3,977 ±0,125	4,027 ±0,222	3,596 ±0,080

N = 6 macacos por grupo (semanas 0, 3, 6, 9, 12 y 15); N = 3 macacos por grupo (semanas 21, 27)

Tabla 12

Análisis de especificidad de antisueros recogidos en las semanas 9 y 15 de macacos cangrejeros inmunizados con la vacuna de placebo (0 µg/dosis) o vacuna para EA de UBI (150 µg/dosis o 750 µg/dosis)												
SEQ ID NO:	Secuencia	0 µg/dosis			150 µg/dosis			750 µg/dosis				
		9 WPI	15 WPI	9 WPI	15 WPI	9 WPI	15 WPI	9 WPI	15 WPI			
8	TEEISEVKMD	0,065	0,054	0,075	0,084	0,061	0,081	0,078	0,076			
9	EEISEVKMDA	0,061	0,060	0,082	0,092	0,081	0,092	0,081	0,076			
10	EISEVKMDAE	0,053	0,070	0,060	0,056	0,064	0,056	0,064	0,053			
11	ISEVKMDAEF	0,059	0,055	0,055	0,058	0,063	0,058	0,063	0,062			
12	SEVKMDAEFR	0,045	0,047	0,056	0,053	0,054	0,054	0,054	0,050			
13	EVKMDAEFRH	0,047	0,041	0,046	0,047	0,054	0,047	0,054	0,047			
14	VKMDAEFRHD	0,050	0,043	0,068	0,053	0,061	0,053	0,061	0,054			
15	KMDAEFRHDS	0,056	0,055	0,065	0,031	0,069	0,031	0,069	0,062			
16	MDAEFRHDSG	0,049	0,041	0,056	0,061	0,051	0,061	0,051	0,056			
6	DAEFRHDSGY	0,051	0,053	0,691	0,725	0,972	0,725	0,972	1,682			
17	AEFRHDSGYE	0,045	0,054	0,058	0,059	0,054	0,059	0,054	0,060			
18	EFRHDSGYEV	0,054	0,046	0,047	0,060	0,042	0,060	0,042	0,052			
19	FRHDSGYEVH	0,051	0,060	0,085	0,076	0,066	0,076	0,066	0,096			
20	RHDSGYEVHH	0,054	0,060	0,296	0,400	0,453	0,400	0,453	0,461			
21	HDSGYEVHHQ	0,059	0,052	0,266	0,494	0,419	0,494	0,419	0,332			
22	DSGYEVHHQK	0,042	0,051	0,270	0,289	0,405	0,289	0,405	0,197			
23	SGYEVHHQKL	0,051	0,048	0,097	0,071	0,077	0,071	0,077	0,082			
24	GYEVHHQKLV	0,042	0,047	0,055	0,067	0,052	0,067	0,052	0,059			
25	YEVHHQKLVF	0,042	0,036	0,092	0,069	0,069	0,069	0,069	0,058			
26	EVHHQKLVFF	0,034	0,034	0,044	0,051	0,042	0,051	0,042	0,044			
27	VHHQKLVFFA	0,037	0,039	0,046	0,082	0,057	0,082	0,057	0,083			
28	HHQKLVFFAE	0,038	0,040	0,044	0,052	0,046	0,052	0,046	0,032			
29	HQKLVFFAED	0,048	0,051	0,050	0,058	0,047	0,058	0,047	0,050			
30	QKLVFFAEDV	0,044	0,047	0,043	0,055	0,062	0,055	0,062	0,059			
3	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK	NA	0,087	NA	3,107	NA	3,107	NA	3,069			
NA = No disponible												

Tabla 13

Concentración de A β ₁₋₄₀ (pg/ml) de macacos cangrejeros antes y después de la vacuna para EA de UBI en suero (panel superior) y líquido cefalorraquídeo (panel inferior)				
A β ₁₋₄₀ Suero				
Dosis de vacuna	0 wpi (n=6)	15 wpi (n=6)	21 wpi (n=3)	26 wpi (n=3)
0 μ g (control)	61,7 $\pm$ 12,7	63,0 $\pm$ 16,8	63,7 $\pm$ 12,2	52,7 $\pm$ 2,5
150 μ g	53,9 $\pm$ 6,3	127,4 $\pm$ 23,8	144,8 $\pm$ 17,3	158,0 $\pm$ 38,1
750 μ g	56,8 $\pm$ 7,7	138,2 $\pm$ 18,9	144,5 $\pm$ 22,5	118,0 $\pm$ 20,9
A β ₁₋₄₀ Líquido cefalorraquídeo				
Dosis de vacuna	15 wpi (n=3)	28 wpi (n=3)		
0 μ g (control)	56,4 $\pm$ 6,0	59,7 $\pm$ 5,9		
150 μ g	63,9 $\pm$ 6,5	67,6 $\pm$ 5,4		
750 μ g	57,5 $\pm$ 5,9	54,3 $\pm$ 2,9		

Tabla 14

Proliferación expresada como índice de estimulación por células mononucleares de sangre periférica en macaco cangrejero tras el cocultivo con diversos péptidos A β			
Dominio de péptido	Índice de estimulación (IE) [IE positivo > 4,0]		
	Grupo 1 Control de vacuna de placebo	Grupo 2 Vacuna para EA UBITH® (dosis baja)	Grupo 3 Vacuna para EA UBITH® (dosis alta)
A β ₁₋₁₄	-- (1,5)	-- (0,2)	-- (1,2)
A β ₁₋₁₆	++ (12,7)	+ (7,8)	+ (7,9)
A β ₁₇₋₄₂	++++ (83,7)	++++ (46,9)	++++ (56,6)
A β ₁₋₄₂	++ (16,0)	++ (15,1)	++ (15,5)
A β ₁₋₁₄ (SEQ ID NO: 4) DAEFRHDSGYEVHH			
A β ₁₋₁₆ (SEQ ID NO: 66) DAEFRHDSGYEVHHQK			
A β ₁₇₋₄₂ (SEQ ID NO: 67) LVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA			
A β ₁₋₄₂ (SEQ ID NO: 1) DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA			

Tabla 15

Medición de la concentración de citocinas en células mononucleares de sangre periférica (CMSPs) de macaco cangrejero tras la estimulación con péptidos A β ₁₋₁₄ , A β ₁₋₄₂ o el mitógeno ^a PHA (fitohemaglutina)				
Citocina	Dosis de vacuna	Concentración de citocinas ^b (pg/ml)		
		A β ₁₋₁₄	A β ₁₋₄₂	PHA
IL-2	Placebo	BDL ^c	23,3 $\pm$ 13,1	90,6 $\pm$ 12,4
	150 μ g	BDL	19,4 $\pm$ 9,7	96,1 $\pm$ 13,3
	750 μ g	BDL	25,2 $\pm$ 11,8	97,5 $\pm$ 6,6
IL-6	Placebo	BDL	23,1 $\pm$ 11,7	69,1 $\pm$ 12,0
	150 μ g	BDL	15,0 $\pm$ 9,1	70,6 $\pm$ 15,7
	750 μ g	BDL	23,4 $\pm$ 10,5	66,2 $\pm$ 7,3
TNF- α	Placebo	BDL	9,2 $\pm$ 5,3	91,0 $\pm$ 29,1
	150 μ g	BDL	7,9 $\pm$ 4,8	96,1 $\pm$ 22,2
	750 μ g	BDL	7,8 $\pm$ 5,9	89,0 $\pm$ 13,7

^a Se cultivaron células mononucleares de sangre periférica (CMSPs) de seis macacos cangrejeros 24 horas después de la última inmunización (15 wpi) en ausencia o presencia de péptidos A β o el mitógeno PHA. Se probaron los sobrenadantes de cultivo para concentraciones detectables de cada citocina (IL2, IL6 y TNF α) por pruebas de ELISA comercial (U-CyTech Biosciences, Utrecht, Países Bajos).

^b El resultado se mostró como media $\pm$ desviación estándar.

^c BDL, por debajo del nivel de detección.

Tabla 16

Comparación de la inmunogenicidad de la vacuna para EA de UBI en los niveles de dosis de diferencia en cobayas, macacos de la India y babuinos				
Especie [BW]	Péptido dosis (μg) ²		$\log_{10}$ Título de anticuerpos $>2^3$	
	por animal	por kg BW	3 semanas después de 1 dosis	3 semanas después de 2 dosis
Cobaya [300 - 400 gramos]	1	2,5 - 3,3	0/3 ⁴	0/3
	3	7,5 - 10	0/3	0/3
	10	25 - 33	0/6	5/6
	30	75 - 100	1/6	6/6
	100	250 - 333	2/3	3/3
	300	750 - 1000	2/3	3/3
Macaco [4 - 5 kg]	150	30 - 37,5	4/6	6/6
	750	150 - 187,5	6/6	6/6
Babuino [10 - 15 kg]	300 - A ¹	20 - 30	3/4	4/4
	300 - B ¹	20 - 30	2/2	2/2
	1200	80 - 120	2/2	2/2

¹ Babuinos inmunizados en la Parte A a 0 y 3 semanas y en Parte B a 78 y 81 semanas (después del periodo de descanso de 72 semanas).

² Cada dosis de 1 ml consiste en 600 μg de péptido.

³ Los valores de $\log_{10} >2$ se puntúan como títulos anti-A β positivos.

⁴ Los números representan el número de animales con títulos positivos / número total de animales probados.
BW: peso corporal;

Tabla 17
Mapeo de epítopes para el análisis de especificidad fino en el extremo N de Aβ₁₋₄₂ por sueros (16 wp) de todos los pacientes vacunados

SEQ ID NO:	Secuencia peptídica	Posición de Aβ	Sujetos																			
			P101	P102	P103	P104	P105	P106	P107	P108	P109	P201	P202	P203	P204	P205	P206	P207	P208	P209	P210	
8	TEEISEVKMD	-9 a 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
9	EEISEVKMDA	-8 a 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
10	EISEVKMDAE	-7 a 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11	ISEVKMDAEF	-6 a 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
12	SEVKMDAEFR	-5 a 5	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
13	EVKMDAEFRH	-4 a 6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	58	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
14	VKMDAEFRHD	-3 a 7	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	13	
15	KMDAEFRHDS	-2 a 8	94	0	0	0	0	0	0	0	0	2	7	0	12	0	0	0	0	0	52	
16	MDAEFRHDSG	-1 a 9	420	12	0	0	0	0	0	0	0	19	116	0	17	0	0	2	6	0	121	
6	DAEFRHDSGY	1 a 10	1983	1669	36	1721	3840	5193	2838	948	1675	1034	42313	1284	274	81	1797	6024	4093	27596	20968	
17	AEFRHDSGYE	2 a 11	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
18	EFRHDSGYEV	3 a 12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
19	FRHDSGYEVH	4 a 13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
20	RHDSGYEVHH	5 a 14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
21	HDSGYEVHHQ	6 a 15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
22	DSGYEVHHQK	7 a 16	214	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
23	SGYEVHHQKL	8 a 17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
24	GYEVHHQKLV	9 a 18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	
25	YEVHHQKLVF	10 a 19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	
26	EVHHQKLVFF	11 a 20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
27	VHHQKLVFFA	12 a 21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	0	0	0	
28	HHQKLVFFAE	13 a 22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
29	HQKLVFFAED	14 a 23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
30	QKLVFFAEDV	15 a 24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK	1 a 28	685	161	220	295	450	715	1163	478	430	339	509	279	284	39	226	906	1157	893	1321	

Tabla 18

Análisis de concentraciones de A β ₁₋₄₀ (pg/ml) en plasma de pacientes con EA antes y después de la inmunización con vacuna para EA de UBI y correlación con título de anticuerpos anti-A β ₁₋₂₈ (log ₁₀) en orden decreciente				
Sujeto ID (n = 12)	Ab anti-A β ₁₋₂₈ (log ₁₀) Semana 16	A β ₁₋₄₀ (pg/ml) Semana 0	A β ₁₋₄₀ (pg/ml) Semana 16	A β ₁₋₄₀ (pg/ml) Semana 16 – Semana 0
P207	3,504	72,6	114,5	41,9
P105	3,164	53,5	75,1	21,6
P106	3,048	124,9	145,8	20,9
P109	2,778	492,9	1031,9	639,0
P108	2,622	29,3	44,4	15,1
P208	2,594	85,2	129,9	44,7
P206	2,462	90,2	102,1	11,9
P204	2,420	30,7	45,1	14,4
P205	1,989	77,7	72,0	-5,7
P107	1,790	147,0	92,7	-54,3
P209	1,467	58,6	87,7	29,1
P210	1,449	44,4	32,6	-11,8

Los datos en negrita tienen elevados niveles de A β ₁₋₄₀ en la semana 16 después de las inmunizaciones de la vacuna para EA de UBI en las semanas 0, 4 y 12.

Tabla 19

Índices medios de estimulación por células mononucleares de sangre periférica (CMSPs) de pacientes recogidas en la semana 0 y semana 16 tras el cocultivo con diversos péptidos A β				
Péptido (SEQ ID NO:)	Semana 0	Semana 16	Diferencia	Prueba de la t para datos emparejados
	media (DE)	media (DE)	media (DE)	Valor de p
A β ₁₋₁₄ (SEQ ID NO: 4)	0,93 (0,36)	0,90 (0,22)	-0,03 (0,39)	0,73
A β ₁₋₁₆ (SEQ ID NO: 66)	0,92 (0,30)	0,98 (0,25)	0,06 (0,40)	0,54
A β ₁₋₂₈ (SEQ ID NO: 3)	0,96 (0,30)	1,04 (0,34)	0,08 (0,56)	0,55
A β ₁₇₋₄₂ (SEQ ID NO: 67)	0,96 (0,34)	1,04 (0,29)	0,08 (0,49)	0,47
A β ₁₋₄₂ (SEQ ID NO: 1)	0,97 (0,38)	1,08 (0,49)	0,10 (0,53)	0,40
p1412*	0,87 (0,22)	0,99 (0,33)	0,11 (0,34)	0,18
PHA	28,73 (14,24)	27,75 (32,85)	-0,98 (26,57)	0,87

* p1412 es un péptido de control no relevante.

Análisis estadísticos: Se examinaron las diferencias en las proliferaciones de linfocitos entre la semana 0 y la semana 16 por la prueba de la t para datos emparejados. Se examinaron las diferencias entre el cambio de las concentraciones medias de citocinas (semana 16 frente a la semana 0) en respuesta a los péptidos A β y controles por la prueba del orden con signo de Wilcoxon para datos emparejados. Se determinaron los niveles estadísticos de significancia por pruebas bilaterales (p<0,05). Se usó R (versión 2.13.0) para todos los análisis estadísticos.

