

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0619747-7 A2**

(22) Data de Depósito: 08/12/2006
(43) Data da Publicação: 18/10/2011
(RPI 2128)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/00
A61P 25/28
C07K 16/18

(54) Título: MÉTODO PARA PRODUZIR UMA COMPOSIÇÃO DE VACINA TERAPÊUTICA, CONSTRUTO ANTIGÊNICO, COMPOSIÇÃO DE VACINA, USOS DE UM FRAGMENTO DE PEPTÍDEO ANTIGÊNICO ABETA, DE UM ANTÍGENO DE PEPTÍDEO ABETA OU UM CONSTRUTO ANTIGÊNICO, MÉTODOS PARA TRATAR UM CONDIÇÃO OU DOENÇA ASSOCIADA COM AMILÓIDE, PARA SIGNIFICATIVAMENTE AUMENTAR A RETENÇÃO OU CAPACIDADE DE MEMÓRIA COGNITIVA DE UM MAMÍFERO, PARA INDUZIR UMA RESPOSTA IMUNE EM UM ANIMAL, PARA PREPARAR E PRODUZIR UM MEDICAMENTO PARA O TRATAMENTO DE UMA CONDIÇÃO OU DOENÇA ASSOCIADA COM AMILÓIDE, E, ANTICORPO OU MISTURA DE ANTICORPOS

(30) Prioridade Unionista: 12/12/2005 EP 05027091.7,
02/05/2006 EP 06009098.2, 02/05/2006 EP 06009098.2

(73) Titular(es): Ac Immune Sa

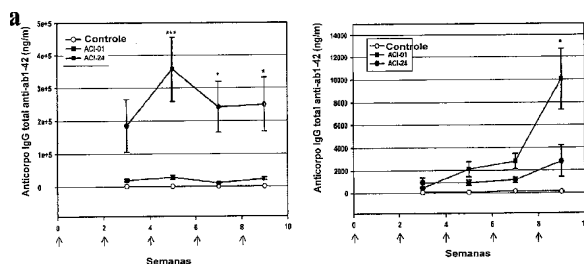
(72) Inventor(es): Andrea Pfeifer, Claude Nicolau

(74) Procurador(es): MOMSEN, LEONARDOS & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006011861 de
08/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/068411 de
21/06/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA PRODUZIR UMA COMPOSIÇÃO DE VACINA TERAPÊUTICA, CONSTRUTO ANTIGÊNICO, COMPOSIÇÃO DE VACINA, USOS DE UM FRAGMENTO DE PEPTÍDEO ANTIGÊNICO ABETA, DE UM ANTÍGENO DE PEPTÍDEO ABETA OU UM CONSTRUTO ANTIGÊNICO, MÉTODOS PARA TRATAR UMA CONDIÇÃO OU DOENÇA ASSOCIADA COM AMILÓIDE, PARA SIGNIFICATIVAMENTE AUMENTAR A RETENÇÃO OU CAPACIDADE DE MEMÓRIA COGNITIVA DE UM MAMÍFERO, PARA INDUZIR UMA RESPOSTA IMUNE EM UM ANIMAL, PARA PREPARAR E PRODUZIR UM MEDICAMENTO PARA O TRATAMENTO DE UMA CONDIÇÃO OU DOENÇA ASSOCIADA COM AMILÓIDE, E, ANTICORPO OU MISTURA DE ANTICORPOS. A presente invenção refere-se aos métodos e às composições para o uso diagnóstico e terapêutico no tratamento de doenças e de distúrbios que são causados por ou estão associados com proteínas amilóide ou tipo-amilóide incluindo amiloidose. Em particular, a presente invenção proporciona novos métodos e composições para gerar uma resposta imune elevadamente específica e elevadamente efetiva em um organismo, mas particularmente dentro de um animal, particularmente um mamífero ou um humano, que é capaz de prevenir ou de aliviar amiloidose, ou os sintomas associados com amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neurológicos tal como mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda de capacidade de memória cognitiva tal como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI).



“MÉTODO PARA PRODUZIR UMA COMPOSIÇÃO DE VACINA
TERAPÊUTICA, CONSTRUTO ANTIGÊNICO, COMPOSIÇÃO DE
VACINA, USOS DE UM FRAGMENTO DE PEPTÍDEO ANTIGÊNICO
ABETA, DE UM ANTÍGENO DE PEPTÍDEO ABETA OU UM
5 CONSTRUTO ANTIGÊNICO, MÉTODOS PARA TRATAR UMA
CONDIÇÃO OU DOENÇA ASSOCIADA COM AMILÓIDE, PARA
SIGNIFICATIVAMENTE AUMENTAR A RETENÇÃO OU
CAPACIDADE DE MEMÓRIA COGNITIVA DE UM MAMÍFERO, PARA
INDUZIR UMA RESPOSTA IMUNE EM UM ANIMAL, PARA
10 PREPARAR E PRODUZIR UM MEDICAMENTO PARA O
TRATAMENTO DE UMA CONDIÇÃO OU DOENÇA ASSOCIADA COM
AMILÓIDE, E, ANTICORPO OU MISTURA DE ANTICORPOS”

A presente invenção refere-se aos métodos e às composições
para o uso diagnóstico e terapêutico no tratamento de doenças e distúrbios que
15 são causadas(os) por ou estão associados(as) com proteínas amilóides ou
proteínas tipo-amilóide incluindo amiloidose, um grupo de distúrbios e
anormalidades associados com proteína amilóide tal como Mal de Alzheimer
(AD).

Amiloidose não é uma entidade doentia individual mas em vez
20 disso um grupo diverso de processos doentios progressivos caracterizados por
depósitos de tecido extracelular de proteínas cerosas, semelhantes a amido
chamadas de amilóide, que se acumulam em um ou mais órgãos ou sistemas
do corpo. À medida que os depósitos amilóides se desenvolvem, começam a
interferir com a função normal do órgão ou sistema do corpo. Há pelo menos
25 15 tipos diferentes de amiloidose. As formas maiores são amiloidose primária
sem antecedente conhecido, amiloidose secundária após alguma outra
condição, e amiloidose hereditária.

Amiloidose secundária ocorre em pessoas que possuem uma
doença inflamatória ou infecciosa crônica, tal como tuberculose, uma

infecção bacteriana chamada de febre do mediterrâneo, infecções ósseas (osteomielite), artrite reumatóide, inflamação de intestino delgado (ileíte granulomatosa), doença de Hodgkin, e lepra.

Depósitos amilóides tipicamente contêm três componentes.

5 Fibrilas de proteína amilóide, que totalizam cerca de 90% do material amilóide, compreendem um dos vários tipos diferentes de proteínas. Estas proteínas são capazes de se dobrarem em denominadas fibrilas de folha “beta-pregueada”, uma configuração de proteína única que exhibe sítios de ligação para vermelho Congo resultando em propriedades de coloração únicas da
10 proteína amilóide. Em adição, os depósitos amilóides estão intimamente associados com o componente amilóide P (AP) (pentagonal), uma glicoproteína relacionada com amilóide P de soro (SAP) normal, e com glicosaminoglicanos (GAG) sulfatados, carboidratos complexos de tecido conjuntivo.

15 Muitas doenças de envelhecimento são baseadas em ou estão associadas com proteínas tipo-amilóide e são caracterizadas, em parte, pelo aumento de depósitos extracelulares de amilóide ou material tipo-amilóide que contribuem para a patogênese, bem como a progressão da doença. Estas doenças incluem, mas não são limitadas a, distúrbios neuronais tais como Mal
20 de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam. Outras doenças que são baseadas
25 em ou estão associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeldt Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular.

Embora a patogênese destas doenças possa ser diversa, seus depósitos característicos muitas vezes contêm muitos constituintes moleculares compartilhados. Em um grau significativo, isto pode ser atribuível à ativação local de rotas pró-inflamatórias levando deste modo à deposição concorrente de componentes de complemento ativados, reagentes de fase aguda, moduladores imunes, e outros mediadores inflamatórios (McGeer et al., 1994).

Mal de Alzheimer (AD) é um distúrbio neurológico primariamente considerado em ser causado por placas amilóides, um acúmulo de depósito anormal de proteínas no cérebro. O tipo mais freqüente de amilóide verificado no cérebro de indivíduos afetados é composto primariamente de fibrilas A β . Evidência científica demonstra que um aumento na produção e no acúmulo de proteína beta-amilóide em placas leva à morte de célula nervosa, que contribui para o desenvolvimento e a progressão do Mal de Alzheimer. Perda de células nervosas em áreas cerebrais estratégicas, por sua vez, causa redução nos neurotransmissores e debilitação da memória. As proteínas principalmente responsáveis pelo desenvolvimento de placa incluem proteína precursora de amilóide (APP) e duas presenilinas (presenilina I e presenilina II). Clivagem seqüencial da proteína precursora de amilóide (APP), que é constitutivamente expressada e catabolizada na maioria das células, pelas enzimas β e γ secretases leva à liberação de um peptídeo A β de 39 a 43 aminoácidos. A degradação de APPS provavelmente aumenta sua propensão para se agregar em placas. É especialmente o fragmento A β (1-42) que possui uma propensão alta para desenvolver agregados devido aos dois resíduos de aminoácido muito hidrofóbicos em sua terminação-C. Portanto é crido que o fragmento A β (1-42) está principalmente envolvido e é responsável pela iniciação de formação de placa neurotrítica em Mal de Alzheimer e possui, portanto, um potencial patológico alto. Portanto há uma necessidade de anticorpos específicos que

podem selecionar e difundir a formação de placa amilóide.

Os sintomas de Mal de Alzheimer manifestam-se lentamente e o primeiro sintoma pode ser apenas um esquecimento brando. Neste estágio, indivíduos podem esquecer de eventos recentes, atividades, os nomes de pessoas da família ou de coisas e podem não ser capazes de solucionar problemas de matemática simples. À medida que a doença progride, os sintomas são mais facilmente notados e se tornam suficientemente sérios para fazerem com que as pessoas com Mal de Alzheimer ou seus membros familiares procurem ajuda médica. Sintomas de estágio brando do Mal de Alzheimer incluem o esquecimento de como realizar tarefas simples tais como o cuidado da aparência, e o desenvolvimento de problemas com a fala, o entendimento, a leitura, ou a escrita. Pacientes com Mal de Alzheimer no estágio tardio podem se tornar ansiosos ou agressivos, podem fugir de casa e finalmente necessitam de cuidado total.

Presentemente, o único meio definido para diagnosticar Mal de Alzheimer é identificar as placas e os emaranhados em tecido cerebral em uma autópsia após a morte do indivíduo. Portanto, médicos apenas podem fazer um diagnóstico de Mal de Alzheimer “possível” ou “provável” enquanto a pessoa ainda estiver viva. Usando os métodos correntes, os médicos podem diagnosticar Mal de Alzheimer corretamente até 90 por cento do tempo utilizando várias ferramentas para diagnosticar Mal de Alzheimer “provável”. Médicos perguntam sobre a saúde geral da pessoa, os problemas médicos do passado, e a história de quaisquer dificuldades que a pessoa apresenta na realização das atividades diárias. Testes comportamentais de memória, solução de problemas, atenção, contagem, e linguagem proporcionam informação sobre a degeneração cognitiva e os testes médicos tais como testes de sangue, urina, ou fluido espinhal, e varreduras cerebrais podem proporcionar alguma outra informação.

O manejo do Mal de Alzheimer consiste de tratamentos

baseados em medicação e baseados em não-medicação. Tratamentos que almejam a mudança do curso subjacente da doença (retardamento ou reversão da progressão) têm sido até agora largamente mau sucessivos. Tem sido mostrado que medicamentos que restauram o déficit (defeito), ou mau funcionamento, nos mensageiros químicos das células nervosas (neurotransmissores), tais como inibidores de colinesterase (ChEIs), melhoram os sintomas. Medicamentos também estão disponíveis para solucionar as manifestações psiquiátricas de Mal de Alzheimer.

Inibidores de colinesterase, tais como Tacrina e Rivastgmina, são correntemente a única classe de agentes que são aprovados pela FDA para o tratamento de Mal de Alzheimer. Estes agentes são medicamentos que restauram o defeito, ou o mau funcionamento, na neurotransmissão química no cérebro. ChEIs impedem a degradação enzimática de neurotransmissores aumentando deste modo a quantidade de mensageiros químicos disponíveis para transmitir os sinais nervosos no cérebro.

Para algumas pessoas nos estágios iniciais e intermediários da doença, as drogas tacrina (COGNEX®, Morris Plains, NJ), donepezil (ARICEPT®, Tokyo, JP), rivastigmina (EXELON®, East Hanover, NJ), ou galantamina (REMINYL®, New Brunswick, NJ) podem ajudar a prevenir que alguns sintomas se tornem piores por um tempo limitado. Outra droga, memantina (NAMENDA®, Nova Iorque, NY), tem sido aprovada para o tratamento de Mal de Alzheimer moderado a severo. Também, alguns medicamentos podem ajudar a controlar os sintomas comportamentais de Mal de Alzheimer tais como insônia, agitação, perambulação, ansiedade, e depressão. Tratamento destes sintomas muitas vezes torna os pacientes mais confortáveis e torna seu cuidado mais fácil para os tratadores. Infelizmente a despeito dos avanços de tratamento significativos mostrando que esta classe de agentes é consistentemente melhor do que um placebo, a doença continua a progredir, e o efeito médio sobre o funcionamento mental tem apenas sido

modesto. ChEIs também possuem efeitos colaterais que incluem disfunção gastrointestinal, toxicidade hepática e perda de peso.

Há esperança de que os avanços no entendimento das anormalidades cerebrais que ocorrem em Mal de Alzheimer proporcionem o arcabouço para novos alvos de tratamento que estão mais focalizados sobre a alteração do curso e do desenvolvimento da doença. Muitos compostos, incluindo agentes antiinflamatórios, estão sendo ativamente investigados. Testes clínicos usando inibidores específicos de ciclooxigenase (COX-2), tais como rofecoxib e celecoxib, também estão a caminho.

Outras doenças que são baseadas em ou estão associadas com o acúmulo e o depósito de proteína tipo-amilóide são debilitação cognitiva suave, demência de corpo de Lewy (LBD), esclerose lateral amiotrófica (ALS), miosite de corpo de inclusão (IBM) e degeneração macular, em particular degeneração macular relacionada com a idade (AMD).

Debilitação cognitiva suave (MCI) é um termo geral mais comumente definido como um distúrbio de memória sutil mas mensurável. Uma pessoa com MCI experimenta problemas de memória maiores do que os normalmente esperados com a idade, mas não mostra outros sintomas de demência, tais como raciocínio ou julgamento debilitado. MCI é uma condição que freqüentemente reflete em um estágio pré-clínico de AD.

É crido que a deposição de β -amilóide dentro do córtex entorrinal (EC) desempenha um papel chave no desenvolvimento de debilitação cognitiva suave (MCI) em idosos. Isto está em linha com a observação de que os níveis de CSF-A $A\beta(1-42)$ declinam significativamente uma vez AD se torne clinicamente observável. Em contraste com CSF- $A\beta(1-42)$ níveis de CSF-tau estão significativamente aumentados no estágio de MCI, e estes valores continuam a ser elevados depois, indicando níveis aumentados de CSF-tau podem ajudar na detecção de indivíduos com MCI que são preditos em desenvolverem AD.

Demência de corpo de Lewy (LBD) é um distúrbio neurodegenerativo que pode ocorrer em pessoas mais velhas do que 65 anos de idade, que tipicamente causa sintomas de debilitação cognitiva (pensamento) e mudanças comportamentais anormais. Sintomas podem
5 incluir debilitação cognitiva, sinais neurológicos, distúrbios de sono, e insuficiência autônoma. Debilitação cognitiva é a característica presente de LBD na maioria dos casos. Pacientes têm episódios recorrentes de confusão que progressivamente pioram. A flutuação em capacidade cognitiva está muitas vezes associada com graus de deslocamento de atenção e de vigiância.
10 Debilitação cognitiva e flutuações de pensamento podem variar durante minutos, horas ou dias.

Corpos de Lewy são formados de proteínas de monofilamento fosforiladas e não-fosforiladas; eles contêm a proteína sináptica alfa-sinucleína bem como ubiquitina, que está envolvida na eliminação de
15 proteínas danificadas ou anormais. Em adição aos Corpos de Lewy, os neuritos de Lewy, que são corpos de inclusão nos processos celulares das células nervosas, também podem estar presentes. Placas de amilóide podem se formar no cérebro de pacientes afligido com DLB, contudo tendem a ser menos em número do que as vistas em pacientes com Mal de Alzheimer.
20 Emaranhados neurofibrilares, a outra característica micropatológica de AD, não são uma característica comum de DLB mas estão freqüentemente presentes em adição às placas de amilóide.

Esclerose lateral amiotrófica (ALS) é caracterizada pela degeneração dos neurônios motores inferior e superior. Em alguns pacientes
25 com ALS, demência ou afasia pode estar presente (ALS-D). A demência é mais comumente uma demência frontotemporal (FTD), e muitos destes casos possuem inclusões unquitina-positivas, tau-negativas em neurônios do giro dentado e camadas superficiais dos lobos frontal e temporal.

Miosite de corpo de inclusão (IBM) é uma doença

incapacitante normalmente verificada em pessoas acima de 50 anos de idade, na qual as fibras musculares desenvolvem inflamação e começam a atrofiar - mas na qual o cérebro é poupado e os pacientes retêm seu intelecto total. Duas enzimas envolvidas na produção de proteína amilóide- β foram encontradas

5 aumentadas dentro das células musculares de pacientes com esta doença muscular progressiva, mais comum de pessoas idosas, na qual amilóide- β também está aumentado.

Outra doença que é baseada em ou está associada com o acúmulo e o depósito de proteína tipo-amilóide é a degeneração macular.

10 Degeneração macular é uma doença ocular comum que causa deterioração da mácula, que é a área central da retina (o tecido fino como papel no fundo do olho onde as células sensíveis à luz enviam sinais visuais ao cérebro). Visão 'retilínea para a frente', clara, nítida é processada pela mácula. Dano na mácula resulta no desenvolvimento de pontos cegos ou visão

15 borrada ou distorcida. Degeneração macular relacionada com a idade (AMD) é uma causa maior de debilitação visual nos Estados Unidos e para pessoas acima de 65 anos de idade é a causa principal de cegueira legal dentre os caucasianos. Aproximadamente 1,8 milhões de americanos de idade de 40 anos e mais velhos possuem AMD avançada, e outros 7,3 milhões de pessoas

20 com AMD intermediária estão sob risco substancial de perda de visão. O governo estima que em 2020 haverá 2,9 milhões de pessoas com AMD avançada. Vítimas de AMD são muitas vezes surpreendidas e frustradas em verificar quanto pouco é sabido sobre as causas e o tratamento desta condição cegante.

25 Há duas formas de degeneração macular: degeneração macular seca e degeneração macular úmida. A forma seca, na qual as células da mácula lentamente começam a se decompor, é diagnosticada em 85 por cento dos casos de degeneração macular. Ambos os olhos são normalmente afetados por AMD seca, embora um olho possa perder a visão enquanto que o outro

olho permanece não afetado. Gânglios, que são depósitos amarelos sob a retina, são comumente sinais iniciais de AMD seca. O risco de desenvolvimento de AMD seca ou de AMD úmida avançada aumenta à medida que aumenta o número ou o tamanho dos gânglios. É possível que AMD seca avance e cause perda de visão sem se transformar na forma úmida da doença; contudo, também é possível que a AMD seca de estágio inicial subitamente mude para a forma úmida.

A forma úmida, embora apenas totalize 15 por cento dos casos, resulta em 90 por cento da cegueira, e é considerada AMD avançada (não há estágio inicial ou intermediário de AMD úmida). AMD úmida é sempre precedida pela forma seca da doença. À medida que a quantidade efetiva de forma seca piora, algumas pessoas começam a ter vasos sanguíneos anormais crescendo atrás da mácula. Estes vasos são muito frágeis e vazam e sangue (daí degeneração macular ‘úmida’), causando dano rápido na mácula.

A forma seca de AMD inicialmente muitas vezes causará visão ligeiramente borrada. O centro de visão em particular pode se tornar então borrado e esta região cresce cada vez mais à medida que a doença progride. Nenhum sintoma pode ser notado se apenas um olho é afetado. Em AMD úmida, linhas retas podem aparecer onduladas e perda de visão central pode ocorrer rapidamente.

Diagnose de degeneração macular tipicamente envolve um exame de olho dilatado, teste de acuidade visual, e uma visão do fundo de olho usando um procedimento chamado de fundoscopia para auxiliar no diagnóstico de AMD, e - se AMD úmida for suspeita - angiografia com fluoresceína também pode ser realizada. Se AMD seca alcança os estágios avançados, não há tratamento corrente para prevenir perda de visão. Contudo, uma fórmula de dose alta específica de antioxidantes e zinco pode retardar ou prevenir a AMD intermediária de progredir para o estágio avançado. Macugen® (injeção de pegaptanib sódico), fotocoagulação por laser e terapia

fotodinâmica podem controlar o crescimento de vaso sanguíneo anormal e o sangramento na mácula, que é útil para algumas pessoas que possuem AMD úmida; contudo visão que já está perdida não será restaurada por estas técnicas. Se visão já estiver perdida, há auxiliares de visão baixa que podem
5 ajudar a melhorar a qualidade de vida.

Um dos sinais iniciais de degeneração macular relacionada com a idade (AMD) é o acúmulo de depósitos extracelulares conhecidos como gânglios entre a lâmina basal do epitélio retinal pigmentado (RPE) e a membrana de Bruch (BM). Estudos recentes conduzidos por Anderson et al.
10 têm confirmado que gânglios contêm amiloide beta. (Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256).

Pesquisa avançada continua com os estudos de exploração de fatores ambientais, genéticos, e dietéticos que podem contribuir com AMD. Novas estratégias de tratamento também estão sendo exploradas, incluindo
15 transplantes de células retiniais, drogas que evitarão ou tornarão mais lento o progresso da doença, terapia de radiação, terapias genéticas, e um chip de computador implantado na retina que pode ajudar a estimular a visão e agentes que evitarão o crescimento de novos vasos sanguíneos sob a mácula.

O que é necessário portanto, são composições de vacinas
20 terapêuticas efetivas e métodos para solucionar as complicações associadas com amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amiloide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitada a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições
25 caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amiloide tais

como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeld Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes Iniciada em Idade Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular.

5 Em particular o que é necessário são vacinas terapêuticas especializadas e elevadamente efetivas e composições compreendendo as citadas vacinas, que são capazes de contra-atacar as manifestações fisiológicas da doença tal como a formação de placas associadas com agregação de fibras de amilóide ou de peptídeo tipo-amilóide.

10 A presente invenção proporciona métodos novos e composições novas para gerar uma resposta elevadamente efetiva e elevadamente imune em um organismo, mas particularmente dentro de um animal, particularmente um mamífero ou um humano, que é capaz de prevenir ou de aliviar amiloidose, ou outros sintomas associados com amiloidose, um
15 grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo,
20 debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como
25 paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeld Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular.

Em particular, a presente invenção proporciona métodos novos e composições novas para reter ou melhorar, mas particularmente para

restaurar, mais particularmente para completamente restaurar a capacidade de memória cognitiva em um mamífero exibindo uma condição ou doença amilóide-associada.

Um objetivo da invenção é proporcionar uma composição de vacina terapêutica e um método para produzir uma tal composição para o tratamento de doenças e distúrbios que são causados ou estão associados com amilóide ou proteínas tipo-amilóide incluindo amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI) compreendendo um fragmento de peptídeo da parte N-terminal do peptídeo A β , particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de um segmento único ou repetitivo de entre 13 e 15 resíduos de aminoácido contíguos da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de resíduos 1-15, 1-14, e 1-13 da parte N-terminal do peptídeo A β , mais particularmente de resíduo 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, incluindo seus fragmentos funcionalmente equivalentes, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β como antes mencionado aqui ligado em, ou incorporado ou reconstituído em um adjuvante/partícula carreador tal como, por exemplo, um lipossomo.

Este segmento contínuo de 13 a 15 resíduos de aminoácido pode ser obtido do fragmento N-terminal 1-16, 1-17, 1-18 ou 1-20 do peptídeo A β mas particularmente do fragmento N-terminal 1-16 ou 1-17 do peptídeo A β como dado em SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 5, respectivamente e pode ser interrompido pela deleção de um a três resíduos de aminoácido para resultar em um segmento de entre 13 e 15 resíduos de aminoácido, no

qual os resíduos de aminoácido deletados podem ser resíduos de aminoácido adjacentes ou resíduos separados uns dos outros por pelo menos 1 resíduo de aminoácido, mas particularmente resíduos de aminoácido que não são resíduos negativamente carregados, se for desejado que uma carga efetiva total da molécula peptídeo antigênico seja negativa, ou resíduos de aminoácido que não são positivamente carregados, se for desejado que uma carga efetiva total da molécula de peptídeo antigênico seja positiva. Este segmento contínuo de 13 a 15 resíduos de aminoácido pode estar repetido no construto antigênico de acordo com a invenção entre 2 e 50 vezes, particularmente entre 2 e 30 vezes, mais particularmente entre 2 e 20 vezes, ainda mais particularmente entre 2 e 16 vezes, mas especialmente entre 2 e 10 vezes.

Em uma modalidade específica da invenção, o segmento contíguo de 13 a 15 resíduos de aminoácido é usado na forma de um polímero selecionado do grupo consistindo de um de 2-meros, um de 3-meros, um de 4-meros, um de 5-meros, um de 6-meros, um de 7-meros, um de 8-meros, um de 9-meros, um de 10-meros, um de 11-meros, um de 12-meros, um de 13-meros, um de 14-meros, um de 15-meros, um de 16-meros, um de 20-meros, um de 30-meros e um de 50-meros.

Em uma outra modalidade, a invenção proporciona uma composição de vacina terapêutica e um método para produzir uma tal composição para o tratamento de doenças e distúrbios que são causados ou estão associados com amilóide ou proteínas tipo-amilóide incluindo amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI) como adicionalmente

especificado aqui abaixo usando um fragmento de peptídeo A β da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), mais particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3.

Também é compreendido pela presente invenção um fragmento de peptídeo que é essencialmente idêntico aos fragmentos acima mencionados e possui substancialmente a mesma atividade biológica de citados fragmentos, mas particular um fragmento de peptídeo que é uma variante covalentemente modificada de citados fragmentos pelo fato de que as alterações resultam na substituição de um ou mais aminoácidos, particularmente de entre um e 10 aminoácidos, mais particularmente de entre um e 6 aminoácidos, ainda mais particularmente de entre um e 4 aminoácidos, mas especialmente de entre um e 3 aminoácidos, por um aminoácido quimicamente similar. Tabelas de substituição conservativa proporcionando aminoácidos funcionalmente similares são bem conhecidas na arte e são descritas aqui abaixo. A substituição conservativa é preferivelmente para ser feita de tal modo que a carga efetiva total do peptídeo e também a distribuição de carga sobre a molécula de peptídeo permaneçam essencialmente as mesmas.

Em uma modalidade específica da invenção pelo menos um, particularmente 2, mais particularmente 3 ou até mesmo todos os resíduos de aminoácido 1 negativamente carregados, 3, 7, 11 podem ser substituídos por um resíduo de aminoácido negativamente carregado quimicamente similar. Particularmente, o Asp em posição 1 e 7, respectivamente, pode ser

substituído por um Glu e o Glu em posição 9 e 11, respectivamente, pode ser substituído por um Asp.

Em uma modalidade específica da invenção, uma composição de vacina terapêutica e um método para produzir uma tal composição são proporcionados compreendendo um fragmento de peptídeo A β da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de antígeno de peptídeo 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 15), mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13), ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14, especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3, para o tratamento de doenças e distúrbios que são causados ou estão associados com amilóide ou proteínas tipo-amilóide incluindo amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI).

Em uma modalidade específica a invenção proporciona uma composição de vacina terapêutica e um método de produzir uma composição de vacina terapêutica para retenção ou melhoria, particularmente para restauração completa da capacidade de memória cognitiva de um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de debilitação de

memória usando um fragmento de peptídeo A β da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 15), mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13) ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14, especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3.

Também é um objetivo da invenção proporcionar um método para o tratamento de doenças e distúrbios que são causados ou estão associados com amilóide ou proteínas tipo-amilóide incluindo amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI) pela administração a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, uma composição de vacina de acordo com a invenção e como aqui descrito.

Em uma modalidade específica a invenção proporciona um método para reter ou aumentar a capacidade de memória cognitiva mas, particularmente, para totalmente restaurar a capacidade de memória cognitiva de um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de debilitação de memória pela administração a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, uma composição de vacina de acordo com a

invenção e como aqui descrito.

Um outro objetivo da invenção é proporcionar uma composição de vacina terapêutica e um método para produzir uma tal composição bem como um método para o tratamento de doenças e distúrbios que são causados ou estão associados com amilóide ou proteínas tipo-amilóide incluindo amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), usando um antígeno de peptídeo A β de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, mas particularmente um fragmento de peptídeo A β da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 15), mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13), ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14, especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3, no qual o antígeno de peptídeo A β é modificado de tal modo que é capaz de manter e estabilizar uma conformação definida caracterizada por uma proporção equilibrada de porções de espiral aleatória e/ou de β -foliada e/ou α -helicoidal e de induzir uma resposta imune elevadamente específica no animal tratado.

A composição de vacina de acordo com a invenção e como

aqui antes descrito sob administração a um animal, particularmente um mamífero, mas especialmente um humano, resulta principalmente na geração de anticorpos de subtipos Th2 não-inflamatórios, tais como, por exemplo, isotipos IgG1 e IgG2b e/ou anticorpos de subclasse IgG independente de
5 célula-T tal como, por exemplo, IgG3 e/ou não leva a um aumento significativo em marcadores de inflamação no cérebro, particularmente de marcadores de inflamação selecionados do grupo consistindo de IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α .

Em uma outra modalidade da invenção a vacina de acordo
10 com a presente invenção como aqui antes descrito, sob administração a um animal, particularmente um mamífero, mas especialmente um humano, leva a um decréscimo significativo de A β 1-40 e A β 1-42 insolúveis relacionados com placa, no cérebro.

Em ainda uma outra modalidade da invenção a vacina de
15 acordo com a presente invenção como aqui antes descrito, sob administração a um animal, particularmente um mamífero, mas especialmente um humano, leva a uma redução significativa no nível de A β 1-42 solúvel no cérebro.

É adicionalmente proporcionada uma vacina de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, que, sob administração a um animal,
20 particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição amilóide-associada caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva leva a um aumento na retenção da capacidade de memória cognitiva.

A invenção adicionalmente se refere a uma vacina de acordo
25 com a presente invenção e como aqui antes descrito, que, sob administração a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição amilóide-associada caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva leva a uma restauração completa da capacidade de memória cognitiva.

Em particular, o antígeno de peptídeo A β de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, especialmente um fragmento de peptídeo A β da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 15), mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13), ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14, especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3, está presente ligado em, ou incorporado ou reconstituído em um carreador tal como, por exemplo, uma vesícula, uma molécula ou corpo particulado mas, particularmente, um lipossomo.

As composições imunogênicas da presente invenção podem compreender lipossomos preparados por reconstituição de lipossomos na presença de peptídeos antigênicos purificados ou parcialmente purificados ou modificados de acordo com a invenção. Adicionalmente, os fragmentos de peptídeo podem ser reconstituídos em lipossomos. A presente invenção também inclui fragmentos de peptídeo antigênicos modificados de modo a aumentar sua antigenicidade. Por exemplo, grupos antigênicos e adjuvantes podem ser ligados em ou misturados com o peptídeo. Exemplos de grupos antigênicos e adjuvantes incluem, mas não são limitados a, derivados de muramil-dipeptídeo lipofílico, adjuvantes polímeros em bloco não-iônicos, hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio, e suas misturas.

Em outra modalidade da invenção o antígeno de peptídeo A β de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, especialmente um

fragmento de peptídeo A β da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 15), mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13), ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14, especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3, é modificado por um grupo lipofílico ou hidrofóbico, que facilita a inserção na bicamada lipídica do carreador de lipossomo/adjuvante imune, particularmente por um grupo lipofílico ou hidrofóbico que funciona como uma âncora para o peptídeo na bicamada de lipossomo e possui uma dimensão que lava o peptídeo a ser posicionado e estabilizado intimamente próximo da superfície do lipossomo.

Em uma outra modalidade da invenção, o grupo lipofílico ou hidrofóbico é um ácido graxo, um triglicerídeo ou um fosfolipídeo, mas especialmente um ácido graxo, um triglicerídeo ou um fosfolipídeo, no qual a estrutura principal de carbonos de ácido graxo possui pelo menos 10 átomos de carbono. Particularmente, o grupo lipofílico ou hidrofóbico é um ácido graxo com uma estrutura principal de carbonos de pelo menos aproximadamente 14 átomos de carbono e até aproximadamente 24 átomos de carbono, com cada número individual de átomo de carbono caindo dentro desta faixa também sendo parte da presente invenção. Mais particularmente, o grupo lipofílico ou hidrofóbico possui uma estrutura principal de carbonos de pelo menos 14 átomos de carbono, mas especialmente 16 átomos de carbono. Exemplos de grupos hidrofóbicos incluem, mas não são limitados a, ácido

palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico, e ácido linolênico. Em uma modalidade específica da presente invenção o grupo lipofílico ou hidrofóbico é ácido palmítico.