Tabla 20

Concentraciones medias de citocinas (DE) (pg/ml) ¹ producidas por células mononucleares de sangre periférica (CMSPs) de pacientes recogidas en la semana 0 y semana 16 tras el cocultivo con diversos péptidos Aβ													
Péptido (SEQ ID NO:)	Th1				Th2				Ambos				
	IL-2		IFN-γ		IL-6		IL-10		TNF-α				
	Semana 0	Semana 16	Semana 0	Semana 16	Semana 0	Semana 16	Semana 0	Semana 16	Semana 0	Semana 16	Semana 0	Semana 16	
Aβ ₁₋₁₄ (4)	31,06 (32,48)	31,20 (24,29)	13,52 (16,88)	16,07 (12,88)	31,34 (29,67)	50,74 (51,97)	5,67 (1,56)	5,62 (1,58)	36,82 (62,84)	39,84 (51,69)			
Aβ ₁₋₁₆ (66)	31,42 (31,38)	35,98 (23,93)	14,95 (16,14)	13,76 (14,19)	52,50 (31,68)	50,35 (42,63)	5,70 (1,63)	5,81 (1,78)	47,42 (72,17)	47,25 (69,73)			
Aβ ₁₋₂₈ (3)	36,73 (34,29)	40,55 (27,99)	15,99 (23,57)	20,68 (24,39)	31,74 (25,38)	42,27 (41,84)	5,61 (1,52)	6,17 (2,46)	41,59 (66,53)	51,20 (67,78)			
Aβ ₁₇₋₄₂ (67)	24,59 (-25,68)	29,15 (21,17)	9,67 (9,74)	13,58 (15,63)	>44,55 (70,86) ³	46,90 (51,30)	5,34 (0,86)	5,56 (1,54)	15,60 (18,44)	24,78 (39,26)			
Aβ ₁₋₄₂ (1)	23,06 (17,65)	27,34 (16,86)	13,42 (16,12)	>44,84 (77,34)	>141,25 (130,11) ⁴	>202,02 (121,32) ⁵	11,13 (22,68)	31,90 (50,21)	>31,63 (71,46) ³	>88,78 ⁶ (132,91)			
p1412	(27,42)	(25,97)	(18,39)	(29,89)	31,81 (52,12)	60,69 (95,80)	(0,64)	5,18 (0,53)	17,14 (23,50)	(29,26)			
PHA	10,38 ⁷ (11,34)	12,84 ⁷ (6,49)	>320,00 (0,00) ²	>318,91 (4,77) ²	>320,00 (0,00) ²	>320,00 (0,00) ²	173,83 (84,75)	>162,77 (99,70)	>313,01 (30,48) ²	>300,87 (46,51) ²			
Control de células	33,36 (24,91)	38,83 (33,08)	13,81 (12,29)	17,84 (18,24)	45,86 (41,93)	65,31 (76,54)	5,88 (2,45)	5,73 (1,59)	44,32 (70,90)	46,72 (67,76)			

1. El intervalo cuantificable del ensayo es entre 5 y 320 pg/ml.

2. Concentraciones de 90 % o más sujetos estuvieron por encima del límite superior de cuantificación (AQL), es decir, 320 pg/ml.

3. Un paciente tuvo un valor de AQL.

4. Seis pacientes tuvieron valores de AQL.

5. Ocho pacientes tuvieron valores de AQL.

6. Cuatro pacientes tuvieron valores de AQL.

7. La ausencia de producción de IL-2 observada en respuesta al mitógeno PHA está de acuerdo con los hallazgos informados por Katial et. Al, et al 1998 en condiciones experimentales similares.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Wang, Chang-Yi
5	<120> Vacuna peptídica para la prevención e inmunoterapia de demencia del tipo Alzheimer
	<130> TBD
	<140> TBD
10	<141> Con la presente
	<150> 13843883
	<151> 15-03-2013
15	<160> 67
	<170> PatentIn versión 3.5
	<210> 1
20	<211> 42
	<212> PRT
	<213> <i>Homo sapiens</i>
	<220>
25	<221> PÉPTIDO
	<222> (1)..(42)
	<223> Abeta 1-42 o APP 770(D672-A713)
	<400> 1
	Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
	1 5 10 15
	Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
	20 25 30
	Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
30	35 40
	<210> 2
	<211> 40
	<212> PRT
35	<213> <i>Homo sapiens</i>
	<220>
	<221> PÉPTIDO
	<222> (1)..(40)
40	<223> Abeta 1-40 o APP770(D672-V711)
	<400> 2
	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
45	<210> 3
	<211> 28

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(28)
 <223> Abeta 1-28 o AP770(D672-K699)

 <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
 20 25

 <210> 4
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(14)
 <223> Abeta 1-14 o APP770(D672-H685)

 <400> 4
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His
 1 5 10

 <210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(12)
 <223> Abeta 1-12 o APP 770(D672-V683)

 <400> 5
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val
 1 5 10

 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)
 <223> Abeta 1-10 o APP 770(D672-Y681)

 <400> 6
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr
 1 5 10

 <210> 7
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 800 028 T3

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(28)
 5 <223> Abeta 15-42 o APP 770(Q686-A711)

 <400> 7

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

 Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 20 25

 10 <210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 15 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)
 <223> Abeta -9-1 o APP 770(T663-D672)

 20 <400> 8

 Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp
 1 5 10

 <210> 9
 <211> 10
 25 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 30 <222> (1)..(10)
 <223> Abeta -8-2 o APP 770(E664-A673)

 <400> 9

 Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp Ala
 1 5 10

 35 <210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 40 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)
 <223> Abeta -7-3 o APP 770(E665-E674)

 45 <400> 10

 Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp Ala Glu
 1 5 10

 50 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)
 <223> Abeta -6-4 o APP 770(I666-F675)
 5 <400> 11
 Ile Ser Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 10
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)
 <223> Abeta -5-5 o APP 770(S667-R676)
 15 <400> 12
 Ser Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg
 1 5 10
 20
 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <220>
 <221> PROPEP
 <222> (1)..(10)
 <223> Abeta -4-6 o APP 770(E668-H677)
 30 <400> 13
 Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His
 1 5 10
 35
 <210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)
 <223> Abeta -3-7 o APP 770(V669-D678)
 45 <400> 14
 Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp
 1 5 10
 50
 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 55
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)
 <223> Abeta -2-8 o APP 770(K670-S679)

ES 2 800 028 T3

<400> 15

Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser
1 5 10

5 <210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(10)
<223> Abeta -1-9 o APP 770(M671-G680)

<400> 16

Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly
1 5 10

15 <210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(10)
<223> Abeta 2-11 o APP 770(A673-E682)

25 <400> 17

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

30 <210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(10)
<223> Abeta 3-12 o APP 770(E674-V683)

40 <400> 18

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

45 <210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

50 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(10)
<223> Abeta 4-13 o APP 770(F675-H684)

<400> 19

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

ES 2 800 028 T3

5 <210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 10 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)
 <223> Abeta 5-14 o APP 770(R676-H685)

 <400> 20

 Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His
 1 5 10

 15 <210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 20 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)
 <223> Abeta 6-15 o APP 770(H677-Q686)

 25 <400> 21

 His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln
 1 5 10

 30 <210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 35 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)
 <223> Abeta 7-16 o APP 770(D678-K687)

 <400> 22

 Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10

 40 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 45 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)
 <223> Abeta 8-17 o APP 770(S679-L688)

 50 <400> 23

 Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
 1 5 10

 55 <210> 24
 <211> 10
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)
 <223> Abeta 9-18 o APP 770(G680-V689)

<400> 24

Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val
 1 5 10

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)
 <223> Abeta 10-19 o APP 770(Y681-F690)

<400> 25

Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe
 1 5 10

<210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)
 <223> Abeta 11-20 o APP 770(E682-F691)

<400> 26

Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe
 1 5 10

<210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)
 <223> Abeta 12-21 o APP 770(V683-A692)

<400> 27

Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala
 1 5 10

<210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)

ES 2 800 028 T3

<223> Abeta 13-22 o APP 770(H684-E693)

<400> 28

His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu
1 5 10

5

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(10)

<223> Abeta 14-23 o APP 770(H685-D694)

15

<400> 29

His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
1 5 10

20

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(10)

<223> Abeta 15-24 o APP 770(Q686-V695)

<400> 30

Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
1 5 10

30

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(7)

<223> Abeta 16-22 o APP 770(K687-E693)

40

<400> 31

Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu

1

5

45

<210> 32

<211> 4

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(1)

<223> épsilon K

5	<220> <221> PÉPTIDO <222> (1)..(4) <223> espaciador A <400> 32	Lys Lys Lys Lys 1
10	<210> 33 <211> 17 <212> PRT <213> <i>Clostridium tetani</i>	
15	<220> <221> PÉPTIDO <222> (1)..(17) <223> Th de <i>Clostridium tetani</i> 1	
20	<400> 33	Lys Lys Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu 1 5 10 15
		Leu
25	<210> 34 <211> 15 <212> PRT <213> Virus del sarampión	
30	<220> <221> PÉPTIDO <222> (1)..(15) <223> Th de MVF1	
	<400> 34	Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val 1 5 10 15
35	<210> 35 <211> 24 <212> PRT <213> <i>Bordetella pertussis</i>	
40	<220> <221> PÉPTIDO <222> (1)..(24) <223> Th de <i>Bordetella pertussis</i>	
45	<400> 35	Gly Ala Tyr Ala Arg Cys Pro Asn Gly Thr Arg Ala Leu Thr Val Ala 1 5 10 15
		Glu Leu Arg Gly Asn Ala Glu Leu 20
50	<210> 36 <211> 17 <212> PRT	

<213> *Clostridium tetani*
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 5 <222> (1)..(17)
 <223> Th de *Clostridium tetani* 2
 <400> 36
 Trp Val Arg Asp Ile Ile Asp Asp Phe Thr Asn Glu Ser Ser Gln Lys
 1 5 10 15
 Thr
 10
 <210> 37
 <211> 23
 <212> PRT
 15 <213> *diphtheria bacilli*
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(23)
 <223> Th de difteria
 20
 <400> 37
 Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Val Ala Ala Leu Ser
 1 5 10 15
 Ile Leu Pro Gly His Gly Cys
 20
 <210> 38
 25 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Plasmodium falciparum*
 <220>
 30 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(21)
 <223> Th de *Plasmodium falciparum*
 <400> 38
 Asp His Glu Lys Lys His Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe
 1 5 10 15
 Asn Val Val Asn Ser
 20
 35
 <210> 39
 <211> 17
 <212> PRT
 40 <213> *Schistosoma mansoni*
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(17)
 45 <223> Th de *Schistosoma mansoni*
 <400> 39

ES 2 800 028 T3

Lys Trp Phe Lys Thr Asn Ala Pro Asn Gly Val Asp Glu Lys His Arg
1 5 10 15

His

<210> 40
<211> 25
<212> PRT
<213> Toxina del cólera

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(25)
<223> Th de la toxina del cólera

<400> 40

Ala Leu Asn Ile Trp Asp Arg Phe Asp Val Phe Cys Thr Leu Gly Ala
1 5 10 15

Thr Thr Gly Tyr Leu Lys Gly Asn Ser
20 25

<210> 41
<211> 15
<212> PRT
<213> Virus del sarampión

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(15)
<223> Th de MvF 2

<400> 41

Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly Ile
1 5 10 15

<210> 42
<211> 22
<212> PRT
<213> Virus del sarampión

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(22)
<223> Th de KKKMvF 3

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> S o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> K o R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> G o T

5 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> H o T

10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> K o R

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> G o T

<400> 42
Lys Lys Lys Ile Ser Ile Xaa Glu Ile Xaa Xaa Val Ile Val Xaa Xaa
1 5 10 15
Ile Glu Xaa Ile Leu Phe
20

20 <210> 43
<211> 18
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis B

25 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(18)
<223> Th de HBsAg 1

30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> K o R

35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> K o R

40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> K o R

45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> L o l o V o F

50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> F o K o R

55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> L o l o V o F

60 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> L o l o V o F

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> K o R

10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> L o l o V o F

15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> L o l o V o F

20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> L o l o V o F

25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Q o L o l o V o F

30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> L o l o V o F

35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> D o R

40

<400> 43

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Pro Xaa Ser
 1 5 10 15

Xaa Xaa

<210> 44
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Virus del sarampión

45

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(19)
 <223> MvF 4 Th

50

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> S o T

55

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> K o R

60

5 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> G o T

10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> H o T

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> K o R

<400> 44

Ile Ser Ile Xaa Glu Ile Xaa Xaa Val Ile Val Xaa Xaa Ile Glu Thr
1 5 10 15

Ile Leu Phe

20 <210> 45
<211> 18
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis B

25 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(18)
<223> Th de HBsAg 2

30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> I o F

35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> I o F

40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> T o L

45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> I o L

50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> I o L

55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> P o I

60 <220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)
 <223> Q o T

 5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> S o T

 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> L o I

 <400> 45
 Lys Lys Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Arg Ile Xaa Thr Ile Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

 15 Xaa Asp

 <210> 46
 <211> 19
 <212> PRT
 20 <213> Virus del sarampión

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(19)
 25 <223> Th de MvF 5

 <400> 46
 Ile Ser Ile Thr Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Ile Glu Thr
 1 5 10 15

 Ile Leu Phe

 30 <210> 47
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis B

 35 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(18)
 <223> Th de HBsAg 3

 40 <400> 47
 Lys Lys Lys Ile Ile Thr Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Ile Thr Thr
 1 5 10 15

 Ile Asp

 <210> 48
 <211> 32
 45 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 50 <222> (1)..(14)
 <223> Abeta 1-14

5	<220> <221> PÉPTIDO <222> (15)..(15) <223> épsilon K como espaciador
10	<220> <221> PÉPTIDO <222> (16)..(32) <223> Th de <i>Clostridium tetani</i> 1 <400> 48 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Lys Lys 1 5 10 15 Lys Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu 20 25 30
15	<210> 49 <211> 26 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>
20	<220> <221> PÉPTIDO <222> (1)..(10) <223> Abeta 1-10
25	<220> <221> PÉPTIDO <222> (11)..(11) <223> épsilon K como espaciador
30	<220> <221> PÉPTIDO <222> (12)..(26) <223> Th de MvF 1
35	<400> 49 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Lys Leu Ser Glu Ile Lys 1 5 10 15 Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val 20 25
40	<210> 50 <211> 28 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>
45	<220> <221> PÉPTIDO <222> (1)..(12) <223> Abeta 1-12
50	<220> <221> PÉPTIDO <222> (13)..(13) <223> épsilon K como espaciador <220>

ES 2 800 028 T3

<221> PÉPTIDO
 <222> (14)..(28)
 <223> Th de MvF 1
 5 <400> 50
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val Lys Leu Ser Glu
 1 5 10 15
 Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val
 20 25
 <210> 51
 <211> 30
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 15 <222> (1)..(14)
 <223> Abeta 1-14
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 20 <222> (15)..(15)
 <223> épsilon K como espaciador
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 25 <222> (16)..(30)
 <223> Th de MvF 1
 <400> 51
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Lys Leu
 1 5 10 15
 Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val
 20 25 30
 30 <210> 52
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(14)
 <223> Abeta 1-14
 40 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (15)..(15)
 <223> épsilon K como espaciador
 45 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (16)..(39)
 <223> Th de *Bordetella pertussis*
 50 <400> 52

ES 2 800 028 T3

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

Ala Tyr Ala Arg Cys Pro Asn Gly Thr Arg Ala Leu Thr Val Ala Glu
20 25 30

Leu Arg Gly Asn Ala Glu Leu
35

<210> 53
<211> 32
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(14)
<223> Abeta 1-14

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (15)..(15)
<223> épsilon K como espaciador

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (16)..(32)
<223> Th de *Clostridium tetani* 2

<400> 53

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

Val Arg Asp Ile Ile Asp Asp Phe Thr Asn Glu Ser Ser Gln Lys Thr
20 25 30

<210> 54
<211> 38
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(14)
<223> Abeta 1-14

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (15)..(15)
<223> épsilon K como espaciador

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (16)..(38)
<223> Th de *Diphtheria*

<400> 54

ES 2 800 028 T3

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

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

Leu Pro Gly His Gly Cys
35

<210> 55
<211> 36
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(14)
<223> Abeta 1-14

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (15)..(15)
<223> épsilon K como espaciador

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (16)..(36)
<223> Th de *Plasmodium falciparum*

<400> 55

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

His Glu Lys Lys His Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn
20 25 30

Val Val Asn Ser
35

<210> 56
<211> 32
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(14)
<223> Abeta 1-14

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (15)..(15)
<223> épsilon K como espaciador

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (16)..(32)
<223> Th de *Schistosoma mansoni*

<400> 56

ES 2 800 028 T3

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

Trp Phe Lys Thr Asn Ala Pro Asn Gly Val Asp Glu Lys His Arg His
20 25 30

<210> 57
<211> 40
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(14)
<223> Abeta 1-14

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (15)..(15)
<223> épsilon K como espaciador

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (16)..(40)
<223> Th de la toxina del cólera

<400> 57
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Lys Ala
1 5 10 15

Leu Asn Ile Trp Asp Arg Phe Asp Val Phe Cys Thr Leu Gly Ala Thr
20 25 30

Thr Gly Tyr Leu Lys Gly Asn Ser
35 40

<210> 58
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(14)
<223> Abeta 1-14

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (15)..(15)
<223> épsilon K como espaciador

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (16)..(30)
<223> Th de MvF 2

<400> 58

ES 2 800 028 T3

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

Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly Ile
20 25 30

5 <210> 59
<211> 37
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(14)
<223> Abeta 1-14

15 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (15)..(15)
<223> épsilon K como espaciador

20 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (16)..(37)
<223> KKKMvF 3 Th

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> S o T

30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (25)..(25)
<223> K o R

35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(26)
<223> G o T

40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> H o T

45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> K o R

50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (34)..(34)
<223> G o T

<400> 59

ES 2 800 028 T3

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

Lys Lys Ile Ser Ile Xaa Glu Ile Xaa Xaa Val Ile Val Xaa Xaa Ile
20 25 30

Glu Xaa Ile Leu Phe
35

5
<210> 60
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10
<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(14)
<223> Abeta 1-14

15
<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (15)..(15)
<223> épsilon K como espaciador

20
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> K o R

25
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> K o R

30
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> K o R

35
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> L o l o V o F

40
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> F o K o R

45
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(21)
<223> L o l o V o F

50
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> L o l o V o F

55
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> K o R

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (25)..(25)
 <223> L o l o V o F

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(26)
 <223> L o l o V o F

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> L o l o V o F

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> Q o L o l o V o F

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> L o l o V o F

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (33)..(33)
 <223> D o R

<400> 60

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

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Pro Xaa Ser Xaa
 20 25 30

Xaa

35 <210> 61
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(14)
 <223> (Abeta 1-14) x 4 como péptido ramificado

45 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (15)..(15)
 <223> (épsilon K) x 2 como conector

50 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (16)..(16)
 <223> épsilon K como espaciador enlazado

55 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (17)..(31)

ES 2 800 028 T3

<223> Th de MvF 1

<400> 61

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

Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val
20 25 30

5

<210> 62

<211> 37

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(14)

<223> Abeta 1-14

15

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (15)..(15)

<223> épsilon K como espaciador enlazado

20

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (16)..(37)

<223> Th de KKK- MvF 4

25

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> S o T

30

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (25)..(25)

<223> K o R

35

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(26)

<223> G o T

40

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> H o T

45

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> K o R

50

<400> 62

ES 2 800 028 T3

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

Lys Lys Ile Ser Ile Xaa Glu Ile Xaa Xaa Val Ile Val Xaa Xaa Ile
20 25 30

Glu Thr Ile Leu Phe
35

5
<210> 63
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10
<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(14)
<223> Abeta 1-14

15
<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (15)..(15)
<223> épsilon K como espaciador enlazado

20
<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (16)..(33)
<223> Th de HBsAg 2

25
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> I o F

30
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> I o F

35
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(21)
<223> T o L

40
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> I o L

45
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(26)
<223> I o L

50
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(29)
<223> P o I

55
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> Q o T

5 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> S o T

10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32)..(32)
<223> L o I

<400> 63

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

Lys Lys Ile Ile Thr Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Pro Gln Ser Leu
20 25 30

Asp

15 <210> 64
<211> 37
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(14)
<223> Abeta 1-14

25 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (15)..(15)
<223> épsilon K como espaciador enlazado

30 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (16)..(37)
<223> Th de KKK-MvF 5

35 <400> 64

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

Lys Lys Ile Ser Ile Thr Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Ile
20 25 30

Glu Thr Ile Leu Phe
35

40 <210> 65
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(14)
<223> Abeta 1-14

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (15)..(15)
 <223> épsilon K como espaciador enlazado
 5
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (16)..(33)
 <223> Th de HBsAg 3
 10
 <400> 65
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Lys Lys
 1 5 10 15
 Lys Lys Ile Ile Thr Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Ile Thr Thr Ile
 20 25 30
 Asp
 15
 <210> 66
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 20
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(16)
 <223> Abeta 1-16 o APP 770(D672-K687)
 <400> 66
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 25
 <210> 67
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(26)
 <223> Abeta 17-42 o APP 770(L688-A713)
 35
 <400> 67
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 1 5 10 15
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 20 25
 40

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una combinación de construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 62 y 63 o SEQ ID NOs: 64 y 65.
2. La composición según la reivindicación 1, que comprende además un oligodesoxinucleótido (ODN) de CpG para formar un complejo inmunoestimulante estabilizado.
3. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además un adyuvante.
4. Una composición farmacéutica que comprende:
 - a) la combinación de construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ de SEQ ID NOs: 62 y 63 según la reivindicación 1;
 - b) un oligodesoxinucleótido (ODN) de CpG; y
 - c) un vehículo de administración y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, en donde las construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ en (a) y el oligodesoxinucleótido (ODN) de CpG en (b) están en forma de un complejo inmunoestimulante estabilizado.
5. La composición farmacéutica según la reivindicación 4, en donde la combinación de construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ en (a) están presentes en una relación molar igual.
6. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5, en donde el vehículo de administración y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable es Alhydrogel (Al(OH)₃).
7. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5, en donde el vehículo de administración y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable es Adjuphos (AlPO₄).
8. Una composición farmacéutica que comprende:
 - a) la combinación de construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ de SEQ ID NOs: 64 y 65 según la reivindicación 1;
 - b) un oligodesoxinucleótido (ODN) de CpG; y
 - c) un vehículo de administración y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, en donde las construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ en (a) y el oligodesoxinucleótido (ODN) de CpG en (b) están en forma de un complejo inmunoestimulante estabilizado.
9. La composición farmacéutica según la reivindicación 8, en donde la combinación de construcciones de inmunógenos de péptidos Aβ en (a) están presentes en una relación molar igual.
10. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 8 y 9, en donde el vehículo de administración y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable es Alhydrogel (Al(OH)₃).
11. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 8 y 9, en donde el vehículo de administración y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable es Adjuphos (AlPO₄).
12. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 para su uso en producir anticuerpos que reconocen el extremo N de β-amiloide (Aβ) en un hospedador.
13. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 para su uso en el tratamiento de un paciente con enfermedad de Alzheimer (EA).
14. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 para su uso en producir anticuerpos que reconocen el extremo N de β-amiloide (Aβ) en un hospedador.
15. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 para su uso en el tratamiento de un paciente con enfermedad de Alzheimer (EA).