5 Em ainda uma outra modalidade da invenção o grupo hidrofóbico é ácido palmítico e a preparação de lipossomo pode em adição conter um adjuvante tal como, por exemplo, lipídeo A, alume, fosfato de cálcio, interleucina 1, e/ou microcápsulas de polissacarídeos e proteínas, mas particularmente um lipídeo A desintoxicado, tal como monofosforil- ou difosforil-lipídeo A, ou alume.

10 Um outro objetivo da invenção é proporcionar uma composição de vacina terapêutica e um método para produzir uma tal composição usando um peptídeo antigênico imunogênico de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, para o tratamento de doenças e distúrbios que são causados ou estão associados com amilóide ou proteínas

15 tipo-amilóide incluindo amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), particularmente para retenção, aumento ou restauração da capacidade de memória cognitiva

20 de um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de debilitação de memória, bem como um método para o tratamento de citada amiloidose, no qual o antígeno de peptídeo β -amilóide é a antígeno de peptídeo A β palmitoilado de acordo com a invenção e como aqui antes descrito reconstituído em um lipossomo, especialmente um fragmento de

25 peptídeo A β palmitoilado da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β palmitoilado consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-

15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 15) palmitoilado, mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13) palmitoilado, ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14 palmitoilado, especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15 palmitoilado, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β palmitoilado consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3, modificados por resíduos de palmitoíla covalentemente ligados, particularmente entre 2 e 4 resíduos de palmitoíla, mais particularmente 4 resíduos de palmitoíla, copulados em cada terminação do antígeno de peptídeo via um ou mais, mas particularmente via um ou dois resíduos de aminoácido adequados tais como lisina, ácido glutâmico ou cisteína, ou qualquer outro resíduo de aminoácido que pode ser adequadamente usado para copulação em um resíduo de palmitoíla no peptídeo antigênico.

Em uma modalidade específica da invenção, 2 ou mais das moléculas de antígeno de peptídeo A β palmitoilado modificadas por resíduos de palmitoíla covalentemente ligados em cada extremidade do peptídeo são reconstituídas em um lipossomo único.

A presente invenção proporciona métodos novos e composições imunogênicas novas compreendendo um peptídeo antigênico imunogênico, que, sob administração a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição amilóide-associada, particularmente de uma condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tal como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), induz uma resposta imune em citado animal ou humano. O tratamento com a vacina terapêutica de acordo com a invenção leva a uma retenção ou a um aumento na capacidade de memória cognitiva mas, particularmente, a uma restauração completa da capacidade de memória cognitiva.

Outro objetivo da invenção é proporcionar uma composição de vacina terapêutica e um método para produzir uma tal composição usando um peptídeo antigênico imune, para induzir uma resposta imune em um animal, particularmente um mamífero ou um humano, bem como um método para induzir uma resposta imune em um animal, particularmente um mamífero ou um humano, citado animal ou humano sofrendo de uma condição amilóide-associada caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tal como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), pela administração to citado animal ou humano uma composição de vacina terapêutica compreendendo um antígeno de peptídeo A β de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β palmitoilado da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β palmitoilado consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 15) palmitoilado, mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13) palmitoilado, ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14 palmitoilado, especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15 palmitoilado, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β palmitoilado consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3, de tal modo que a capacidade de memória cognitiva do animal ou humano tratado é retida ou aumentada mas, particularmente, completamente restaurada.

O peptídeo antigênico como aqui antes descrito, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de

resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 16), mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13), ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14, especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3, também é parte da presente invenção.

Também é parte da invenção um antígeno de peptídeo A β palmitoilado de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, especialmente um fragmento de peptídeo A β palmitoilado da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β palmitoilado consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 16) palmitoilado, mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13) palmitoilado, ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14 palmitoilado, especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15 palmitoilado, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β palmitoilado consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3, modificados por resíduos de palmitoíla covalentemente ligados, particularmente entre 2 e 4 resíduos de palmitoíla, mais particularmente 4 resíduos de palmitoíla, copulados em cada terminação do

antígeno de peptídeo via um ou mais, mas particularmente via um ou dois
resíduos de aminoácido adequados tal como lisina, ácido glutâmico ou
cisteína, ou qualquer outro resíduo de aminoácido que pode ser
adequadamente usado para copulação em um resíduo de palmitoíla no
5 peptídeo antigênico.

Em uma modalidade específica da invenção, 2 ou mais das
moléculas de antígeno de peptídeo A β palmitoilado modificadas por resíduos
de palmitoíla covalentemente ligados em cada extremidade do peptídeo são
reconstituídas em um lipossomo único.

10 É adicionalmente compreendido pela presente invenção um
peptídeo antigênico apresentado ligado em, ou incorporado ou reconstituído
em um carreador tal como, por exemplo, uma vesícula, uma molécula ou
corpo particulado mas, particularmente, um lipossomo, como aqui antes
descrito, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β da parte N-
15 terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β
consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-
15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-
16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-
15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-
20 15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-
16(Δ 15), mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1- 16(Δ 14) ou
A β 1-16(Δ 13), ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14,
especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-5, mas especialmente um
fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como
25 dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3
apresentado ligado em, ou incorporado ou reconstituído em um carreador tal
como, por exemplo, uma vesícula, uma molécula ou corpo particulado como
aqui antes descrito.

Sem a intenção de se ligar a uma hipótese específica, é

razoável assumir que a resposta imune induzida pela composição de vacina terapêutica da invenção pode levar o animal ou humano a uma estimulação de células-T e outras células imunes reativas direcionadas contra um agente imunogênico, mas particularmente à geração de anticorpos elevadamente específicos e elevadamente efetivos possuindo a capacidade para especialmente reconhecerem e se ligarem em epitopos específicos de uma variedade de antígenos β -amilóides, cujo anticorpo, sob ligação no antígeno, medeia e/ou induz o efeito observável de retenção, aumento e, particularmente, restauração completa da capacidade de memória cognitiva no animal ou humano tratado.

A presente invenção adicionalmente proporciona uma composição de vacina, que, sob administração a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, induz a geração de um anticorpo no animal ou humano tratado que diretamente e especialmente se liga em fibras β -amilóides tais como, por exemplo, fibras compreendendo Peptídeos monoméricos $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 ou 1-43, mas especialmente em fibras compreendendo Peptídeos monoméricos $A\beta$ 1-42 e/ou é capaz de induzir solubilização de filamentos ou fibrilas amilóides poliméricas de peso molecular alto pré-formadas pela agregação de peptídeos monoméricos β -amilóides, particularmente peptídeos monoméricos β -amilóides tais como, por exemplo, peptídeos monoméricos $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 ou 1-43, mas especialmente peptídeos monoméricos $A\beta$ 1-42, por seleção e especialmente ligação em um epitopo dentro de uma região epitópica da proteína β -amilóide, particularmente uma região epitópica do polipeptídeo $A\beta$ confinada pelos resíduos de aminoácido aa_n - aa_m com n sendo um número inteiro entre 2 e 15, particularmente entre 5 e 15, mais particularmente entre 8 e 15, ainda mais particularmente entre 10 e 15 e m sendo um número inteiro entre 3 e 17, particularmente entre 6 e 17, mais particularmente entre 9 e 17, ainda mais particularmente entre 11 e 17, no qual n e m não podem ser números idênticos

e n sempre tem que ser um número menor do que m, com a diferença entre n e $m \geq 2$.

Em uma modalidade específica da invenção, o anticorpo liga-se em um epitopo dentro de uma região epitópica da proteína β -amilóide compreendendo resíduos de aminoácido 1-10, mas particularmente resíduos de aminoácido 1-9.

O citado anticorpo também se liga especialmente nos peptídeos monoméricos e oligoméricos amilóides solúveis, particularmente peptídeos monoméricos ou oligoméricos β -amilóides selecionados do grupo consistindo de peptídeos $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 ou 1-43, mas especialmente $A\beta$ 1-2, e inibe a agregação de monômeros ou oligômeros $A\beta$ em fibrilas poliméricas de massa molecular alta.

Em uma outra modalidade, a invenção proporciona um anticorpo, particularmente um anticorpo monoclonal, incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais, cujo anticorpo incorpora pelo menos uma das propriedades selecionadas do grupo consistindo de inibição de agregação, desagregação, indução de transição conformacional, reconhecimento de e ligação direta em um epitopo na região 4-16, particularmente na região 1-9, mas especialmente uma combinação de duas ou mais das citadas propriedades. Mais especialmente, um anticorpo é proporcionado, particularmente um anticorpo monoclonal, incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais, cujo anticorpo mostra uma reatividade combinada contra a região 1-16 e 29-40, mais particularmente contra a região 1-16 e 22-35 pelo fato de que ele é capaz de reconhecer e de se ligar em ambas as citadas regiões, a região 1-16 e a região 29-40 e a região 1-16 e 22-35, respectivamente, e incorpora pelo menos uma das propriedades aqui antes mencionadas, isto é inibição de agregação, desagregação, indução de transição conformacional, mas especialmente uma combinação de duas ou

mais das citadas propriedades.

Os anticorpos que são induzidos pela composição de vacina de acordo com a invenção e que podem ser obtidos de um animal imunizado ou de uma linhagem celular de hibridoma produzindo os citados anticorpos, também são parte da invenção.

Em uma modalidade específica, a invenção proporciona um anticorpo incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais particularmente um anticorpo monoclonal incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais obtível por imunização de um animal adequado com uma composição de vacina de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, particularmente uma composição de vacina compreendendo um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 15), mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14)) ou A β 1-16(Δ 13), ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14, mas especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15, cujo anticorpo é um anticorpo bifuncional e, sob co-incubação com peptídeos monoméricos β -amilóides, particularmente peptídeos monoméricos β -amilóides tais como, por exemplo, peptídeos monoméricos A β 1-38, 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 ou 1-43, mas especialmente peptídeos monoméricos A β 1-42, inibe a agregação dos monômeros A β em fibrilas poliméricas de massa molecular alta e, em adição, sob co-incubação com filamentos ou fibrilas amilóides de massa molecular alta pré-formadas formadas pela agregação de peptídeos monoméricos β -amilóides, particularmente peptídeos monoméricos β -amilóides tais como, por exemplo, peptídeos monoméricos A β 1-38, 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 ou 1-43, mas especialmente peptídeos monoméricos A β 1-42, é capaz de desagregar os filamentos ou fibrilas poliméricas pré-formadas.

Em uma modalidade específica, a invenção proporciona um anticorpo, particularmente um anticorpo bifuncional, mas especialmente um anticorpo monoclonal, particularmente um anticorpo monoclonal bifuncional,

incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais, que exibe especificidade alta para peptídeos monoméricos A β 1-42 mas mostra essencialmente nenhuma ou apenas diminuta reatividade cruzada para peptídeos monoméricos A β 1-38, A β 1-39, A β 1-40, e/ou A β 1-41, particularmente um anticorpo, mas especialmente um anticorpo monoclonal, incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais, cujo anticorpo é até 100 vezes, particularmente 50 a 100 vezes, mais particularmente 80 a 100 vezes, mas especialmente 100 vezes mais sensível ao peptídeo amilóide A β 1-42 em comparação com A β 1-38, A β 1-39, A β 1-40, A β 1-41 e até 1.000 vezes, particularmente 500 a 1.000 vezes, mais particularmente 800 a 1.000 vezes, mas especialmente 1.000 vezes mais sensível ao peptídeo amilóide A β 1-42 em comparação com A β 1-38, e assim é capaz de inibir, in vitro e in vivo, a agregação de peptídeos monoméricos amiloidogênicos, mas especialmente de peptídeo amilóide A β 1-42.

Em outra modalidade específica da invenção um anticorpo, particularmente um anticorpo bifuncional, mas especialmente um anticorpo monoclonal, particularmente um anticorpo monoclonal bifuncional, incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais, que possui uma sensibilidade de ligação alta para peptídeo amilóide A β 1-42 e é capaz de detectar fibras A β 1-42 em uma concentração baixa de pelo menos 0,001 μ g, mas particularmente em uma faixa de concentração de entre 0,5 μ g e 0,001 μ g, mais particularmente entre 0,1 μ g e 0,001 μ g, mas especialmente em uma concentração de 0,001 μ g.

Em uma modalidade muito específica da invenção um anticorpo é proporcionado, particularmente um anticorpo monoclonal, incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais, cujo anticorpo é capaz de detectar fibras A β 1-42 em uma concentração mínima de 0,001 μ g e fibras A β 1-40 em uma concentração

mínima de 0,1 µg e fibras Aβ1-38 em uma concentração mínima de 1 µg de quantidade de fibras.

Ligação dos anticorpos de acordo com a invenção e como aqui antes descrito em peptídeos monoméricos amiloidogênicos mas, particularmente, na forma amilóide (1-42) leva a uma inibição da agregação de peptídeos monoméricos amiloidogênicos em filamentos ou fibrilas de massa molecular alta. Por meio da inibição da agregação de peptídeos monoméricos amiloidogênicos os anticorpos de acordo com a presente invenção são capazes de prevenir ou tornarem mais lenta a formação de placas amilóides, particularmente a forma amilóide (1-42), que conhecidamente se torna insolúvel por mudança da conformação e é a maior parte das placas amilóides em cérebros de animais ou humanos doentes.

Em uma modalidade específica a presente invenção refere-se a um anticorpo monoclonal incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais cujo anticorpo possui as propriedades características de um anticorpo produzido pela linhagem de célula de hibridoma EJ 7H3, depositada aos 08 de dezembro de 2005 como DSM ACC2756.

Mais particularmente, a invenção refere-se a um anticorpo monoclonal incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais produzido pela linhagem de célula de hibridoma EJ 7H3, depositada aos 08 de dezembro de 2005 como DSM ACC2756.

Também um objetivo da presente invenção é proporcionar um método para a prevenção, o tratamento ou o alívio dos efeitos de amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma

perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeldt Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular, mas particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), pela administração de um construto antigênico supramolecular de acordo com a presente invenção, mas particularmente uma composição de vacina compreendendo um tal construto antigênico supramolecular de acordo com a invenção a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, afetado por um tal distúrbio e assim em necessidade de um tal tratamento.

Em outra modalidade da presente invenção é proporcionado um método para a preparação de uma composição de vacina para induzir uma resposta imune em um organismo, em particular um animal ou humano afetado por um tal distúrbio, doença ou condição e assim em necessidade de um tal tratamento, para a prevenção, o tratamento ou o alívio dos efeitos de amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o

complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeld Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular, mas particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI).

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção é portanto proporcionado um método para a preparação de uma composição de vacina terapêutica para a prevenção, o tratamento ou o alívio dos efeitos de amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeld Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular, mas particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), compreendendo formulação de um anticorpo de acordo com a invenção em uma forma farmacêuticamente aceitável.

Em uma modalidade específica, a presente invenção faz uso de uma preparação antigênica que resulta em exposição e estabilização intensificadas de uma conformação de antígeno preferida, que enfim leva a uma resposta imune elevadamente específica e resulta na geração de anticorpos com propriedades únicas.

Em uma modalidade, a presente invenção proporciona composições imunogênicas compreendendo um construto antigênico supramolecular compreendendo antígeno de peptídeo β -amilóide de acordo com a invenção e como aqui antes descrito representativo da parte N-terminal do peptídeo β -amilóide, cujo peptídeo antigênico é modificado de tal modo que é capaz de manter e estabilizar uma conformação definida do antígeno, particularmente uma conformação que é caracterizada por uma proporção equilibrada de porções de espiral aleatória, α -helicoidal e de β -foliada. Esta conformação definida leva à indução de uma resposta imune forte e elevadamente específica sob introdução em um animal ou um humano.

Em outra modalidade da invenção a composição de vacina de acordo com a invenção pode compreender em adição a um antígeno de peptídeo A β , particularmente o antígeno de peptídeo A β da invenção como aqui antes descrito, um inibidor de ativação de complemento. A invenção assim se refere a uma composição de vacina e a um método para produzir uma tal composição para o tratamento de doenças e distúrbios que são causados ou estão associados com amilóide ou proteínas tipo-amilóide incluindo amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI) compreendendo um fragmento de peptídeo da parte N-terminal do peptídeo A β , particularmente

um fragmento de peptídeo A β consistindo de um segmento único ou repetitivo de entre 7 e 16 resíduos de aminoácido contíguos, especialmente de entre 13 e 16 resíduos de aminoácido contíguos, particularmente da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de resíduos 1-16, 1-15, 1-14, e 1-13 da parte N-terminal do peptídeo A β , mais particularmente de resíduo 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, incluindo seus fragmentos funcionalmente equivalentes, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β como antes mencionado aqui ligado em, ou incorporado ou reconstituído em um adjuvante/partícula carreador tal como, por exemplo, um lipossomo juntamente com um inibidor do sistema de complemento, particularmente um inibidor da rota de complemento selecionado do grupo consistindo de versões solúveis de proteínas regulatórias de membrana, anticorpos humanizados para proteínas de complemento, inibidores de molécula pequena atuando em vários estágios da rota de complemento e inibidores de molécula pequena atuando em vários estágios da rota de complemento.

Este segmento contínuo de 13 a 15 resíduos de aminoácido pode ser repetido no construto de acordo com a invenção entre 2 e 50 times, particularmente entre 2 e 30 times, mais particularmente entre 2 e 20 times, ainda mais particularmente entre 2 e 16 times, mas especialmente entre 2 e 10 vezes.

Em uma modalidade específica da invenção, o inibidor de ativação de complemento que é um componente da composição de vacina terapêutica como mencionado aqui antes é um composto selecionado do grupo consistindo de Receptor 1 de complemento solúvel de humano, anti-proteína C5 de complemento de humano tal como, por exemplo, um anticorpo monoclonal humanizado anti-C5 ou um fragmento de cadeia única de um anticorpo monoclonal humanizado, inibidor-N de C1-esterase Inibidor C1

Natural de humano.

Adicionalmente compreendida pela presente invenção é uma composição de vacina de acordo com a invenção como mencionado aqui antes, compreendendo em adição a um fragmento de peptídeo A β , particularmente o fragmento de peptídeo A β de acordo com a invenção, um efetor alostérico de hemoglobina, que uma vez nas células vermelhas do sangue dispara um decréscimo da afinidade de hemoglobina/O₂ de tal modo que oxigênio seja liberado em uma maneira regulada subsequente nos tecidos.

A invenção assim se refere a uma composição de vacina e um método para produzir uma tal composição para o tratamento de doenças e distúrbios que são causados ou estão associados com amilóide ou proteínas tipo-amilóide incluindo amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI) compreendendo um fragmento de peptídeo da parte N-terminal do peptídeo A β , particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de um segmento único ou repetitivo de entre 7 e 16 resíduos de aminoácido contíguos, especialmente de entre 13 e 16 resíduos de aminoácido contíguos, particularmente da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de resíduos 1-16, 1-15, 1-14, e 1-13 da parte N-terminal do peptídeo A β , mais particularmente de resíduo 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, incluindo seus fragmentos funcionalmente equivalentes, mas particularmente um fragmento de peptídeo A β como mencionado aqui antes que é modificado por resíduos de palmitoíla covalentemente ligados em cada

extremidade do peptídeo para resultar em entre 2 e 4, particularmente 4
resíduos de palmitoíla, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β
como antes mencionado aqui ligado em, ou incorporado ou reconstituído em
um adjuvante/partícula carreador tal como, por exemplo, um lipossomo junto
5 com um composto que dispara um decréscimo da afinidade de
hemoglobina/O₂ de tal modo que oxigênio é liberado subsequente para
os tecidos de órgão.

Este segmento contínuo de 13 a 15 resíduos de aminoácido
pode ser repetido no construto de acordo com a invenção entre 2 e 50 vezes,
10 particularmente entre 2 e 30 vezes, mais particularmente entre 2 e 20 vezes,
ainda mais particularmente entre 2 e 16 vezes, mas especialmente entre 2 e 10
vezes.

Em particular, compostos que podem ser adequadamente
usados dentro de uma composição de acordo com a invenção são aqueles
15 selecionados do grupo consistindo de uma droga antilipidêmica tal como, por
exemplo, ácido clofibrico ou bezafibrato incluindo os derivados de
bezafibrato LR16 e L35, derivado de uréia tal como, por exemplo, ácido [2-
[4-[[(aril-amino)-carbonil]-amino]-fenóxi]-2-metil-propiónico, um efetor
alostérico de hemoglobina.

20 O composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂ pode
ser adicionalmente um composto compreendendo um ligante aniônico para
um sítio alostérico de hemoglobina, no qual o ligante aniônico compreende
um anel de pirofosfato interno, opcionalmente juntamente com um cátion
não-tóxico tal como, por exemplo, Ca²⁺ e Na⁺.

25 Mais especialmente, a invenção refere-se a uma composição
de vacina terapêutica de acordo com a invenção como aqui antes mencionado,
compreendendo em adição ao fragmento de peptídeo A β de acordo com a
invenção derivados de hexafosfato de inositol (IHP) compreendendo um anel
de pirofosfato interno, opcionalmente juntamente com um cátion não-tóxico

tal como, por exemplo, Ca^{2+} e Na^{+} .

Em ainda outra modalidade uma composição de vacina de acordo com a invenção e como aqui antes mencionado é proporcionada compreendendo, em adição a um fragmento de peptídeo $\text{A}\beta$, particularmente o fragmento de peptídeo $\text{A}\beta$ de acordo com a invenção, uma combinação de um inibidor do sistema de ativação de complemento, particularmente um inibidor da rota de complemento selecionado do grupo consistindo de versões solúveis de proteínas regulatórias de membrana, anticorpos humanizados para proteínas de complemento, inibidores de molécula pequena atuando em vários estágios da rota de complemento e reguladores de complemento de humano expressados em animais transgênicos e um efector alostérico de hemoglobina que reduz a afinidade de hemoglobina/ O_2 de tal modo que mais oxigênio é liberado subsequente aos tecidos, em uma maneira regulada.

A invenção assim adicionalmente se refere a uma composição de vacina e a um método para produzir uma tal composição para o tratamento de doenças e distúrbios que são causados ou estão associados com amilóide ou proteínas tipo-amilóide incluindo amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI) compreendendo um fragmento de peptídeo da parte N-terminal do peptídeo $\text{A}\beta$, particularmente um fragmento de peptídeo $\text{A}\beta$ consistindo de um segmento único ou repetitivo de entre 7 e 16 resíduos de aminoácido contíguos, especialmente de entre 13 e 16 resíduos de aminoácido contíguos, particularmente da parte N-terminal do peptídeo $\text{A}\beta$, mas particularmente um fragmento de peptídeo $\text{A}\beta$ consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de resíduos 1-16, 1-15, 1-14, e

1-13 da parte N-terminal do peptídeo A β , mais particularmente de resíduo 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, incluindo seus fragmentos funcionalmente equivalentes, particularmente um fragmento de peptídeo A β como aqui antes mencionado que é modificado por resíduos de palmitoíla covalentemente ligados em cada extremidade do peptídeo para resultar em entre 2 e 4, particularmente 4 resíduos de palmitoíla, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β como antes mencionado aqui ligado em, ou incorporado ou reconstituído em um adjuvante/partícula carreador tal como, por exemplo, um lipossomo juntamente com um inibidor do sistema de complemento, particularmente um inibidor da ativação de complemento selecionado do grupo consistindo de versões solúveis de proteínas regulatórias de membrana, anticorpos humanizados para proteínas de complemento, inibidores de molécula pequena atuando em vários estágios da rota de complemento e reguladores de complemento de humano expressados em animais transgênicos e um composto, particularmente um efector alostérico de hemoglobina, que diminui a afinidade de hemoglobina/O₂ de tal modo que mais oxigênio é liberado subsequente aos tecidos, em uma maneira regulada.

Este segmento contínuo de 13 a 15 resíduos de aminoácido pode ser repetido no construto de acordo com a invenção entre 2 e 50 vezes, particularmente entre 2 e 30 vezes, mais particularmente entre 2 e 20 vezes, ainda mais particularmente entre 2 e 16 vezes, mas especialmente entre 2 e 10 vezes.

Em ainda outra modalidade, um método para o tratamento de uma condição ou doença amilóide-associada é proporcionado compreendendo a administração a um animal, particularmente a um mamífero, mas especialmente a um humano sofrendo de uma tal doença ou condição de uma composição de vacina terapêutica de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, particularmente de uma composição de vacina compreendendo um antígeno de peptídeo A β 1-15, mais particularmente um antígeno de

peptídeo A β 1-15 palmitoilado.

Em uma modalidade específica da invenção a administração de citada composição de vacina resulta principalmente na geração de anticorpos de subtipos não-inflamatórios, particularmente do subtipo não-inflamatório Th2 tais como, por exemplo, isotipos IgG1 e IgG2b.

Em uma outra modalidade específica, a administração de citada composição de vacina resulta principalmente na geração de anticorpos da subclasse IgG independente de célula-T, particularmente do isotipo IgG3.

Em ainda outra modalidade da invenção, a administração de citada composição de vacina não leva a um aumento significativo em marcadores de inflamação no cérebro, particularmente de marcadores de inflamação selecionados do grupo consistindo de IL-16, IL-6, IFN- γ e TNF α .

Em ainda outra modalidade da invenção, a administração de citada composição de vacina leva a um decréscimo significativo de A β 1-40 e A β 1-42 relacionados com placa, insolúvel no cérebro.

Em ainda outra modalidade da invenção, a administração de citada composição de vacina leva a uma redução significativa no nível de A β 1-42 solúvel no cérebro.

Em particular, a condição ou doença associada a amilóide é uma selecionada do grupo consistindo de doenças incluindo, mas não limitadas a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeld Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início

na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular.

Mais particularmente, a condição ou doença associada com amilóide é Mal de Alzheimer.

Em ainda outra modalidade específica da invenção, um método para o tratamento de uma condição ou doença amilóide-associada é proporcionado de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, no qual a administração de citada composição de vacina a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição amilóide-associada caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva leva a um aumento, particularmente a uma restauração completa na restauração da capacidade de memória cognitiva.

Em ainda outra modalidade, um método para o tratamento de uma condição ou doença amilóide-associada é proporcionado compreendendo a administração a um animal, particularmente a um mamífero, mas especialmente a um humano sofrendo de uma tal doença ou condição, uma composição de vacina terapêutica compreendendo um construto antigênico de acordo com a invenção e como aqui antes descrito e um inibidor do sistema de complemento, no qual a citada composição de vacina é particularmente administrada de tal modo que o inibidor de complemento e o construto antigênico são administrados concomitante, intermitente ou sequencialmente.

Em uma modalidade específica, o inibidor de complemento é administrado antes da vacinação com o construto antigênico, particularmente dentro de uma janela de tempo iniciando até 20 horas antes da vacinação e terminando imediatamente antes da vacinação.

Em outra modalidade específica, o inibidor de complemento é administrado subsequente à vacinação com o construto antigênico dentro de uma janela de tempo iniciando imediatamente após a vacinação e terminando 1 dia após a aplicação da vacina.

Em ainda outra modalidade da invenção é proporcionado um método para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma condição ou doença amilóide-associada compreendendo usando uma composição de vacina de acordo com a invenção e como aqui antes descrito.

Estes e outros objetivos, características e vantagens da presente invenção se tornarão evidentes após uma revisão da seguinte descrição detalhada da modalidade descrita e das reivindicações anexadas.

Os termos “polipeptídeo”, “peptídeo”, e “proteína”, como aqui usados, são intercambiáveis e são definidos para significarem uma biomolécula composta de aminoácidos ligados por uma ligação peptídica.

O termo “peptídeos,” são cadeias de aminoácidos (tipicamente L-aminoácidos) cujos carbonos alfa estão ligados por intermédio de ligações peptídicas formadas por uma reação de condensação entre o grupo carboxila do carbono alfa de um aminoácido e o grupo amino do carbono alfa do outro aminoácido. O grupo amino terminal em uma extremidade da cadeia (i.e., a terminação amino) possui um grupo amino livre, enquanto que o aminoácido terminal na outra extremidade da cadeia (i.e., a terminação carboxila) possui um grupo carboxila livre. Como tal, o termo “terminação amino” (abreviada terminação-N) refere-se ao grupo alfa-amino livre no aminoácido na terminação amino do peptídeo, ou ao grupo alfa-amino (grupo imino quando participando em uma ligação peptídica) de um aminoácido em qualquer outra localização dentro do peptídeo. Similarmente, o termo “terminação carboxila” (abreviada terminação-C) refere-se ao grupo carboxila livre no aminoácido na terminação carboxila de um peptídeo, ou ao grupo carboxila de um aminoácido em qualquer outra localização dentro do peptídeo.

Tipicamente, os aminoácidos compondo um peptídeo são numerados na ordem, iniciando na terminação amino e aumentando na direção da terminação carboxila do peptídeo. Assim, quando um aminoácido é citado em “seguir” outro, aquele aminoácido é posicionado mais próximo da

terminação carboxila do peptídeo do que o aminoácido precedente.

O termo “resíduo” é aqui usado para se referir a um aminoácido que é incorporado em um peptídeo por uma ligação amida. Como tal, o aminoácido pode ser um aminoácido naturalmente ocorrente ou, se não limitado de outro modo, pode incluir análogos conhecidos de aminoácidos naturais que funcionam em uma maneira similar à dos aminoácidos naturalmente ocorrentes (i.e., miméticos de aminoácido). Além disso, um mimético de ligação amida inclui modificações de estrutura principal de peptídeo bem conhecidas por aquelas pessoas experientes na arte.

A frase “consistindo essencialmente de” é aqui usada para excluir quaisquer elementos que substancialmente alterariam as propriedades essenciais dos peptídeos aos quais a frase se refere. Assim, a descrição de um peptídeo “consistindo essencialmente de” exclui quaisquer substituições, adições ou deleções de aminoácido, que substancialmente alterariam a atividade biológica daquele peptídeo.

Ademais, uma pessoa experiente na arte reconhecerá que, como mencionado acima, adições, deleções ou substituições individuais que alteram, adicionam ou deletam um único aminoácido ou uma percentagem pequena de aminoácidos (tipicamente menos de 5%, mais tipicamente menos de 1%) em uma seqüência codificada são variações conservativamente modificadas onde as alterações resultam na substituição de um aminoácido por um aminoácido quimicamente similar. Tabelas de substituição conservativa proporcionando aminoácidos funcionalmente similares são bem conhecidas na arte. Os seguintes seis grupos contêm cada um os aminoácidos que são substituições conservativas de uns pelos outros:

- 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
- 2) Ácido Aspártico (D), Ácido Glutâmico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);

- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); e
6) Fenil-alanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W).

As frases “isolado” ou “biologicamente puro” referem-se ao material que está substancialmente ou essencialmente livre de componentes que normalmente acompanham-no como encontrados em seu estado nativo. Assim, os peptídeos aqui descritos não contêm materiais normalmente associados com seu ambiente *in situ*. Tipicamente, os peptídeos imunogênicos, isolados aqui descritos são pelo menos cerca de 80% puros, normalmente pelo menos 90%, e preferivelmente pelo menos 95% conforme medido por intensidade de banda sobre um gel corado com prata.

Homogeneidade ou pureza de proteína pode ser indicada por numerosos métodos bem conhecidos na arte, tal como eletroforese em gel de poliacrilamida de uma amostra de proteína, seguida por visualização sob coloração. Para certos propósitos resolução alta será necessária e HPLC ou meio similar para purificação será utilizado.

Quando os peptídeos imunogênicos são relativamente curtos em comprimento (i.e., menores do que cerca de 50 aminoácidos), são muitas vezes sintetizados usando técnicas de síntese química padrão de peptídeo.

Síntese em fase sólida na qual o aminoácido C-terminal da seqüência é ligado em um suporte insolúvel seguido pela adição seqüencial dos aminoácidos restantes na seqüência é um método preferido para a síntese química dos peptídeos imunogênicos aqui descritos. Técnicas para síntese em fase sólida são conhecidas por aquelas pessoas experientes na arte..

Alternativamente, os peptídeos imunogênicos aqui descritos são sintetizados usando metodologia de ácido nucleico recombinante. Geralmente, esta envolve a criação de uma seqüência de ácido nucleico que codifica o peptídeo, posicionando o ácido nucleico dentro de um cassete de expressão sob o controle de um promotor particular, expressando o peptídeo em um hospedeiro, isolando o peptídeo ou polipeptídeo expressado e, se

requerido, renaturando o peptídeo. Técnicas suficientes para guiar uma pessoa experiente através de tais procedimentos são encontradas na literatura.

Uma vez expressados, os peptídeos recombinantes podem ser purificados de acordo com procedimentos padrão, incluindo precipitação por sulfato de amônio, colunas de afinidade, cromatografia em coluna, eletroforese em gel e semelhante. Composições substancialmente puras de cerca de 50% a 95% de homogeneidade são mais preferidas para uso como agentes terapêuticos.