Figura 1

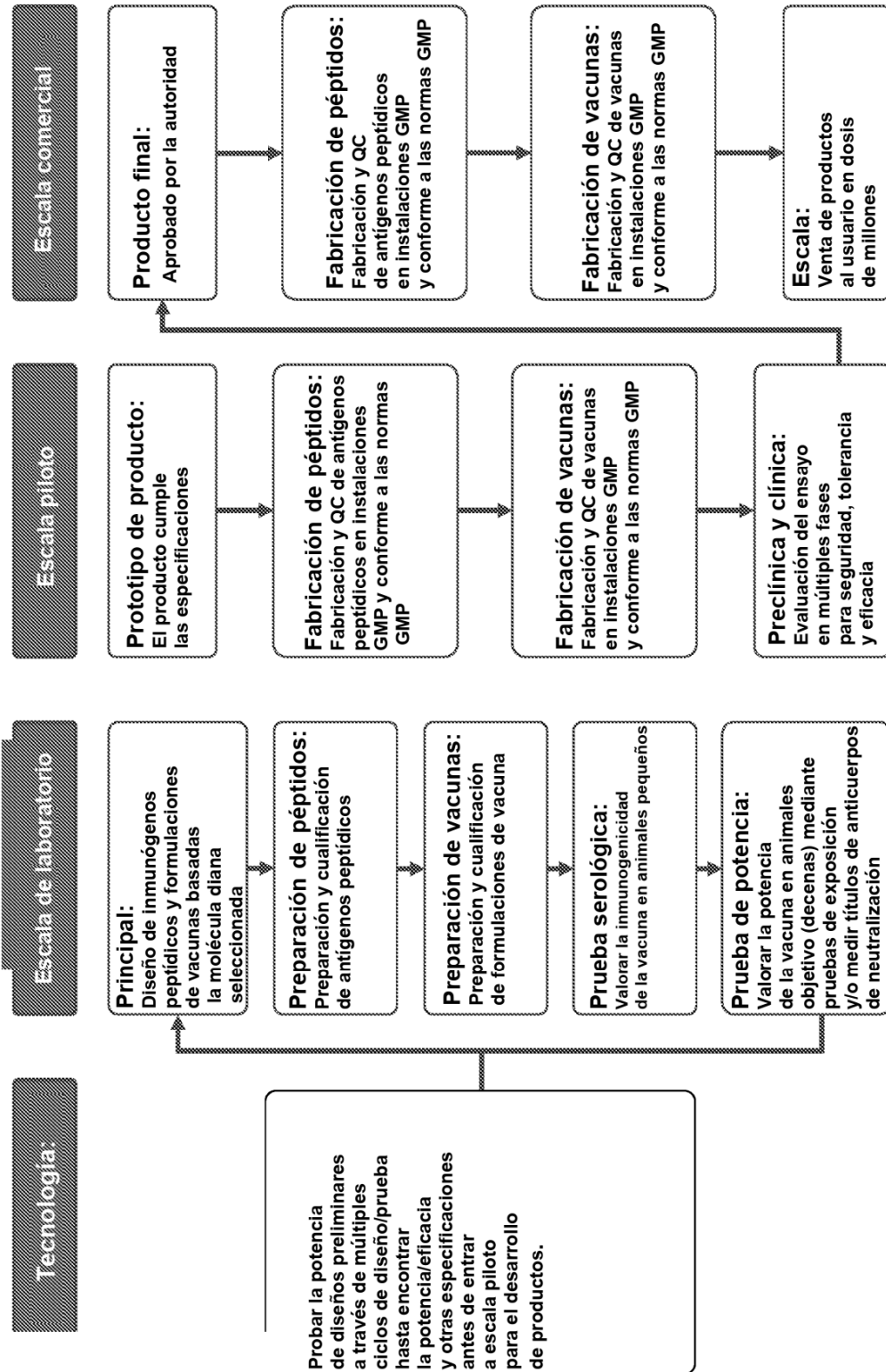


Figura 2A

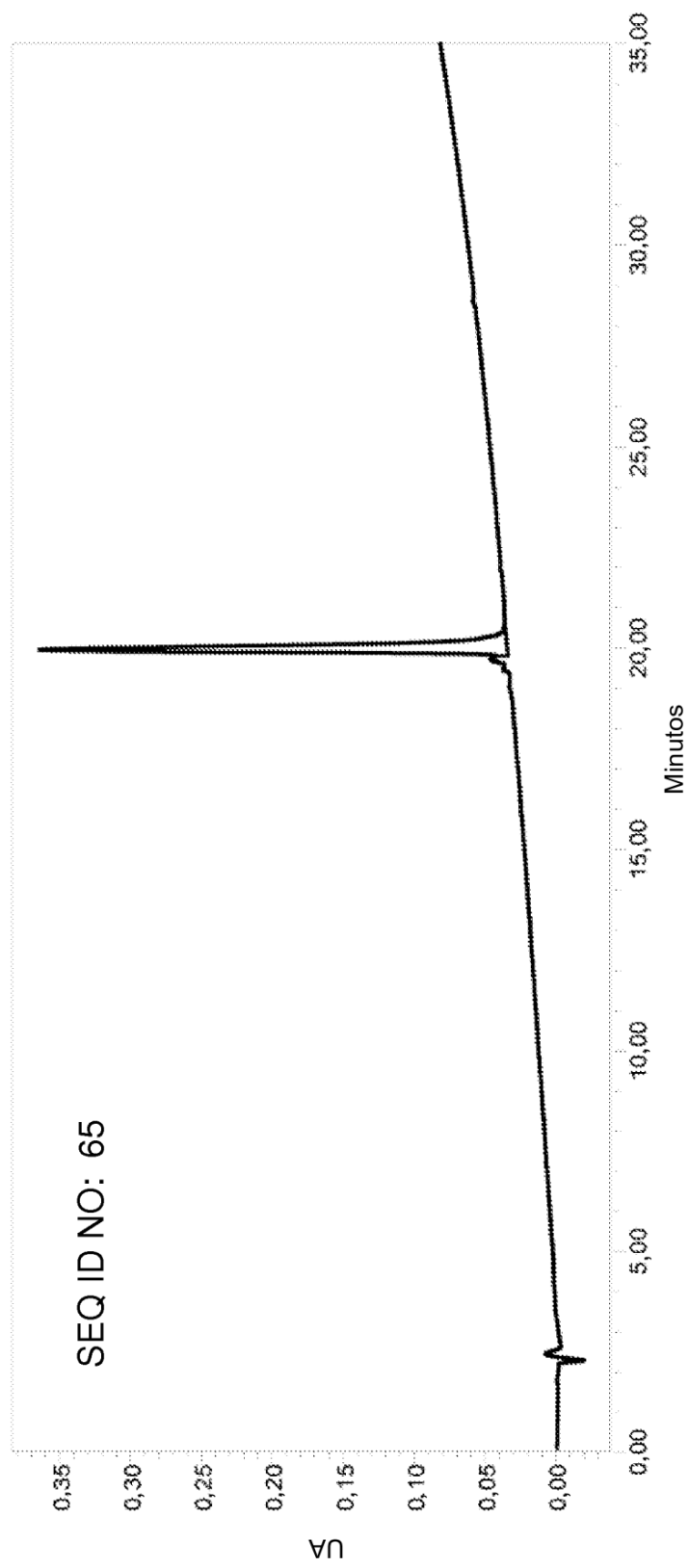


Figura 2B

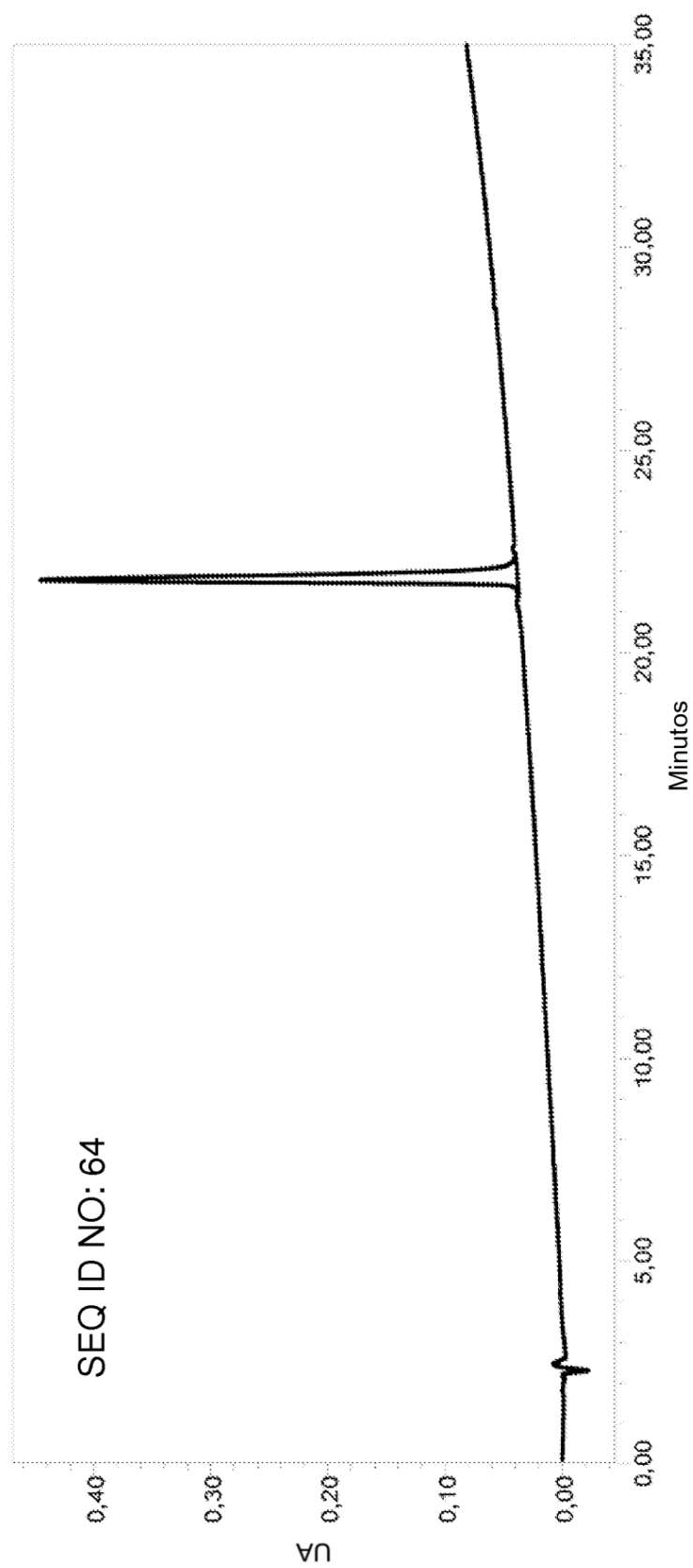


Figura 2C

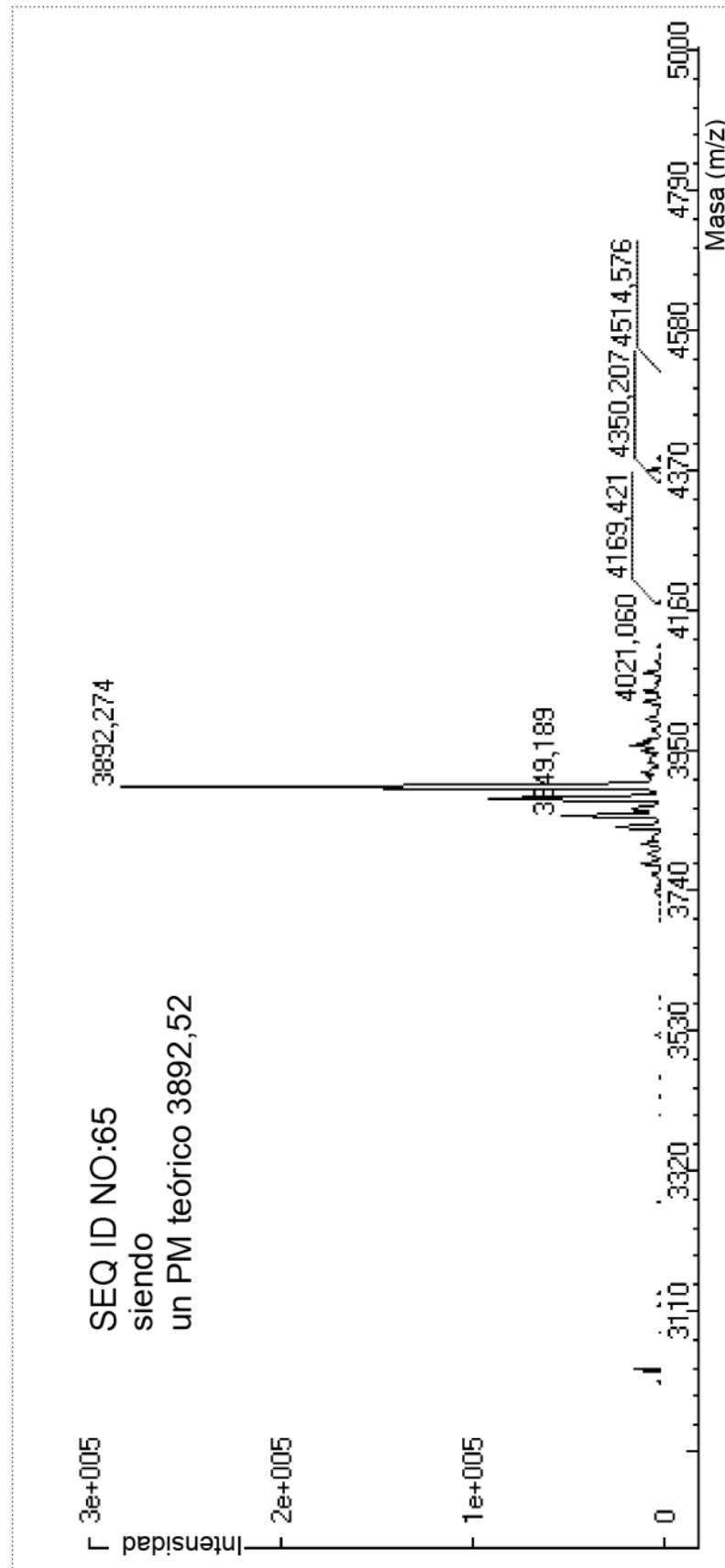


Figura 2D

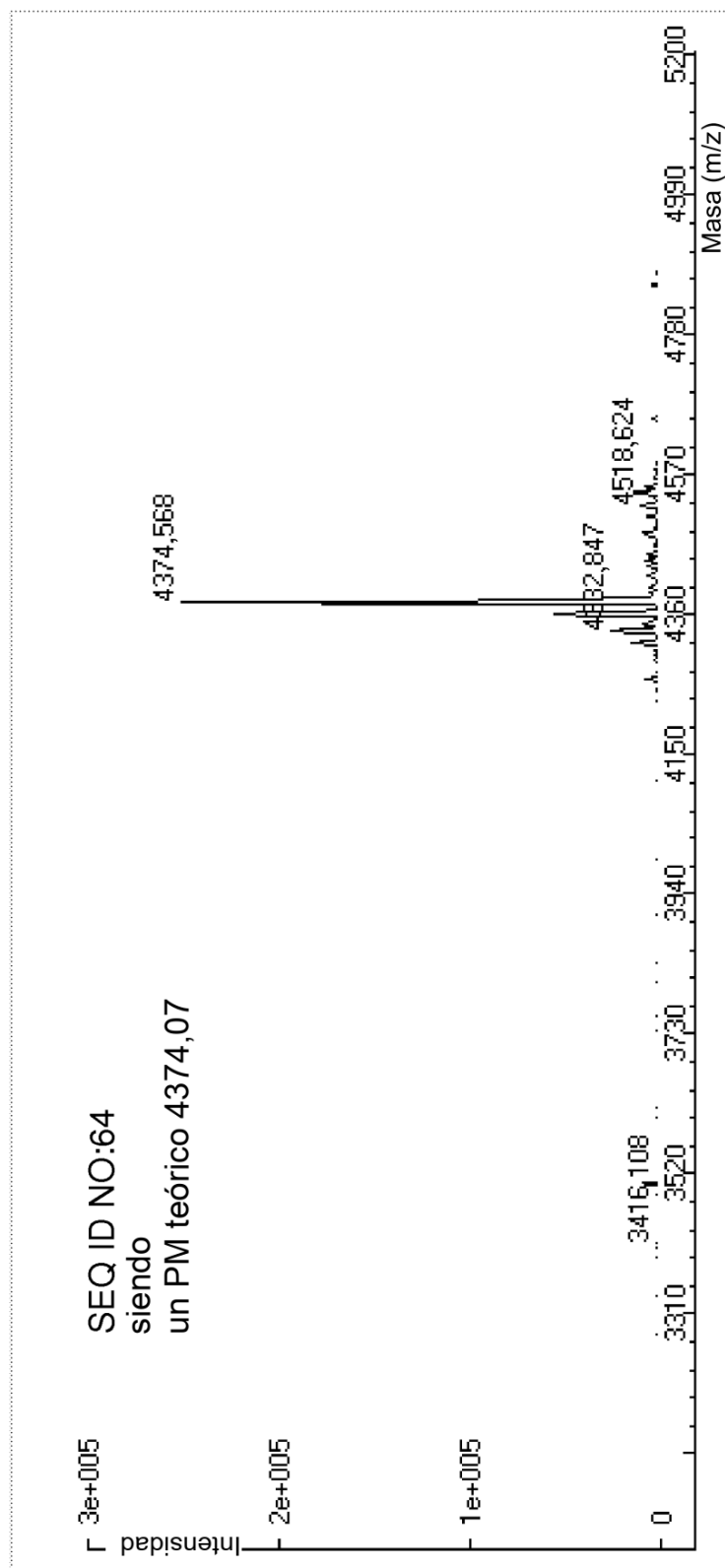


Figura 2E

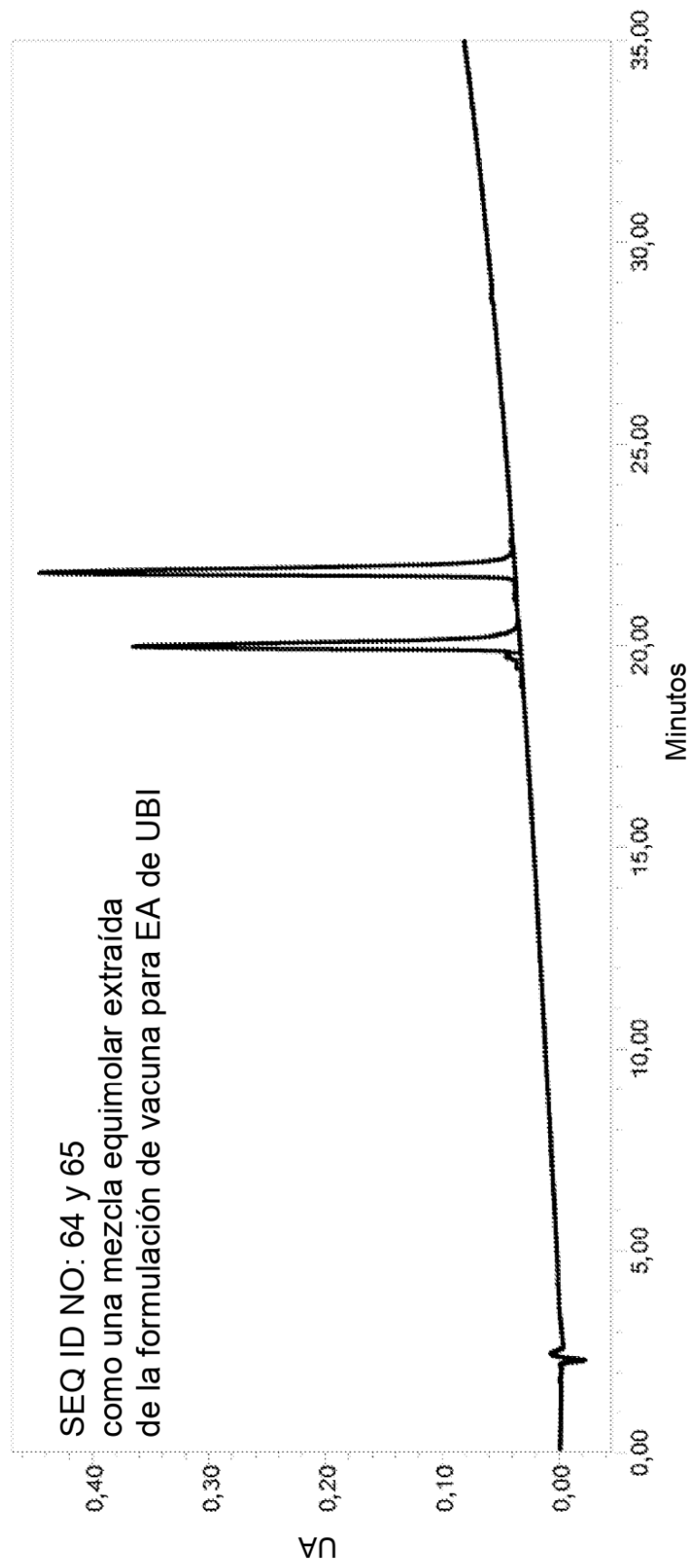


Figura 3A

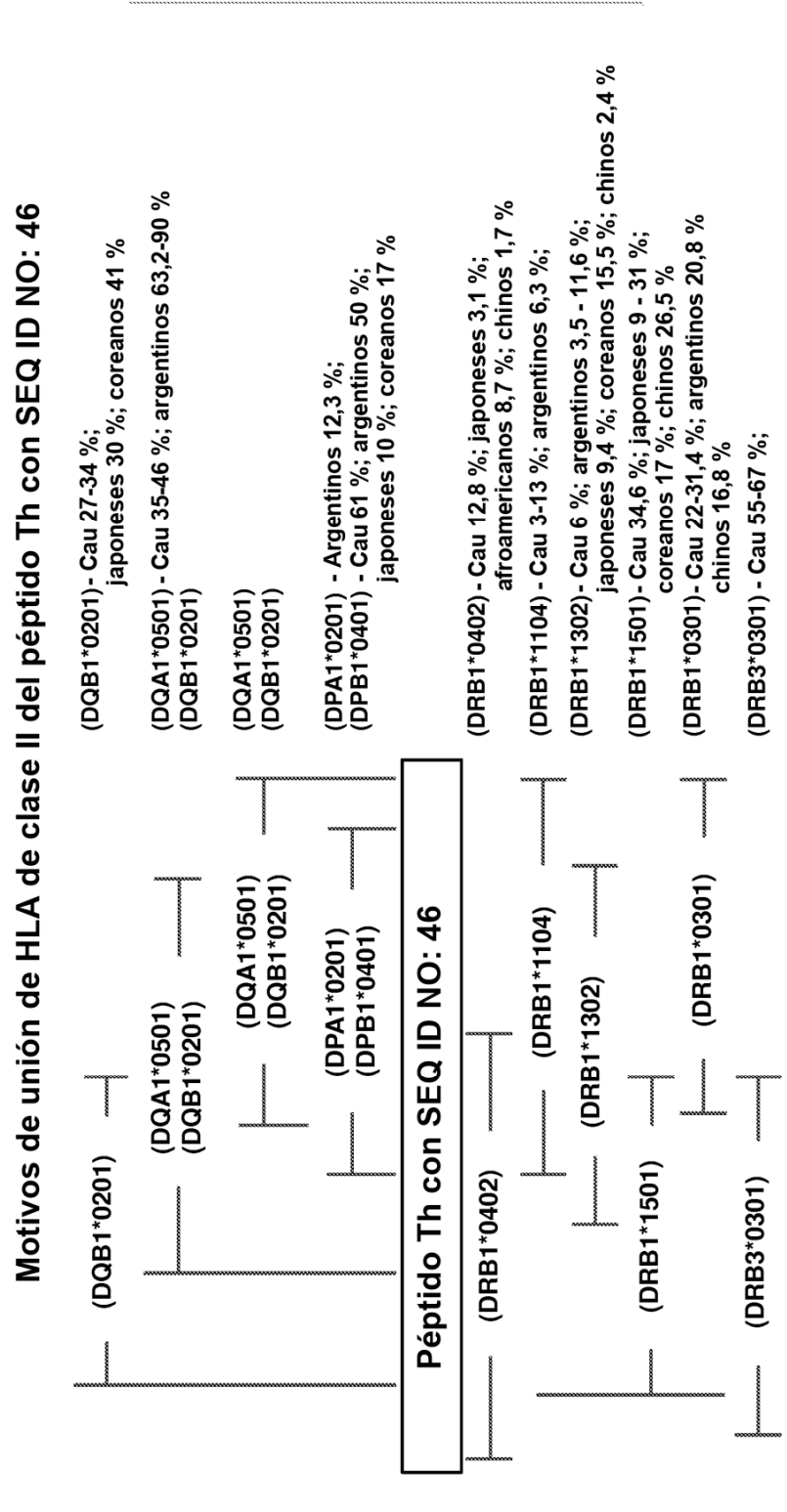


Figura 3B

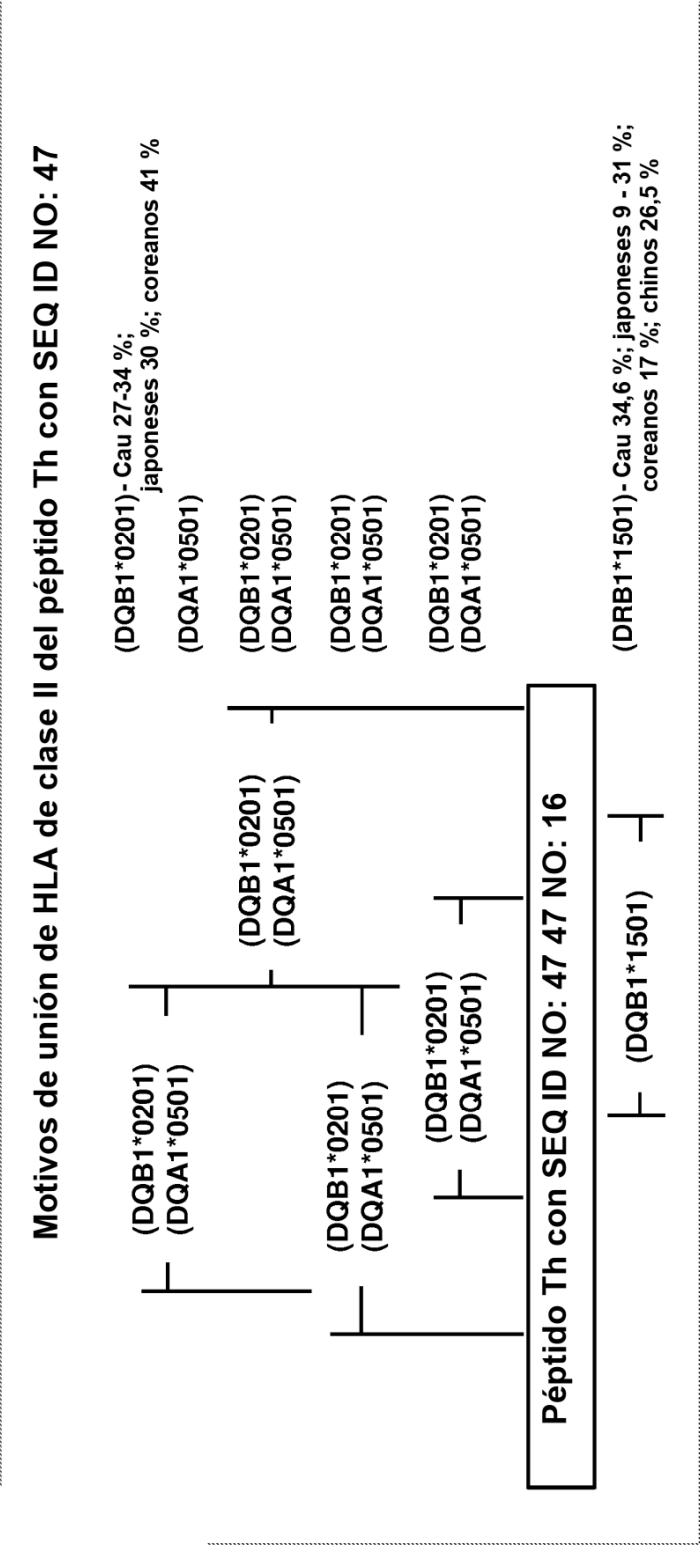


Figura 4

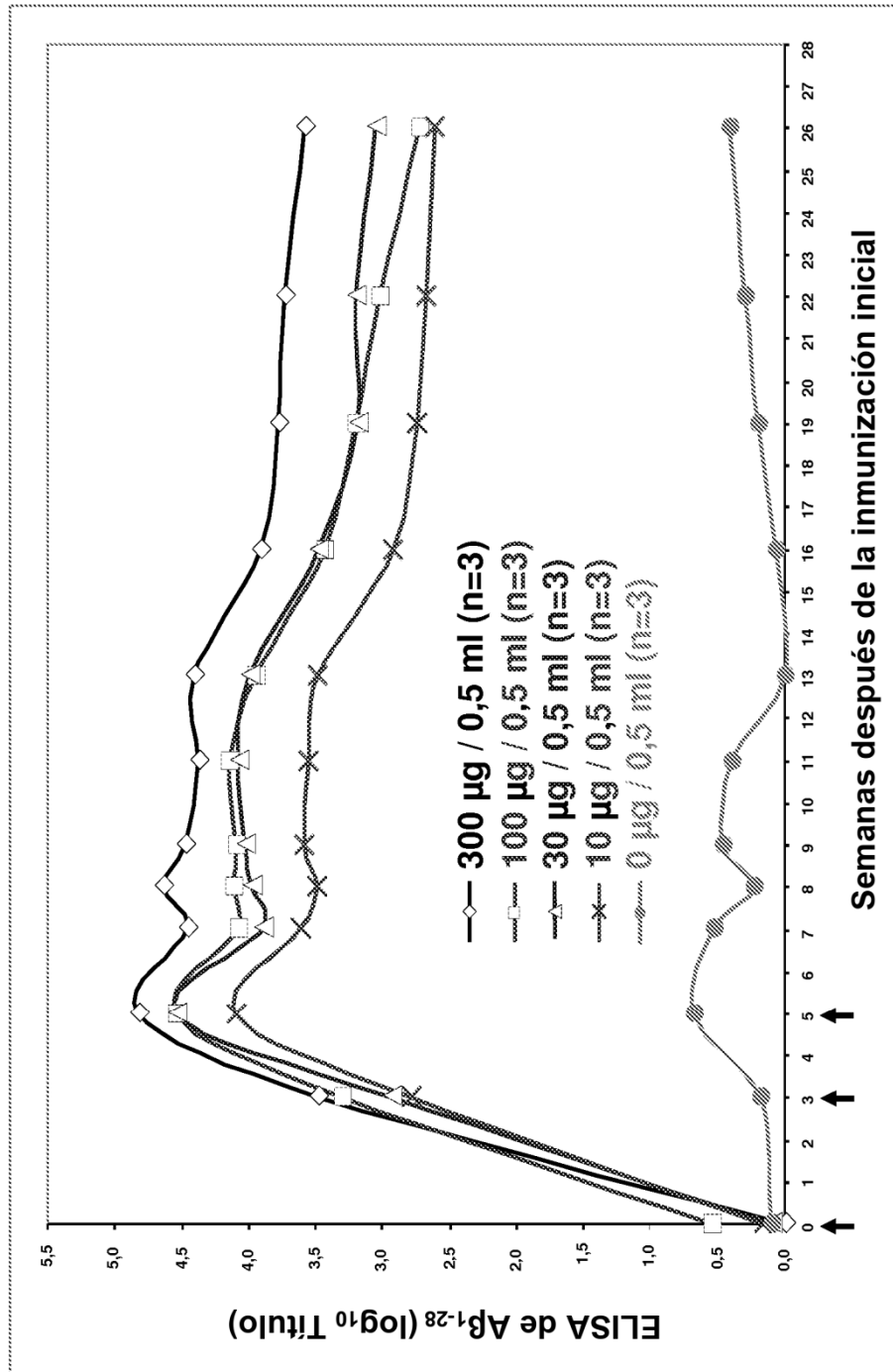


Figura 5A

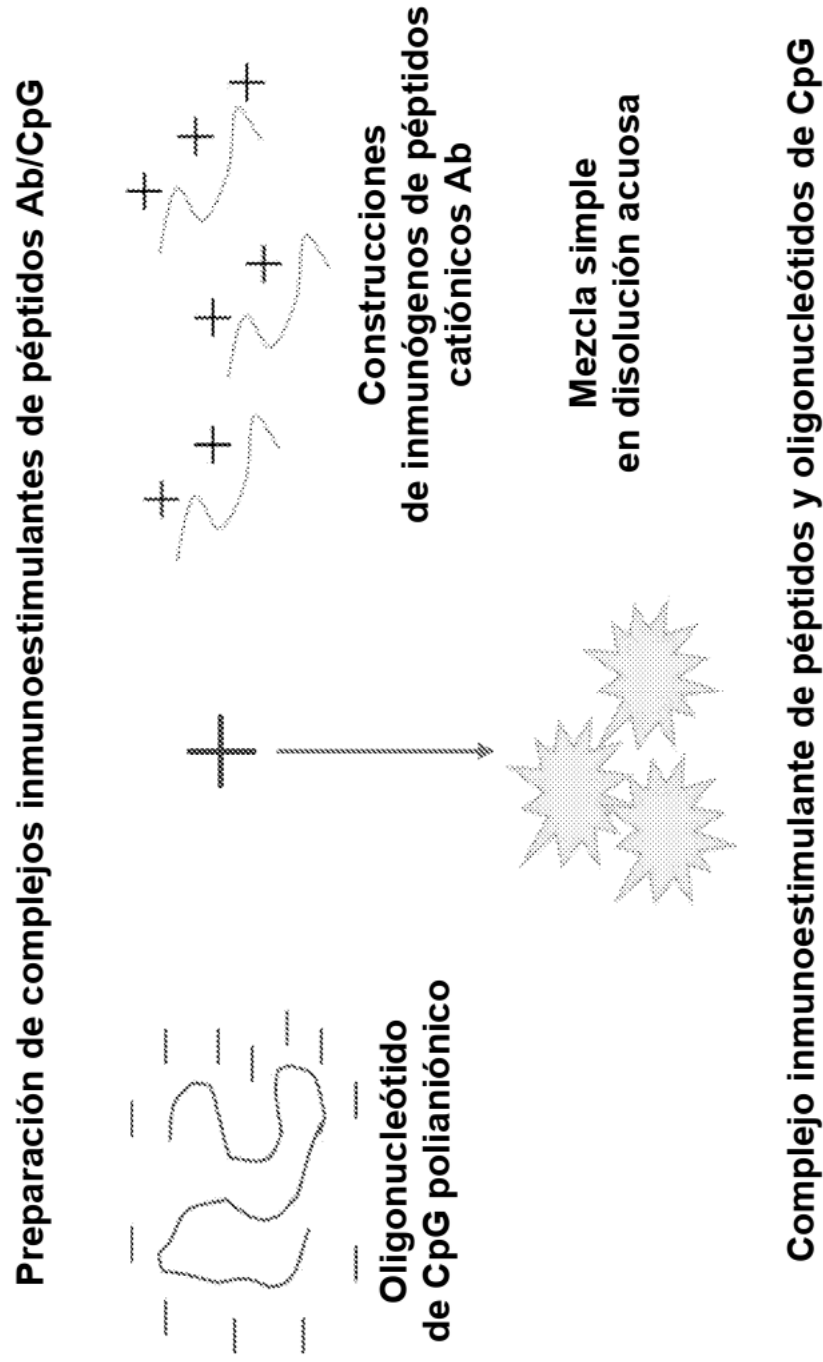


Figura 5B

Preparación de suspensiones de vacuna basadas en sales minerales

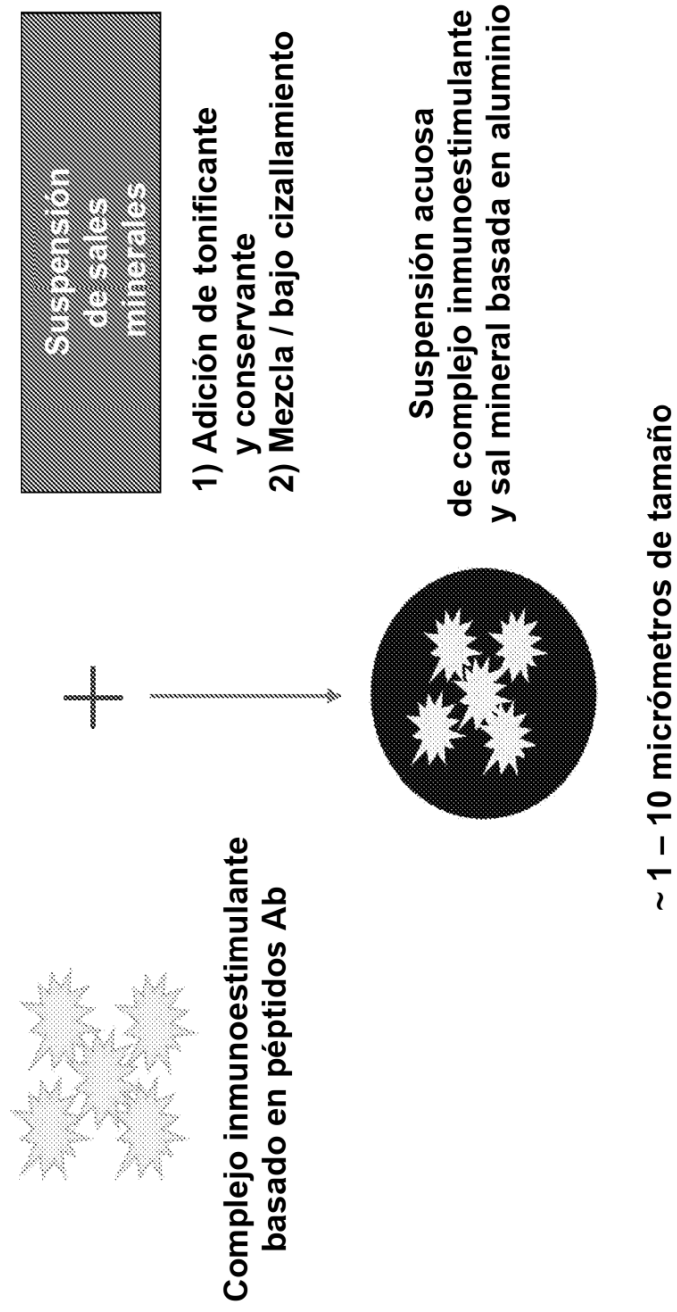
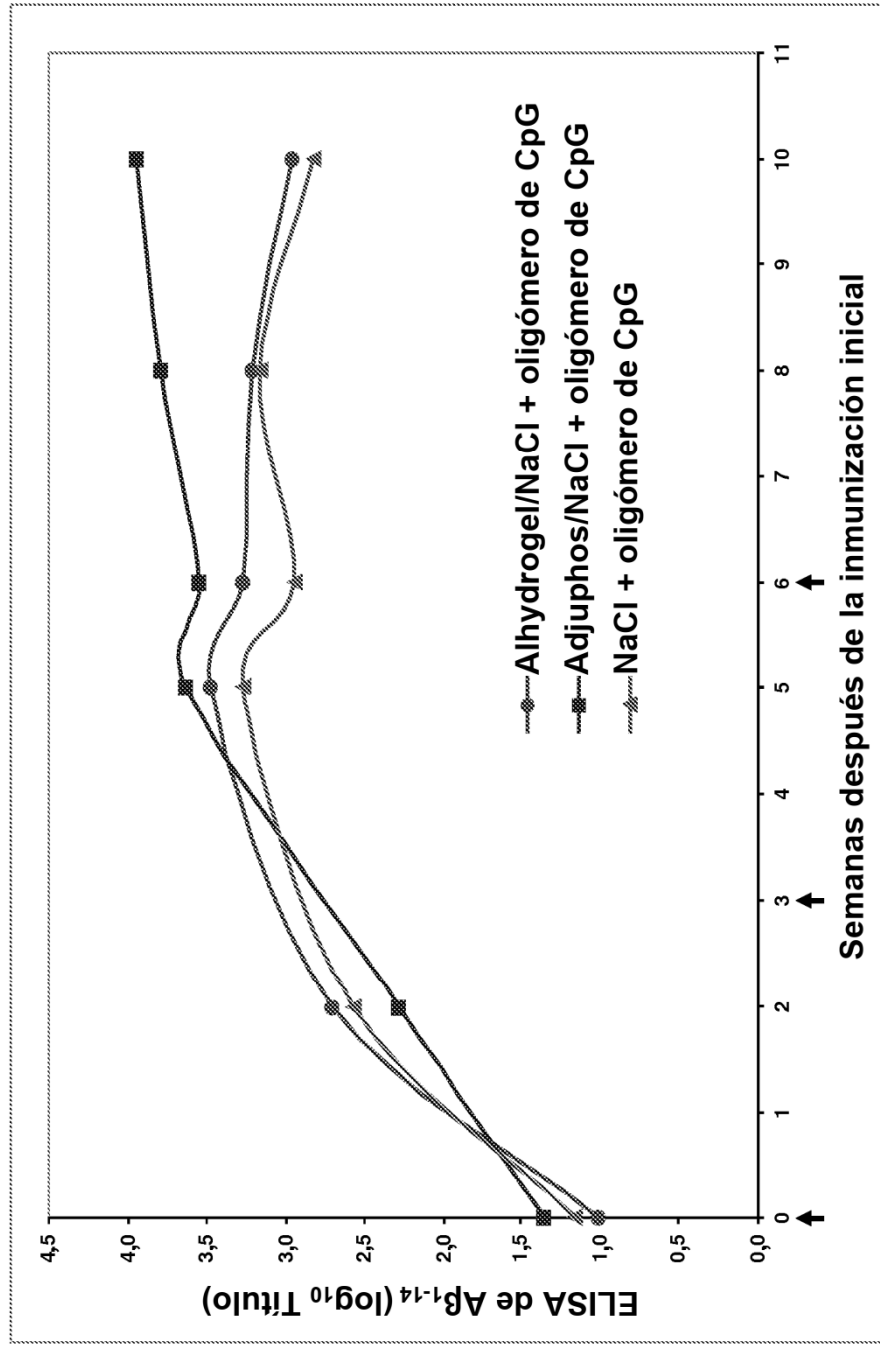
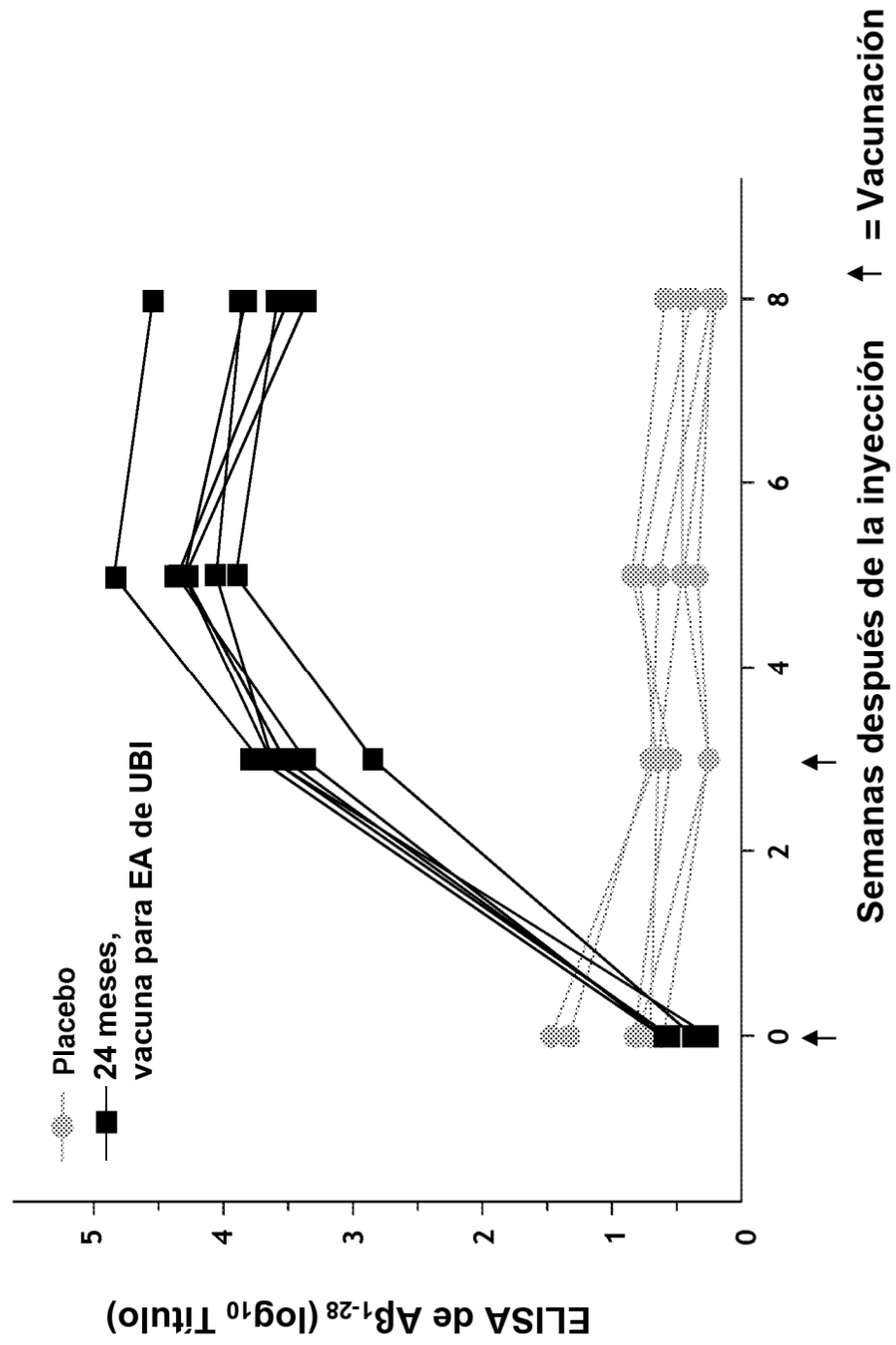


Figura 6



↑: Inmunización con 300 µg/0,5 ml/dosis de formulaciones de vacuna que comprenden construcciones de péptidos derivados de Aβ₁₋₁₄ con SEQ ID NO: 64 y 65

Figura 7



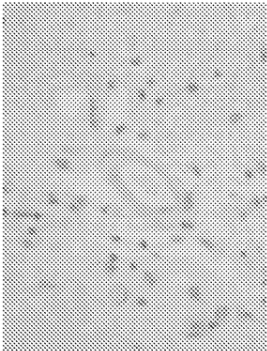
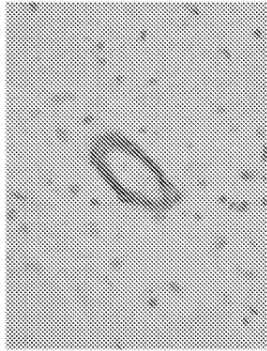
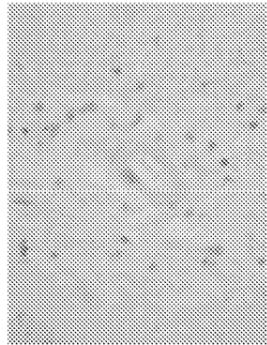