Uma pessoa experiente na arte reconhecerá que após a síntese química, purificação ou expressão biológica, os peptídeos imunogênicos podem possuir uma conformação substancialmente diferente das conformações nativas dos peptídeos constituintes. Neste caso, é muitas vezes necessário desnaturar e reduzir o peptídeo antiproliferativo e então fazer com que o peptídeo retorne para a conformação preferida. Métodos de redução e de desnaturação de proteínas e de indução de redobramento são conhecidos por aquelas pessoas experientes na arte.

Antigenicidade da proteína purificada pode ser confirmada, por exemplo, pela demonstração de reação com soro imune, ou com antisoros produzidos contra a própria proteína.

Os termos “um”, “uma”, “o”, e “a”, são aqui usados como definidos para significarem “um ou mais” e incluem o plural a não ser que o contexto seja inapropriado.

Os termos “detectar” ou “detectado” como aqui usados significam o uso de técnicas conhecidas para detecção de moléculas biológicas tais como métodos imunoquímicos ou histológicos e referem-se à determinação qualitativa ou quantitativa da presença ou concentração da biomolécula sob investigação.

Por “isolado” quer-se dar o significado de uma molécula biológica livre de pelo menos alguns dos componentes com os quais ela

naturalmente ocorre.

Os termos “anticorpo” ou “anticorpos” como aqui usados são termos reconhecidos na arte e são entendidos para se referirem às moléculas ou fragmentos ativos de moléculas que se ligam em antígenos conhecidos, particularmente às moléculas de imunoglobulina e em porções imunologicamente ativas de moléculas de imunoglobulina, i.e moléculas que contêm um sítio de ligação que se liga imuno especificamente em um antígeno. A imunoglobulina de acordo com a invenção pode ser de qualquer tipo (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA e IgY) ou classe (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou subclasses de molécula de imunoglobulina.

“Anticorpos” são intencionados dentro do escopo da presente invenção para incluírem anticorpos monoclonais, policlonais, quiméricos, de cadeia única, biespecíficos, simianizados, de humano e humanizados bem como seus fragmentos ativos. Exemplos de fragmentos ativos de moléculas que se ligam em antígenos conhecidos incluem fragmentos Fab e F(ab')₂, incluindo os produtos de uma biblioteca de expressão de imunoglobulina Fab e fragmentos de ligação de epítipo de qualquer um dos anticorpos e fragmentos mencionados acima.

Estes fragmentos ativos podem ser derivados de um anticorpo da presente invenção por numerosas técnicas. Por exemplo, anticorpos monoclonais purificados podem ser clivados com uma enzima, tal como pepsina, e submetidos à filtração em gel de HPLC. A fração apropriada contendo os fragmentos Fab pode ser então colhida e concentrada por filtração em membrana e semelhante. Para descrição adicional de técnicas gerais para o isolamento de fragmentos ativos de anticorpos, veja por exemplo, Khaw, B. A. et al. J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982); Rousseaux et al. Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986.

Um “anticorpo humanizado” refere-se a um tipo de anticorpo engenheiro possuindo suas CDRs derivadas de uma imunoglobulina doadora

de não-humano, as partes derivadas de imunoglobulina restantes da molécula sendo derivadas de uma (ou mais) imunoglobulina(s) de humano. Em adição, resíduos de suporte de molde podem ser alterados para preservação da afinidade de ligação. Métodos para obtenção de “anticorpos humanizados”
5 são bem conhecidos na arte. (veja, e.g., Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)).

Um “anticorpo humanizado” também pode ser obtido por uma nova abordagem de engenharia genética que permite a produção de anticorpos
10 policlonais afinidade-maturados semelhantes a de humano tais como, por exemplo, de coelhos. (<http://www.rctech.com/bioventures/therapeutic.php>).

O termo “anticorpo monoclonal” é também bem conhecido na arte e refere-se a um anticorpo que é produzido em massa em laboratório a partir de um único clone e que reconhece apenas um antígeno. Anticorpos
15 monoclonais são tipicamente preparados pela fusão de uma célula-B produtora de anticorpo, normalmente de vida curta, em uma célula de crescimento rápido, tal como uma célula de câncer (algumas vezes referida como uma célula “imortal”). A célula híbrida resultante, ou hibridoma, multiplica-se rapidamente, criando um clone que produz quantidades grandes
20 do anticorpo.

“Anticorpo funcionalmente equivalente” é entendido dentro do escopo da presente invenção para se referir a um anticorpo que substancialmente compartilha pelo menos uma propriedade funcional maior com um anticorpo acima mencionado e aqui descrito compreendendo:
25 especificidade de ligação em proteína β -amilóide, particularmente na proteína A β 1-42, e mais particularmente na região epitópica 4-16 da proteína A β 1-42, imunorreatividade *in vitro*, inibição de agregação dos monômeros de A β 1-42 nos quais fibrilas poliméricas de massa molecular alta e/ou desagregação de fibrilas poliméricas A β 1-42 pré-formadas, e/ou uma propriedade de quebra

de β -foliada e alívio dos efeitos dos distúrbios associados com amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeld Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular, quando profilática ou terapêuticamente administrado. Os anticorpos podem ser de qualquer classe tal como IgG, IgM, ou IgA, etc ou de qualquer subclasse tal como IgG1, IgG2a, etc e outras subclasses mencionadas aqui acima ou conhecidas na arte.

Ademais, os anticorpos podem ser produzidos por qualquer método, tal como exibição de fago, ou produzidos em qualquer organismo ou linhagem celular, incluindo bactérias, inseto, mamífero ou outro tipo de célula ou de linhagem celular que produz anticorpos com características desejadas, tal como anticorpos humanizados. Os anticorpos também podem ser formados pela combinação de uma porção Fab e uma região Fc de espécies diferentes.

O termo “antígeno” refere-se a uma entidade ou a um seu fragmento que pode induzir uma resposta imune em um organismo, particularmente um animal, mais particularmente um mamífero incluindo um humano. O termo inclui imunógenos e regiões responsáveis pela antigenicidade ou determinantes antigênicos.

Como aqui usado, o termo “solúvel” significa parcial ou completamente dissolvido em uma solução aquosa.

Também como aqui usado, o termo “imunogênico” refere-se às substâncias que ocasionam ou intensificam a produção de anticorpos, células-T e outras células imunes reativas direcionadas contra um agente imunogênico e contribuem para uma resposta imune em humanos ou animais.

Uma resposta imune ocorre quando um indivíduo produz anticorpos suficientes, células-T e outras células imunes reativas contra composições imunogênicas da presente invenção administradas para moderarem ou aliviarem o distúrbio a ser tratado.

O termo “hibridoma” é reconhecido na arte e é entendido por aquelas pessoas experientes na arte para se referir a uma célula produzida pela fusão de uma célula produtora de anticorpo e uma célula imortal, e.g. uma célula de mieloma múltiplo. Esta célula de híbrida é capaz de produzir um fornecimento contínuo de anticorpo. Veja a definição de “anticorpo monoclonal” acima e os Exemplos abaixo para uma descrição mais detalhada do método de fusão.

O termo “carreador” como aqui usado significa uma estrutura na qual o peptídeo antigênico ou construto supramolecular pode ser incorporado em ou pode estar associado com, deste modo apresentando ou expondo peptídeos antigênicos ou parte do peptídeo ao sistema imune de um humano ou animal. Qualquer partícula que pode ser adequadamente usada em terapia de animal ou humano tal como, por exemplo, uma vesícula, a partícula ou um corpo particulado pode ser usado como um carreador dentro do contexto da presente invenção.

O termo “carreador” adicionalmente compreende métodos de liberação nos quais composições de construto antigênico supramolecular compreendendo o peptídeo antigênico podem ser transportadas para sítios desejados por mecanismos de liberação. Um exemplo de um tal sistema de

liberação utiliza metais coloidais tal como outro coloidal.

Proteínas carreadoras que podem ser usadas nas composições de construto antigênico supramolecular da presente invenção incluem, mas não são limitadas a, proteína ligante de maltose “MBP”; albumina de soro
5 bovino “BSA”; hemocianina de lapa “KLH”; ovalbumina; flagelina; tiroglobulina; albumina de soro de qualquer espécie; gama-globulina de qualquer espécie; células singeneicas; células singeneicas possuindo antígenos; e polímeros de D- e/ou L- aminoácidos.

No construto antigênico supramolecular de acordo com a
10 presente invenção, o lipossomo pode possuir uma função dual pelo fato de que podem ser usado como um carreador compreendendo o construto supramolecular como aqui antes descrito e, ao mesmo tempo, função como um adjuvante para aumentar ou estimular a resposta imune dentro do animal ou humano alvo a ser tratado com a vacina terapêutica de acordo com a
15 invenção. Também é para ser entendido que as composições de construto antigênico supramolecular da presente invenção podem adicionalmente compreender adjuvantes adicionais incluindo, mas não limitados a, hemocianina de lapa (KLH), albumina de soro bovino (BSA) e outros adjuvantes tal como, por exemplo, lipídeo A, alume, fosfato de cálcio,
20 interleucina 1, e/ou microcápsulas de polissacarídeos e proteínas, mas particularmente um lipídeo A desintoxicado, tal como monofosforil- ou difosforil-lipídeo A, ou alume, outros conservantes, diluentes, emulsificadores, estabilizadores, e outros componentes que são conhecidos e usados em vacinas da arte anterior. Além disso, qualquer sistema adjuvante
25 conhecido na arte pode ser usado na composição da presente invenção. Tais adjuvantes incluem, mas não são limitados a, adjuvante incompleto de Freund, adjuvante completo de Freund, manana acetilada β -(1,4)-ligada polidispersada (“Acemannan”), TITERMAX® (adjuvantes de copolímero de polioxietileno-polioxipropileno da CytRx Corporation), Adjuvantes de lipídeo

modificado da Chiron Corporation, adjuvantes de derivado de saponina da Cambridge Biotech, Bordetella pertussis morta, o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas, ânions poliméricos grandes tal como sulfato de dextrano, e geles inorgânicos tais como alume, hidróxido de alumínio, ou fosfato de alumínio.

Ademais, o termo “quantidade efetiva” refere-se à quantidade de composição antigênica/imunogênica que, quando administradas a um humano ou animal, ocasiona uma resposta imune. A quantidade efetiva é prontamente determinada por uma pessoa experiente na arte seguindo procedimentos rotineiros.

O termo “construto antigênico supramolecular” refere-se a um construto antigênico de acordo com a presente invenção e como aqui antes descrito. Em particular, “construto antigênico supramolecular” refere-se a um construto antigênico compreendendo um antígeno de peptídeo A β de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, especialmente um fragmento de peptídeo A β da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 15), mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13), ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14, especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3, cujo peptídeo antigênico is apresentado ligado em, ou incorporado ou reconstituído em um carreador tal como, por exemplo, uma vesícula, uma molécula ou corpo particulado mas, particularmente, um

lipossomo. Mais particularmente, o peptídeo antigênico de acordo com a invenção é modificado por um grupo lipofílico ou hidrofóbico, que facilita a inserção na bicamada lipídica do carreador de lipossomo/adjuvante imune, particularmente por um grupo lipofílico ou hidrofóbico incluindo, mas não limitado a, um ácido graxo, um triglicerídeo ou um fosfolipídeo, mas especialmente um ácido graxo, um triglicerídeo ou um fosfolipídeo, no qual a estrutura principal de carbonos de ácido graxo possui pelo menos 10 átomos de carbono que funciona como uma âncora para o peptídeo na bicamada de lipossomo e possui uma dimensão que leva o peptídeo a ser posicionado e estabilizado em proximidade íntima da superfície de lipossomo.

Por exemplo, as composições de construto antigênico supramolecular de acordo com a invenção podem ser parenteralmente administradas, mas particularmente intraperitonealmente, intravenosamente, subcutaneamente e intramuscularmente em uma faixa de aproximadamente 1,0 µg a 10,0 mg por paciente, embora esta faixa não é intencionada para ser limitante. A quantidade real de composição requerida para ocasionar uma resposta imune variará para cada paciente individual dependendo da imunogenicidade da composição administrada e da resposta imune do indivíduo. Conseqüentemente, a quantidade específica administrada a um indivíduo será determinada por experimentação rotineira e baseada no treinamento e na experiência de uma pessoa experiente na arte.

O construtos antigênicos supramoleculares de acordo com a presente invenção pode ser usado para a preparação de uma composição de vacina para induzir uma resposta imune em um organismo, em particular um animal ou humano, para a prevenção, o tratamento ou o alívio dos efeitos de amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por

uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que
5 estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeldt Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular, mas
10 particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI).

Assim um objetivo da presente invenção é proporcionar um método para a prevenção, o tratamento ou o alívio dos efeitos de amiloidose,
15 um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo,
20 debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeldt
25 Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular, mas particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação

cognitiva suave (MCI), pela administração de um construto antigênico supramolecular de acordo com a presente invenção, mas particularmente uma composição de vacina compreendendo tais construtos antigênicos supramoleculares de acordo com a invenção a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, afetado por um tal distúrbio e assim em
5 necessidade de um tal tratamento.

Em outra modalidade da presente invenção é proporcionado um método para a preparação de uma composição de vacina para induzir uma resposta imune em um organismo, em particular um animal ou humano
10 afetado por um tal distúrbio, doença ou condição e assim em necessidade de um tal tratamento, para a prevenção, o tratamento ou o alívio dos efeitos de amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amiloide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como
15 Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que
20 estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amiloide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeldt Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular, mas
25 particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI) Em ainda uma outra modalidade da presente invenção é portanto proporcionado um método para a preparação de uma composição para a prevenção, o tratamento ou o alívio dos efeitos de amiloidose, um

grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma
5 perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como
10 paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeldt Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular, mas particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da
15 capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), compreendendo formulação de um anticorpo de acordo com a invenção em uma forma farmacêuticamente aceitável.

Em uma modalidade específica, a presente invenção faz uso de uma preparação antigênica que resulta em exposição e estabilização
20 intensificadas de uma conformação de antígeno preferida, que enfim leva a uma resposta imune elevadamente específica e resulta na geração de anticorpos com propriedades únicas.

Em uma modalidade, a presente invenção proporciona composições imunogênicas compreendendo um construto antigênico
25 supramolecular compreendendo antígeno de peptídeo β -amilóide de acordo com a invenção e como aqui antes descrito representativo da parte N-terminal do peptídeo β -amilóide, cujo peptídeo antigênico é modificado de tal modo que é capaz de manter e estabilizar uma conformação definida do antígeno, particularmente uma conformação que é caracterizada por uma proporção

equilibrada de porções de espiral aleatória, α -helicoidal e de β -foliada. Esta conformação definida leva à indução de uma resposta imune forte e elevadamente específica sob introdução em um animal ou um humano.

Um modo de alcançar a formação e a estabilização da conformação desejada do peptídeo antigênico é pela apresentação do peptídeo antigênico ligado em, ou incorporado ou reconstituído, parcial ou totalmente, em um carreador tal como, por exemplo, uma vesícula, uma molécula ou corpo particulado ou qualquer outro meio que possa adequadamente servir como um carreador/adjuvante para o peptídeo antigênico. Em uma modalidade específica da invenção, o peptídeo antigênico é ligado em, ou incorporado ou reconstituído no carreador através de interações fracas, tais como, por exemplo, interação de van der Waals, hidrofóbica ou eletrostática, ou uma combinação de duas ou mais das citadas interações, de tal modo que um peptídeo seja apresentado com uma conformação específica, que é mantida e estabilizada pela restrição de citado peptídeo antigênico em sua liberdade de movimento tridimensional de modo que mudanças conformacionais sejam evitadas ou severamente restringidas.

Quando uma vesícula, uma partícula ou um corpo particulado é usado como um carreador/adjuvante tal como, por exemplo, um lipossomo, a composição do peptídeo antigênico pode ser escolhida de tal modo que sua carga efetiva total seja idêntica àquela da superfície do carreador/adjuvante na qual o peptídeo está ligado. Forças de repulsão eletrostática sendo efetivas entre a superfície carregadora/adjuvante identicamente carregada e o peptídeo antigênico, mas particularmente a superfície carregadora identicamente carregada e os resíduos de aminoácido constituindo o peptídeo antigênico e mais particularmente a superfície carregadora identicamente carregada e os resíduos de aminoácido identicamente carregados compreendidos no peptídeo antigênico, pode fazer com que o peptídeo antigênico adquira uma conformação definida, elevadamente específica e estabilizada que garante

uma atividade biológica alta. como um resultado, o peptídeo antigênico é exposto e apresentado em uma conformação que é elevadamente biologicamente ativa pelo fato de que permite que o sistema imune do organismo alvo livremente interaja com os determinantes antigênicos contidos no construto antigênico na conformação biologicamente ativa, que leva a uma resposta imune forte e conformação-específica, resultando em, por exemplo, um título de anticorpo alto no organismo alto.

Por coordenação cuidadosa das cargas efetivas totais do peptídeo antigênico por um lado e do carreador no qual o peptídeo se torna ligado, incorporado ou reconstituído por outro lado, o peptídeo antigênico é apresentado exposto sobre, ou em íntima proximidade da, superfície carregadora em uma conformação que é induzida e estabilizada pelas forças de repulsão eletrostática sendo efetivas entre a superfície carregadora identicamente carregada e o peptídeo antigênico, mas particularmente a superfície carregadora identicamente carregada e os resíduos de aminoácido constituindo o peptídeo antigênico e mais particularmente a superfície carregadora identicamente carregada e os resíduos de aminoácido identicamente carregados compreendidos no peptídeo antigênico. Isto resulta em uma apresentação do construto antigênico de tal modo que está livremente acessível ao maquinário de defesa imune do organismo alvo e assim é capaz de induzir uma resposta imunogênica forte e elevadamente específica sob administração a um animal ou um humano. A resposta imunogênica pode ser adicionalmente aumentada pelo uso de um lipossomo como um carreador, cujo lipossomo pode funcionar como um adjuvante para aumentar ou estimular a resposta imune dentro do animal ou humano alvo a ser tratado com a vacina terapêutica de acordo com a invenção. Opcionalmente, o lipossomo pode, em adição, conter um outro adjuvante tal como, por exemplo, lipídeo A, alume, fosfato de cálcio, interleucina 1, e/ou microcápsulas de polissacarídeos e proteínas, mas particularmente a lipídeo A

desintoxicado, tal como monofosforil- ou difosforil-lipídeo A, ou alume.

Em uma modalidade específica da invenção um peptídeo antigênico de acordo com a invenção e aqui antes descrito, particularmente um peptídeo antigênico cuja carga efetiva total é negativa, é usado
5 reconstituído em um lipossomo, particularmente um lipossomo cujos constituintes são escolhidos de tal modo que uma carga efetiva total do grupo cabeça do lipossomo é negativa. Em particular, o lipossomo é composto de constituintes selecionados do grupo consistindo de dimiristoil-fosfatidil-colina (DMPC), dimiristoil-fosfatidil-etanol-amina (DMPEA), dimiristoil-fosfatidil-
10 glicerol (DMPG) e colesterol e, opcionalmente, adicionalmente contém monofosforil lipídeo A ou qualquer outro adjuvante que pode ser adequadamente usado dentro do escopo da presente invenção tal como, por exemplo, alume, fosfato de cálcio, interleucina 1, e/ou microcápsulas de polissacarídeos e proteínas.

15 Em outra modalidade específica da invenção um antígeno de peptídeo modificado de acordo com a invenção e como aqui antes descrito é proporcionado covalentemente ligado em uma molécula de tipo âncora que é capaz de inserir no carreador/adjuvante fixando deste modo o peptídeo no carreador/adjuvante e apresentando-o sobre ou intimamente próximo da
20 superfície de uma molécula de carreador/adjuvante de tal modo que forças eletrostáticas podem se tornar efetivas como aqui antes descrito.

Quando lipossomos são usados como um carreador/adjuvante, o construto de peptídeo antigênico geralmente possui uma cauda hidrofóbica que se insere dentro da membrana de lipossomo quando é formado.

25 Adicionalmente, peptídeos antigênicos podem ser modificados para conterem uma cauda hidrofóbica de modo que possa ser inserida dentro do lipossomo.

Os construtos antigênicos supramoleculares da presente invenção geralmente compreendem peptídeos modificados para intensificação

do efeito antigênico no qual tais peptídeos podem ser modificados por peguilação (usando poli(etileno-glicol) ou poli(etileno-glicol) modificado), ou modificado via outros métodos tal como por ácido palmítico como aqui antes descrito, poli-aminoácidos (por exemplo poli-glicina, poli-histidina), poli-sacarídeos (por exemplo poli(ácido galacturônico), poli(ácido láctico), poliglicolídeo, quitina, quitosano), polímeros sintéticos (poliamidas, poliuretanos, poliésteres) ou co-polímeros (eg. poli(ácido metacrílico) e N-(2-hidróxi)-propil-metacrilamida) e semelhante.

Em uma modalidade específica da invenção, são proporcionados peptídeos antigênicos de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, que são modificados para conterem uma cauda hidrofóbica de modo que os citados peptídeos podem ser inseridos no lipossomo. Em particular, o peptídeo β -amilóide pode ser modificado por um grupo lipofílico ou hidrofóbico que facilita a inserção na bicamada lipídica do carreador/adjuvante. Os grupos lipofílicos ou hidrofóbicos da presente invenção podem ser ácidos graxos, triglicerídeos e fosfolipídeos, particularmente ácidos graxos, triglicerídeos e fosfolipídeos, nos quais a estrutura principal de carbonos de ácido graxo possui pelo menos 10 átomos de carbono particularmente grupos lipofílicos possuindo ácidos graxos com uma estrutura principal de carbonos de pelo menos aproximadamente 14 átomos de carbono e até aproximadamente 24 átomos de carbono, mais particularmente grupos hidrofóbicos possuindo uma estrutura principal de carbonos de pelo menos 14 átomos de carbono. Exemplos de grupos hidrofóbicos incluem, mas não são limitados a, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolênico e colesterol ou DSPE. Em uma modalidade específica da invenção o grupo hidrofóbico é ácido palmítico.

Palmitoilação, embora proporcione uma âncora para o peptídeo na bicamada de lipossomo, devido ao comprimento relativo reduzido

do grupo de ácido graxo C16:0 faz com que o peptídeo seja apresentado exposto sobre ou em proximidade íntima da superfície de lipossomo. Portanto, as células processando o antígeno terão que capturar o lipossomo inteiro com o peptídeo.

5 Em outra modalidade da invenção, PPOR EXEMPLO é usado na preparação de um construto supramolecular, no qual a terminação de PPOR EXEMPLO livre é covalentemente ligada em uma molécula de fosfatidil-etanol-amina (onde o ácido graxo pode ser: mirístico, palmítico, esteárico, oleico etc. ou combinação dos mesmos). Esta estrutura
10 supramolecular pode ser reconstituída em lipossomos consistindo de fosfolipídeos e colesterol (fosfatidil-etanol-amina, fosfatidil-glicerol, colesterol em razões molares variadas. Outros fosfolipídeos podem ser usados. Lipídeo A é usado em uma concentração de aproximadamente 40 µg/pmol de fosfolipídeos.

15 Ainda outro objetivo da presente invenção é a provisão de composições de vacina compreendendo construtos antigênicos supramoleculares compreendendo um peptídeo antigênico de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, cujo peptídeo é modificado de modo a intensificar o efeito antigênico no qual tal peptídeo, particularmente um
20 fragmento de peptídeo Aβ da parte N-terminal do peptídeo Aβ, mas particularmente um fragmento de peptídeo Aβ consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ2), 1-16(Δ4), 1-16(Δ5), 1-16(Δ6), 1-16(Δ8), 1-16(Δ9), 1-16(Δ10); 1-16(Δ12), 16(Δ13), 16(Δ14), 1-16(Δ15), 1-15(Δ2), 1-15(Δ4), 1-15(Δ5), 1-15(Δ6), 1-15(Δ8), 1-15(Δ9), 1-15(Δ10); 1-15(Δ12), 15(Δ13),
25 15(Δ14), um antígeno de peptídeo Aβ1-16(Δ16), mais particularmente um antígeno de peptídeo Aβ1-16(Δ14) ou Aβ1-16(Δ13), ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo Aβ1-14, especialmente um antígeno de peptídeo Aβ1-15, mas especialmente um fragmento de peptídeo Aβ

consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3, é modificado via peguilação (usando poli(etileno-glicol) ou poli(etileno-glicol) modificado), ou modificado via outros métodos tais como por poli-aminoácidos (e.g. poli-glicina, poli-histidina), poli-sacarídeos (e.g. poli(ácido galacturônico), poli(ácido láctico), poliglicolídeo, quitina, quitosano), polímeros sintéticos (poliamidas, poliuretanos, poliésteres) ou co-polímeros (poli(ácido metacrílico) e N-(2-hidróxi) propil metacrilamida) e semelhante.

Em outra modalidade da invenção, o antígeno de peptídeo β -amilóide de acordo com a invenção e como aqui antes descrito é um fragmento de peptídeo A β palmitoilado da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β palmitoilado consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 15) palmitoilado, mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13) palmitoilado, ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14 palmitoilado, especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15 palmitoilado, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β palmitoilado consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3, modificadas por resíduos de palmitoíla covalentemente ligados em cada extremidade do peptídeo para resultar em entre 2 e 4, particularmente 4 resíduos, reconstituído em um lipossomo. Este construto palmitoilado antigênico pode ser usado para o tratamento de uma amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e com o objetivo de aliviar os sintomas associados com

a doença ou para restaurar uma condição verificada em indivíduos saudáveis que não estão afetados pela doença.

Em certas modalidades, o construto antigênico supramoleculares da presente invenção compreendem uma seqüência de peptídeo antigênico como aqui antes descrito, covalentemente ligada em lisina peguilada - pelo menos uma em cada terminação mas particularmente 1 ou 2 em cada formulação. O comprimento da cadeia de PPOR EXEMPLO (poli(etileno-glicol)) pode variar de $n = 8$ a $n = 150.000$ ou mais, particularmente de $n = 10$ a $n = 80.000$, mais particularmente de $n = 10$ a $n = 10.000$. Em uma modalidade específica da invenção o comprimento da cadeia de PPOR EXEMPLO é não maior do que $n = 45$, particularmente entre $n = 5$ e $n = 40$, mais particularmente entre $n = 10$ e $n = 30$, e ainda mais particularmente $n = 10$.

Lipossomos que podem ser usados nas composições da presente invenção incluem aqueles conhecidos por uma pessoa experiente na arte. Qualquer um dos lipídeos padrão úteis para preparar os lipossomos pode ser usado. Lipossomos de bicamada e de multicamadas padrão podem ser usados para preparar composições da presente invenção. Embora qualquer método de preparação de lipossomos conhecido por uma pessoa experiente na arte possa ser usado, os lipossomos mais preferidos são preparados de acordo com o método de Alving et al., Infect. Immun. 60:2438-2444, 1992, aqui incorporado como referência. O lipossomo opcionalmente pode conter um adjuvante ou e imunomodulador ou ambos. Um imunomodulador preferido é lipídeo A, particularmente um lipídeo A desintoxicado tal como, por exemplo, monofosforil- ou difosforil-lipídeo A.

O lipossomo pode possuir uma função dual pelo fato de que pode ser usado como um carreador compreendendo o construto supramolecular como aqui antes descrito e, ao mesmo tempo, função como um adjuvante para aumentar ou estimular a resposta imune dentro do animal

ou humano alvo a ser tratado com a vacina terapêutica de acordo com a invenção. Opcionalmente, o lipossomo pode, em adição, conter um outro adjuvante ou e imunomodulador ou ambos tal como, por exemplo, lipídeo A, alume, fosfato de cálcio, interleucina 1, e/ou microcápsulas de polissacarídeos e proteínas, mas particularmente a lipídeo A, mais particularmente a lipídeo A desintoxicado, tal como monofosforil- ou difosforil-lipídeo A, ou alume.

Em particular, amiloidose relacionada com a idade incluindo distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeld Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular, mas particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), é tratada pela administração de um construto antigênico supramolecular de acordo com a presente invenção, mas particularmente de uma composição de vacina compreendendo tais construtos antigênicos supramoleculares de acordo com a invenção a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, afetado por um tal distúrbio e assim em necessidade de um tal tratamento mas especialmente Mal de Alzheimer, cuja manifestação sintomática é evidenciada por um esquecimento brando a até uma total perda de memória.

A composição da presente invenção compreendendo um construto antigênico supramolecular de acordo com a invenção e como aqui

antes descrito pode ser preparada na forma de uma solução líquida, ou de uma suspensão injetável, se não em uma forma sólida adequada para solubilização antes da injeção no contexto de, por exemplo, um kit para fazer uso da presente composição, como descrito abaixo.

5 A composição da presente invenção compreendendo um construto antigênico supramolecular é administrada a um humano ou animal sofrendo de uma doença amilóide-associada para induzir uma resposta imune em citado humano ou animal para aliviar os sintomas associados com a doença ou para restaurar uma condição encontrada em indivíduos saudáveis
10 que não estão afetados pela doença.

 As composições da presente invenção são administradas a um humano ou animal por qualquer uma das rotas de administração apropriadas. Em geral, a composição pode ser administrada por rotas tópica, oral, retal, nasal ou parenteral (por exemplo, intravenosa, subcutânea, ou intramuscular).
15 Em adição, a composição pode ser incorporada em matrizes de liberação prolongada tais como polímeros biodegradáveis, os polímeros sendo implantados na vizinhança de onde a liberação é desejada, por exemplo, no sítio de um tumor. O método inclui a administração de uma dose única, administração de doses repetidas em intervalos de tempo predeterminados, e
20 administração prolongada por um período de tempo predeterminado.

 Em particular, a composição de peptídeo antigênico de acordo com a invenção é administrada por injeção parenteral, particularmente por injeção intraperitoneal, intravenosa, subcutânea e intramuscular.

 A dosagem da composição dependerá da condição sendo
25 tratada, da composição particular usada, e de outros fatores clínicos tais como peso, tamanho e condição do paciente, área superficial corporal, o composto ou composição particular a ser administrado(a), outras drogas sendo concorrentemente administradas, e a rota de administração.

 A composição de vacina terapêutica de acordo com a invenção

pode ser administrada em combinação com outras substâncias biologicamente ativas e procedimentos para o tratamento de doenças. As outras substâncias biologicamente ativas podem ser parte da mesma composição já compreendendo a vacina terapêutica de acordo com a invenção, na forma de uma mistura, na qual a vacina terapêutica e a outra substância biologicamente ativa são intermisturadas em ou com o mesmo carreador e/ou solvente farmacologicamente aceitável ou podem ser proporcionadas separadamente como parte de composições separadas, que podem ser oferecidas separadamente ou juntamente na forma de um kit de partes.

A composição de vacina terapêutica de acordo com a invenção pode ser administrada concomitantemente com a outra substância biologicamente ativa ou outras substâncias biologicamente ativas, intermitente ou seqüencialmente. Por exemplo, a composição de vacina terapêutica de acordo com a invenção pode ser administrada simultaneamente com uma primeira substância biologicamente ativa adicional ou seqüencialmente após ou antes da administração da vacina terapêutica. Se um esquema de aplicação é escolhido onde mais do que uma substância biologicamente ativa adicional é administrada juntamente com a pelo menos uma vacina terapêutica If de acordo com a invenção, os compostos ou substâncias podem ser parcialmente administrados, simultaneamente, parcialmente seqüencialmente em várias combinações.

Outro objetivo da presente invenção é proporcionar misturas de uma vacina terapêutica de acordo com a invenção e, opcionalmente, uma ou mais outras substâncias biologicamente ativas, bem como métodos de uso de uma vacina terapêutica de acordo com a invenção, ou suas misturas incluindo composições compreendendo a citada vacina terapêutica ou misturas de vacinas terapêuticas para a prevenção e/ou o tratamento terapêutico e/ou o alívio dos efeitos de amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amiloide incluindo

amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade tal como doenças incluindo, mas não limitadas a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, 5 debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeld 10 Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular.

As misturas de acordo com a invenção podem compreender, em adição a uma vacina terapêutica de acordo com a invenção, uma 15 substância biologicamente ativa tal como, por exemplo, compostos conhecidos usados na medicação de amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com amilóide ou proteína tipo-amilóide tal como a proteína A β envolvida em Mal de Alzheimer incluindo um anticorpo produzido contra um antígeno de peptídeo imunogênico, particularmente um 20 anticorpo produzido contra um antígeno imunogênico apresentado na forma de um construto antigênico supramolecular, mais particularmente um anticorpo de acordo com a presente invenção e como aqui descrito.

Em outra modalidade da invenção, o outro composto ou substância biologicamente ativa também pode ser um agente terapêutico que 25 pode ser usado no tratamento de doenças e distúrbios que são causados ou estão associados com amilóide ou proteínas tipo-amilóide incluindo amiloidose causada por amilóide β ou pode ser usado na medicação de outros distúrbios neuronais.

O outro composto ou substância biologicamente ativa pode

exercer seu efeito biológico pelo mesmo mecanismo da ou por mecanismo similar ao da vacina terapêutica de acordo com a invenção ou por um mecanismo de ação não relacionado ou por uma multiplicidade de mecanismos de ação relacionados e/ou não relacionados.

5 Geralmente, o outro composto biologicamente ativo pode incluir intensificadores de neurotransmissão, drogas psicoterapêuticas, inibidores acetilcolina-esterase, bloqueadores de canal de cálcio, aminas biogênicas, tranquilizadores de benzodiazepina, intensificadores de síntese, armazenagem ou liberação de acetilcolina, agonistas de receptor pós-sináptico
10 de acetilcolina, inibidores de monoamina-oxidase-A ou -B, antagonistas de receptor de N-metil-D-aspartato-glutamato, drogas antiinflamatórias não-esteroidais, antioxidantes, e antagonistas de receptor serotoninérgico.

Em particular, a mistura de acordo com a invenção pode compreender pelo menos um outro composto biologicamente ativo
15 selecionado do grupo consistindo de compostos contra estresse oxidativo, compostos anti-apoptóticos, quelantes de metal, inibidores de reparo de DNA tal como pirenzepina e metabólitos, ácido 3-amino-1-propano-sulfônico (3APS), 1,3-propano-dissulfonato (1,3PDS), ativadores de secretase, inibidores de β - e γ -secretases, proteínas tau, neurotransmissor, quebradores
20 de β -foliada, moléculas antiinflamatórias, ou inibidores de colinesterase (ChEIs) tal como tacrina, rivastigmina, donepezil, e/ou galantamina e outras drogas e suplementos nutritivos, juntos com uma vacina terapêutica de acordo com a invenção e, opcionalmente, um carreador e/ou um diluente e/ou um excipiente farmacologicamente aceitável.

25 Em uma outra modalidade, as misturas de acordo com a invenção podem compreender niacina ou memantina juntas com a vacina terapêutica de acordo com a invenção e, opcionalmente, um carreador e/ou um diluente e/ou um excipiente farmacologicamente aceitável.

Em ainda outra modalidade da invenção são proporcionadas

misturas que compreendem “antipsicóticos atípicos” tais como, por exemplo clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol ou olanzapina para o tratamento de sintomas psicóticos positivos e negativos incluindo alucinações, ilusões, distúrbios de pensamento (manifestados por incoerência marcante, descarrilhamento, tangencialidade), e comportamento bizarro ou desorganizado, bem como anedonia, afeto ausente, apatia, e supressão social, junto com uma vacina terapêutica de acordo com a invenção e, opcionalmente, um carreador e/ou um diluente e/ou um excipiente farmaceuticamente aceitável.

Em uma modalidade específica da invenção, as composições e misturas de acordo com a invenção e como aqui antes descrito compreendem a vacina de acordo com a invenção e a substância biologicamente ativa, respectivamente, em uma quantidade terapêutica ou profilaticamente ativa.

Outros compostos que podem ser adequadamente usados em misturas em combinação com a vacina de acordo com a invenção são descritos, por exemplo, em WO 2004/058258 (veja especialmente páginas 16 e 17) incluindo alvos de droga terapêutica (página 36-39), ácidos alcanosulfônicos e ácido alcanol-sulfônico (páginas 39-51), inibidores de colinesterase (páginas 51-56), antagonistas de receptor de NMDA (páginas 56-58), estrogênios (páginas 58-59), drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (páginas 60-61), antioxidantes (páginas 61-62), agonistas de receptores ativados por proliferadores de peroxisoma (PPAR) (páginas 63-67), agentes abaixadores de colesterol (páginas 68-75); inibidores de amilóide (páginas 75-77), inibidores de formação de amilóide (páginas 77-78), quelantes de metal (páginas 78-79), antipsicóticos e antidepressivos (páginas 80-82), suplementos nutricionais (páginas 83-89) e compostos aumentadores da disponibilidade de substâncias biologicamente ativas no cérebro (veja páginas 89-93) e pró-drogas (páginas 93 e 94), cujo documento é aqui incorporado como referência, mas especialmente os compostos mencionados nas páginas

indicadas acima.

É longamente conhecido que vacinação de um hospedeiro animal ou humano com uma proteína de hospedeiro norma pode levar ao desenvolvimento de auto- anticorpos direcionados contra a proteína de hospedeiros resultando em distúrbios coletivamente conhecidos como distúrbios autoimunes. A β e sua proteína precursora são tais proteínas normais. Uso destas proteínas de hospedeiro em uma vacinação portanto tem o potencial de criar efeitos colaterais indesejados. Há alguma evidência na literatura de que A β pode ativar uma resposta neuro-inflamatória que pode ser parcialmente causada por uma sobre-ativação do sistema de complemento, que já está elevadamente ativado em pacientes sofrendo de Mal de Alzheimer ou outras doenças neurodegenerativas.

A β de humano em sua conformação de β -foliada é um ativador poderoso do sistema de complemento de humano. Fortemente se liga em cauda de colágeno do complemento de humano Clq. Sobre-ativação do sistema de complemento pode resultar em inversão do sistema de defesa natural do hospedeiro e levar à autodestruição de células e tecidos incluindo neurônios e seus processos. Por exemplo, o complexo de ataque de membrana (MAC) que é parte do sistema de defesa do hospedeiro e protege o hospedeiro contra bactérias e vírus invasores pela inserção de si mesmo em citadas bactérias e vírus, sob sobre-ativação ele mesmo pode se inserir nas células hospedeiras e causar autodestruição. Sobre-ativação pode adicionalmente levar à estimulação de microglia para produzirem compostos tóxicos tais como radicais livres de oxigênio e proteases nocivas.

Assim um outro objetivo da presente invenção é prevenir que efeitos colaterais potenciais tais como complicações neurológicas causadas pela vacinação em um animal ou humano sofrendo de uma doença autoimune com um autoantígeno, que tem o potencial para adicionalmente estimular um sistema de complemento já sobre-ativado. Isto pode ser conseguido dentro do

escopo da presente invenção pela administração de um antígeno de peptídeo A β , particularmente um antígeno de peptídeo A β palmitoilado, mais particularmente o antígeno de peptídeo A β 1-15 palmitoilado, mas especialmente o antígeno de peptídeo de peptídeo A β 1-15 palmitoilado (ACI-
5 24, A β 1-15) em combinação com um inibidor de complemento.

Assim outra modalidade da invenção é a provisão de uma composição de vacina compreendendo em adição a um antígeno de peptídeo A β , particularmente o antígeno de peptídeo A β de acordo com a invenção e aqui antes descrito; um inibidor do sistema de complemento.

10 O inibidor de complemento pode ser um composto selecionado do grupo consistindo de Receptor 1 de complemento solúvel de humano, anti-anti-proteína C5 de complemento de humano tal como, por exemplo, um anticorpo monoclonal anti-C5 humanizado ou um fragmento de cadeia única de um anticorpo monoclonal humanizado, inibidor-N de C1-esterase e
15 Inibidor de C11 de Humano Natural.

Ênfase recente sobre co/morbidez de A β e doença cerebrovascular, a ligação entre A β e aterosclerose, debilitação cognitiva associada com angiopatia de amilóide, patologia microvascular cerebral significativa, e depuração deficiente de A β através da Barreira
20 Hematoencefálica em Mal de Alzheimer, tudo indica que o distúrbio vascular é uma característica importante de neurodegeneração crônica em Mal de Alzheimer. (Zlokovic, B.: (2005) Trends in Neurosciences 28, 202-208). Portanto, disfunção neurovascular poderia ter um papel maior na patogênese de Mal de Alzheimer.

25 Há uma evidência ampla de uma forte associação entre o declínio cognitivo em Mal de Alzheimer e distúrbio cerebrovascular (Torre, de la, J. C.: (2004) Neurol. Res. 26, 517-524, Gorelick, P. B.: (2004) Stroke 35, 2620-2622). Densidade microvascular reduzida, números aumentados de vasos fragmentados, mudança marcante de diâmetros de vaso, etc. têm sido

descritos em Mal de Alzheimer (Bailey, T. L. et al: (2004) Neurol. Res. 26, 573-578 Farkas, E., e Luiten, P. G.: (2001) Prof. Neurobiol. 64, 575-611).

Vários estudos, incluindo o estudo de Rotterdam baseado em população grande (Greenberg, S. M et al: (2004) Stroke 35, 2616-2619) têm
5 mostrado que fatores de risco vascular podem ser responsáveis pelo declínio cognitivo em idosos - levando à denominada “demência vascular”. Vários fatores de risco para Mal de Alzheimer e demência vascular se sobrepõem, incluindo ataques de isquemia transiente, aterosclerose, doença cardíaca, viscosidade sérica alta, etc.

10 Demência vascular ocorre como um resultado de dano no tecido cerebral após privação de oxigênio causada por vasos sanguíneos estreitados ou bloqueados no cérebro e é a segunda forma mais freqüente de demência. Pacientes freqüentemente sofrem de ambos Mal de Alzheimer e demência vascular. É estimado que 1,7 milhões de pessoas na EU e 55.000
15 pessoas nos USA sofrem de demência vascular.

Uma terapia restauradora de pressão de O₂ normal no cérebro, a despeito da debilitação de fluxo sanguíneo possui o potencial de significativamente influenciar a evolução de Mal de Alzheimer e de dramaticamente reduzir a demência vascular.

20 Assim ainda outra modalidade da invenção é a provisão de uma composição de vacina que compreende em adição a um antígeno de peptídeo A β , particularmente o antígeno de peptídeo A β de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, um composto que dispara um decréscimo da afinidade de hemoglobina/O₂ de tal modo que oxigênio é
25 liberado subseqüentemente para os tecidos de órgão.

Em particular, o composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂ pode ser um composto selecionado do grupo consistindo de uma droga antilipídêmica tal como, por exemplo, ácido clofíbrico ou bezafibrato incluindo os derivados de bezafibrato LR16 e L35, derivado de

uréia tal como, por exemplo, ácido [2-[4-[(aril-amino)-carbonil]-amino]-fenóxi]-2-metil-propiónico, um efetor alostérico de hemoglobina tal como, por exemplo, 2,3-difosfo-glicerato (DPG), hexaquisfosfato de inositol (IHP), e fosfato de piridoxal.

5 Mais particularmente, o composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂ pode ser um composto compreendendo um ligante aniônico para um sítio alostérico de hemoglobina, na qual o ligante aniônico compreende um anel de pirofosfato interno, opcionalmente juntamente com um cátion não-tóxico.

10 Ainda mais particularmente, o composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂ é um derivado de hexafosfato de inositol (IHP) compreendendo pelo menos um anel de pirofosfato interno, opcionalmente juntamente com um cátion não-tóxico.

Com o objetivo de capturar os efeitos benéficos oferecidos por
15 um inibidor de complemento e um composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂ para aliviar os efeitos potencialmente nocivos de um sistema de complemento sobre-ativado e de distúrbios cerebrovasculares, respectivamente, a presente invenção proporciona uma composição de vacina na qual um antígeno de peptídeo A β , particularmente o antígeno de peptídeo
20 A β de acordo com a invenção e aqui antes descrito, é compreendido em combinação com um inibidor do sistema de complemento e um composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂, particularmente um efetor alostérico de hemoglobina.

A composição de vacina de acordo com a invenção
25 compreendendo um antígeno de peptídeo A β , particularmente o antígeno de peptídeo A β de acordo com a invenção e aqui antes descrito, pode ser administrada concomitantemente, intermitentemente ou seqüencialmente com um inibidor de complemento e/ou um composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂ para aliviar os efeitos potencialmente nocivos de um sistema

de complemento sobre-ativado e de distúrbios cerebrovasculares, respectivamente. Por exemplo, a composição de vacina de acordo com a invenção pode ser administrada simultaneamente com um inibidor de complemento ou seqüencialmente após ou antes a administração da vacina. Se
5 um esquema de aplicação é escolhido no qual um inibidor de complemento e um composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂, particularmente um efetor alostérico de hemoglobina, são administrados juntos com a pelo menos um vacina de acordo com a invenção, os compostos ou substâncias podem ser parcialmente administrados simultaneamente, parcialmente
10 seqüencialmente em várias combinações.

Outro objetivo da presente invenção é a provisão de misturas de uma vacina de acordo com a invenção e um inibidor de complemento e/ou um composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂, particularmente um efetor alostérico de hemoglobina, bem como de métodos de uso de uma
15 vacina de acordo com a invenção, ou suas misturas incluindo composições compreendendo citada vacina ou misturas de uma vacina de acordo com a invenção e um inibidor de complemento e/ou um composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂, particularmente um efetor alostérico de hemoglobina, para a prevenção e/ou o tratamento terapêutico e/ou o alívio dos
20 efeitos de amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade tal como doenças incluindo, mas não limitadas a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (Mal de Alzheimer), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral
25 hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeld Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início

na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular.

O peptídeo amilóide 1-15 modificado pode ser sintetizado seguindo o método relatado em Nicolau et. al. (2002) Proc Natl. Acad. Sci USA 99, 2332-2337. A abordagem relatada em Nicolau et al envolve a modificação do peptídeo antigênico por um enxerto sobre resina de um grupo lipofílico ou hidrofóbico, em resíduos de aminoácido terminais de um peptídeo pré-formado. Em particular, um aminoácido protegido, particularmente um aminoácido Fmoc-protégido, é ligado em uma resina usando química de copulação conhecida. O grupo protetor é removido e um seguido resíduo de aminoácido protegido é copulado. Síntese de peptídeo automática padrão usando química de proteção conhecida, particularmente química de Fmoc/tBu, e grupos protetores de cadeia lateral padrão são então usados pra sintetizar o peptídeo antigênico A β , particularmente o peptídeo antigênico A β 1-15 por copulação em aminoácidos 1 a 15 de proteína amilóide A β 1-42 para produzir o fragmento de peptídeo com uma seqüência dada em SEQ ID NO:1. Em uma etapa final dois outros aminoácidos protegidos são copulados no fragmento de peptídeo em crescimento. Os grupos Mtt podem ser então seletivamente clivados e copulados em ácido palmítico. Após lavagem da resina, o grupo protetor é removido e a resina é simultaneamente clivada, seguido por desproteções de cadeia lateral usando metodologia padrão. O produto final pode ser então obtido em pureza alta e sua identidade é confirmada por métodos conhecidos na arte tal como, por exemplo, espectrometria de massa com ionização por pulverização de elétrons.

O grupo lipofílico ou hidrofóbico de acordo com a presente invenção pode ser um ácido graxo, um triglicerídeo ou um fosfolipídeo no qual a estrutura principal de carbonos de ácido graxo possui pelo menos 10 átomos de carbono. Particularmente, o grupo lipofílico ou hidrofóbico é um ácido graxo com uma estrutura principal de carbonos de pelo menos

aproximadamente 14 átomos de carbono e até aproximadamente 24 átomos de carbono, com cada número individual de átomo de carbono caindo dentro desta faixa também sendo parte da presente invenção. Mais particularmente, o grupo lipofílico ou hidrofóbico possui uma estrutura principal de carbonos de pelo menos 14 átomos de carbono, mas especialmente 16 átomos de carbono. Exemplos de grupos hidrofóbicos incluem, mas não são limitados a, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico, e ácido linolênico. Em uma modalidade específica da presente invenção o grupo lipofílico ou hidrofóbico is ácido palmítico.

Antígenos lipossomais de acordo com a invenção podem ser então preparados como descrito em Nicolau et al., 2002. O peptídeo antigênico amilóide A β modificado, particularmente o peptídeo antigênico A β 1-15 modificado pode ser reconstituído em um construto consistindo de lipossomos, particularmente lipossomos feitos de dimiristoil-fosfatidil-colina (DMPC), dimiristoil-fosfatidil-etanol-amina (DMPEA), dimiristoil-fosfatidil-glicerol (DMPG) e colesterol, opcionalmente contendo monofosforil-lipídeo A.

Em uma modalidade específica da invenção lipossomos com lipídeo A são usados como adjuvante para preparar a vacina anti-amilóide. Dimiristoil-fosfatidil-colina, -glicerol e colesterol são misturados, particularmente em uma razão molar de 0,9:1,0:0,7. Um imunomodulador forte tal como, por exemplo, monofosforil-lipídeo A é então adicionado em uma concentração adequada, particularmente em uma concentração de entre 30 e 50 mg por mmol, mais particularmente a 40 mg por mmol de fosfolipídeos. O peptídeo antigênico A β modificado é então adicionado em uma razão molar de peptídeo para fosfolipídeos de entre 1:30 e 1:200, particularmente em uma razão molar de entre 1:50 e 1:120, mais particularmente of 1:100. Solventes são removidos, por exemplo por evaporação, e o filme resultante é hidratado com solução tampão estéril tal

como, por exemplo PBS.

Lipossomos também podem ser preparados pela técnica de injeção de fluxo cruzado como descrita, por exemplo, em Wagner et al (2002) Journal of Liposome Research Vol 12(3), pp 259-270. Durante a injeção de
5 soluções de lipídeo em um sistema tampão aquoso, lipídeos tendem a formar “precipitados”, seguido por auto-arranjo em vesículas. O tamanho da vesícula obtida depende de fatores tais como a concentração de lipídeo, a velocidade de agitação, a velocidade de injeção, e a escolha de lipídeos. O sistema de preparação pode consistir de um módulo de injeção de fluxo cruzado, vasos
10 para a fase polar (e.g. uma solução tampão PBS), um vaso de solução de etanol/lipídeo e um dispositivo de pressão, mas particularmente um dispositivo de pressão de nitrogênio. Embora a solução aquosa ou polar seja bombeada através do módulo de injeção de fluxo cruzado a solução de etanol/lipídeo é injetada na fase polar com pressões variadas aplicadas.

15 Para determinar a imunogenicidade do construto antigênico A β modificado um animal adequado selecionado do grupo consistindo de camundongos, ratos, coelhos, porcos, aves, etc., mas particularmente camundongos, especialmente camundongos C57BL/6 são imunizados com o peptídeo antigênico. Imunogenicidade do construto antigênico é determinada
20 por sondagem de amostras de soro em intervalos de tempo adequados após imunização usando um imunoensaio tal como, por exemplo, um ensaio ELISA:

O construto antigênico modificado, particularmente o construto antigênico palmitoilado e, mais particularmente o construto de A β 1-
25 15 palmitoilado é usado para a imunização de um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de sintomas associados com amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de

Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o

5 complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeldt Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca

10 senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular, mas particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI) ou qualquer outra doença amilóide-associada.

O construto antigênico supramolecular de acordo com a

15 presente invenção, mas particularmente uma composição de vacina compreendendo um tal construto antigênico supramolecular de acordo com a invenção é administrado a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, por quaisquer rotas de administração padrão. Em geral, a composição pode ser administrada por rotas de administração tópica, oral,

20 retal, nasal ou parenteral (por exemplo, intravenosa, subcutânea, ou intramuscular). Em adição, a composição pode ser incorporada em matrizes de liberação prolongada tais como polímeros biodegradáveis, os polímeros sendo implantados na vizinhança onde a liberação é desejada, por exemplo, no sítio de um tumor. O método de administração de uma dose única,

25 administração de doses repetidas em intervalos de tempo predeterminados, e administração prolongada por um período de tempo predeterminado.

Em uma modalidade específica da invenção o construto antigênico de acordo com a invenção, particularmente uma composição de vacina compreendendo o citado construto antigênico em uma forma

farmaceuticamente aceitável, é administrado em doses repetidas, em particular em 1 a 15 doses, mais particularmente em 2 a 10 doses, mais particularmente em 3 a 7 doses e ainda mais particularmente em 4 a 6 doses, em intervalos de tempo de entre 1 e 10 semanas, particularmente em intervalos de tempo de entre 1 e 6 semanas, mais particularmente em intervalos de tempo de entre 1 e 4 semanas, e ainda mais particularmente em intervalos de tempo de entre 2 e 3 semanas. A resposta imune é monitorada por retirada de amostra de soro em um tempo adequado aos o reforço, particularmente 3 a 10 dias após o reforço, mais particularmente 4 a 8 dias após o reforço e mais particularmente 5 a 6 dias após o reforço e determinação da imunogenicidade do construto antigênico usando metodologia conhecida, particularmente um dos imunoensaios comumente usados tal como, por exemplo, um ensaio de Imunização ELISA com o construto antigênico de acordo com a invenção, mas particularmente com uma composição de vacina compreendendo o construto antigênico de acordo com a invenção em uma forma farmaceuticamente aceitável leva a uma resposta imune significativa e elevadamente específica no animal ou humano tratado.

As composições de construto antigênico supramolecular da presente invenção são administradas a um humano ou animal para induzir imunidade aos agentes antigênicos tais como organismos infecciosos ou aos aspectos antigênicos de outras condições patológicas tal como agregação β -amilóide (Mal de Alzheimer) ou distúrbios hiper-proliferativos tal como câncer. O animal ou humano imunizado desenvolve anticorpos circulantes contra o organismo infeccioso, reduzindo ou inativando deste modo sua capacidade para estimular doença.

As composições da presente invenção também podem ser usadas para produzir anticorpos direcionados contra peptídeos antigênicos. Anticorpos resultantes são administrados a indivíduos para passivamente

imunizá-los contra uma variedade de doenças ou distúrbios, incluindo mas não limitados a, doenças associadas com proteína amilóide.

Assim, em uma modalidade específica da invenção, as composições de construto antigênico supramolecular da presente invenção são usadas para produzir um painel de anticorpos monoclonais ou policlonais que são específicos para vários distúrbios, incluindo por exemplo, Mal de Alzheimer. Anticorpos são preparados por métodos bem conhecidos por aquelas pessoa experientes na arte.

A composições da presente invenção são administradas a um humano ou animal por qualquer meio apropriado, preferivelmente por injeção. Por exemplo, um peptídeo antigênico modificado reconstituído em lipossomos é administrado por injeção subcutânea. Se internamente produzidos ou proporcionados de fontes externas, os anticorpos circulantes ligam-se em antígeno e reduzem ou inativam sua capacidade para estimular doença.

Em certas modalidades, os construtos antigênicos supramoleculares compreendem, um peptídeo possuindo a seqüência de aminoácidos de β -amilóide. Os peptídeos também podem compreender ou corresponder ao peptídeo amilóide beta e seus fragmentos ativos. Adicionalmente, os peptídeos úteis para a presente invenção adicionalmente compreendem $A\beta$.

É adicionalmente proporcionado um método para a produção de um anticorpo incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais de acordo com a presente invenção, particularmente um método para a produção de um anticorpo monoclonal incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais de acordo com a invenção, cujo método compreende a produção de anticorpos mas particularmente anticorpos monoclonais contra um construto antigênico supramolecular compreendendo um peptídeo

antigênico correspondendo à seqüência de aminoácidos antígeno de peptídeo A β de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, mas particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 15), mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13), ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14, mas especialmente o peptídeo β -amilóide A β 1-15, modificado com grupos hidrofóbicos tal como, por exemplo, ácido palmítico ou um grupo hidrofílico tal como, por exemplo, poli(etileno-glicol) (PEG) ou uma combinação de ambos, no qual os citados grupos hidrofóbico e hidrofílico, respectivamente, é covalentemente ligado em cada terminação de peptídeo antigênico através de pelo menos um, particularmente através de 1 ou 2 aminoácidos copulados no resíduo de aminoácido terminal em cada extremidade do peptídeo antigênico, tal como, por exemplo, lisina ou qualquer outro aminoácido ou análogo de aminoácido adequado capaz de servir como um dispositivo conector para copulação dos grupos hidrofóbico e hidrofílico no fragmento de peptídeo tal como, por exemplo, ácido glutâmico e cisteína.

O anticorpo, particularmente o anticorpo monoclonal, obténível pelo citado método é capaz, sob administração a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de debilitação de memória, de reter ou aumentar a capacidade de memória cognitiva no animal tratado, mamífero ou humano. Um outro aspecto da invenção é a provisão de um anticorpo incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais, ou, mais particularmente, um anticorpo monoclonal incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais, que tem sido produzido contra um construto antigênico supramolecular compreendendo um peptídeo antigênico correspondendo à seqüência de aminoácidos do antígeno de peptídeo A β de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, mas particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 15), mais particularmente um antígeno de

peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13), ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14, mas especialmente o peptídeo β -amilóide A β 1-15, modificado com um grupo hidrofóbico tal como, por exemplo, ácido palmítico ou um grupo hidrofílico tal como, por exemplo, poli(etileno-glicol) (PEG) ou uma combinação de ambos, no qual os citados grupos hidrofóbico e hidrofílico, respectivamente, são covalentemente ligados em cada uma das terminações do peptídeo antigênico através de um aminoácido tal como, por exemplo, lisina ou qualquer outro aminoácido ou análogo de aminoácido adequado capaz de servir como uma molécula de ligação. Quando um PPOR EXEMPLO é usado como o grupo hidrofílico, as terminações de PPOR EXEMPLO livres são covalentemente ligadas em fosfatidil-etanol-amina ou qualquer outro composto adequado para funcionar como o elemento de âncora para embeber construto antigênico na bicamada de um lipossomo.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: Síntese de antígeno de peptídeo tetra(palmitoil-lisina)-A β 1-15

1.1 Protocolo de síntese 1:

O peptídeo amilóide 1-15 palmitoilado foi sintetizado seguindo um método previamente relatado melhorado (Nicolau et. al. 2002). Esta nova abordagem envolveu o enxerto sobre resina de ácido palmítico nos resíduos de Lys terminais do peptídeo pré-formado em vez de uma síntese em fase sólida em etapas incorporando o aminoácido modificado Fmoc-Lys(Pal)-OH. Esta abordagem nova melhora a eficiência de copulação e dá um produto de pureza consideravelmente mais alta. Assim, o aminoácido ortogonalmente protegido Fmoc-Lys(Mtt)-OH foi ligado em uma resina Wang usando química de copulação de HBTU. O grupo Fmoc foi removido usando piperidina 20% em DMF e um segundo resíduo de Fmoc-Lys(Mtt)-OH foi copulado. Síntese de peptídeo automática padrão usando química de Fmoc/tBu e grupos protetores de cadeia lateral padrão foi então usada para

copular nos seguintes 15 aminoácidos. Finalmente, os últimos dois aminoácidos copulados foram Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Os grupos Mtt foram então seletivamente clivados usando TFA 1% em diclorometano e então copulados em ácido palmítico usando HBTU. Após a lavagem da resina, o grupo Fmoc foi removido com piperidina 20% em N,N-Dimetil-formamida (DMF) e finalmente clivagem de resina e desproteções de cadeias laterais simultâneas foram realizadas usando TFA sob condições padrão. Trituração de etil-éter frio deu o produto como um sólido branco. Espectrometria de massa com ionização por pulverização eletrônica confirmou a identidade do produto (m/z esperada: 1097,9 ($[M]3^+$); verificado: 1096,8 ($[M-3H]3^+$), sem outros peptídeos tri-, di- ou mono-palmitoilados detectados.

1.2 Protocolo de síntese 2:

Uma abordagem alternativa pode ser usada para a síntese de antígeno de peptídeo tetra(palmitoil-lisina)-A β 1-15 baseada em enxerto sobre resina de ácido palmítico nos resíduos de lisina terminais do peptídeo pré-formado. Assim, sobre a 2-cloro-tritil-resina foi copulado o aminoácido Fmoc-Lys(ivDde)-OH ortogonalmente protegido. Após a desproteção de Fmoc um segundo Fmoc-Lys(ivDde)-OH foi copulado seguido por 15 rodadas de síntese automática padrão de peptídeo usando a química de Fmoc/tBu e grupos protetores de cadeia lateral de aminoácido padrão. Após a copulação dos últimos dois resíduos Fmoc-Lys(ivDde)-OH, o grupo Fmoc foi removido usando piperidina 20% em DMF e a terminação-N foi protegida com um grupo Boc usando Bicarbonato de terc-butila. Os grupos protetores ivDde foram então quimiosseletivamente removidos sob tratamento com hidrazina 3% em DMF e então ácido palmítico foi copulado nestes quatro resíduos de lisina usando HBTU utilizando duas copulações de 18h cada. Após a lavagem da resina, as cadeias laterais foram desprotegidas usando TFA/TIPS sob condições padrão. Trituração do etil-éter frio deu os produtos como um sólido branco. MALDI-T confirmou a identidade do produto sem

outros peptídeos tri-, di- ou mono-palmitoilados detectados.

As vacinas de lipossomos vacinas foram preparadas usando um método como descrito em US6843942 e EP1337322.

EXEMPLO 2: Síntese de antígeno de peptídeo lipídeo-PEG

5 β-amilóide N- e C- terminal

Palmitoilação, embora proporcione uma âncora para o peptídeo na bicamada de lipossomo, devido ao comprimento reduzido relativo do grupo de ácido graxo C16:0 faz com que o peptídeo praticamente resida sobre a superfície de lipossomo. Portanto, células processando o antígeno
10 terão de capturar todo o lipossomo com o peptídeo, o que resultaria em uma resposta imune mais lenta em termos relativos.

Para intensificar a resposta imune, outro âncora/espaçador tem sido aplicado para reconstituir o peptídeo no lipossomo, e.g. poli(etileno-
glicol) (PEG). PPOR EXEMPLO foi covalentemente ligado no resíduo de
15 lisina ligado em ambas as terminações do peptídeo. Na outra extremidade da cadeia (PEG_n=70) fosfatidil-etanol-amina (PEA) foi covalentemente ligada para funcionar como o elemento ancorador na bicamada de lipossomo. Assim, o lipossomo ainda funciona como um adjuvante e o peptídeo estando suficientemente longe da bicamada pode ser processado sozinho e assim
20 aumenta sua imunogenicidade em comparação com o antígeno palmitoilado.

Metodologias para a monopeguilação de peptídeos na posição-
α-N são conhecidas e amplamente usadas. PEGuilação sítio-específica em
resíduos de aminoácido internos, N- ou C-terminais de peptídeos de tamanho
médio também tem sido descrita seguindo as abordagens de enxerto de
25 peptídeo ou de fase sólida.

Com o objetivo de se evitarem os problemas com impedimento estérico, a reação foi realizada em fase de solução. A abordagem bem sucessiva envolveu a síntese de seqüências de peptídeo usando as proteções de cadeia lateral de aminoácido padrão Fmoc/tBu. Para aquelas seqüências de

peptídeo contendo resíduos internos de Lys ou His (1-16, 1-15), uma Lys(ivDde) ortogonalmente protegido foi adicionado em cada uma das terminações. Uma Gly adicional foi adicionada na terminação-C para facilitar a síntese. O grupo Fmoc foi removido com piperidina 20% em DMF e N-acetilado usando anidrido acético. Clivagem seletiva dos grupos ivDde foi realizada com hidrato de 3% em DMF por 1 h. A 2-cloro-tritil-resina foi favorecida sobre a resina Wang mais amplamente usada porque a primeira provou-se mais resistente à hidrazinólise. Ademais, a 2-cloro-tritil-resina é extremamente sensível a ácido e assim, diferentemente da resina Wang, permite o isolamento de peptídeos protegidos. De fato, foi necessário realizar a reação de copulação na fase de solução porque a copulação do peptídeo ligado em resina no reagente de lipídeo peguado pré-ativado DSPE-PEG-SPA não produziu qualquer produto de copulação. Assim a clivagem seletiva da resina sob condições brandas (ácido acético/trifluoro-etanol/diclorometano, 1:1:8, 1 h, rt) deu os peptídeos internamente protegidos.

Copulações em fase de solução foram realizadas bem sucessivamente com o peptídeo derivado da sequência 1-16, 1-15 em DSPE-PEG-SPA em DMSO e excesso de base. As reações foram então interrompidas pela adição de excesso de etanol-amina por 2 horas e a solução foi liofilizada.

Putificação por HPLC (coluna C4 de fase reversa semi-preparativa) deu entre 50 e 70% de pureza dos conjugados de PEG-lipídeo N- e C-terminais cujas identidades foram confirmadas por MALDI. Cada sequência mostrou variação considerável na facilidade da reação de copulação e condições foram ajustadas conseqüentemente (temperatura, número de equivalentes molares DSPE-PEG-SPA, tempo). Para a separação excesso de DSPE-PEG-SPA da purificação por HPLC do produto desejado é aplicado. Separação dos produtos mono- e di-copulados antes das desproteções de cadeia lateral finais pode ser realizada usando cromatografia de troca

catiônica. Subseqüentes desproteções de cadeia lateral de peptídeo e separação de excesso de DSPE-PEG-SPA extinto leva ao isolamento dos conjugados desejados com uma pureza aceitável.

Antígenos peguilados e palmitoilados:

5 **Aβ 1-15 (ACI-24)**

H₂N-Lys-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-
His(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-
His(Trt)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Lys-Lys-OH

Aβ1-16 (ACI-01)

10 Ac-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-
Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-His(Trt)-
Gln(Trt)-Lys(Boc)-Lys-Gly-OH

Aβ 1-16(Δ94) (ACI-02)

15 Ac-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-
Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-Gln(Trt)-
Lys(Boc)-Lys-Gly-OH

Aβ 22-35(ACI-11)

Ac-Lys-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Val-Gly-Ser(tBu)-Asn(Trt)-
Lys(Boc)-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Lys-Gly-OH

20 **Aβ 29-40 (ACI-12)**

Ac-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-
Lys-Gly-OH

EXEMPLO 3: Análise de estrutura e de conformação

3.1 Análise de conformação do antígeno reconstituído

25 Para ancorar o antígeno Aβ 1-15 sobre a superfície de lipossomo uma série de lisinas palmitoilada foi usada em cada extremidade do peptídeo como previamente descrito (Nicolau, C. et al, 2002).