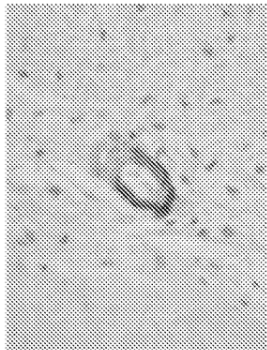
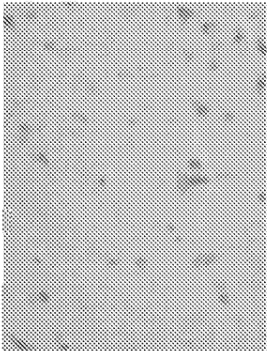
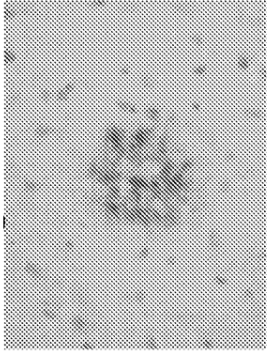
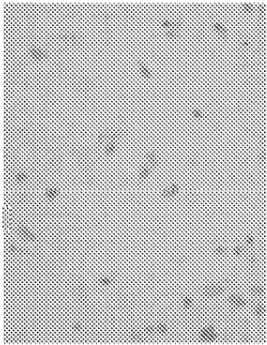
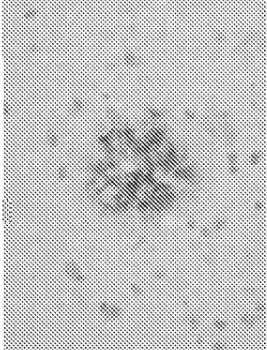
Vasos cerebrales	 Preimmune 400x	 IgG anti-Aβ 400x	 IgG anti-Aβ + péptido Aβ ₁₋₁₄ 400x	 IgG anti-Aβ péptido no relevante 400x
	Figura 8A	Figura 8B	Figura 8C	Figura 8D
Placas amiloides	 Preimmune 400x	 IgG anti-Aβ 400x	 IgG anti-Aβ + péptido Aβ ₁₋₁₄ 400x	 IgG anti-Aβ péptido no relevante 400x
	Figura 8E	Figura 8F	Figura 8G	Figura 8H