Tem sido mostrado que o ácido graxo do ácido palmítico contém 16 átomos de carbono possui o comprimento apropriado para inserção

estável na bicamada de lipossomo. Neste construto o peptídeo está praticamente jazendo sobre a superfície do lipossomo devido ao comprimento do grupo de ácido graxo C16. Em uma tentativa para se ter o peptídeo antigênico associado com o lipossomo-lipídeo A em uma conformação diferente, outro âncora/espaçador tem sido usado para reconstituir o peptídeo A β 1-16 (ACI-01) em lipossomos, a saber poli(etileno-glicol) (PPOR EXEMPLO com 77 unidades repetitivas). A influência do espaçador entre a âncora lipossomal e o peptídeo A β sobre a conformação secundária da seqüência amilóide reconstituída em lipossomos foi medida por Dicroísmo Circular (Figura 1 a). O A β 1-16 PEGuilado parece ser estar numa conformação de proteína não estruturada ou de espiral aleatória (sinal negativo a 210nm e lentamente se aproximando do eixo zero até 260nm) enquanto que o peptídeo A β 1-15 palmitoilado contém uma proporção significativa de conformação de β -foliada (sinal positivo até 210 nm, cruzando o eixo zero então e se aproximando de novo dele até 260 nm). Portanto parece que a proximidade mais íntima do peptídeo palmitoilado da superfície lipossomal pode impor uma conformação secundária definida. Isto é potencialmente devido às interações eletrostáticas do peptídeo com a superfície de lipossomo, que aparentemente não é possível com o peptídeo PEGuilado.

3.2 Análise de estrutura de β -amilóide 1-15 palmitoilado reconstituído em lipossomos

Para analisar a influência de moléculas ligadoras diferentes sobre a conformação do peptídeo β -Amilóide 1-15 reconstituído em lipossomos foi realizada uma análise por RMN (Figuras 1b e 1c). Aqui ácido palmitoílico e poli(etileno-glicol) (PPOR EXEMPLO com n=77), respectivamente, foram usados como a molécula ligadora ou âncora no lipossomo.

Para estudos de RMN as amostras incluindo os peptídeos

amilóide 1-15 palmitoilado (ACI-24) e antígeno A β 1-16 peguilado (ACI-01) reconstituídos em lipossomos foram homogeneizados por agitação vigorosa e a concentração da solução foi aumentada por centrifugação (3.000 rpm por 3*90 minutos a 4°C) e as pelotas úmidas resultantes foram transferidas para rotores MAS. Amostras adicionais foram preparadas por suspensão das preparações de peptídeo ACI-01 e ACI-24 em uma concentração de 1 mM em tampão PBS em pH 7,2, bem como em solução 4 mM no mesmo tampão da sequência de peptídeo sem o ligador. 10% de D2O foram adicionados em cada amostra.

Espectros de ^1H HR-MAS RMN foram registrados em um espectrômetro Bruker Avance 500 operando em uma frequência de 500,13 MHz (11.4T) equipado com uma sonda de ressonância tripa de 4 mm ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^2\text{H}$) HR-MAS. Cada amostra foi introduzida em rotores de ZrO_2 de 4 mm equipados com insertos cilíndricos de 50 μL . Para todos os experimentos de RMN as amostras foram centrifugadas em uma frequência igual à largura espectral (6250 Hz) que elimina as bandas laterais de giro do espectro. Os espectros de RMN de próton unidimensional foram adquiridos com ambas pré-saturação e sequência de Watergate (Piotto, M. et al (1992); Piotto, M., et al (2005)) e pelo acúmulo de 1.000-1.500 varreduras. A temperatura do ar de suporte fluindo para dentro da sonda foi ajustada em 295K para garantir 298K na amostra.

Figuras 1 b e 1 c demonstram as diferenças em espectros de RMN unidimensional de peptídeo β -amilóide palmitoilado e peguilado. Duas diferenças significativas em 8,00 e 8,25 ppm puderam ser observadas. Devido ao fato de que ambos os peptídeos possuem exatamente a mesma sequência de aminoácidos, exceto a 16^a lisina, estas diferenças em 8,00 e 8,25ppm indicam diferenças em estrutura secundária porque a Lisina não deve dar um sinal positivo nesta área de espectro de resíduos de aminoácido aromático.

Pôde ser demonstrado pelos espectros de RMN de próton

unidimensional na área de resíduos de aminoácido aromático que o projeto específico de construto supramolecular de acordo com a presente invenção resulta em um peptídeo amilóide antigênico com uma estrutura secundária significativa, elevadamente específica e única quando reconstituída em lipossomos, que difere de moléculas ligadoras diferentes. Isto poderia significar que o ligador/âncora força e fixa o peptídeo em uma estrutura secundária certa ou definida que é dependente da molécula ligadora usada. No caso de uso destas moléculas como uma vacina para ativar imunização é provável que os anticorpos produzidos contra estes antígenos estruturalmente diferentes sejam específicos para antígeno e para conformação.

Os dados prévios obtidos por ELISA e ORT (tarefa de reconhecimento de objeto um teste de memória cognitiva) após imunização de camundongos APP x PS-1 com antígenos A β 1-15 palmitoilado e A β 1-16 peguilado (veja Exemplo abaixo) mostram que o antígeno palmitoilado restaura a debilitação de memória neste modelo de Mal de Alzheimer embora ambos demonstrassem imunogenicidade. O mecanismo potencial pelo qual os dois antígenos apresentando o mesmo peptídeo causam dois anticorpos funcionais diferentes *in vivo*, está mais provavelmente ligado à estrutura secundária diferente do peptídeo apresentado causado pela tecnologia de ligador.

EXEMPLO 4: Quantificação de peptídeo reconstituído externa e internamente orientado

A quantidade de peptídeo reconstituído em ACI-01 e ACI-24 foi estabelecida por um ensaio baseado em fluorescamina (FLA) que reage especialmente com aminas primárias para formar adutos covalente elevadamente fluorescentes (Udenfriend, S. et al, 1972). Reação de FLA com a terminação-N do peptídeo Pal1-15 em ACI-24 e com Lys-16 em ACI-01 é antecipada.

Com o objetivo de separar os peptídeos livres daqueles nos

lipossomos, amostras foram submetidas à ultracentrifugação e os sobrenadantes resultantes foram analisados para conteúdo de peptídeo usando o ensaio de FLA. Peptídeos livres não foram detectáveis em nos sobrenadantes quer ACI-01 quer ACI-24.

5 Marcação das frações pelotizadas com FLA mostrou seletividade muito alta para reação com o peptídeo nos lipossomos tanto para ACI-24 quanto para ACI-01. Com o objetivo de determinar o peptídeo total presente sobre as superfícies de lipossomo, os ensaios foram repetidos na presença de Triton X-100 (2% em PBS) para separar as bicamadas lipídicas.
10 Isto resultou em um aumento significativo na marcação; revelando que aproximadamente 63 % de peptídeo está exposto sobre a superfície da membrana. Por outro lado, marcação de ACI-01 com FLA apenas alcança um platô em FLA 1,2 mM no qual a concentração da emissão é idêntica quando o ensaio é realizado quer na ausência quer na presença de Triton X-100. Isto
15 demonstra que todo o peptídeo está exposto sobre a superfície da vacina PEGuilada ACI-01.

EXEMPLO 5: Comparação de imunogenicidade de antígenos peguilados e palmitoilados em camundongos C57BL/6 de tipo selvagem (ELISA)

20 Antígenos lipossomais foram preparados como descrito (Nicolau et al., 2002). Os antígenos peguilados A β 1-16(014), A β 4-11 e palmitoilado A β 1-15 foram reconstituídos em um construto consistindo de lipossomos feitos de dimiristoil-fosfatidil-colina (DMPC), dimiristoil-fosfatidil-etanol-amina (DMPEA), dimiristoil-fosfatidil-glicerol (DMPG) e
25 colesterol (razões molares de 0,9: 0,1: 0,1: 0,7) contendo monofosforil-lipídeo A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a 40mg/mM de fosfolipídeos.

Os antígenos peguilados A β 1-16(014), A β 4-11 e palmitoilado A β 1-15 (ACI-24) foram usados para a imunização em camundongos C57BL/6 em intervalos de 2 semanas. 10-12 Animais foram imunizados com

cada antígeno. Soros foram retirados 5 dias após os reforços e ELISA foram conduzidos com várias diluições dos soros. Resultados comparativos mostrando a imunogenicidade de antígenos diferentes são apresentados.

Os dados de ELISA mostraram que PEG-A β 1-16(Δ 14) lipossomal é significativamente mais imunogênico do que A β 1-15 palmitoilado. ALUME adicional não aumentou a imunogenicidade de PEG-A β 1-16(Δ 14) nos camundongos. A resposta a anticorpo induzida por PEG-A β 4-11 foi mais lenta em comparação com PEG-A β 1-16(Δ 14).

Devido à questão de tradução da resposta imune mais rápida em uma capacidade de memória maior o antígeno peguilado foi comparado com o antígeno palmitoilado em modelo de Mal de Alzheimer em camundongos transgênicos duplos.

Um modelo alternativo pode ser usado como descrito em US6843942 e EP1337322.

EXEMPLO 6: Comparação de imunogenicidade de antígenos peguilados versus palmitoilados em modelo de mal de Alzheimer em camundongos (ELISA)

6.1 Para estudos de imunização *in vivo* de camundongos APP717 C57BL/6 x PS-1 A246E FVB (APPxPS-1) foram individualmente engaiolados, duplamente cegamente randomizados, combinados por idade e genotipificados por PCR.

Camundongos fêmeas adultos (3-4 meses) foram usados de uma cepa de camundongo transgênico duplo expressando ambos Proteína Precursor Amilóide mutante de humano (APP-V717I) e presenilina-1 mutante de humano (PS1-A246E) ambas sob o controle do promotor de gene thyl de camundongo e em genótipo residual Fl (FVB x C57BI). Todos os camundongos foram genotipificados por reação em cadeia de polimerase (PCR) na idade de 3 semanas e cada camundongo foi unicamente marcado. Todos os camundongos foram genotipificados duas vezes durante a duração

de sua vida por uma segunda PCR realizada no início do estudo, e antes da randomização cega em diferentes grupos experimentais. Os camundongos tiveram livre acesso à água e à ração de camundongo padrão (Muracon-G, Trouw Nutrition, Gent, Bélgica). Os camundongos foram alojados sob um
5 ritmo de dia-noite revertido em gaiolas metálicas padrão, de acordo com a legislação local sobre o bem estar animal. 5 d antes do início do teste de comportamento, os camundongos foram engaiolados em gaiolas de macrolon Tipo 2 e transportados para o laboratório de comportamento para se aclimatizarem e se habituarem ao ambiente do laboratório de teste.

10 6.2 Imunização

Lipossomos com lipídeo A foram usados como adjuvante para preparar a vacina anti-amilóide (Nicolau et al., 2002). Dimiristoil-fosfatidilcolina, -glicerol e colesterol foram misturados em uma razão molar de 0,9:1,0:0,7. Monofosforil-lipídeo A, um imunomodulador forte, foi
15 adicionado em uma concentração de 40 mg por mmol de fosfolipídeos. Os peptídeos palmitoilados e peguilados foram adicionados em uma razão molar peptídeo para fosfolipídeos de 1:100.

Solventes foram evaporados, e o filme resultante foi hidratado com PBS estéril (pH 7,3) para uma concentração final de fosfolipídeo de 4
20 mmol.

Os antígenos palmitoilados (ACI-24, A β 1-15) e peguilados (ACI-01, A β 1-16) foram usados para a imunização em camundongos APPxPS-1 em intervalos de 2 (5 inoculações i.p.). Em cada grupo experimental, 10 animais foram imunizados com cada antígeno por injeção
25 intraperitoneal (200 μ L por injeção, contendo 8 mmoles de peptídeos). Lipossomos vazios serviram como controle. Soros foram retirados em intervalos regulares (bissemanalmente) e também 5 dias após o reforço e um ELISA anti-amilóide foram conduzidos com várias diluições dos soros. Resultados comparativos mostrando a imunogenicidade dos antígenos

diferentes são apresentados.

Resposta imune significativa poderia ser alcançada tanto em camundongos APPxPS-1 imunizados com antígeno A β /lipossomo palmitoilado quanto em camundongos APPxPS-1 imunizados com antígeno A β /lipossomo peguila-
 5 do cinco dias após a sexta inoculação de antígeno. Mas em contraste com a resposta imune em camundongos C57BL/6 saudáveis o antígeno peguila-
 do não produziu um título de anticorpo maior do que o do antígeno palmitoilado no modelo de doença.

A resposta imune de IgG específica anti A β aumentou mais rapidamente com ACI-24, atingindo o pico após 5 semanas. Ambas as vacinas ocasionaram isotipos e classes de imunoglobulina significativamente diferente, com o antígeno palmitoilado ACI-24 resultando em títulos mais altos de IgG, em oposição a ACI-01 PEGuila-
 10 do ocasionando mais anticorpos da classe IgM. As amostras de sangue finais de todos os animais também foram analisadas para seu isotipo IgG. (Figura 2) anticorpos IgG e IgM específicos para A β 1-42 foram identificados por ELISA. Placas foram revestidas com 10 μ g/mL de Amilóide β 1-42 durante a noite a 4°C. Após lavagem de cada cavidade com Tween 20 0,05% em PBS e bloqueio com BSA 1%, diluições seriadas de soros foram adicionadas nas placas e incubadas
 15 a 37°C por 2 horas. Após lavagem, as placas foram incubadas com uma Ig anti-camundongo conjugada com fosfatase (IgG, anticorpo inteiro, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) ou anticorpos específicos para isotipo (IgM, IgG1, IgG2a e IgG3, adquiridos da Pharmingen BD, San Diego, CA, USA e Ig2b de Zymed Laboratories, San Francisco, CA) por 2 h a 37°C. Após a
 20 lavagem final, as placas foram incubadas com PNPP (para-nitro-fenil-fosfato), o substrato de fosfatase, e lidas a 405 nm usando uma leitora de placa de ELISA. Resultados são expressados por referência às diluições seriadas de uma coleção titulada dos camundongos adultos imunizados ou de diluições seriadas de um anticorpo comercialmente disponível (6E10,

Chemicon International, Temecula, CA, USA). Alternativamente, resultados são expressados como O.D. em uma diluição onde soros não estavam em nível de saturação (Tabela 1).

Tabela 1.

	IgG1 Contr ole	ACI- 01	ACI- 24	IgG2 a Contr ole	ACI- 01	ACI- 24	IgG2 b Contr ole	ACI- 01	ACI- 24
Médi a	0,1	0,11	1,33	0,15	0,22	0,55	0,59	1,81	2,88
SD	0,01	0,02	0,98	0,03	0,03	0,77	0,12	1,23	0,82

5

	IgG3 Controle	ACI- 01	ACI-24
Média	0,1	0,63	2,05
SD	0,00	0,22	0,39

ACI-24 resultou principalmente nos isotipos e IgG1 e IgG2b, ambos subtipos Th2 predominantemente não-inflamatórios, e também em IgG3, que é uma subclasse de IgG independente de célula-T. Com exceção de um animal vacinado com ACI-24, ambas as vacinas induziram apenas níveis baixos de IgG2a (Th1).

10

Mapeamento de epítipo dos anticorpos resultantes foi realizado por ELISA usando uma biblioteca de peptídeos compreendendo um total de 33 peptídeos biotinilados cobrindo a seqüência de aminoácidos completa de A β 1-42 enquanto que um peptídeo β completo biotinilado serviu como controle positivo. Imunização com ambas as vacinas, ACI-01 e ACI-24, resultou em anticorpos anti-A β com os mesmos epítopos definidos pelos aminoácidos 1-9 de A β (peptídeo1). Em adição, analisamos a dependência conformacional eventual pela medição da ligação específica dos anti-soros anti-A β resultantes para A β polimérico, pela adaptação do ensaio ELISA sobre fibras A β 1-42. A imunização com ACI-24 produziu títulos significativamente mais altos de anticorpos anti-A β reconhecendo fibras A β 1-42 do que anti-soros produzidos por camundongos imunizados com ACI-01

15

20

(Tabela 2). Dos resultados obtidos segue que a imunização com ACI-01 e ACI-24 produziu respostas imunes que diferiram não apenas em seu título, as subclasses e isotipos-Ig mas também em sua especificidade conformacional.

Tabela 2.

	Controle	ACI-01	ACI-24
SEM	2049,0±46,7	3426,2±221,9	7770,6±2090,1
Estatística ANOVA		p< 0,05	p< 0,01

5 **EXEMPLO 7: Comparação de antígenos peguilados versus palmitoilados em capacidade de reconhecimento em um modelo de Mal de Alzheimer em camundongos (ORT)**

10 7.1 Impacto sobre melhoria de capacidade de memória não-espaial dependente de hipocampo, no modelo de Mal de Alzheimer em camundongo APP x PS1

Para analisar o impacto sobre a melhoria de capacidade de memória não-espaial dependente de hipocampo, no modelo de Mal de Alzheimer em camundongo APP x PS1 no decorrer do tempo de imunização de 3 meses por vacinação ativa de anti-A β 1-16/1-15 usando os antígenos palmitoilados (ACI-24, A β 1-15) e peguilados (ACI-01, A β 1-16), um teste de reconhecimento de objeto (ORT) foi essencialmente realizado como descrito (Tang et al. 1999; Rampon et al. 2000). Análise estatística foi feita pelo uso de Teste de Comparação Múltipla de Turkey-Kramer ANOVA (Moechars,D.et al (1999) e (1996)). Este teste foi realizado usando o GraphPad InStat versão 3.06 para Windows, Software GraphPad, San Diego Califórnia USA, www.graphpad.com.

Resumidamente, um horário de imunização de três meses foi instalado de seis inoculações bissemanais com ACI-01 e ACI-24. Um grupo de camundongos recebeu lipossomos vazios como controle. Os camundongos foram habituados por 1 h em uma caixa de campo aberto Plexiglas (52 cm x 52 cm x 40 cm) com paredes verticais pretas e um piso translúcido fracamente iluminado por uma lâmpada posicionada sob a caixa. No dia seguinte os

animais foram posicionados na mesma caixa e submetidos a um teste de aquisição de 10 min. Durante este teste os camundongos foram posicionados individualmente no campo aberto na presença de objeto A (mármore ou dado), e foi medido o tempo gasto para explorar o objeto A (quando o focinho do animal foi direcionado na direção do objeto a uma distância < 1 cm). Durante um teste de retenção de 10 (segundo teste), que foi realizado 3 h mais tarde, um novo objeto (objeto B: mármore ou dado) foi posicionado junto com o objeto familiar (objeto A) no campo aberto. O tempo (t_A e t_B) que o animal demorou explorando os dois objetos foi registrado. O índice de reconhecimento (RI), definido como a razão do tempo gasto explorando o objeto novo sobre o tempo gasto explorando ambos os objetos $[(t_B/(t_A + t_B)) \times 100]$ foi usado para medir a memória não-espacial. Análise estatística foi feita usando ANOVA de fator único como descrito ((Moechars et al. 1999; Moechars et al. 1996)).

Os antígenos palmitoilado (ACI-24) e peguilado (ACI-01) foram usados para a imunização em camundongos APPxPS-1 em intervalos de 2 semanas. 10 Animais de três meses de idade foram imunizados i.p. com cada antígeno (200 μ L por cada injeção i.p. e 100 μ g de peptídeo) e lipossomo vazio serviu como controle. Soros foram tirados 5 dias após o reforço e ELISA foram conduzidos com várias diluições dos soros. Resultados comparativos mostram a imunogenicidade dos antígenos diferentes.

A capacidade cognitiva de camundongos APPxPS-1 imunizados com antígenos A β , palmitoilado (ACI-24) e peguilado (ACI-01), foi avaliada em um paradigma de memória de reconhecimento visual não-espacial, pela sujeição deles a uma tarefa de reconhecimento de objeto que é conhecidamente dependente da atividade hipocampal ((Tang et al. 1999), (Rampon et al. 2000)). Basicamente, três horas após o treinamento para familiarizar todos os camundongos com um dado objeto, eles foram testados para retenção pela confrontação deles com um objeto novo, ao lado de e em

adição ao familiar.

A capacidade de memória cognitiva ou retenção de camundongos APP x PS-1 pôde ser significativamente aumentada por imunização com antígeno A β 1-15 palmitoilado (ACI-24) comparado com os camundongos APP x PS-1 tratados como controle ($76,1 \pm 3,9\%$ versus $49,1 \pm 4,5\%$ para controle; Tabela 3). Isto prova que os camundongos imunizados com ACI-24 reconheceram e se lembraram do objeto original por pelo menos 3 horas, deduzindo deste modo que a motivação deles e a capacidade de exploração deles estavam intactas como camundongos saudáveis combinados em idade, sexo e raça, quando comparados com camundongos de tipo selvagem saudáveis não-transgênicos e não-tratados ($61,8 \pm 5,1\%$). Embora o peptídeo ACI-01 seja apenas um aminoácido C-terminal mais longo (a 16^a Lisina) do que o peptídeo ACI-24 e apenas a tecnologia de ligador é diferente entre estas vacinas, imunização com antígeno A β 1-16 peguado (ACI-01) não demonstra qualquer restauração de memória ($45,6 \pm 6,2\%$) comparável com ACI-24.

Tabela 3.

	Controle	ACI-01	ACI-24	Saudável
SEM	$49,1 \pm 4,5$	$45,6 \pm 6,2$	$76,1 \pm 3,9$	$61,8 \pm 5,1$
Estatística		n.s.* versus controle	$p < 0,05$ versus controle	n.s,* versus controle

n.s.*: não significativo

7.2 Contribuição potencial das classes de anticorpo diferentes IgM e IgG para a funcionalidade cognitiva

Para analisar a contribuição potencial das classes de anticorpo IgM e IgG para a funcionalidade cognitiva, uma análise de correlação foi realizada.

Anticorpos IgM não se correlacionam com a capacidade de memória ($r^2=0,2333$) mas os anticorpos da classe IgG resultantes correlacionaram-se aproximadamente ($r^2=0,857$) para o grau de capacidade de memória (índice ORT) em duas fases. Entre um Índice ORT de 0 a 20 uma relação mais linear foi observada enquanto que em um Índice ORT maior do

que 20 a correlação entra em uma fase de saturação. Isto poderia indicar que anticorpos IgM que não passam pela barreira hematoencefálica não contribuem para a restauração de memória. Em contraste, anticorpos IgG cruzam a barreira hematoencefálica dependendo de sua subclasse e são ligados para a melhoria de memória.

Para avaliar a capacidade da imunização com ACI-24 para modificar a quantidade de peptídeos β -amilóides solúveis e insolúveis no cérebro de camundongos APPxPS-1, A β 1-40 e A β 1-42 de humano foram medidos por ELISA específico na fração solúvel dos homogeneizados cerebrais. Kits de ELISA comercialmente disponíveis foram usados (Amilóide β 40 ou β 42 ELISA, The Genetics Company, Zurique, Suíça). O ELISA realizado de acordo com o protocolo do fabricante. Quantificação do conteúdo de A β das amostras foi obtida por comparação da absorbância com a curva padrão preparada com A β 1-40 ou A β 1-42 sintético (Tabela 4)

Tabela 4.

	A β Solúvel	A β 42 Solúvel	A β 40 Insolúvel	A β 42 Insolúvel
Controle	2,6 $\pm$ 0,6	3,1 $\pm$ 1,0	3,0 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,04
ACI-24	2,1 $\pm$ 0,8	2,1 $\pm$ 0,9	2,0 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,07
Estatística ANOVA	n.s.	p<0,01	p<0,05	p<0,05

n.s.* não significativo

Dados são expressados em média (A β ng/g de homogeneizado de cérebro $\pm$ SEM)

A imunização com ACI-24 levou a uma diminuição significativa de A β 1-40 e A β 1-42 relacionados com placa, insolúvel. Os níveis de A β 1-42 solúvel também foram significativamente reduzidos, enquanto que os níveis de A β 1-40 solúvel mostraram apenas uma tendência para diminuição

EXEMPLO 8: Imunização com ACI-01 e -24 não causa inflamação

A segurança de ambas as vacinas lipossomais, ACI-01 e ACI-

24, foi avaliada pela medição da produção local de citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α por ELISA específico. Os níveis de TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-1 β foram medidos em homogeneizados cerebrais totais usando ELISA de sanduíche de acordo com os manuais dos fabricantes (todos R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Resultados são expressados em $\mu\text{g/mL}$ por referência às diluições seriais das citocinas recombinantes. A extensão de células microgliais ativadas (MHCII) e astrogliose (GFAP) no cérebro na região do subiculum foi avaliada por imuno-histoquímica quantitativa.

Imunização com qualquer um de ACI-01 ou ACI-24 não aumentou significativamente os níveis de IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no cérebro. Similarmente, não foram observadas diferenças em astrogliose sob imunização com ACI-24, enquanto que a extensão de microglia ativada mostrou uma tendência para diminuição após o período de imunização de três meses.

EXEMPLO 9: Manufatura de mAbs

Antígeno palmitoilado (ACI-24, A β 1-15) foi usado para a imunização em camundongos C57BL/6 em intervalos de 2 semanas. Animais foram imunizados com cada antígeno (vol. de injeção: 200 μL contendo 8 mmoles de peptídeo). A última injeção foi realizada 4 dias antes da morte dos animais. Após 5 reforços dos camundongos com títulos terapêuticos (quando uma diluição de 1:5.000 dos soros foi positiva em ELISA) foram selecionados para uma fusão. Células de baço foram colhidas dos animais imunizados e hibridomas foram gerados pela fusão de células de baço sensibilizadas com uma linhagem de célula de mieloma. A fusão dos linfócitos-B de camundongos dos baços foi conduzida com linhagem SP2-0 de células de mieloma (ATCC, Manassas, VA) usando os processos bem conhecidos de Kohler e Milstein (Nature 256: 495-497 (1975)) e Harlow e Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque 1988)).

As células foram induzidas para se fundirem pela adição de poli(etileno-glicol). As células híbridas resultantes são então clonadas na maneira convencional, e.g. usando diluição limitante clones de hibridoma produtos de IgG foram selecionados e testados para sua ligação específica em peptídeo A β 1-42 por ELISA e os clones resultantes, que produzem os anticorpos monoclonais desejados, foram cultivados.

Os hibridomas assim obtidos são quimicamente selecionados pela plaqueação das células em um meio de seleção contendo hipoxantina, aminopterina e timidina (HTA).

Hibridomas são subseqüentemente selecionados para a capacidade de produzir anticorpos monoclonais contra distúrbios ou doenças específicos amilóide-associados. Hibridomas produtores de anticorpos de interesse são clonados, expandidos e armazenados congelados para produção futura. O hibridoma preferido produz um anticorpo monoclonal possuindo o isotipo IgG, mais preferivelmente o isotipo IgG2.

EXEMPLO 10: Determinação de especificidade para anticorpo mACI-24-Ab4

Para analisar a especificidade do anticorpo ACI-24-Ab4, concentrações diferentes de fibrilas de amilóide 1-42, 1-40 e 1-38 pré-formadas foram aplicadas como manchas sobre Membrana de Nitrocelulose Hybond ECL (Amersham Biosciences). Após o bloqueio com leite em pó 10% e Tween 20 0,7%, as membranas foram incubadas com anticorpo primário a 20 μ g/mL por 2 h na RT. Após lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo IgG de ovelha anti-camundongo conjugado com peroxidase de rábano (Amersham Biosciences) por 1 h na RT, lavadas e incubadas com solução quimioluminescente seguida pela exposição da membrana ao filme de raios-X.

Para medir a ligação do mAb (mACI-24-Ab4) em fibras de amilóide β 1-42, fibras de A β 1-42, 1-40 e 1-38 foram pré-formadas por sete

dias a 37°C e aplicadas como manchas sobre a membrana. 20 µg/mL de anticorpo foi usado para medir a capacidade de ligação e o anticorpo ligado foi detectado por anticorpo IgG de ovelha anti-camundongo conjugado com peroxidase de rábano por exposição de 20 minutos.

5 Como poderia ser demonstrado por análise Dot Blot, o anticorpo mACI-24-Ab4 se liga em fibras de Aβ pré-formadas diferentes com sensibilidade diferente. O anticorpo exibe a sensibilidade de ligação mais alta em fibras Aβ1-42 do que em Aβ1-40 ou Aβ1-38. É capaz de detectar pelo menos 0,001 µg de fibras Aβ1-42 enquanto que o limite de detecção do anticorpo para fibras Aβ1-40 é de pelo menos 0,1 µg e para as fibras Aβ1-38 é de 1 µg, significando que a sensibilidade é 100 vezes a 1.000 vezes menor para estes tipos de fibras amilóides. Estes dados demonstram que o anticorpo ACI-24-Ab4 é pelo menos 100 vezes mais sensível a uma forma amilóide (1-42) que conhecidamente se torna insolúvel pela mudança da conformação secundária e sendo a maior parte das placas amilóides em cérebros de
10 pacientes com Mal de Alzheimer.
15

EXEMPLO 11: Fracionamento por ultracentrifugação em gradiente de densidade

20 As propriedades de anticorpos monoclonais na imobilização de polimerização de fibra de Aβ1-42 e na desagregação de fibras de Aβ1-42 foram estudadas por ultracentrifugação em gradiente de densidade (Rzepecki et al., 2004) que é baseada no princípio da distribuição entre fibras de peptídeo resultantes de tamanhos diferentes após incubação com e sem os anticorpos seguido por uma análise de sedimentação em SDS-PAGE em um
25 gradiente pré-formado (OptiPrep™). Análise simultânea de população de fibras Aβ pré-formadas, desagregação e inibição de propriedades de agregação dos anticorpos co-incubados, e a ligação dos anticorpos nas fibras são vantagens óbvias deste método.

Todos os anticorpos monoclonais produzidos contra Aβ1-75

(mACI-24-Ab4) foram analisados em ensaios de inibição e desagregação.

Para a inibição de agregação de A β 1-42, monômeros de A β 1-42 foram incubados com mAbs em duas razões molares diferentes (razão molar de monômero A β 1-42 trinta ou cem vezes mais alta do que MAb) com a concentração final de A β de 50 μ M. Após 24 horas de incubação a 37°C, amostras foram posicionadas em camada sobre um gradiente descontínuo de OptiprepTM e tubos foram centrifugados a 259.000 g por 3 horas a 4°C. 15 frações foram colhidas (140 μ L cada), fração 1 foi a fração menos densa do topo do gradiente e fração 15 foi a fração mais densa do fundo do gradiente. A pelota também foi colhida. As frações colhidas foram analisadas por SDS-PAGE com coloração de prata. A concentração de A β 1-42 para ensaios de inibição foi cinco vezes menor do que para ensaios de desagregação que diminuem a cinética de agregação de amilóide e garantem a medição dentro da fase linear.

Sem adição de mAb, o peptídeo A β foi agregado após tempo de incubação de 24 e a maior parte da proteína foi encontrada em frações 13 a pelota, (pelota, muito pouco em 12), demonstrando polimerização completa dos monômeros de peptídeo A β . Inibição significativa e bem sucessiva de agregação deve ser resultado em oligômeros ou fibras menores, que devem ser encontrados em frações com densidade menor. No ensaio de agregação mACI-24-Ab4 causou um deslocamento em bandas para a maior parte (banda mais forte) de 13 para 11 e 12 e uma solubilização significativa das bandas correndo em fração 13 para pelota. Isto significa que mACI-24-Ab4 exibe uma capacidade forte para inibir a polimerização de monômeros de peptídeo A β em fibras e revelou uma ligação específica nas fibras A β (fração 11 e 12).

Para a desagregação de fibrilas de A β 1-42 pré-formadas por co-incubação com MAbs (em duas razões molares diferentes 1:30 e 1:100, MAb + Monômero A β 1-42 com a concentração final de A β final de 246 μ M), as amostras foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após 24 horas as amostras

foram fracionadas por ultracentrifugação e separadas por SDS-PAGE como descrito acima e antes (Rzepecki et al., 2004).

Similar ao ensaio de agregação, polimerização de fibra completa pôde ser demonstrada pela distribuição de fibrilas de A β 1-42 sozinhas em frações 12 a P (pelota). Aqui deslocamentos de fibras na direção de frações de densidade menor indicaria atividade de desagregação do anticorpo, quando co-incubado com fibras pré-formadas. Adição de mACI-24-Ab4 em razão molar de 1:100 mostrou um deslocamento da maior parte das fibras amilóides de 12 para 11. Portanto mACI-24-Ab4 também indica uma atividade de desagregação forte.

EXEMPLO 12: Aplicação combinada de um antígeno palmitoilado e um inibidor de ativação de complemento em um teste de retenção de capacidade de reconhecimento em um modelo de Mal de Alzheimer em camundongo (ORT)

Com o objetivo de prevenir os efeitos colaterais potenciais tais como complicações neurológicas causadas por uma estimulação através de vacinação de um sistema de complemento já sobre-ativado, o antígeno palmitoilado (ACI-24, A β 1-15) é administrado em combinação com um inibidor de complemento selecionado do grupo consistindo de TP10 (Receptor 1 de complemento de humano solúvel), Eculizumab (anti- anti-proteína C5 de complemento de humano), Pexelizumab (anti- complemento C5), Inibidor C1 Natural Cetor® (C1-esteraseremmer-N) Inibidor C1 Natural de humano.

O inibidor de complemento é administrado antes da vacinação de um paciente humano com o antígeno palmitoilado (ACI-24, A β 1-15) e imediatamente depois.

Em um esquema de aplicação onde o inibidor de complemento é administrado antes da vacinação com o antígeno palmitoilado (ACI-24, A β 1-15), o composto inibidor é administrado em uma janela de tempo

começando até 20 horas antes da vacinação e terminando imediatamente antes da vacinação. (Esquema de Aplicação 1)

Em um esquema de aplicação onde o inibidor de complemento é administrado subsequente à vacinação com o antígeno palmitoilado (ACI-24, A β 1-15), o composto inibidor é administrado em uma janela de tempo iniciando imediatamente após a vacinação e terminando 1 dia após a aplicação da vacina. (Esquema de Aplicação 2)

12.1 TP10 (Receptor 1 de complemento de humano solúvel 1)

Em testes humanos com TP10 foi verificado que é preferível manter uma concentração de TP10 dentro de uma faixa de entre 100 μ g/mL e 160 μ g/mL por 24 horas após CPB. Com o objetivo de alcançar uma faixa de concentração é mais apropriado dar uma dose inicial de 10 mg/kg durante 0,5 hora seguida por 10 mg/kg durante 23,5 horas (Li JS, Am Heart J. 2004 Jan;147(1):173-80.)

A vacinação com antígeno palmitoilado (ACI-24, A β 1-15) é quer feita após uma concentração desejável de TP10 ter sido alcançada após o Esquema de Aplicação 1 quer, alternativamente, antes de a dose inicial de TP10 de 10 mg/kg ser aplicada de acordo com o Esquema de Aplicação 2.

12.2 Eculizumab (anti- anti-proteína C5 de complemento de humano)

Eculizumab (600 mg) é administrado por infusões a cada semana por quatro semanas, seguido por uma semana mais tarde por uma dose de 900-mg e então por outras doses de 900 mg semana sim semana não até semana 12 (Hillmen P, N Engl J Med. 2004 Feb 5;350(6):552-9.).

Para tratamento de longa duração Eculizumab pode ser administrado em uma dose de 900 mg a cada 12 a 14 dias. (Hill A, Blood. 2005 Oct 1;106(7):2559-65. Epub 2005 Jun 28.)

A vacinação com antígeno palmitoilado (ACI-24, A β 1-15) é quer feita após a primeira dose de 600 mg de Eculizumab ter sido

administrada seguindo o Esquema de Aplicação 1 quer, alternativamente, antes da dose inicial de 600 mg de Eculizumab ser dada de acordo com o Esquema de Aplicação 2.

Em alguns casos pode ser mais apropriado aplicar o Esquema de Aplicação 1 apenas após a semana 4, quando as primeiras 4 rodadas de administração de Eculizumab estão terminadas e uma concentração estável no estado de equilíbrio é alcançada no corpo humano.

12.3 Pexelizumab (anti-complemento C5)

Pexelizumab é dado intravenosamente em um bolo a 2,0 mg/kg durante 10 minutos cuja administração de bolo pode ser seguida por uma infusão de 1,0 mg/kg durante 20 horas (<http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/106/23/2986-a>) ou de 0,05 mg/kg/hora por 24 horas.

A vacinação com antígeno palmitoilado (ACI-24, A β 1-15) é feita após o primeiro bolo de 2,0 mg/kg de Pexelizumab ter sido administrado seguindo o Esquema de Aplicação 1 quer, alternativamente, antes de o bolo inicial de 2,0 mg/kg de Pexelizumab ser dado de acordo com o Esquema de Aplicação 2.

Em alguns casos pode ser mais apropriado aplicar o Esquema de Aplicação 1 apenas após a segunda aplicação por infusão estar completa e uma concentração estável no estado de equilíbrio é alcançada no corpo humano.

12.4 Inibidor C1 de humano natural

O inibidor C1 é administrado em doses de 6,25 a 100 U/kg (van Doorn MB, Allergy Clin Immunol. 2005 Oct;116(4):876-83. Epub 2005 Aug 8.)

Alternativamente, um concentrado de inibidor de C1 esterase pasteurizado pode ser administrado em doses de entre 500 e 1000 IU (De Serres J, Transfus Apher Sci. 2003 Dec;29(3):247-54.); (Bork K, Arch Intern

Med. 2001 Mar 12;161(5):714-8.)

Inibidor C1 também pode ser dado intravenosamente em uma infusão de 1 hora, partindo com 6.000 IU, seguido por 3.000 IU, 2.000 IU, e 1.000 IU em intervalos de 12 horas (Caliezi C, Crit Care Med. 2002 Aug;30(8):1722-8.)

Finalmente, o inibidor C1 é administrado intravenosamente a cada terceiro dia como um concentrado de inibidor aquecido por vapor em uma concentração de 25 unidades de plasma per quilograma de peso corporal (Waytes AT, N Engl J Med. 1996 Jun 20;334(25):1630-4.).

A vacinação com antígeno palmitoilado (ACI-24, A β 1-15) é quer feita após o inibidor C1 ter sido administrado seguindo o Esquema de Aplicação 1 quer, alternativamente, antes de a dose inicial de inibidor C1 ser dada de acordo com o Esquema de Aplicação 2.

12.5 Inibidor C1 natural Cetor® (C1-esteraseremmer-N)

O C1-esteraseremmer-N ou Cetor® é administrado em uma dosagem de 1.000 U, 1.500 U ou 2.000 U e mais tarde na mesma dose do outro produto é administrado.

A vacinação com antígeno palmitoilado (ACI-24, A β 1-15) é quer feita após a 2ª dose seguindo o Esquema de Aplicação 1 quer, alternativamente, antes da dose inicial de 1.000 U, 1.500 U ou 2.000 U de C1-esteraseremmer-N ou Cetor® ser dada de acordo com o Esquema de Aplicação 2.

Referência de arquivo de agente ou de requerente L3018 PCT BS	Número do Pedido Internacional Pedido PCT Novo
--	---

INDICAÇÕES RELACIONADAS COM O MICROORGANISMO DEPOSITADO OU OUTRO MATERIAL BIOLÓGICO
(Regra PCT 13 bis)

A. As indicações feitas abaixo referem-se ao microorganismo ou outro material biológico depositado referido na descrição na página __23__ linha __8__.	
B. IDENTIFICAÇÃO DO DEPÓSITO	
outros depósitos são identificados em uma folha adicional ☐	
Nome da instituição de depósito DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VONMIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH	
Endereço da instituição de depósito <i>(incluindo código postal e país)</i> Mascheroder Weg 1 b 38124 Braunschweig DE	
Data de depósito Dezembro 8, 2005 (08/12/2005)	Número de acesso DSM ACC2756
C. Indicações adicionais <i>(deixar em branco se não aplicável)</i>	esta informação é continuada em uma folha adicional ☐
Requerente faz uso da Regra 28(4) ECP	
D. Estados designados aos quais são feitas indicações <i>(se as indicações não forem para todos os estados designados)</i>	
EP	
E. FORNECIMENTO SEPARADO DE INDICAÇÕES <i>(deixar em branco se não aplicável)</i>	
As indicações listadas abaixo serão submetidas ao International Bureau mais tarde <i>(especificar a natureza geral das indicações por exemplo, "Número de Acesso do Depósito")</i>	

Para uso apenas do escritório receptor

☒ Esta folha foi recebida com o pedido internacional
oficial autorizado Gorge, Olivier

Para uso apenas do International Bureau

☐ Esta folha foi recebida pelo International Bureau em: 23 dec 2006
oficial autorizado PETER WIMMER

Figuras

Figura 1a: Desenho e caracterização biofísica de duas vacinas lipossomais contendo imunógenos de peptídeo com os primeiros aminoácidos 15 (ACI-24, A β 1-15) e 16 (ACI-01, A β 1-16) do peptídeo amilóide β 1-42 de comprimento total. b) ACI-01 contém A β 1-16 flanqueado com o resíduo de lisina PEGuilado em cada lado que transporta DSPE servindo como âncora lipossomal na outra extremidade de cadeia de PPOR EXEMPLO (a). Para ACI-24 (b), dois resíduos de lisina palmitoilada terminal foram covalentemente ligados em cada extremidade de A β 1-15 para reconstituir e ancorar o antígeno no lipossomo (a). c) Espectros de CD dos dois antígenos reconstituídos no lipossomo. ACI-01 exibe espectros indicativos de conformação de proteína não estruturada e aleatoriamente espiralada (sinal negativo até 210 nm e lentamente se aproxima de eixo zero até 260 nm) enquanto que espectros de ACI-24 contêm uma proporção significativa de estrutura beta (sinal positivo até 210 nm, cruzando o eixo zero e então se aproximando dele de novo até 260 nm). Para análise de espectros CD amostras de beta-amilóide (ACI-01 e-24) foram reconstituídas em lipossomo e sonicadas pelo uso de um sonicador de sonda em uma concentração de peptídeo de 0,9865 mg/mL (1 ml em PBS). Espectros CD foram registrados em um Dichrograph (JASCO J-810) com uma cubeta de célula de quartzo de comprimento de caminho óptico de 0,1 cm. A janela espectral foi de 190-260 nm em uma velocidade de varredura de 20 nm/min a 25°C e dados brutos foram expressados em elipticidade em unidade θ (mdeg).

Figura 1b: A região espectral de ^1H incluindo os prótons de amida de peptídeo e as cadeias laterais aromáticas de espectros de RMN por giro de ângulo mágico de A. a vacina ACI-01, B. a vacina ACI-24, C. ACI-01 1 mM, D. ACI-24 1 mM e E. peptídeo Ab1-15 4 mM em tampão PBS, pH 7,2.

Figura 1c: Espectros de ^1H RMN unidimensional de 9 a 5,5

ppm de beta-Amilóide 1-15 peguilado (preto) e palmitoilado (azul). Peptídeos foram sintetizados, covalentemente ligados em ácido palmítico ou em PEG respectivamente e reconstituídos em PBS. Para análise de RMN, amostras foram centrifugadas e foi registrado um espectro total de 9 a 0,2 ppm.

Figura 2: Análise de títulos específicos de amilóide nos soros de camundongos APPxPS1 imunizados com antígenos PEGuilado (ACI-01) ou palmitoilado (ACI-24) em lipossomos comparados com camundongos imunizados com lipossomos vazios (controle). a) Imunização com ACI-24 gerou níveis altos de anticorpos IgG específicos para amilóide (a, esquerda) apenas após duas imunizações e três semanas após a primeira semana e alcançou um máximo após 5 semanas. Enquanto que imunização com ACI-01 gerou níveis altos de anticorpos IgM específicos para amilóide (a, direita) com um máximo após 7 semanas mas apenas níveis baixos de IgG comparado com ACI-24 (a, esquerda, $p < 0,5$).

Depósito:

As seguintes linhagens de célula de hibridoma foram depositadas no “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)” em Braunschweig, Mascheroder WEG 1 B, 38124 Braunschweig, sob as condições do Tratado de Budapeste:

Designação da linhagem de hibridoma	Designação de anticorpo	Data de depósito	Número de acesso
EJ 7H3	mACI-24-Ab4	08 Dezembro 2005	DSM ACC2756

Referências

- Alving et al., Infect. Immun. 60:2438-2444, 1992
 Bork K, Arch Intern Med. 2001 Mar 12;161(5):714-8
 Caliezi C, Crit Care Med. 2002 Aug;30(8):1722-8.
 De Serres J, Transfus Apher Sci. 2003 Dec;29(3):247-54
 Doom MB van, Allergy Clin Immunol. 2005 Oct;116(4):876-83.
 Epub 2005 Aug 8 Harlow e Lane (Antibodies: A Laboratory Manual

(Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque 1988)

FYLAKTAKIDOU, K.C., LEHN, J.-M. GREFERATH, R. NICOLAU, C., "Inositol triphosphate: a new membrane permeant allosteric effector of haemoglobin", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 1605-1608, 2005.

Hodgson et al., *Bio/Technology*, 9:421 (1991)

Khaw, B. A. et al. *J. Nucl. Med.* 23:1011-1019 (1982)

Kohler e Milstein (*Nature* 256: 495-497 (1975))

Moechars, D., Dewachter, I., Lorent, K., Reverse, D., Baekelandt, V., Naidu, A., Tesseur, I., Spittaels, K., Haute, C.V., Checler, F., Godaux, E., Cordell, B. e Van Leuven, F.: 1999, *J. Biol. Chem.* 274, 6483-6492.

Moechars, D., Lorent, K., De Strooper, B., Dewachter, I., & Van Leuven, F. "Expression in brain of amyloid precursor protein mutated in the alpha-secretase site causes disturbed behavior, neuronal degeneration and premature death in transgenic mice". *EMBO J.* 15, 1265-1274 (1996).

Hill A, *Blood*. 2005 Oct 1;106(7):2559-65. Epub 2005 Jun 28.

Hillmen P, *N Engl J Med*. 2004 Feb 5;350(6):552-9.

Li J S, *Am Heart J*. 2004 Jan;147(1):173-80

Moechars, D., Lorent, K., De Strooper, B., Dewachter, I. e Van Leuven, F.: 1996, *EMBO J.* 15, 1265-1274.

Nicolau, C., Greferath, R., Balaban, T. S., Lazarte, J. E., e Hopkins, R. J. (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2332-2337.

Piotto, M., Saudek, V., & Sklenar, V. "Gradient-tailored excitation for single-quantum RMN spectroscopy of aqueous solutions". *J. Biomol. RMN* 2, 661-665 (1992).

Piotto, M., Elbayed, K., Wieruszeski, J. M., & Lippens, G. "Practical aspects of shimming a high resolution magic angle spinning probe". *J. Magn Reson.* 173, 84-89 (2005).

Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032
(1989) Rampon, C., Tang, Y.P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyin, M. e Tsien,
J.Z.: 2000, Nat. Neurosci. 3, 238-244.

Rzepecki et al., 2004 Rousseaux et al. Methods Enzymology,
5 121:663-69, Academic Press, 1986.

Tang, Y.P., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner,
G.A., Zhuo, M., Liu, G. e Tsien, J. Z.: 1999, Nature 401, 63-69.

B Teisseire, C Ropars, M C Villeréal, e C Nicolau, "Long-
term physiological effects of enhanced O₂ release by inositol hexaphosphate-
10 loaded erythrocytes" Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 October; 84(19): 6894-
6898

Teisseire B, Ropars C, Villeréal MC, Nicolau C. "Long-term
physiological effects of enhanced O₂ release by inositol hexaphosphate-
loaded erythrocytes". Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Oct; 84(19) 6894-
15 6898.

Udenfriend, S. et al. "Fluorescamine: a reagent for assay of
amino acids, peptides, proteinss, and primary amines in the picomole range".
Science 178, 871-872 (1972). Wagner et al (2002) Journal of Liposome
Research Vol 12(3), pp 259 - 270

20 Waytes AT, N Engl J Med. 1996 Jun 20; 334(25):1630-4 US-P
6843942 EPA 1337322

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir uma composição de vacina terapêutica, caracterizado pelo fato de compreender o uso de um fragmento de peptídeo antigênico A β consistindo de um segmento único ou repetitivo de entre 13 e 15 resíduos de aminoácido contíguos da parte N-terminal do peptídeo A β para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o segmento contíguo de 13 a 15 resíduos de aminoácido é obtido do fragmento N-terminal 1-16 ou 1-17 do peptídeo A β .

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a composição de vacina terapêutica compreende um fragmento de peptídeo A β consistindo de um segmento único ou repetitivo de entre 13 e 15 resíduos de aminoácido contíguos da parte N-terminal do peptídeo A β selecionado do grupo consistindo de resíduos 1-15, 1-14, e 1-13.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a composição de vacina terapêutica compreende um fragmento de peptídeo A β único ou repetitivo selecionado do grupo consistindo de antígeno de peptídeo A β ₁₋₁₅ como dado em SEQ ID NO: 1 e A β _{1-16(Δ ,14)} como dado em SEA ID NO: 3.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o antígeno de peptídeo A β é modificado de tal modo que é capaz de manter e estabilizar uma conformação definida caracterizada por uma proporção equilibrada de porções de espiral randômica e/ou de β -foliada e/ou α -helicoidal.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o antígeno de peptídeo A β é apresentado reconstituído em um carreador tal como, por exemplo, uma vesícula, uma molécula ou corpo particulado.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o antígeno de peptídeo A β é apresentado reconstituído em um lipossomo.

5 8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o antígeno de peptídeo A β é modificado por um grupo lipofílico ou hidrofóbico que facilita a inserção dentro da bicamada lipídica do adjuvante/carreador de lipossomo.

10 9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a dimensão do grupo lipofílico ou hidrofóbico em combinação com a carga efetiva total do peptídeo antigênico e do carreador/adjuvante no qual o peptídeo torna-se ligado, incorporado ou reconstituído é tal que o peptídeo antigênico é exposto, estabilizado e apresentado em uma conformação elevadamente biologicamente ativa, que permite que o sistema imune do organismo alvo livremente interaja com os determinantes
15 antigênicos contidos no construto antigênico em sua conformação exposta, estabilizada e elevadamente biologicamente ativa, que leva a uma resposta imune forte.

20 10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 9, caracterizado pelo fato de que o grupo lipofílico ou hidrofóbico é um ácido graxo, um triglicerídeo ou um fosfolipídeo.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o grupo lipofílico ou hidrofóbico é um ácido graxo, particularmente um ácido graxo com uma estrutura principal de carbono de pelo menos 10 átomos de carbono.

25 12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o grupo hidrofóbico é ácido palmítico.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 12, caracterizado pelo fato de que a preparação de lipossomo contém um adjuvante.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o adjuvante é lipídeo A, particularmente lipídeo A desintoxicado, tal como monofosforil ou difosforil lipídeo A ou alume.

15. Método para produzir uma composição de vacina terapêutica, caracterizado pelo fato de compreender o uso de um peptídeo antigênico imunogênico para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide, no qual o antígeno de peptídeo 3-amilóide é um antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ palmitoilado modificado por resíduos de aminoácido palmitoilados covalentemente ligados, particularmente entre 2 e 4, mais particularmente 4 resíduos, reconstituído em um lipossomo.

16. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ é modificado por 2 resíduos de aminoácido palmitoilados covalentemente ligados nas terminações-N e -C do peptídeo, respectivamente.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ é modificado por 4 resíduos de aminoácido palmitoilados, dois dos quais são covalentemente ligados nas terminações-N e -C do peptídeo, respectivamente.

18. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que 2 ou mais moléculas de antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ palmitoiladas modificadas por resíduos de palmitoíla covalentemente ligados, particularmente um ou dois resíduos, em cada extremidade do peptídeo são reconstituídas em um lipossomo único.

19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que a condição ou doença associada com amilóide é uma selecionada do grupo consistindo de doenças incluindo, mas não limitadas a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave

(MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeldt Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a condição ou doença associada com amilóide é Mal de Alzheimer.

21. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a condição associada com amilóide é caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva em um animal, particularmente um mamífero ou um humano.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o tratamento de um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição associada com amilóide caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva leva a um aumento na retenção da capacidade de memória cognitiva.

23. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o tratamento de um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição associada com amilóide caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva leva a uma restauração completa da capacidade de memória cognitiva.

24. Construto antigênico, caracterizado pelo fato de compreender um fragmento de peptídeo antigênico A β consistindo de um segmento único ou repetitivo de entre 13 e 15 resíduos de aminoácido contíguos da parte N-terminal do peptídeo A β para o tratamento de uma

condição ou doença associada com amilóide.

25. Construto antigênico de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o segmento contíguo de 13 a 15 resíduos de aminoácido é obtido do fragmento N-terminal 1-16 ou 1-17 do peptídeo A β .

26. Construto antigênico de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a composição de vacina terapêutica compreende um fragmento de peptídeo A β consistindo de um segmento único ou repetitivo de entre 13 e 15 resíduos de aminoácido contíguos da parte N-terminal do peptídeo A β selecionado do grupo consistindo de resíduos 1-15, 1-14, e 1-13.

27. Construto antigênico de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 26, caracterizado pelo fato de que a composição de vacina terapêutica compreende um fragmento de peptídeo A β único ou repetitivo selecionado do grupo consistindo de antígeno de peptídeo A β ₁₋₁₅ como dado em SEQ ID NO: 1 e A β _{1-16(Δ 14)} como dado em SEA ID NO: 3.

28. Construto antigênico de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 27, caracterizado pelo fato de que o antígeno de peptídeo A β é modificado de tal modo que é capaz de manter e estabilizar uma conformação definida caracterizada por uma proporção equilibrada de porções de espiral randômica e/ou de β -foliada e/ou α -helicoidal.

29. Construto antigênico de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 28, caracterizado pelo fato de que o antígeno de peptídeo A β é apresentado ligado em ou reconstituído em um adjuvante/carreador tal como, por exemplo, uma vesícula, uma molécula ou corpo particulado.

30. Construto antigênico de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o antígeno de peptídeo A β é apresentado reconstituído em um lipossomo.

31. Construto antigênico de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o antígeno de peptídeo A β é modificado por

um grupo lipofílico ou hidrofóbico que facilita a inserção na bicamada lipídica do carreador de lipossomo.

32. Construto antigênico de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a dimensão do grupo lipofílico ou hidrofóbico em combinação com a carga efetiva total do peptídeo antigênico e do carreador no qual o peptídeo torna-se ligado incorporado ou reconstituído é tal que o peptídeo antigênico é exposto ao solvente e apresentado em uma conformação que é biologicamente ativa pelo fato de que permite que o sistema imune do organismo alvo livremente interaja com os determinantes antigênicos contidos no construto antigênico, que leva a uma resposta imunogênica forte e, conseqüentemente, um título de anticorpo alto no organismo alto.

33. Construto antigênico de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 32, caracterizado pelo fato de que o grupo lipofílico ou hidrofóbico é um ácido graxo, um triglicerídeo ou um fosfolipídeo.

34. Construto antigênico de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o grupo lipofílico ou hidrofóbico é um ácido graxo, particularmente um ácido graxo com uma estrutura principal de carbono de pelo menos 10 átomos de carbono.

35. Construto antigênico de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o grupo hidrofóbico é ácido palmítico.

36. Construto antigênico de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 35, caracterizado pelo fato de que a preparação de lipossomo contém um adjuvante ou um imunomodulador.

37. Construto antigênico de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o imunomodulador é lipídeo A, particularmente lipídeo A desintoxicado tal como monofosforil ou difosforil lipídeo A ou alume.

38. Composição de vacina, caracterizada pelo fato de

compreender um antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide.

39. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 38, caracterizada pelo fato de que o antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ é modificado de tal modo que é capaz de manter e estabilizar uma conformação definida caracterizada por uma proporção equilibrada de porções de espiral randômica, α -helicoidal e de β -foliada.

40. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 ou 39, caracterizada pelo fato de que o antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ é apresentado ligado em um carreador tal como, por exemplo, uma vesícula, uma molécula ou corpo particulado.

41. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 40, caracterizada pelo fato de que o antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ é apresentado reconstituído em um lipossomo.

42. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 41, caracterizada pelo fato de que o antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ é modificado por um grupo lipofílico ou hidrofóbico que facilita a inserção na bicamada lipídica hidrofóbica do adjuvante/carreador de lipossomo.

43. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 42, caracterizada pelo fato de que a dimensão do grupo lipofílico ou hidrofóbico proporcionando uma âncora para o peptídeo na bicamada de lipossomo em combinação com a carga efetiva total do peptídeo antigênico e do carreador no qual o peptídeo torna-se ligado, incorporado ou reconstituído de modo que o peptídeo antigênico seja exposto ao solvente e apresentado em uma conformação que é biologicamente ativa pelo fato de que permite que o sistema imune do organismo alvo livremente interaja com os determinantes antigênicos contidos no construto antigênico, que leva a uma resposta imunogênica forte e, conseqüentemente, um título de anticorpo alto no organismo alto.

44. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de que o grupo lipofílico ou hidrofóbico é um ácido graxo, triglicerídeos ou fosfolipídeos.

5 45. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 44, caracterizada pelo fato de que a estrutura principal de carbono de ácido graxo possui pelo menos 10 átomos de carbono.

46. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 45, caracterizada pelo fato de que o grupo hidrofóbico é ácido palmítico.

10 47. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 41 a 46, caracterizada pelo fato de que a preparação de lipossomo contém um adjuvante e/ou um imunomodulador.

48. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 47, caracterizada pelo fato de que o imunomodulador é lipídeo A desintoxicado, tal como monofosforil ou difosforil lipídeo A.

15 49. Composição de vacina, caracterizada pelo fato de compreender um peptídeo antigênico imunogênico para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide, na qual o antígeno de peptídeo β -amilóide é um antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ palmitoilado modificado por resíduos de palmitoíla covalentemente ligados, particularmente entre 2 e 4,
20 mais particularmente 4 resíduos, em cada extremidade do peptídeo reconstituído em um lipossomo.

50. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 49, caracterizada pelo fato de que 2 ou mais moléculas de antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ palmitoiladas modificadas por resíduos de palmitoíla covalentemente
25 ligados em cada extremidade do peptídeo são reconstituídas em um lipossomo único.

51. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que, sob administração a um animal, particularmente um mamífero, mas especialmente um humano,

resulta principalmente na geração de anticorpos de subtipos não-inflamatórios.

52. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 51, caracterizada pelo fato de que os citados anticorpos são do subtipo Th2 não-inflamatório, particularmente de isotipo IgG1 e IgG2b.

53. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que, sob administração a um animal, particularmente um mamífero, mas especialmente um humano, resulta principalmente na geração de anticorpos da subclasse IgG independente de célula-T.

54. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 53, caracterizada pelo fato de que os citados anticorpos são do isotipo IgG3.

55. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que, sob administração a um animal, particularmente um mamífero, mas especialmente um humano não leva a um aumento significativo em marcadores de inflamação no cérebro.

56. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 53, caracterizada pelo fato de que os citados marcadores são selecionados do grupo consistindo de IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α .

57. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que, sob administração a um animal, particularmente um mamífero, mas especialmente um humano leva a um decréscimo significativo de A β 1-40 e A β 1-42 relacionados com placas, insolúveis, no cérebro.

58. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que, sob administração a um animal, particularmente um mamífero, mas especialmente um humano leva a uma redução significativa no nível de A β 1-42 solúvel no cérebro.

59. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de ser para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide em um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma tal condição.

5 60. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 59, caracterizada pelo fato de que a condição ou doença associada com amilóide é uma selecionada do grupo consistindo de doenças incluindo, mas não limitadas a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de
10 memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva,
15 esclerose múltipla; mal de Creutzfeld Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular.

20 61. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 60, caracterizada pelo fato de que a condição ou doença associada com amilóide é Mal de Alzheimer.

25 62. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que, sob administração a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição associada com amilóide caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva leva a um aumento na retenção da capacidade de memória cognitiva.

63. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que, sob administração

a um animal, particularmente um mamífero, mas especialmente a um humano, sofrendo de uma condição associada com amilóide caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva leva a uma restauração completa da capacidade de memória cognitiva.

5 64. Composição de vacina, caracterizada pelo fato de compreender um antígeno de peptídeo A β para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide juntamente com um inibidor do sistema de complemento.

10 65. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 64, caracterizada pelo fato de que o antígeno de peptídeo A β é um antígeno de peptídeo A β_{1-15} .

15 66. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 65, caracterizada pelo fato de compreender um peptídeo antigênico imunogênico para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide, na qual o antígeno de peptídeo β -amilóide é um antígeno de peptídeo A β_{1-15} palmitoilado modificado por resíduos de palmitoíla covalentemente ligados, particularmente entre 2 e 4, mais particularmente 4 resíduos, em cada extremidade do peptídeo reconstituído em um lipossomo juntamente com um inibidor do sistema de complemento.

20 67. Composição de vacina, caracterizada pelo fato de compreender um antígeno de peptídeo A β para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide juntamente com um composto, particularmente um efector alostérico de hemoglobina, que dispara uma liberação de oxigênio regulada, intensificada para os tecidos.

25 68. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 67, caracterizada pelo fato de que o antígeno de peptídeo A β é um antígeno de peptídeo A β_{1-15} .

69. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 68, caracterizada pelo fato de compreender um peptídeo antigênico imunogênico

para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide, na qual o antígeno de peptídeo β -amilóide é um antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ palmitoilado modificado por resíduos de palmitoíla covalentemente ligados, particularmente entre 2 e 4, mais particularmente 4 resíduos, em cada extremidade do peptídeo reconstituído em um lipossomo juntamente com um composto, particularmente um efector alostérico de hemoglobina, que dispara uma liberação de oxigênio regulada, intensificada para os tecidos.

70. Composição de vacina, caracterizada pelo fato de compreender um antígeno de peptídeo $A\beta$ para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide juntamente com um inibidor do sistema de complemento e um composto particularmente um efector alostérico de hemoglobina, que dispara uma liberação de oxigênio regulada, intensificada para os tecidos.

71. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 70, caracterizada pelo fato de que o antígeno de peptídeo $A\beta$ é um antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$.

72. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 71, caracterizada pelo fato de compreender um peptídeo antigênico imunogênico para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide, na qual o antígeno de peptídeo β -amilóide é um antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ palmitoilado modificado por resíduos de palmitoíla covalentemente ligados, particularmente entre 2 e 4, mais particularmente 4 resíduos, em cada extremidade do peptídeo reconstituído em um lipossomo juntamente com um inibidor do sistema de complemento e um composto modulador de afinidade de hemoglobina/ O_2 , particularmente um efector alostérico de hemoglobina, que dispara uma liberação de oxigênio regulada, intensificada para os tecidos.

73. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 64 a 66 e 70 a 72, caracterizada pelo fato de que o inibidor de complemento é um composto selecionado do grupo consistindo de Receptor 1

de complemento solúvel de humano, anti-proteína C5 de complemento humana tal como, por exemplo, um anticorpo anti-C5 monoclonal humanizado ou um fragmento de cadeia única de um anticorpo monoclonal humanizado, inibidor-N de C1-esterase Inibidor C1 Natural de humano.

5 74. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 69 e 70 a 72, caracterizada pelo fato de que o composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂ é um composto selecionado do grupo consistindo de uma droga antilipidêmica tal como, por exemplo, ácido clofibríco ou bezafibrato incluindo os derivados de bezafibrato LR16 e L35, 10 derivado de uréia tal como, por exemplo, ácido [2-[4[[(aril-amino)-carbonil]-amino]-fenóxi]-2-metil-propiónico, um efetor alostérico de hemoglobina tal como, por exemplo, 2,3-difosfo-glicerato (DPG), hexaquisfosfato de inositol (IHP), e fosfato de piridoxal.

15 75. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 69 e 70 a 72, caracterizada pelo fato de que o composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂ é um composto compreendendo um ligante aniônico para um sítio alostérico de hemoglobina, na qual o ligante aniônico compreende um anel de pirofosfato interno, opcionalmente juntamente com um cátion não-tóxico.

20 76. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 75, caracterizada pelo fato de que o composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂ é um derivado de hexafosfato de inositol (IHP) compreendendo pelo menos um anel de pirofosfato interno, opcionalmente juntamente com um cátion não-tóxico.

25 77. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 64 a 75, caracterizada pelo fato de que o antígeno de peptídeo β-amilóide compreende um construto antigênico como definido em qualquer uma das reivindicações 24 a 37.

78. Uso de um fragmento de peptídeo antigênico Aβ

consistindo de um segmento único ou repetitivo de entre 13 e 15 resíduos de aminoácido contíguos da parte N-terminal do peptídeo A β , caracterizado pelo fato de ser para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide.

5 79. Uso de um antígeno de peptídeo A β como definido nas reivindicações 2 a 23 ou um construto antigênico como definido em qualquer uma das reivindicações 24 a 37, caracterizado pelo fato de ser para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide.

10 80. Uso de um antígeno de peptídeo A β de acordo com a reivindicação 79, caracterizado pelo fato de que a condição ou doença associada com amilóide é uma selecionada do grupo consistindo de doenças incluindo, mas não limitadas a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo,
15 debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeld
20 Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular.

 81. Uso de um antígeno de peptídeo A β de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que a condição ou doença
25 associada com amilóide é Mal de Alzheimer.

 82. Uso de um antígeno de peptídeo A β de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que a condição associada com amilóide é caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, em debilitação cognitiva suave (MCI) em um animal,

particularmente um mamífero ou um humano.