Figura 9

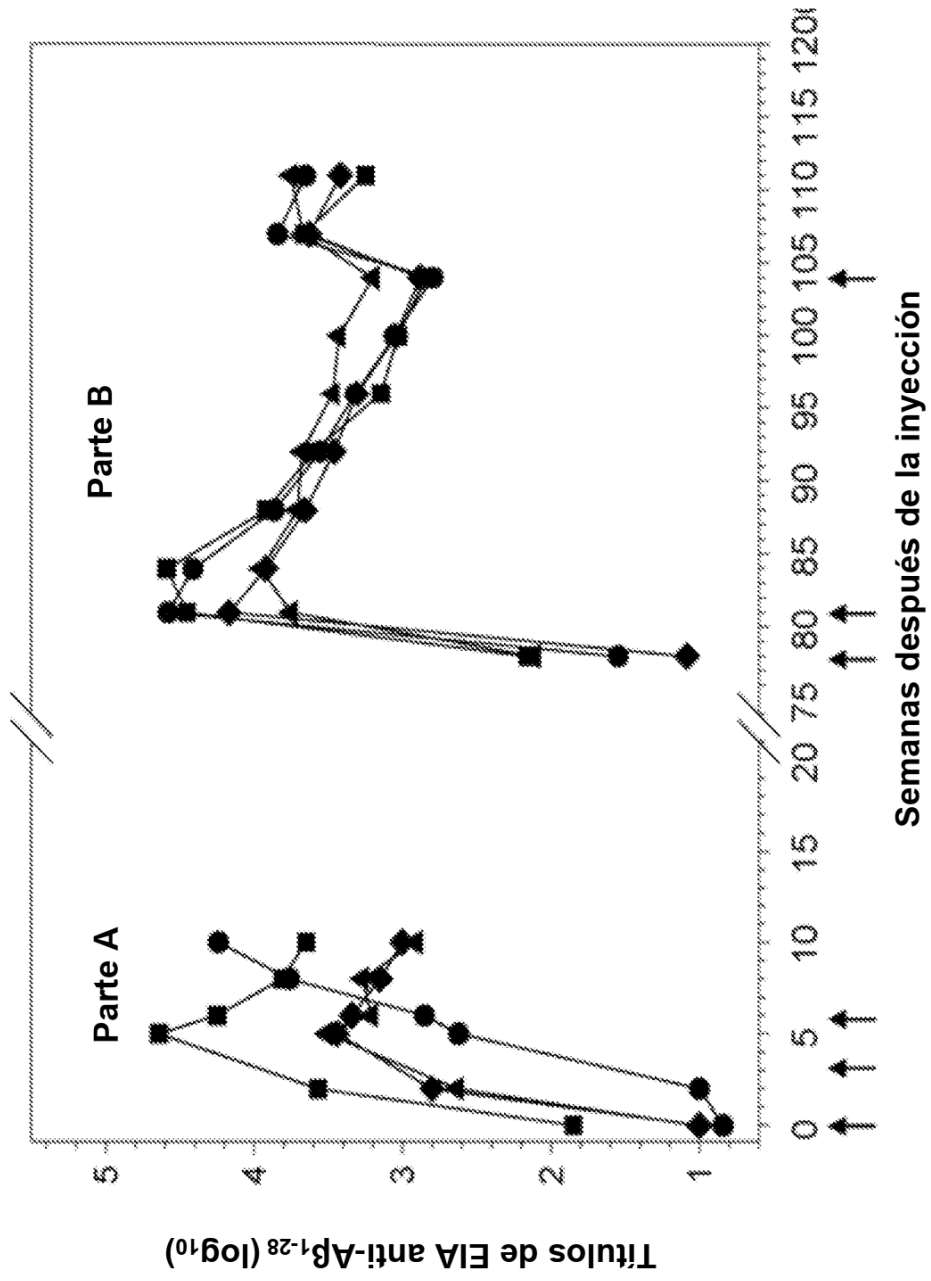


Figura 10A

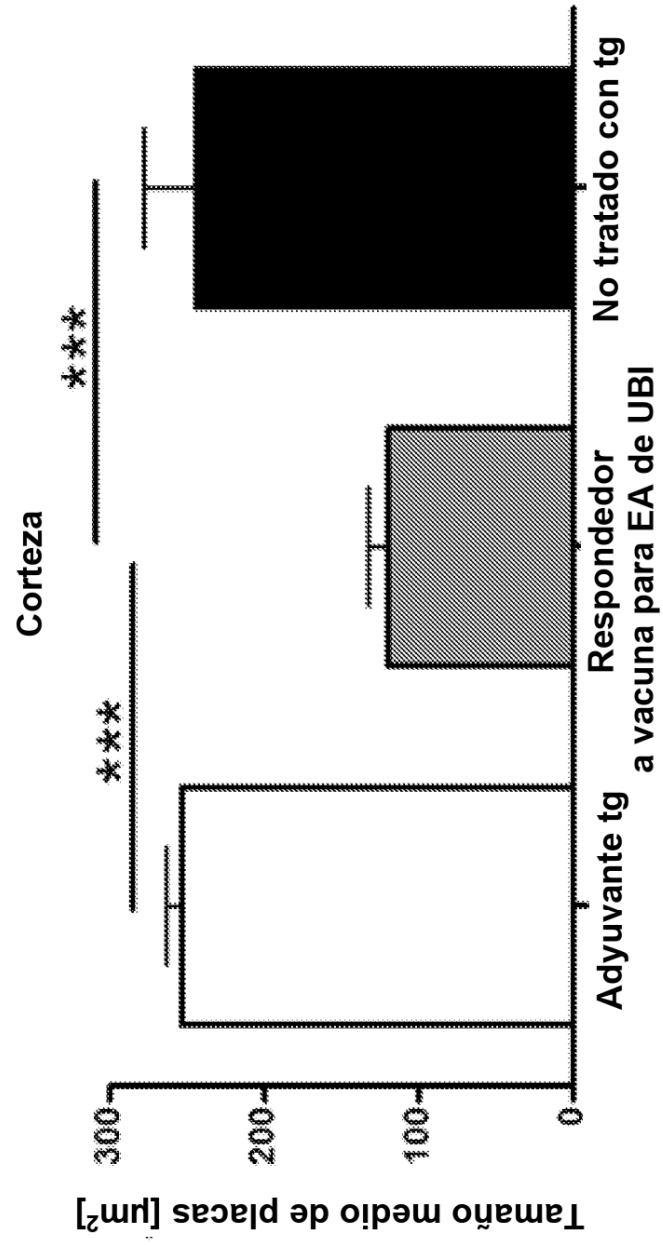


Figura 10B

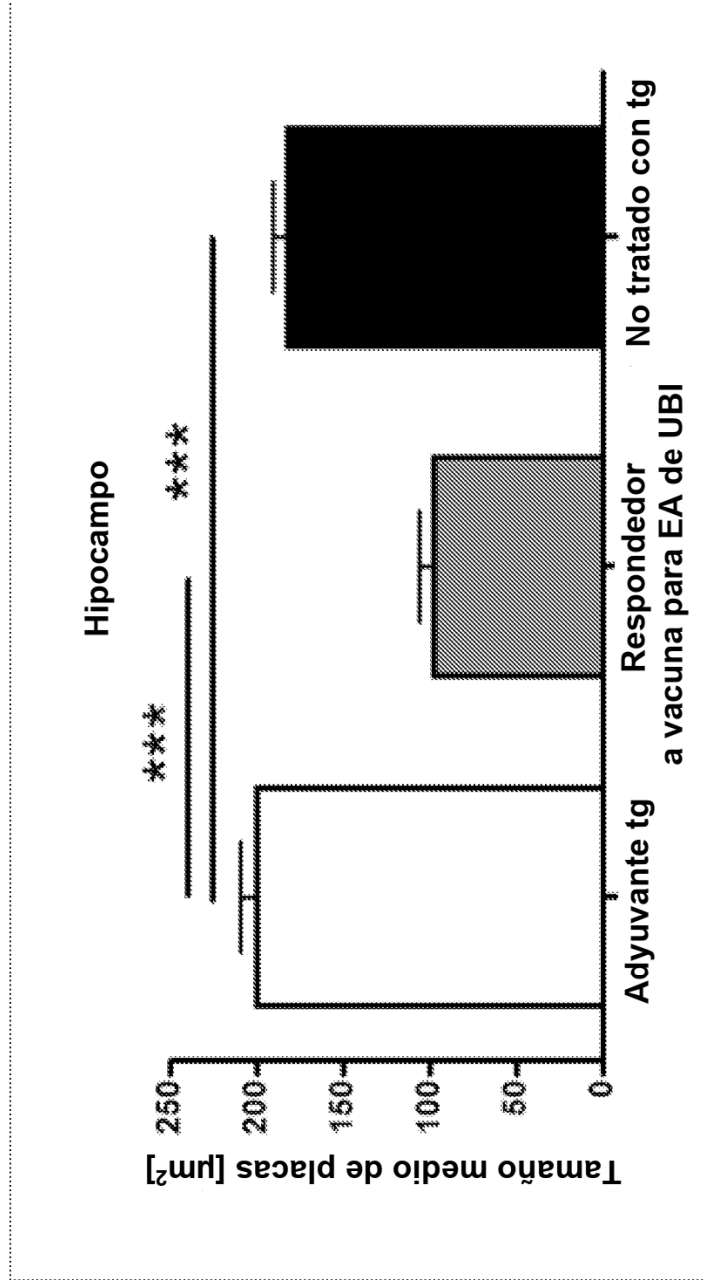


Figura 11A

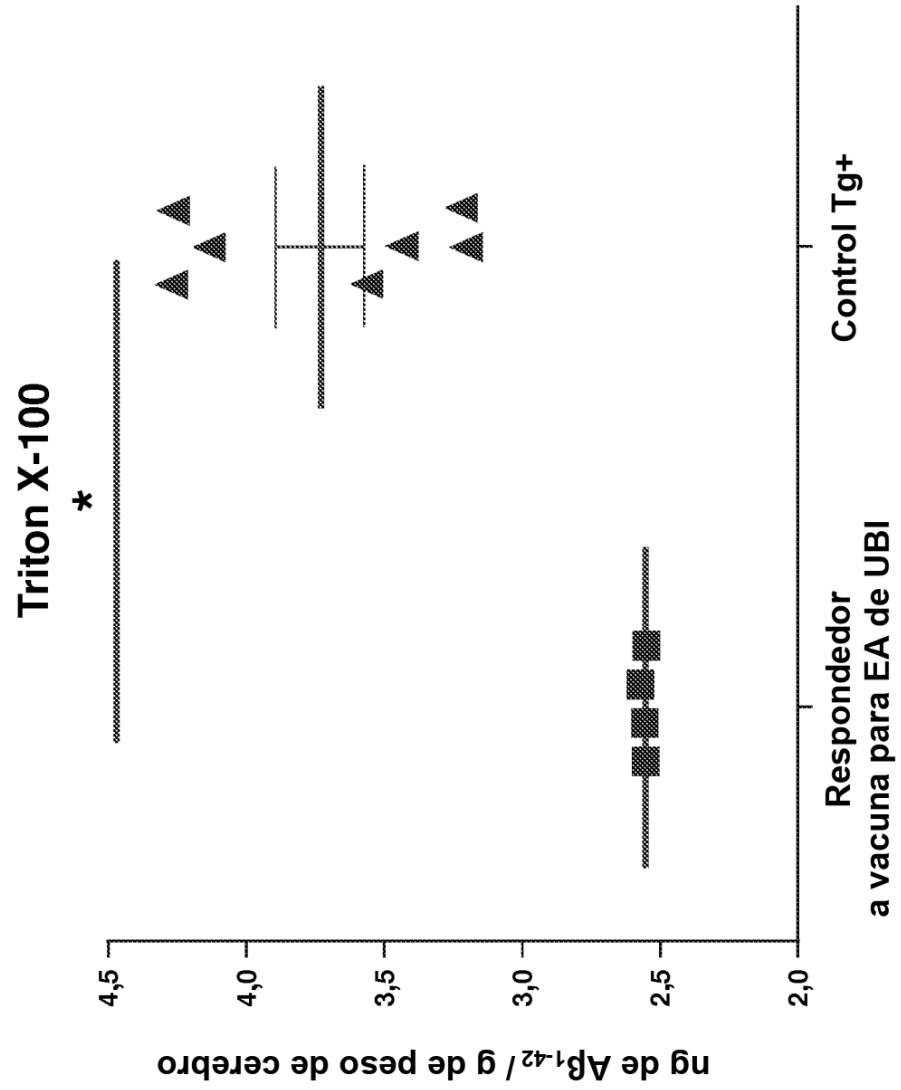


Figura 11B

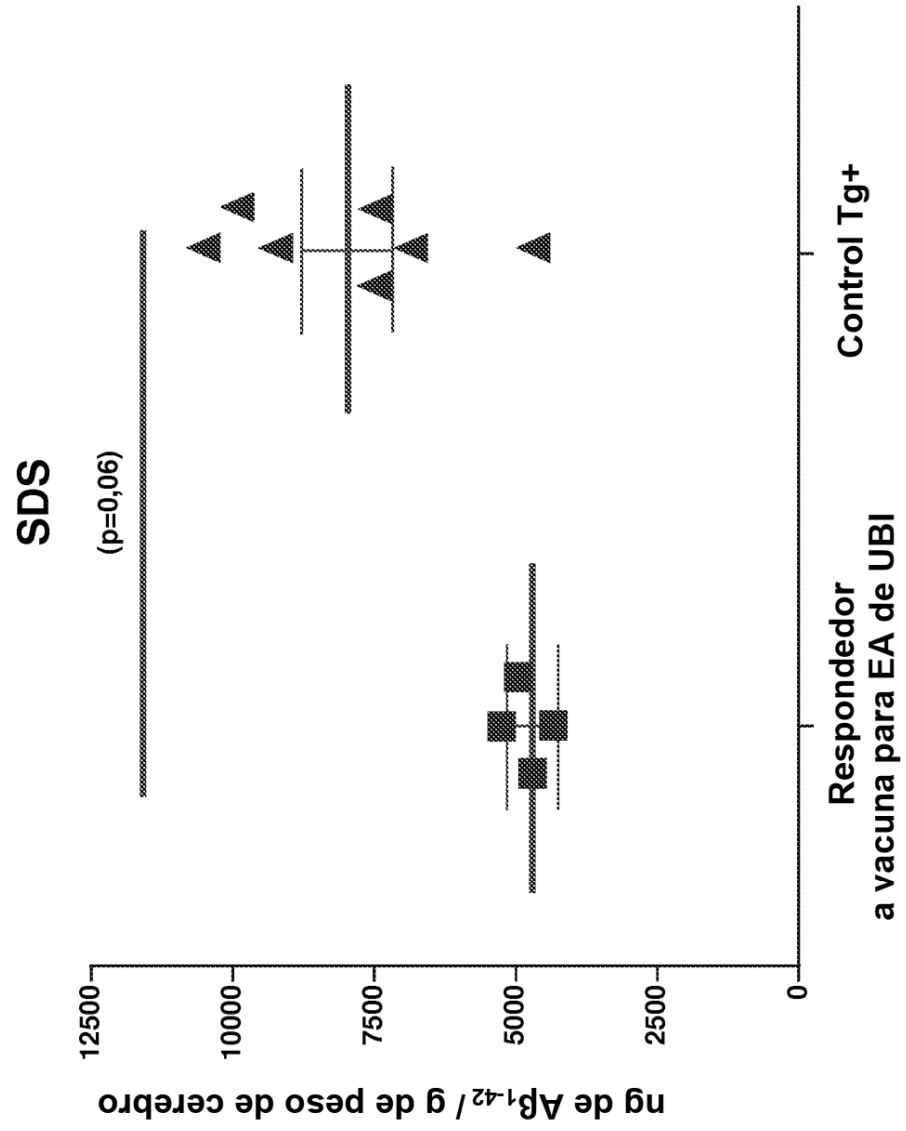


Figura 12