83. Uso de um antígeno de peptídeo A β de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que o tratamento de um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição associada com amilóide caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva leva a um aumento na retenção da capacidade de memória cognitiva.

84. Uso de um antígeno de peptídeo A β de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que o tratamento de um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição associada com amilóide caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva leva a uma restauração completa da capacidade de memória cognitiva.

85. Método para tratar uma condição ou doença associada com amilóide, caracterizado pelo fato de compreender a administração a um animal, particularmente a um mamífero, mas especialmente a um humano, sofrendo de uma tal doença ou condição de uma composição de vacina terapêutica como definida em qualquer uma das reivindicações 38 a 77.

86. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a composição de vacina compreende um antígeno de peptídeo A β ₁₋₁₅, particularmente um antígeno de peptídeo A β ₁₋₁₅ palmitoilado.

87. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a administração de citada composição de vacina resulta principalmente na geração de anticorpos de subtipos não-inflamatórios.

88. Método de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que os citados anticorpos são do subtipo Th2 não-inflamatório, particularmente de isotipo IgG1 e IgG2b.

89. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a administração de citada composição de vacina resulta

principalmente na geração de anticorpos da subclasse IgG independente de célula-T.

90. Método de acordo com a reivindicação 89, caracterizado pelo fato de que os citados anticorpos são do isotipo IgG3.

5 91. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de não levar a um aumento significativo em marcadores de inflamação no cérebro.

10 92. Método de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que os citados marcadores são selecionados do grupo consistindo de IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF α .

93. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a administração de citada composição de vacina leva a um decréscimo significativo de A β 1-40 e A β 1-42 relacionados com placas, insolúveis, no cérebro.

15 94. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a administração de citada composição de vacina leva a uma redução significativa no nível de A β 1-42 solúvel no cérebro.

20 95. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 94, caracterizado pelo fato de que a condição ou doença associada com amilóide é uma selecionada do grupo consistindo de doenças incluindo, mas não limitadas a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral

25 hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeld Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início

na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular.

5 96. Método de acordo com a reivindicação 95, caracterizado pelo fato de que a condição ou doença associada com amilóide é Mal de Alzheimer.

10 97. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 94, caracterizado pelo fato de que a administração de citada composição de vacina a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição associada com amilóide caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva leva a um aumento na retenção da capacidade de memória cognitiva.

15 98. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 94, caracterizado pelo fato de que a administração de citada composição de vacina a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição associada com amilóide caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva leva a uma restauração completa da capacidade de memória cognitiva.

20 99. Método para significativamente aumentar a retenção ou capacidade de memória cognitiva de um mamífero, caracterizado pelo fato de ser por imunização com uma composição de vacina terapêutica como definida em qualquer uma das reivindicações 38 a 77.

25 100. Método de acordo com a reivindicação 99, caracterizado pelo fato de que a composição de vacina compreende um antígeno de peptídeo A β ₁₋₁₅, particularmente um antígeno de peptídeo A β ₁₋₁₅ palmitoilado.

101. Método para induzir uma resposta imune em um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição associada com amilóide caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tal como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), caracterizado pelo fato de ser pela administração ao citado animal ou humano

de uma composição de vacina terapêutica como definida em qualquer uma das reivindicações 38 a 77 de tal modo que a retenção ou capacidade de memória cognitiva do animal ou humano tratado é aumentada.

102. Método para induzir uma resposta imune em um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição associada com amilóide caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), caracterizado pelo fato de ser por administração ao citado animal ou humano de uma composição de vacina terapêutica compreendendo um antígeno de peptídeo A β ₁₋₁₅, particularmente um antígeno de peptídeo A β ₁₋₁₅ palmitoilado de tal modo que a capacidade de memória cognitiva do animal ou humano tratado é completamente restaurada.

103. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a composição de vacina como definida em qualquer uma das reivindicações 64 a 77 é administrada de tal modo que o inibidor de complemento e o construto antigênico são administrados concomitante, intermitente ou seqüencialmente.

104. Método de acordo com a reivindicação 103, caracterizado pelo fato de que o inibidor de complemento é administrado antes da vacinação com o construto antigênico, para dentro de uma janela de tempo iniciando de até 20 horas antes da vacinação e terminando imediatamente antes da vacinação.

105. Método de acordo com a reivindicação 103, caracterizado pelo fato de que o inibidor de complemento é administrado subsequente à vacinação com o construto antigênico dentro de uma janela de tempo iniciando imediatamente após a vacinação e terminando 1 dia após a aplicação da vacina.

106. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 103 a 105, caracterizado pelo fato de que a composição de vacina compreende

um antígeno de peptídeo A β ₁₋₁₅, particularmente um antígeno de peptídeo A β ₁₋₁₅ palmitoilado.

107. Método para preparar um medicamento para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide, caracterizado pelo fato de compreender o uso da composição de vacina como definida em qualquer uma das reivindicações 38 a 77.

108. Método para produzir um medicamento para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide, caracterizado pelo fato de compreender o uso de um peptídeo antigênico imunogênico, no qual o antígeno de peptídeo β -amilóide é um antígeno de peptídeo A β ₁₋₁₅ palmitoilado modificado por resíduos de aminoácido palmitoilados covalentemente ligados, particularmente entre 2 e 4, mais particularmente 4 resíduos, reconstituído em um lipossomo.

109. Anticorpo ou mistura de anticorpos, caracterizado(a) pelo fato de ser obtenível de um animal imunizado com a composição de vacina como definida em qualquer uma das reivindicações 31 a 43.

110. Anticorpo de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de ser um anticorpo monoclonal ou um derivado do mesmo.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> AC Immune S.A.
 <120> Vacina terapêutica
 <130> L3018 PCT
 <150> EP 05027091.7
 <151> 2005-12-12
 <150> EP 06009098.2
 <151> 2006-05-02
 <160> 6
 <170> PatentIn versão 3.1
 <210> 1
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> peptídeo antigênico A β 1-15
 <400> 1
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln 15
 <210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> peptídeo antigênico A β 1-16
 <400> 2
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys 16
 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> peptídeo antigênico A β 1-16 (Δ 14)
 <400> 3
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His Gln Lys 15
 <210> 4
 <211> 8 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> peptídeo antigênico A β 4-11
 <400> 4
 Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu 8
 <210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> peptídeo antigênico A β 22-35
 <400> 5
 Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu 13
 <210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> peptídeo antigênico A β 29-40
 <400> 6
 Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val 12

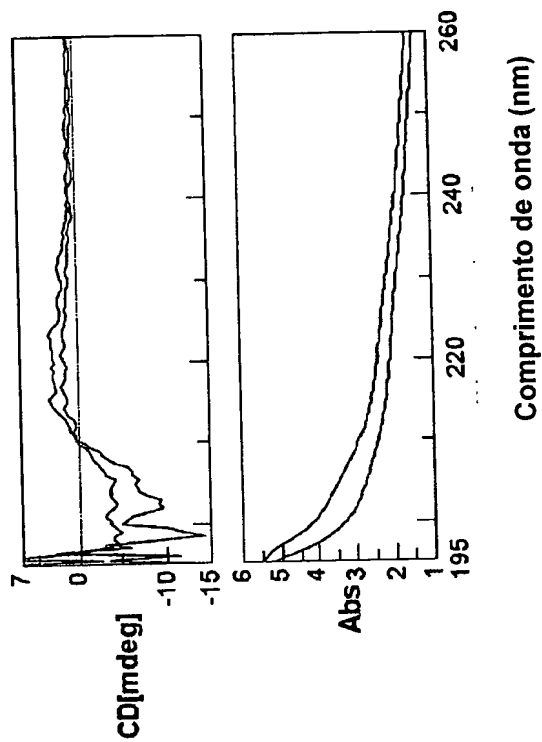


Fig 1 ab

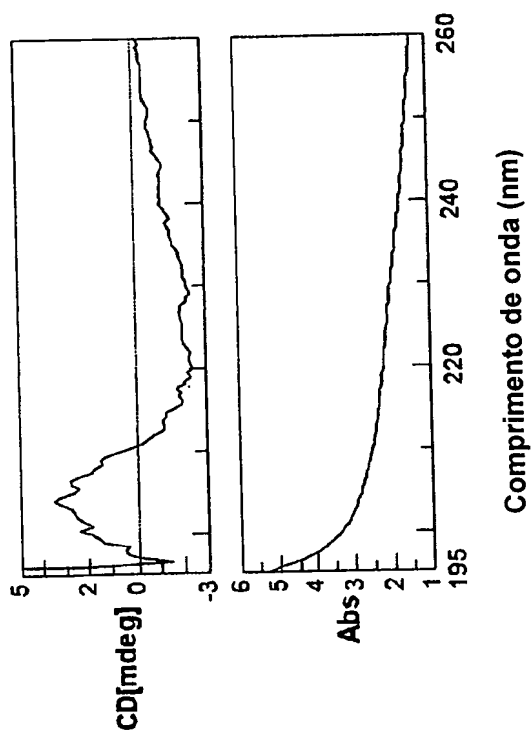
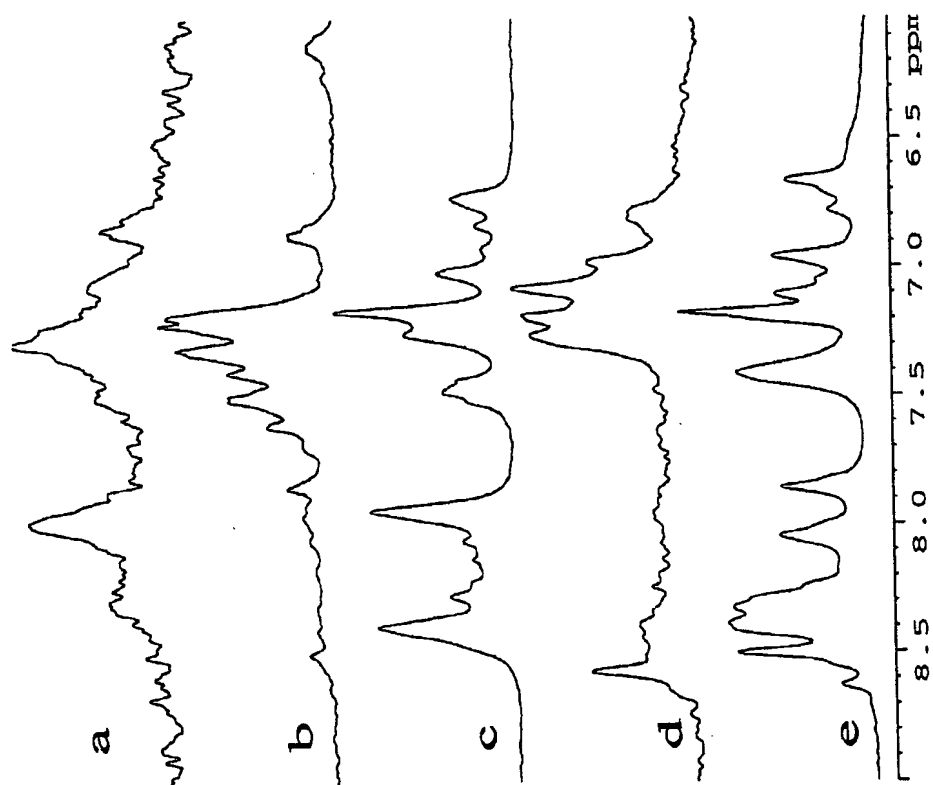
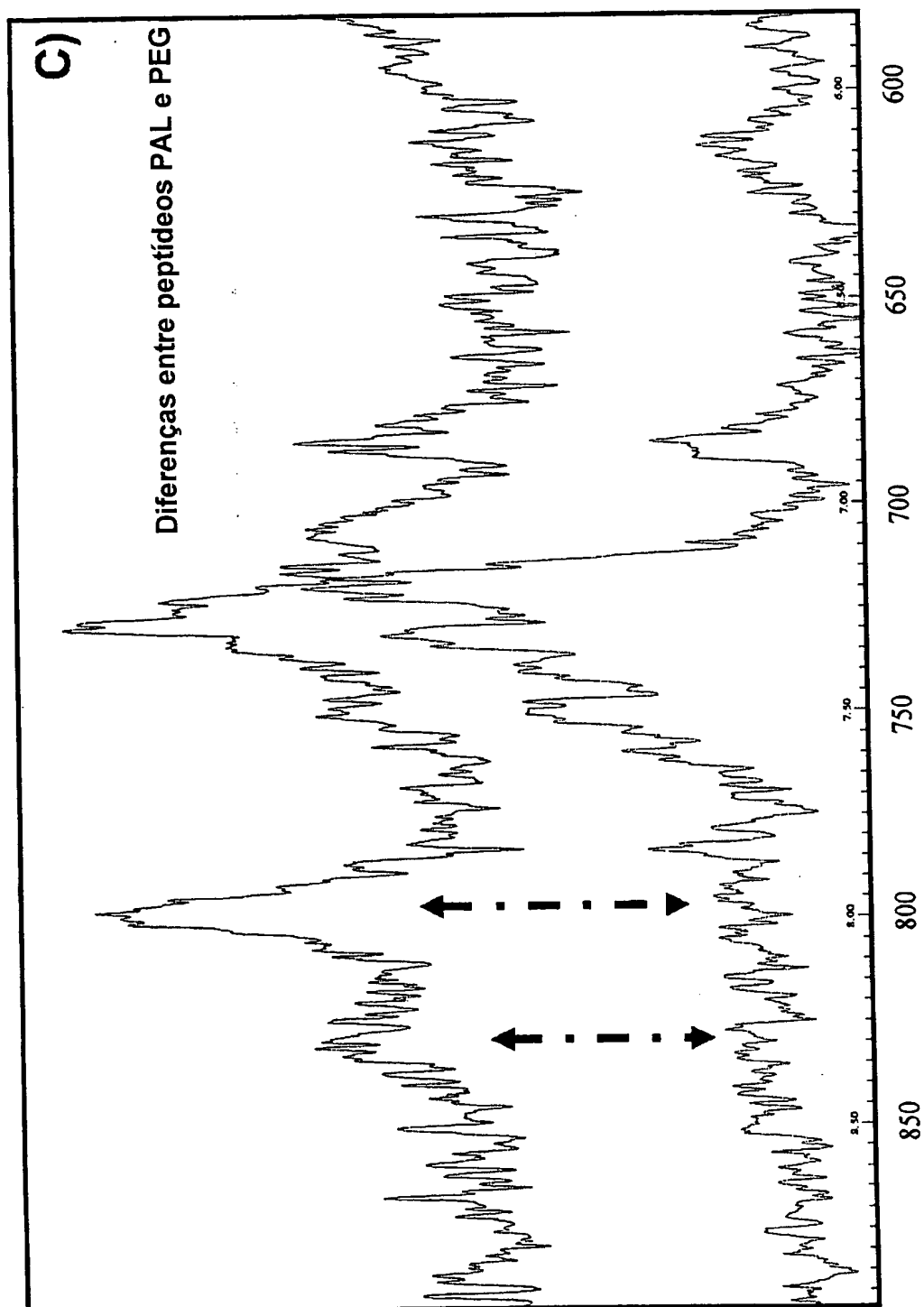


Fig 1 aa

**FIG 1b**

**FIG 1c**

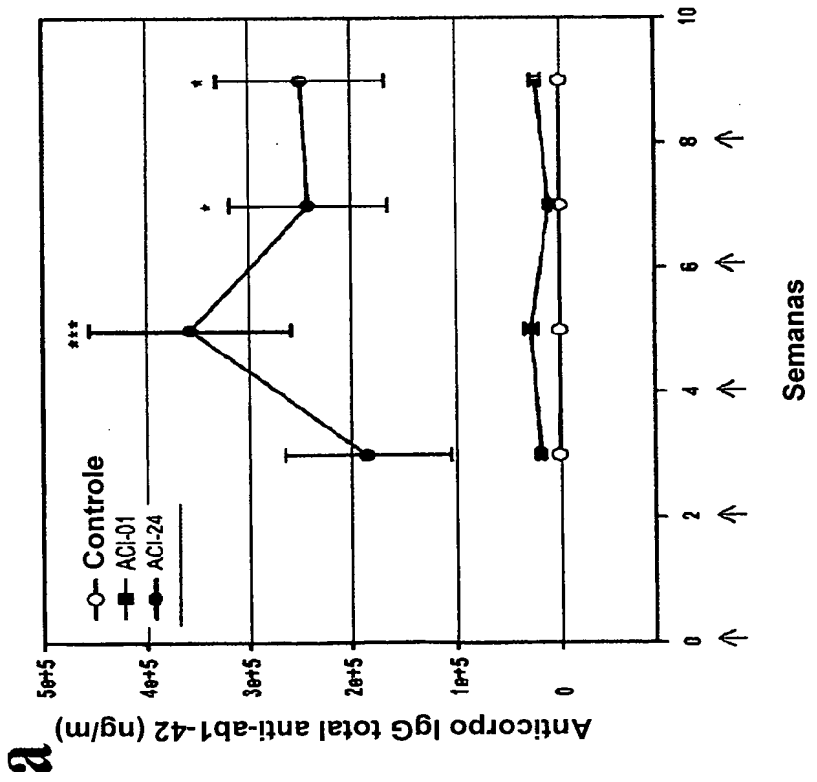


Fig 2 a

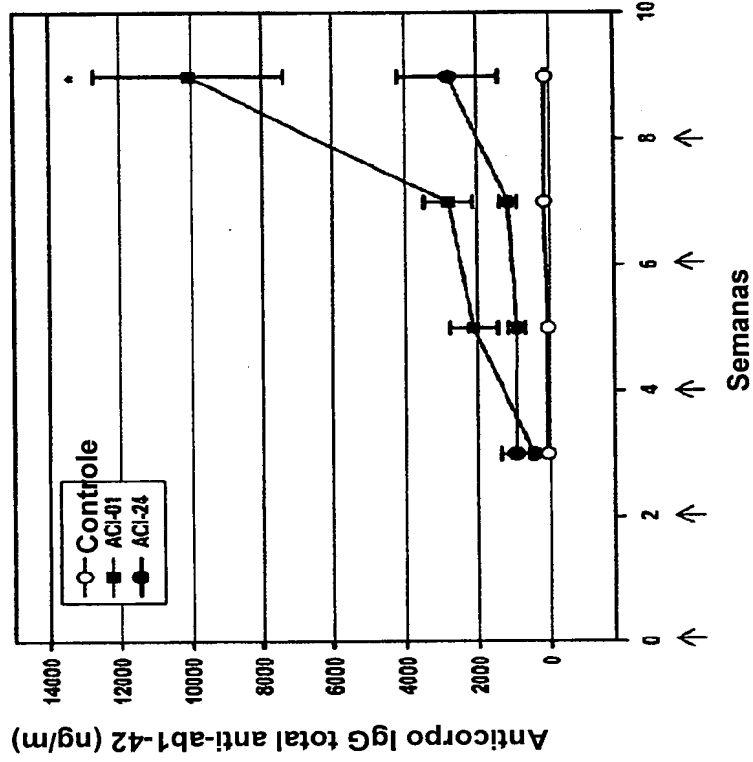


Fig 2 b

RESUMO

“MÉTODO PARA PRODUZIR UMA COMPOSIÇÃO DE VACINA
TERAPÊUTICA, CONSTRUTO ANTIGÊNICO, COMPOSIÇÃO DE
VACINA, USOS DE UM FRAGMENTO DE PEPTÍDEO ANTIGÊNICO
5 ABETA, DE UM ANTÍGENO DE PEPTÍDEO ABETA OU UM
CONSTRUTO ANTIGÊNICO, MÉTODOS PARA TRATAR UMA
CONDIÇÃO OU DOENÇA ASSOCIADA COM AMILÓIDE, PARA
SIGNIFICATIVAMENTE AUMENTAR A RETENÇÃO OU
CAPACIDADE DE MEMÓRIA COGNITIVA DE UM MAMÍFERO, PARA
10 INDUZIR UMA RESPOSTA IMUNE EM UM ANIMAL, PARA
PREPARAR E PRODUZIR UM MEDICAMENTO PARA O
TRATAMENTO DE UMA CONDIÇÃO OU DOENÇA ASSOCIADA COM
AMILÓIDE, E, ANTICORPO OU MISTURA DE ANTICORPOS”

A presente invenção refere-se aos métodos e às composições
15 para o uso diagnóstico e terapêutico no tratamento de doenças e de distúrbios
que são causados por ou estão associados com proteínas amilóide ou tipo-
amilóide incluindo amiloidose. Em particular, a presente invenção
proporciona novos métodos e composições para gerar uma resposta imune
elevadamente específica e elevadamente efetiva em um organismo, mas
20 particularmente dentro de um animal, particularmente um mamífero ou um
humano, que é capaz de prevenir ou de aliviar amiloidose, ou os sintomas
associados com amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com
formação de placa amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose
relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios
25 neurológicos tal como mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou
condições caracterizadas por uma perda de capacidade de memória cognitiva
tal como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI).

“MÉTODO PARA PRODUZIR UMA COMPOSIÇÃO DE VACINA TERAPÊUTICA, CONSTRUTO ANTIGÊNICO, COMPOSIÇÃO DE VACINA, USOS DE UM FRAGMENTO DE PEPTÍDEO ANTIGÊNICO ABETA, DE UM ANTÍGENO DE PEPTÍDEO ABETA OU UM
5 CONSTRUTO ANTIGÊNICO, MÉTODOS PARA TRATAR UMA CONDIÇÃO OU DOENÇA ASSOCIADA COM AMILÓIDE, PARA SIGNIFICATIVAMENTE AUMENTAR A RETENÇÃO OU CAPACIDADE DE MEMÓRIA COGNITIVA DE UM MAMÍFERO, PARA INDUZIR UMA RESPOSTA IMUNE EM UM ANIMAL, PARA
10 PREPARAR E PRODUZIR UM MEDICAMENTO PARA O TRATAMENTO DE UMA CONDIÇÃO OU DOENÇA ASSOCIADA COM AMILÓIDE, E, ANTICORPO OU MISTURA DE ANTICORPOS”

A presente invenção refere-se aos métodos e às composições para o uso diagnóstico e terapêutico no tratamento de doenças e distúrbios que
15 são causadas(os) por ou estão associados(as) com proteínas amilóides ou proteínas tipo-amilóide incluindo amiloidose, um grupo de distúrbios e anormalidades associados com proteína amilóide tal como Mal de Alzheimer (AD).

Amiloidose não é uma entidade doentia individual mas em vez
20 disso um grupo diverso de processos doentios progressivos caracterizados por depósitos de tecido extracelular de proteínas cerosas, semelhantes a amido chamadas de amilóide, que se acumulam em um ou mais órgãos ou sistemas do corpo. À medida que os depósitos amilóides se desenvolvem, começam a interferir com a função normal do órgão ou sistema do corpo. Há pelo menos
25 15 tipos diferentes de amiloidose. As formas maiores são amiloidose primária sem antecedente conhecido, amiloidose secundária após alguma outra condição, e amiloidose hereditária.

Amiloidose secundária ocorre em pessoas que possuem uma doença inflamatória ou infecciosa crônica, tal como tuberculose, uma

infecção bacteriana chamada de febre do mediterrâneo, infecções ósseas (osteomielite), atrite reumatóide, inflamação de intestino delgado (ileíte granulomatosa), doença de Hodgkin, e lepra.

Depósitos amilóides tipicamente contêm três componentes.

5 Fibrilas de proteína amilóide, que totalizam cerca de 90% do material amilóide, compreendem um dos vários tipos diferentes de proteínas. Estas proteínas são capazes de se dobrarem em denominadas fibrilas de folha “beta-pregueada”, uma configuração de proteína única que exhibe sítios de ligação para vermelho Congo resultando em propriedades de coloração únicas da
10 proteína amilóide. Em adição, os depósitos amilóides estão intimamente associados com o componente amilóide P (AP) (pentagonal), uma glicoproteína relacionada com amilóide P de soro (SAP) normal, e com glicosaminoglicanos (GAG) sulfatados, carboidratos complexos de tecido conjuntivo.

15 Muitas doenças de envelhecimento são baseadas em ou estão associadas com proteínas tipo-amilóide e são caracterizadas, em parte, pelo aumento de depósitos extracelulares de amilóide ou material tipo-amilóide que contribuem para a patogênese, bem como a progressão da doença. Estas doenças incluem, mas não são limitadas a, distúrbios neuronais tais como Mal
20 de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam. Outras doenças que são baseadas
25 em ou estão associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeldt Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular.

Embora a patogênese destas doenças possa ser diversa, seus depósitos característicos muitas vezes contêm muitos constituintes moleculares compartilhados. Em um grau significativo, isto pode ser atribuível à ativação local de rotas pró-inflamatórias levando deste modo à deposição concorrente de componentes de complemento ativados, reagentes de fase aguda, moduladores imunes, e outros mediadores inflamatórios (McGeer et al., 1994).

Mal de Alzheimer (AD) é um distúrbio neurológico primariamente considerado em ser causado por placas amilóides, um acúmulo de depósito anormal de proteínas no cérebro. O tipo mais freqüente de amilóide verificado no cérebro de indivíduos afetados é composto primariamente de fibrilas A β . Evidência científica demonstra que um aumento na produção e no acúmulo de proteína beta-amilóide em placas leva à morte de célula nervosa, que contribui para o desenvolvimento e a progressão do Mal de Alzheimer. Perda de células nervosas em áreas cerebrais estratégicas, por sua vez, causa redução nos neurotransmissores e debilitação da memória. As proteínas principalmente responsáveis pelo desenvolvimento de placa incluem proteína precursora de amilóide (APP) e duas presenilinas (presenilina I e presenilina II). Clivagem seqüencial da proteína precursora de amilóide (APP), que é constitutivamente expressada e catabolizada na maioria das células, pelas enzimas β e γ secretases leva à liberação de um peptídeo A β de 39 a 43 aminoácidos. A degradação de APPS provavelmente aumenta sua propensão para se agregar em placas. É especialmente o fragmento A β (1-42) que possui uma propensão alta para desenvolver agregados devido aos dois resíduos de aminoácido muito hidrofóbicos em sua terminação-C. Portanto é crido que o fragmento A β (1-42) está principalmente envolvido e é responsável pela iniciação de formação de placa neurotrítica em Mal de Alzheimer e possui, portanto, um potencial patológico alto. Portanto há uma necessidade de anticorpos específicos que

podem selecionar e difundir a formação de placa amilóide.

Os sintomas de Mal de Alzheimer manifestam-se lentamente e o primeiro sintoma pode ser apenas um esquecimento brando. Neste estágio, indivíduos podem esquecer de eventos recentes, atividades, os nomes de pessoas da família ou de coisas e podem não ser capazes de solucionar problemas de matemática simples. À medida que a doença progride, os sintomas são mais facilmente notados e se tornam suficientemente sérios para fazerem com que as pessoas com Mal de Alzheimer ou seus membros familiares procurem ajuda médica. Sintomas de estágio brando do Mal de Alzheimer incluem o esquecimento de como realizar tarefas simples tais como o cuidado da aparência, e o desenvolvimento de problemas com a fala, o entendimento, a leitura, ou a escrita. Pacientes com Mal de Alzheimer no estágio tardio podem se tornar ansiosos ou agressivos, podem fugir de casa e finalmente necessitam de cuidado total.

Presentemente, o único meio definido para diagnosticar Mal de Alzheimer é identificar as placas e os emaranhados em tecido cerebral em uma autópsia após a morte do indivíduo. Portanto, médicos apenas podem fazer um diagnóstico de Mal de Alzheimer “possível” ou “provável” enquanto a pessoa ainda estiver viva. Usando os métodos correntes, os médicos podem diagnosticar Mal de Alzheimer corretamente até 90 por cento do tempo utilizando várias ferramentas para diagnosticar Mal de Alzheimer “provável”. Médicos perguntam sobre a saúde geral da pessoa, os problemas médicos do passado, e a história de quaisquer dificuldades que a pessoa apresenta na realização das atividades diárias. Testes comportamentais de memória, solução de problemas, atenção, contagem, e linguagem proporcionam informação sobre a degeneração cognitiva e os testes médicos tais como testes de sangue, urina, ou fluido espinhal, e varreduras cerebrais podem proporcionar alguma outra informação.

O manejo do Mal de Alzheimer consiste de tratamentos

baseados em medicação e baseados em não-medicação. Tratamentos que almejam a mudança do curso subjacente da doença (retardamento ou reversão da progressão) têm sido até agora largamente mau sucessivos. Tem sido mostrado que medicamentos que restauram o déficit (defeito), ou mau funcionamento, nos mensageiros químicos das células nervosas (neurotransmissores), tais como inibidores de colinesterase (ChEIs), melhoram os sintomas. Medicamentos também estão disponíveis para solucionar as manifestações psiquiátricas de Mal de Alzheimer.

Inibidores de colinesterase, tais como Tacrina e Rivastigmina, são correntemente a única classe de agentes que são aprovados pela FDA para o tratamento de Mal de Alzheimer. Estes agentes são medicamentos que restauram o defeito, ou o mau funcionamento, na neurotransmissão química no cérebro. ChEIs impedem a degradação enzimática de neurotransmissores aumentando deste modo a quantidade de mensageiros químicos disponíveis para transmitir os sinais nervosos no cérebro.

Para algumas pessoas nos estágios iniciais e intermediários da doença, as drogas tacrina (COGNEX®, Morris Plains, NJ), donepezil (ARICEPT®, Tokyo, JP), rivastigmina (EXELON®, East Hanover, NJ), ou galantamina (REMINYL®, New Brunswick, NJ) podem ajudar a prevenir que alguns sintomas se tornem piores por um tempo limitado. Outra droga, memantina (NAMENDA®, Nova Iorque, NY), tem sido aprovada para o tratamento de Mal de Alzheimer moderado a severo. Também, alguns medicamentos podem ajudar a controlar os sintomas comportamentais de Mal de Alzheimer tais como insônia, agitação, perambulação, ansiedade, e depressão. Tratamento destes sintomas muitas vezes torna os pacientes mais confortáveis e torna seu cuidado mais fácil para os tratadores. Infelizmente a despeito dos avanços de tratamento significativos mostrando que esta classe de agentes é consistentemente melhor do que um placebo, a doença continua a progredir, e o efeito médio sobre o funcionamento mental tem apenas sido

modesto. ChEIs também possuem efeitos colaterais que incluem disfunção gastrointestinal, toxicidade hepática e perda de peso.

Há esperança de que os avanços no entendimento das anormalidades cerebrais que ocorrem em Mal de Alzheimer proporcionem o arcabouço para novos alvos de tratamento que estão mais focalizados sobre a alteração do curso e do desenvolvimento da doença. Muitos compostos, incluindo agentes antiinflamatórios, estão sendo ativamente investigados. Testes clínicos usando inibidores específicos de ciclooxigenase (COX-2), tais como rofecoxib e celecoxib, também estão a caminho.

Outras doenças que são baseadas em ou estão associadas com o acúmulo e o depósito de proteína tipo-amilóide são debilitação cognitiva suave, demência de corpo de Lewy (LBD), esclerose lateral amiotrófica (ALS), miosite de corpo de inclusão (IBM) e degeneração macular, em particular degeneração macular relacionada com a idade (AMD).

Debilitação cognitiva suave (MCI) é um termo geral mais comumente definido como um distúrbio de memória sutil mas mensurável. Uma pessoa com MCI experimenta problemas de memória maiores do que os normalmente esperados com a idade, mas não mostra outros sintomas de demência, tais como raciocínio ou julgamento debilitado. MCI é uma condição que freqüentemente reflete em um estágio pré-clínico de AD.

É crido que a deposição de β -amilóide dentro do córtex entorrinal (EC) desempenha um papel chave no desenvolvimento de debilitação cognitiva suave (MCI) em idosos. Isto está em linha com a observação de que os níveis de CSF-A $A\beta(1-42)$ declinam significativamente uma vez AD se torne clinicamente observável. Em contraste com CSF- $A\beta(1-42)$ níveis de CSF-tau estão significativamente aumentados no estágio de MCI, e estes valores continuam a ser elevados depois, indicando níveis aumentados de CSF-tau podem ajudar na detecção de indivíduos com MCI que são preditos em desenvolverem AD.

Demência de corpo de Lewy (LBD) é um distúrbio neurodegenerativo que pode ocorrer em pessoas mais velhas do que 65 anos de idade, que tipicamente causa sintomas de debilitação cognitiva (pensamento) e mudanças comportamentais anormais. Sintomas podem

5 incluir debilitação cognitiva, sinais neurológicos, distúrbios de sono, e insuficiência autônoma. Debilitação cognitiva é a característica presente de LBD na maioria dos casos. Pacientes têm episódios recorrentes de confusão que progressivamente pioram. A flutuação em capacidade cognitiva está muitas vezes associada com graus de deslocamento de atenção e de vigilância.

10 Debilitação cognitiva e flutuações de pensamento podem variar durante minutos, horas ou dias.

Corpos de Lewy são formados de proteínas de monofilamento fosforiladas e não-fosforiladas; eles contêm a proteína sináptica alfa-sinucleína bem como ubiquitina, que está envolvida na eliminação de

15 proteínas danificadas ou anormais. Em adição aos Corpos de Lewy, os neuritos de Lewy, que são corpos de inclusão nos processos celulares das células nervosas, também podem estar presentes. Placas de amilóide podem se formar no cérebro de pacientes afligido com DLB, contudo tendem a ser menos em número do que as vistas em pacientes com Mal de Alzheimer.