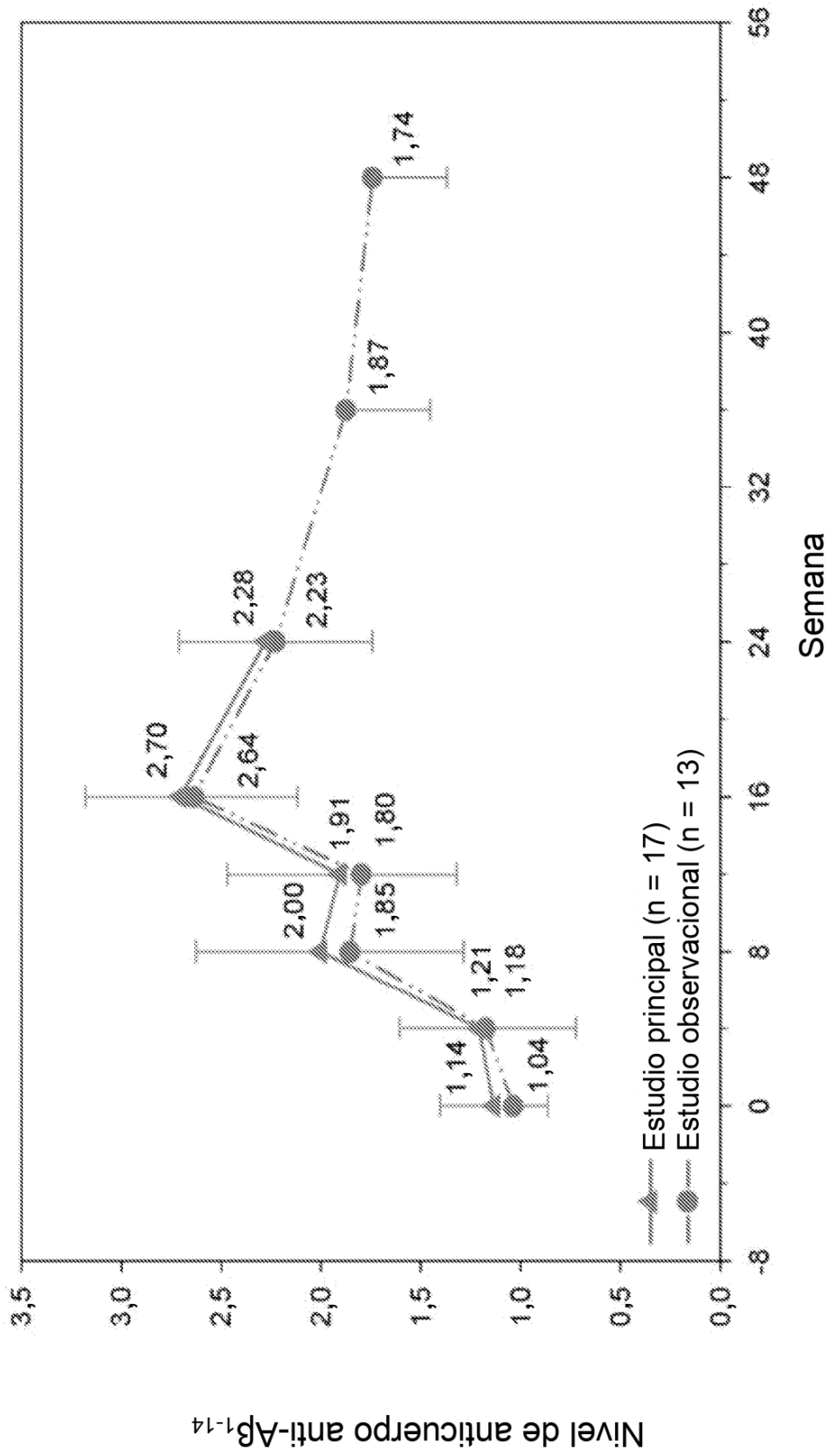


Figura 13

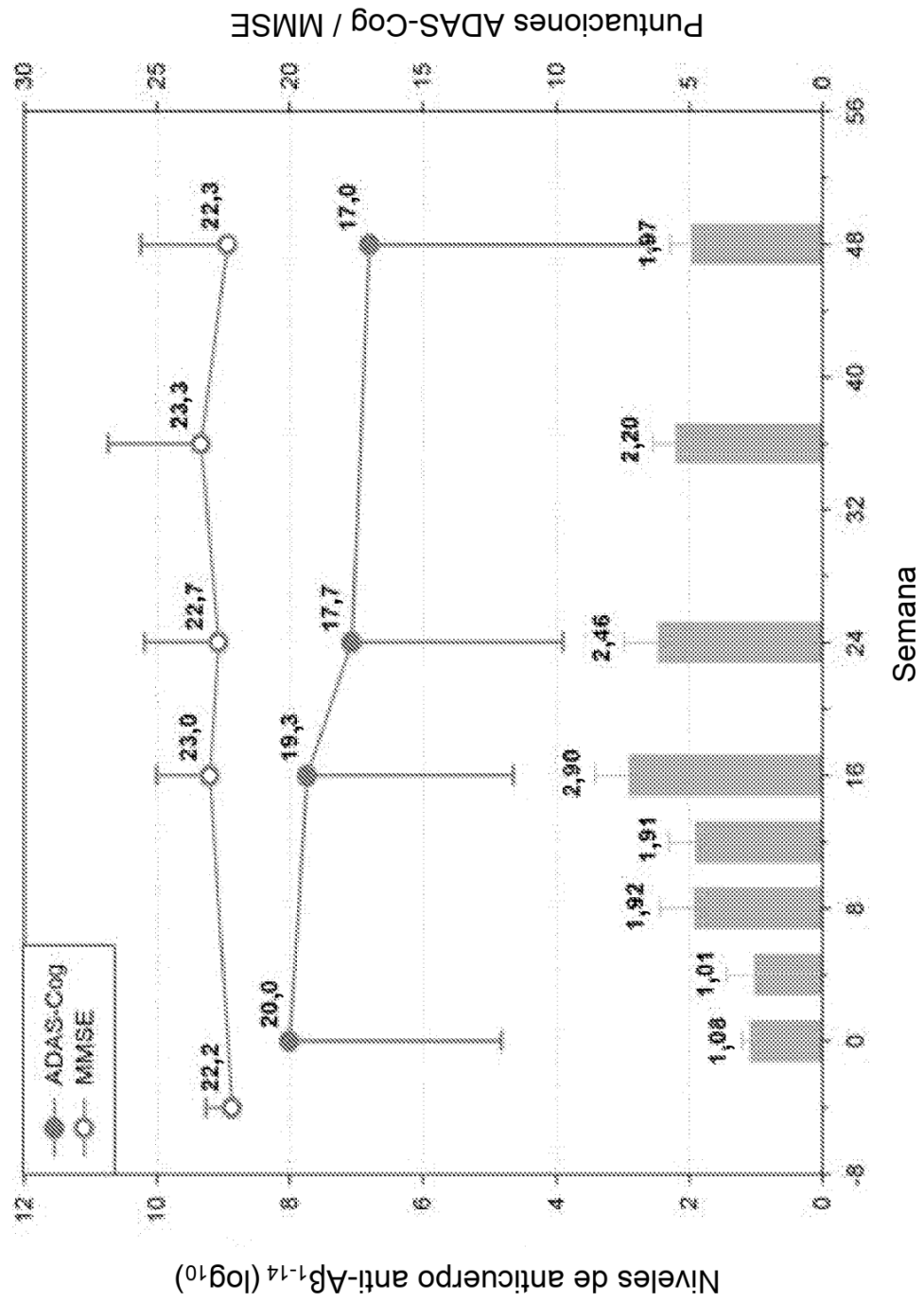


Figura 14

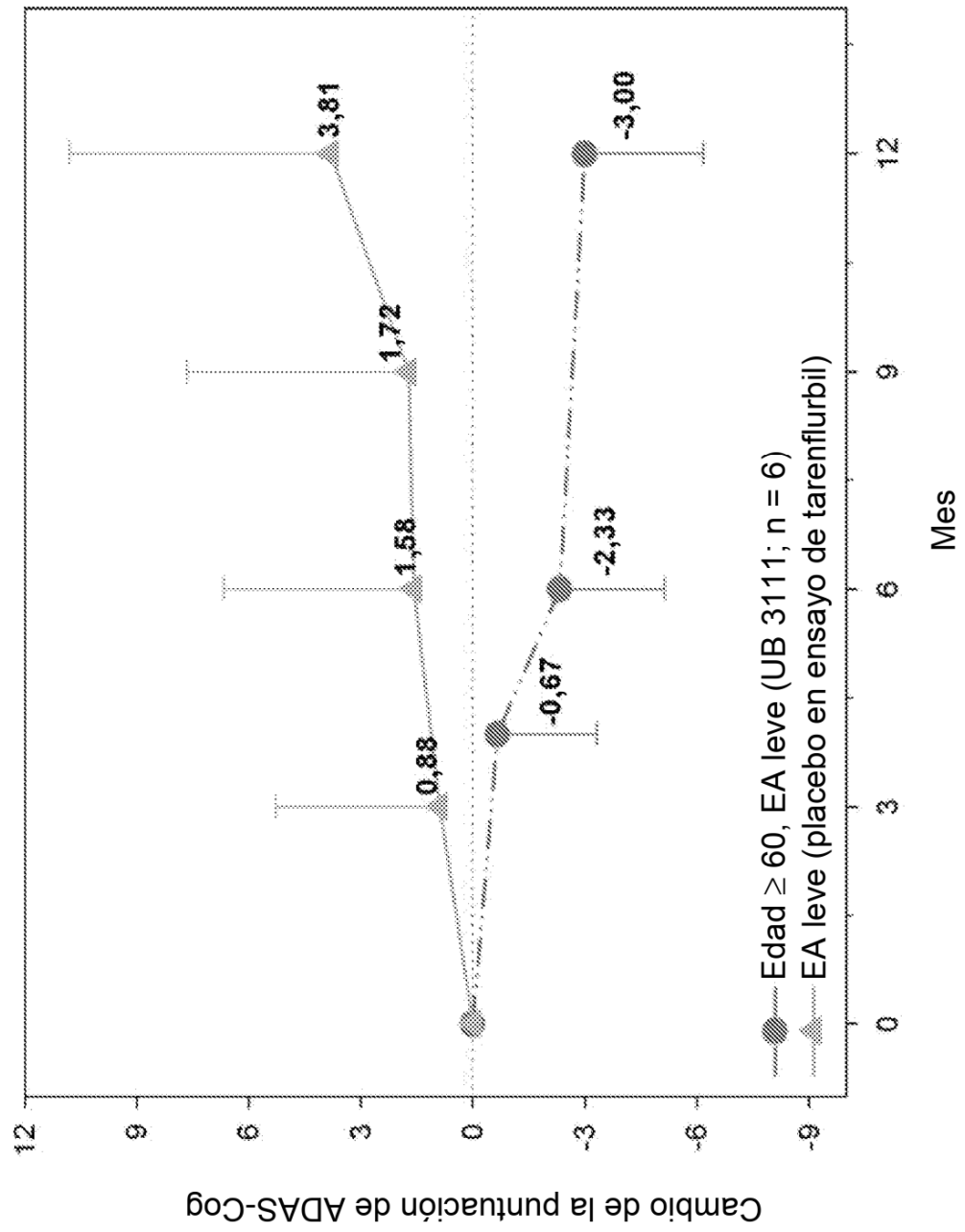


Figura 15A

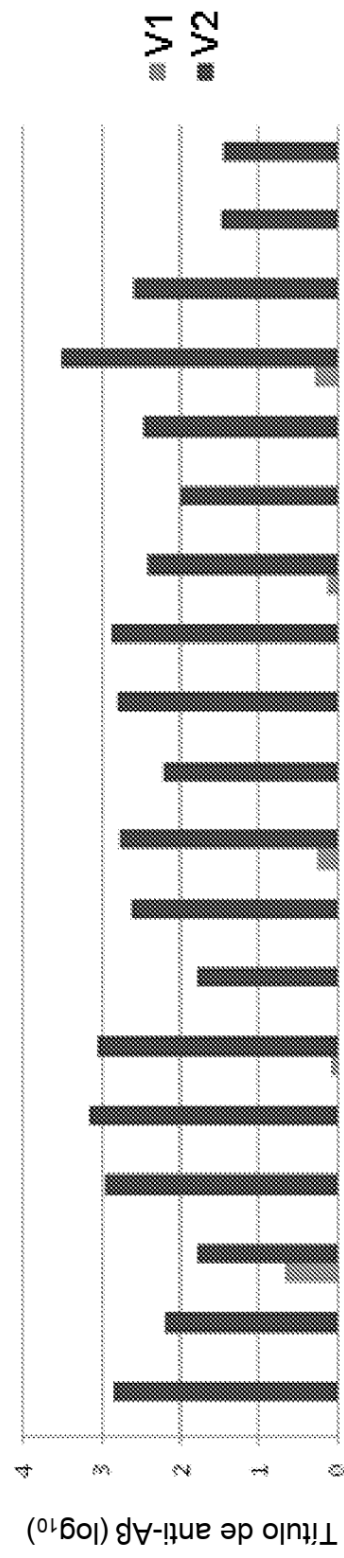


Figura 15B

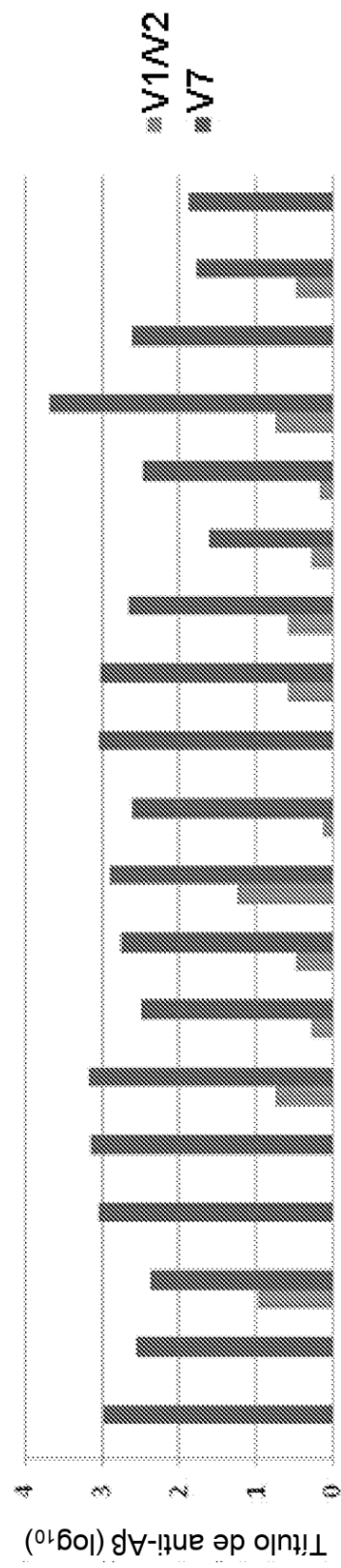


Figura 15C

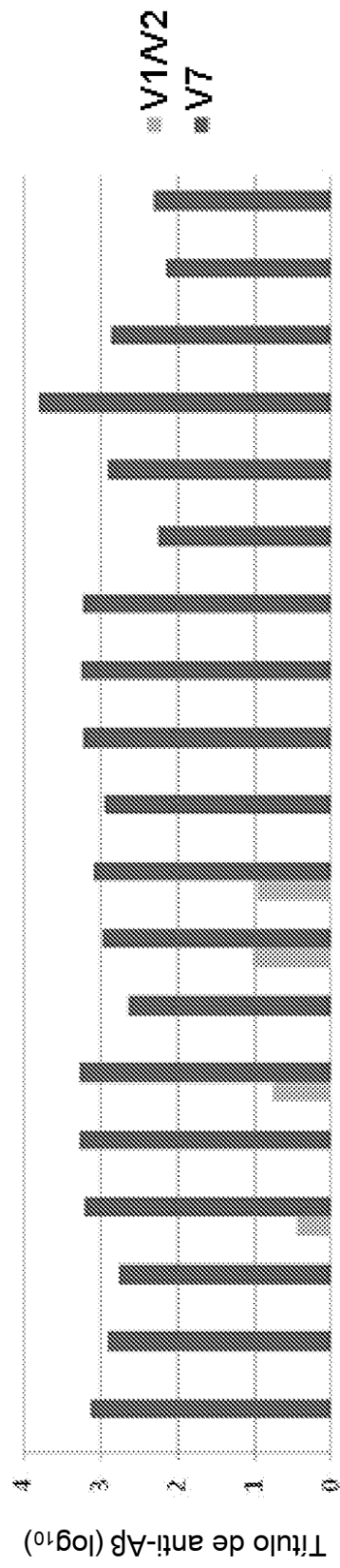


Figura 16