20 Emaranhados neurofibrilares, a outra característica micropatológica de AD, não são uma característica comum de DLB mas estão freqüentemente presentes em adição às placas de amilóide.

Esclerose lateral amiotrófica (ALS) é caracterizada pela degeneração dos neurônios motores inferior e superior. Em alguns pacientes

25 com ALS, demência ou afasia pode estar presente (ALS-D). A demência é mais comumente uma demência frontotemporal (FTD), e muitos destes casos possuem inclusões uniuquitina-positivas, tau-negativas em neurônios do giro dentado e camadas superficiais dos lobos frontal e temporal.

Miosite de corpo de inclusão (IBM) é uma doença

incapacitante normalmente verificada em pessoas acima de 50 anos de idade, na qual as fibras musculares desenvolvem inflamação e começam a atrofiar - mas na qual o cérebro é poupado e os pacientes retêm seu intelecto total. Duas enzimas envolvidas na produção de proteína amilóide- β foram encontradas
5 aumentadas dentro das células musculares de pacientes com esta doença muscular progressiva, mais comum de pessoas idosas, na qual amilóide- β também está aumentado.

Outra doença que é baseada em ou está associada com o acúmulo e o depósito de proteína tipo-amilóide é a degeneração macular.

10 Degeneração macular é uma doença ocular comum que causa deterioração da mácula, que é a área central da retina (o tecido fino como papel no fundo do olho onde as células sensíveis à luz enviam sinais visuais ao cérebro). Visão 'retilínea para a frente', clara, nítida é processada pela mácula. Dano na mácula resulta no desenvolvimento de pontos cegos ou visão
15 borrada ou distorcida. Degeneração macular relacionada com a idade (AMD) é uma causa maior de debilitação visual nos Estados Unidos e para pessoas acima de 65 anos de idade é a causa principal de cegueira legal dentre os caucasianos. Aproximadamente 1,8 milhões de americanos de idade de 40 anos e mais velhos possuem AMD avançada, e outros 7,3 milhões de pessoas
20 com AMD intermediária estão sob risco substancial de perda de visão. O governo estima que em 2020 haverá 2,9 milhões de pessoas com AMD avançada. Vítimas de AMD são muitas vezes surpreendidas e frustradas em verificar quanto pouco é sabido sobre as causas e o tratamento desta condição cegante.

25 Há duas formas de degeneração macular: degeneração macular seca e degeneração macular úmida. A forma seca, na qual as células da mácula lentamente começam a se decompor, é diagnosticada em 85 por cento dos casos de degeneração macular. Ambos os olhos são normalmente afetados por AMD seca, embora um olho possa perder a visão enquanto que o outro

olho permanece não afetado. Gânglios, que são depósitos amarelos sob a retina, são comumente sinais iniciais de AMD seca. O risco de desenvolvimento de AMD seca ou de AMD úmida avançada aumenta à medida que aumenta o número ou o tamanho dos gânglios. É possível que AMD seca avance e cause perda de visão sem se transformar na forma úmida da doença; contudo, também é possível que a AMD seca de estágio inicial subitamente mude para a forma úmida.

A forma úmida, embora apenas totalize 15 por cento dos casos, resulta em 90 por cento da cegueira, e é considerada AMD avançada (não há estágio inicial ou intermediário de AMD úmida). AMD úmida é sempre precedida pela forma seca da doença. À medida que a quantidade efetiva de forma seca piora, algumas pessoas começam a ter vasos sanguíneos anormais crescendo atrás da mácula. Estes vasos são muito frágeis e vazam e sangue (daí degeneração macular 'úmida'), causando dano rápido na mácula.

A forma seca de AMD inicialmente muitas vezes causará visão ligeiramente borrada. O centro de visão em particular pode se tornar então borrado e esta região cresce cada vez mais à medida que a doença progride. Nenhum sintoma pode ser notado se apenas um olho é afetado. Em AMD úmida, linhas retas podem aparecer onduladas e perda de visão central pode ocorrer rapidamente.

Diagnose de degeneração macular tipicamente envolve um exame de olho dilatado, teste de acuidade visual, e uma visão do fundo de olho usando um procedimento chamado de fundoscopia para auxiliar no diagnóstico de AMD, e - se AMD úmida for suspeita - angiografia com fluoresceína também pode ser realizada. Se AMD seca alcança os estágios avançados, não há tratamento corrente para prevenir perda de visão. Contudo, uma fórmula de dose alta específica de antioxidantes e zinco pode retardar ou prevenir a AMD intermediária de progredir para o estágio avançado. Macugen® (injeção de pegaptanib sódico), fotocoagulação por laser e terapia

fotodinâmica podem controlar o crescimento de vaso sanguíneo anormal e o sangramento na mácula, que é útil para algumas pessoas que possuem AMD úmida; contudo visão que já está perdida não será restaurada por estas técnicas. Se visão já estiver perdida, há auxiliares de visão baixa que podem ajudar a melhorar a qualidade de vida.

Um dos sinais iniciais de degeneração macular relacionada com a idade (AMD) é o acúmulo de depósitos extracelulares conhecidos como gânglios entre a lâmina basal do epitélio retinal pigmentado (RPE) e a membrana de Bruch (BM). Estudos recentes conduzidos por Anderson et al. têm confirmado que gânglios contêm amiloide beta. (Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256).

Pesquisa avançada continua com os estudos de exploração de fatores ambientais, genéticos, e dietéticos que podem contribuir com AMD. Novas estratégias de tratamento também estão sendo exploradas, incluindo transplantes de células retiniais, drogas que evitarão ou tornarão mais lento o progresso da doença, terapia de radiação, terapias genéticas, e um chip de computador implantado na retina que pode ajudar a estimular a visão e agentes que evitarão o crescimento de novos vasos sanguíneos sob a mácula.

O que é necessário portanto, são composições de vacinas terapêuticas efetivas e métodos para solucionar as complicações associadas com amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amiloide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitada a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amiloide tais

como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeld Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes Iniciada em Idade Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular.

5 Em particular o que é necessário são vacinas terapêuticas especializadas e elevadamente efetivas e composições compreendendo as citadas vacinas, que são capazes de contra-atacar as manifestações fisiológicas da doença tal como a formação de placas associadas com agregação de fibras de amilóide ou de peptídeo tipo-amilóide.

10 A presente invenção proporciona métodos novos e composições novas para gerar uma resposta elevadamente efetiva e elevadamente imune em um organismo, mas particularmente dentro de um animal, particularmente um mamífero ou um humano, que é capaz de prevenir ou de aliviar amiloidose, ou outros sintomas associados com amiloidose, um
15 grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo,
20 debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como
25 paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeld Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular.

Em particular, a presente invenção proporciona métodos novos e composições novas para reter ou melhorar, mas particularmente para

restaurar, mais particularmente para completamente restaurar a capacidade de memória cognitiva em um mamífero exibindo uma condição ou doença amilóide-associada.

Um objetivo da invenção é proporcionar uma composição de vacina terapêutica e um método para produzir uma tal composição para o tratamento de doenças e distúrbios que são causados ou estão associados com amilóide ou proteínas tipo-amilóide incluindo amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI) compreendendo um fragmento de peptídeo da parte N-terminal do peptídeo A β , particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de um segmento único ou repetitivo de entre 13 e 15 resíduos de aminoácido contíguos da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de resíduos 1-15, 1-14, e 1-13 da parte N-terminal do peptídeo A β , mais particularmente de resíduo 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, incluindo seus fragmentos funcionalmente equivalentes, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β como antes mencionado aqui ligado em, ou incorporado ou reconstituído em um adjuvante/partícula carreador tal como, por exemplo, um lipossomo.

Este segmento contínuo de 13 a 15 resíduos de aminoácido pode ser obtido do fragmento N-terminal 1-16, 1-17, 1-18 ou 1-20 do peptídeo A β mas particularmente do fragmento N-terminal 1-16 ou 1-17 do peptídeo A β como dado em SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 5, respectivamente e pode ser interrompido pela deleção de um a três resíduos de aminoácido para resultar em um segmento de entre 13 e 15 resíduos de aminoácido, no

qual os resíduos de aminoácido deletados podem ser resíduos de aminoácido adjacentes ou resíduos separados uns dos outros por pelo menos 1 resíduo de aminoácido, mas particularmente resíduos de aminoácido que não são resíduos negativamente carregados, se for desejado que uma carga efetiva total da molécula peptídeo antigênico seja negativa, ou resíduos de aminoácido que não são positivamente carregados, se for desejado que uma carga efetiva total da molécula de peptídeo antigênico seja positiva. Este segmento contínuo de 13 a 15 resíduos de aminoácido pode estar repetido no construto antigênico de acordo com a invenção entre 2 e 50 vezes, particularmente entre 2 e 30 vezes, mais particularmente entre 2 e 20 vezes, ainda mais particularmente entre 2 e 16 vezes, mas especialmente entre 2 e 10 vezes.

Em uma modalidade específica da invenção, o segmento contíguo de 13 a 15 resíduos de aminoácido é usado na forma de um polímero selecionado do grupo consistindo de um de 2-meros, um de 3-meros, um de 4-meros, um de 5-meros, um de 6-meros, um de 7-meros, um de 8-meros, um de 9-meros, um de 10-meros, um de 11-meros, um de 12-meros, um de 13-meros, um de 14-meros, um de 15-meros, um de 16-meros, um de 20-meros, um de 30-meros e um de 50-meros.

Em uma outra modalidade, a invenção proporciona uma composição de vacina terapêutica e um método para produzir uma tal composição para o tratamento de doenças e distúrbios que são causados ou estão associados com amilóide ou proteínas tipo-amilóide incluindo amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI) como adicionalmente

especificado aqui abaixo usando um fragmento de peptídeo A β da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), mais particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3.

Também é compreendido pela presente invenção um fragmento de peptídeo que é essencialmente idêntico aos fragmentos acima mencionados e possui substancialmente a mesma atividade biológica de citados fragmentos, mas particular um fragmento de peptídeo que é uma variante covalentemente modificada de citados fragmentos pelo fato de que as alterações resultam na substituição de um ou mais aminoácidos, particularmente de entre um e 10 aminoácidos, mais particularmente de entre um e 6 aminoácidos, ainda mais particularmente de entre um e 4 aminoácidos, mas especialmente de entre um e 3 aminoácidos, por um aminoácido quimicamente similar. Tabelas de substituição conservativa proporcionando aminoácidos funcionalmente similares são bem conhecidas na arte e são descritas aqui abaixo. A substituição conservativa é preferivelmente para ser feita de tal modo que a carga efetiva total do peptídeo e também a distribuição de carga sobre a molécula de peptídeo permaneçam essencialmente as mesmas.

Em uma modalidade específica da invenção pelo menos um, particularmente 2, mais particularmente 3 ou até mesmo todos os resíduos de aminoácido 1 negativamente carregados, 3, 7, 11 podem ser substituídos por um resíduo de aminoácido negativamente carregado quimicamente similar. Particularmente, o Asp em posição 1 e 7, respectivamente, pode ser

substituído por um Glu e o Glu em posição 9 e 11, respectivamente, pode ser substituído por um Asp.

Em uma modalidade específica da invenção, uma composição de vacina terapêutica e um método para produzir uma tal composição são proporcionados compreendendo um fragmento de peptídeo A β da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de antígeno de peptídeo 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 15), mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13), ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1- 14, especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3, para o tratamento de doenças e distúrbios que são causados ou estão associados com amilóide ou proteínas tipo-amilóide incluindo amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI).

Em uma modalidade específica a invenção proporciona uma composição de vacina terapêutica e um método de produzir uma composição de vacina terapêutica para retenção ou melhoria, particularmente para restauração completa da capacidade de memória cognitiva de um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de debilitação de

memória usando um fragmento de peptídeo A β da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 15), mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13) ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14, especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3.

Também é um objetivo da invenção proporcionar um método para o tratamento de doenças e distúrbios que são causados ou estão associados com amilóide ou proteínas tipo-amilóide incluindo amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI) pela administração a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, uma composição de vacina de acordo com a invenção e como aqui descrito.

Em uma modalidade específica a invenção proporciona um método para reter ou aumentar a capacidade de memória cognitiva mas, particularmente, para totalmente restaurar a capacidade de memória cognitiva de um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de debilitação de memória pela administração a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, uma composição de vacina de acordo com a

invenção e como aqui descrito.

Um outro objetivo da invenção é proporcionar uma composição de vacina terapêutica e um método para produzir uma tal composição bem como um método para o tratamento de doenças e distúrbios que são causados ou estão associados com amilóide ou proteínas tipo-amilóide incluindo amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), usando um antígeno de peptídeo A β de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, mas particularmente um fragmento de peptídeo A β da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 15), mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13), ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14, especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3, no qual o antígeno de peptídeo A β é modificado de tal modo que é capaz de manter e estabilizar uma conformação definida caracterizada por uma proporção equilibrada de porções de espiral aleatória e/ou de β -foliada e/ou α -helicoidal e de induzir uma resposta imune elevadamente específica no animal tratado.

A composição de vacina de acordo com a invenção e como

aqui antes descrito sob administração a um animal, particularmente um mamífero, mas especialmente um humano, resulta principalmente na geração de anticorpos de subtipos Th2 não-inflamatórios, tais como, por exemplo, isotipos IgG1 e IgG2b e/ou anticorpos de subclasse IgG independente de célula-T tal como, por exemplo, IgG3 e/ou não leva a um aumento significativo em marcadores de inflamação no cérebro, particularmente de marcadores de inflamação selecionados do grupo consistindo de IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α .

Em uma outra modalidade da invenção a vacina de acordo com a presente invenção como aqui antes descrito, sob administração a um animal, particularmente um mamífero, mas especialmente um humano, leva a um decréscimo significativo de A β 1-40 e A β 1-42 insolúveis relacionados com placa, no cérebro.

Em ainda uma outra modalidade da invenção a vacina de acordo com a presente invenção como aqui antes descrito, sob administração a um animal, particularmente um mamífero, mas especialmente um humano, leva a uma redução significativa no nível de A β 1-42 solúvel no cérebro.

É adicionalmente proporcionada uma vacina de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, que, sob administração a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição amilóide-associada caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva leva a um aumento na retenção da capacidade de memória cognitiva.

A invenção adicionalmente se refere a uma vacina de acordo com a presente invenção e como aqui antes descrito, que, sob administração a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição amilóide-associada caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva leva a uma restauração completa da capacidade de memória cognitiva.

Em particular, o antígeno de peptídeo A β de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, especialmente um fragmento de peptídeo A β da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 15), mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1- 16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13), ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14, especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3, está presente ligado em, ou incorporado ou reconstituído em um carreador tal como, por exemplo, uma vesícula, uma molécula ou corpo particulado mas, particularmente, um lipossomo.

As composições imunogênicas da presente invenção podem compreender lipossomos preparados por reconstituição de lipossomos na presença de peptídeos antigênicos purificados ou parcialmente purificados ou modificados de acordo com a invenção. Adicionalmente, os fragmentos de peptídeo podem ser reconstituídos em lipossomos. A presente invenção também inclui fragmentos de peptídeo antigênicos modificados de modo a aumentar sua antigenicidade. Por exemplo, grupos antigênicos e adjuvantes podem ser ligados em ou misturados com o peptídeo. Exemplos de grupos antigênicos e adjuvantes incluem, mas não são limitados a, derivados de muramil-dipeptídeo lipofílico, adjuvantes polímeros em bloco não-iônicos, hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio, e suas misturas.

Em outra modalidade da invenção o antígeno de peptídeo A β de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, especialmente um

fragmento de peptídeo A β da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 15), mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13), ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14, especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3, é modificado por um grupo lipofílico ou hidrofóbico, que facilita a inserção na bicamada lipídica do carreador de lipossomo/adjuvante imune, particularmente por um grupo lipofílico ou hidrofóbico que funciona como uma âncora para o peptídeo na bicamada de lipossomo e possui uma dimensão que lava o peptídeo a ser posicionado e estabilizado intimamente próximo da superfície do lipossomo.

Em uma outra modalidade da invenção, o grupo lipofílico ou hidrofóbico é um ácido graxo, um triglicerídeo ou um fosfolipídeo, mas especialmente um ácido graxo, um triglicerídeo ou um fosfolipídeo, no qual a estrutura principal de carbonos de ácido graxo possui pelo menos 10 átomos de carbono. Particularmente, o grupo lipofílico ou hidrofóbico é um ácido graxo com uma estrutura principal de carbonos de pelo menos aproximadamente 14 átomos de carbono e até aproximadamente 24 átomos de carbono, com cada número individual de átomo de carbono caindo dentro desta faixa também sendo parte da presente invenção. Mais particularmente, o grupo lipofílico ou hidrofóbico possui uma estrutura principal de carbonos de pelo menos 14 átomos de carbono, mas especialmente 16 átomos de carbono. Exemplos de grupos hidrofóbicos incluem, mas não são limitados a, ácido

palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico, e ácido linolênico. Em uma modalidade específica da presente invenção o grupo lipofílico ou hidrofóbico é ácido palmítico.

Em ainda uma outra modalidade da invenção o grupo hidrofóbico é ácido palmítico e a preparação de lipossomo pode em adição conter um adjuvante tal como, por exemplo, lipídeo A, alume, fosfato de cálcio, interleucina 1, e/ou microcápsulas de polissacarídeos e proteínas, mas particularmente um lipídeo A desintoxicado, tal como monofosforil- ou difosforil-lipídeo A, ou alume.

Um outro objetivo da invenção é proporcionar uma composição de vacina terapêutica e um método para produzir uma tal composição usando um peptídeo antigênico imunogênico de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, para o tratamento de doenças e distúrbios que são causados ou estão associados com amilóide ou proteínas tipo-amilóide incluindo amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), particularmente para retenção, aumento ou restauração da capacidade de memória cognitiva de um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de debilitação de memória, bem como um método para o tratamento de citada amiloidose, no qual o antígeno de peptídeo β -amilóide é a antígeno de peptídeo A β palmitoilado de acordo com a invenção e como aqui antes descrito reconstituído em um lipossomo, especialmente um fragmento de peptídeo A β palmitoilado da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β palmitoilado consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-

15($\Delta 4$), 1-15($\Delta 5$), 1-15($\Delta 6$), 1-15($\Delta 8$), 1-15($\Delta 9$), 1-15($\Delta 10$); 1-15($\Delta 12$), 15($\Delta 13$), 15($\Delta 14$), particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16($\Delta 15$) palmitoilado, mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16($\Delta 14$) ou A β 1-16($\Delta 13$) palmitoilado, ainda mais particularmente um antígeno de
 5 peptídeo A β 1-14 palmitoilado, especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15 palmitoilado, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β palmitoilado consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16($\Delta 14$) como dado em SEQ ID NO: 3, modificados por resíduos de palmitoíla covalentemente ligados, particularmente entre 2 e 4
 10 resíduos de palmitoíla, mais particularmente 4 resíduos de palmitoíla, copulados em cada terminação do antígeno de peptídeo via um ou mais, mas particularmente via um ou dois resíduos de aminoácido adequados tais como lisina, ácido glutâmico ou cisteína, ou qualquer outro resíduo de aminoácido que pode ser adequadamente usado para copulação em um resíduo de
 15 palmitoíla no peptídeo antigênico.

Em uma modalidade específica da invenção, 2 ou mais das moléculas de antígeno de peptídeo A β palmitoilado modificadas por resíduos de palmitoíla covalentemente ligados em cada extremidade do peptídeo são reconstituídas em um lipossomo único.

20 A presente invenção proporciona métodos novos e composições imunogênicas novas compreendendo um peptídeo antigênico imunogênico, que, sob administração a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição amilóide-associada, particularmente de uma condição caracterizada por uma perda da capacidade
 25 de memória cognitiva tal como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), induz uma resposta imune em citado animal ou humano. O tratamento com a vacina terapêutica de acordo com a invenção leva a uma retenção ou a um aumento na capacidade de memória cognitiva mas, particularmente, a uma restauração completa da capacidade de memória cognitiva.

Outro objetivo da invenção é proporcionar uma composição de vacina terapêutica e um método para produzir uma tal composição usando um peptídeo antigênico imune, para induzir uma resposta imune em um animal, particularmente um mamífero ou um humano, bem como um método para

5 induzir uma resposta imune em um animal, particularmente um mamífero ou um humano, citado animal ou humano sofrendo de uma condição amilóide-associada caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tal como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), pela administração

10 to citado animal ou humano uma composição de vacina terapêutica compreendendo um antígeno de peptídeo A β de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β palmitoilado da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β palmitoilado consistindo de resíduos de

15 aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 15) palmitoilado, mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13)

20 palmitoilado, ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14 palmitoilado, especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15 palmitoilado, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β palmitoilado consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3, de tal modo que a capacidade de memória

25 cognitiva do animal ou humano tratado é retida ou aumentada mas, particularmente, completamente restaurada.

O peptídeo antigênico como aqui antes descrito, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de

resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 16),
 5 mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13), ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14, especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ
 10 ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3, também é parte da presente invenção.

Também é parte da invenção um antígeno de peptídeo A β palmitoilado de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, especialmente um fragmento de peptídeo A β palmitoilado da parte N-terminal
 15 do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β palmitoilado consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-
 20 15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 16) palmitoilado, mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13) palmitoilado, ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14 palmitoilado, especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15 palmitoilado, mas especialmente um
 25 fragmento de peptídeo A β palmitoilado consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3, modificados por resíduos de palmitoíla covalentemente ligados, particularmente entre 2 e 4 resíduos de palmitoíla, mais particularmente 4 resíduos de palmitoíla, copulados em cada terminação do

antígeno de peptídeo via um ou mais, mas particularmente via um ou dois
resíduos de aminoácido adequados tal como lisina, ácido glutâmico ou
cisteína, ou qualquer outro resíduo de aminoácido que pode ser
adequadamente usado para copulação em um resíduo de palmitoíla no
5 peptídeo antigênico.

Em uma modalidade específica da invenção, 2 ou mais das
moléculas de antígeno de peptídeo A β palmitoilado modificadas por resíduos
de palmitoíla covalentemente ligados em cada extremidade do peptídeo são
reconstituídas em um lipossomo único.

10 É adicionalmente compreendido pela presente invenção um
peptídeo antigênico apresentado ligado em, ou incorporado ou reconstituído
em um carreador tal como, por exemplo, uma vesícula, uma molécula ou
corpo particulado mas, particularmente, um lipossomo, como aqui antes
descrito, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β da parte N-
15 terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β
consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-
15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-
16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-
15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-
20 15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-
16(Δ 15), mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1- 16(Δ 14) ou
A β 1-16(Δ 13), ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14,
especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-5, mas especialmente um
fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como
25 dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3
apresentado ligado em, ou incorporado ou reconstituído em um carreador tal
como, por exemplo, uma vesícula, uma molécula ou corpo particulado como
aqui antes descrito.

Sem a intenção de se ligar a uma hipótese específica, é

razoável assumir que a resposta imune induzida pela composição de vacina terapêutica da invenção pode levar o animal ou humano a uma estimulação de células-T e outras células imunes reativas direcionadas contra um agente imunogênico, mas particularmente à geração de anticorpos elevadamente específicos e elevadamente efetivos possuindo a capacidade para especialmente reconhecerem e se ligarem em epitopos específicos de uma variedade de antígenos β -amilóides, cujo anticorpo, sob ligação no antígeno, medeia e/ou induz o efeito observável de retenção, aumento e, particularmente, restauração completa da capacidade de memória cognitiva no animal ou humano tratado.

A presente invenção adicionalmente proporciona uma composição de vacina, que, sob administração a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, induz a geração de um anticorpo no animal ou humano tratado que diretamente e especialmente se liga em fibras β -amilóides tais como, por exemplo, fibras compreendendo Peptídeos monoméricos $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 ou 1-43, mas especialmente em fibras compreendendo Peptídeos monoméricos $A\beta$ 1-42 e/ou é capaz de induzir solubilização de filamentos ou fibrilas amilóides poliméricas de peso molecular alto pré-formadas pela agregação de peptídeos monoméricos β -amilóides, particularmente peptídeos monoméricos β -amilóides tais como, por exemplo, peptídeos monoméricos $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 ou 1-43, mas especialmente peptídeos monoméricos $A\beta$ 1-42, por seleção e especialmente ligação em um epitopo dentro de uma região epitópica da proteína β -amilóide, particularmente uma região epitópica do polipeptídeo $A\beta$ confinada pelos resíduos de aminoácido aa_n - aa_m com n sendo um número inteiro entre 2 e 15, particularmente entre 5 e 15, mais particularmente entre 8 e 15, ainda mais particularmente entre 10 e 15 e m sendo um número inteiro entre 3 e 17, particularmente entre 6 e 17, mais particularmente entre 9 e 17, ainda mais particularmente entre 11 e 17, no qual n e m não podem ser números idênticos

e n sempre tem que ser um número menor do que m, com a diferença entre n e $m \geq 2$.

Em uma modalidade específica da invenção, o anticorpo liga-se em um epitopo dentro de uma região epitópica da proteína β -amilóide compreendendo resíduos de aminoácido 1-10, mas particularmente resíduos de aminoácido 1-9.

O citado anticorpo também se liga especialmente nos peptídeos monoméricos e oligoméricos amilóides solúveis, particularmente peptídeos monoméricos ou oligoméricos β -amilóides selecionados do grupo consistindo de peptídeos A β 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 ou 1-43, mas especialmente A β 1-2, e inibe a agregação de monômeros ou oligômeros A β em fibrilas poliméricas de massa molecular alta.

Em uma outra modalidade, a invenção proporciona um anticorpo, particularmente um anticorpo monoclonal, incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais, cujo anticorpo incorpora pelo menos uma das propriedades selecionadas do grupo consistindo de inibição de agregação, desagregação, indução de transição conformacional, reconhecimento de e ligação direta em um epitopo na região 4-16, particularmente na região 1-9, mas especialmente uma combinação de duas ou mais das citadas propriedades. Mais especialmente, um anticorpo é proporcionado, particularmente um anticorpo monoclonal, incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais, cujo anticorpo mostra uma reatividade combinada contra a região 1-16 e 29-40, mais particularmente contra a região 1-16 e 22-35 pelo fato de que ele é capaz de reconhecer e de se ligar em ambas as citadas regiões, a região 1-16 e a região 29-40 e a região 1-16 e 22-35, respectivamente, e incorpora pelo menos uma das propriedades aqui antes mencionadas, isto é inibição de agregação, desagregação, indução de transição conformacional, mas especialmente uma combinação de duas ou

mais das citadas propriedades.

Os anticorpos que são induzidos pela composição de vacina de acordo com a invenção e que podem ser obtidos de um animal imunizado ou de uma linhagem celular de hibridoma produzindo os citados anticorpos, também são parte da invenção.

Em uma modalidade específica, a invenção proporciona um anticorpo incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais particularmente um anticorpo monoclonal incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais obtível por imunização de um animal adequado com uma composição de vacina de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, particularmente uma composição de vacina compreendendo um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 15), mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14)) ou A β 1-16(Δ 13), ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14, mas especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15, cujo anticorpo é um anticorpo bifuncional e, sob co-incubação com peptídeos monoméricos β -amilóides, particularmente peptídeos monoméricos β -amilóides tais como, por exemplo, peptídeos monoméricos A β 1-38, 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 ou 1-43, mas especialmente peptídeos monoméricos A β 1-42, inibe a agregação dos monômeros A β em fibrilas poliméricas de massa molecular alta e, em adição, sob co-incubação com filamentos ou fibrilas amilóides de massa molecular alta pré-formadas formadas pela agregação de peptídeos monoméricos β -amilóides, particularmente peptídeos monoméricos β -amilóides tais como, por exemplo, peptídeos monoméricos A β 1-38, 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 ou 1-43, mas especialmente peptídeos monoméricos A β 1-42, é capaz de desagregar os filamentos ou fibrilas poliméricas pré-formadas.

Em uma modalidade específica, a invenção proporciona um anticorpo, particularmente um anticorpo bifuncional, mas especialmente um anticorpo monoclonal, particularmente um anticorpo monoclonal bifuncional,

incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais, que exhibe especificidade alta para peptídeos monoméricos A β 1-42 mas mostra essencialmente nenhuma ou apenas diminuta reatividade cruzada para peptídeos monoméricos A β 1-38, A β 1-39, A β 1-40, e/ou A β 1-41, particularmente um anticorpo, mas especialmente um anticorpo monoclonal, incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais, cujo anticorpo é até 100 vezes, particularmente 50 a 100 vezes, mais particularmente 80 a 100 vezes, mas especialmente 100 vezes mais sensível ao peptídeo amilóide A β 1-42 em comparação com A β 1-38, A β 1-39, A β 1-40, A β 1-41 e até 1.000 vezes, particularmente 500 a 1.000 vezes, mais particularmente 800 a 1.000 vezes, mas especialmente 1.000 vezes mais sensível ao peptídeo amilóide A β 1-42 em comparação com A β 1-38, e assim é capaz de inibir, in vitro e in vivo, a agregação de peptídeos monoméricos amiloidogênicos, mas especialmente de peptídeo amilóide A β 1-42.

Em outra modalidade específica da invenção um anticorpo, particularmente um anticorpo bifuncional, mas especialmente um anticorpo monoclonal, particularmente um anticorpo monoclonal bifuncional, incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais, que possui uma sensibilidade de ligação alta para peptídeo amilóide A β 1-42 e é capaz de detectar fibras A β 1-42 em uma concentração baixa de pelo menos 0,001 μ g, mas particularmente em uma faixa de concentração de entre 0,5 μ g e 0,001 μ g, mais particularmente entre 0,1 μ g e 0,001 μ g, mas especialmente em uma concentração de 0,001 μ g.

Em uma modalidade muito específica da invenção um anticorpo é proporcionado, particularmente um anticorpo monoclonal, incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais, cujo anticorpo é capaz de detectar fibras A β 1-42 em uma concentração mínima de 0,001 μ g e fibras A β 1-40 em uma concentração

mínima de 0,1 µg e fibras Aβ1-38 em uma concentração mínima de 1 µg de quantidade de fibras.

Ligação dos anticorpos de acordo com a invenção e como aqui antes descrito em peptídeos monoméricos amiloidogênicos mas, particularmente, na forma amilóide (1-42) leva a uma inibição da agregação de peptídeos monoméricos amiloidogênicos em filamentos ou fibrilas de massa molecular alta. Por meio da inibição da agregação de peptídeos monoméricos amiloidogênicos os anticorpos de acordo com a presente invenção são capazes de prevenir ou tornarem mais lenta a formação de placas amilóides, particularmente a forma amilóide (1-42), que conhecidamente se torna insolúvel por mudança da conformação e é a maior parte das placas amilóides em cérebros de animais ou humanos doentes.

Em uma modalidade específica a presente invenção refere-se a um anticorpo monoclonal incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais cujo anticorpo possui as propriedades características de um anticorpo produzido pela linhagem de célula de hibridoma EJ 7H3, depositada aos 08 de dezembro de 2005 como DSM ACC2756.

Mais particularmente, a invenção refere-se a um anticorpo monoclonal incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais produzido pela linhagem de célula de hibridoma EJ 7H3, depositada aos 08 de dezembro de 2005 como DSM ACC2756.

Também um objetivo da presente invenção é proporcionar um método para a prevenção, o tratamento ou o alívio dos efeitos de amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma

perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeldt Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular, mas particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), pela administração de um construto antigênico supramolecular de acordo com a presente invenção, mas particularmente uma composição de vacina compreendendo um tal construto antigênico supramolecular de acordo com a invenção a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, afetado por um tal distúrbio e assim em necessidade de um tal tratamento.

Em outra modalidade da presente invenção é proporcionado um método para a preparação de uma composição de vacina para induzir uma resposta imune em um organismo, em particular um animal ou humano afetado por um tal distúrbio, doença ou condição e assim em necessidade de um tal tratamento, para a prevenção, o tratamento ou o alívio dos efeitos de amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o

complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeld Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular, mas particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI).

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção é portanto proporcionado um método para a preparação de uma composição de vacina terapêutica para a prevenção, o tratamento ou o alívio dos efeitos de amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeld Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular, mas particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), compreendendo formulação de um anticorpo de acordo com a invenção em uma forma farmacêuticamente aceitável.

Em uma modalidade específica, a presente invenção faz uso de uma preparação antigênica que resulta em exposição e estabilização intensificadas de uma conformação de antígeno preferida, que enfim leva a uma resposta imune elevadamente específica e resulta na geração de anticorpos com propriedades únicas.

Em uma modalidade, a presente invenção proporciona composições imunogênicas compreendendo um construto antigênico supramolecular compreendendo antígeno de peptídeo β -amilóide de acordo com a invenção e como aqui antes descrito representativo da parte N-terminal do peptídeo β -amilóide, cujo peptídeo antigênico é modificado de tal modo que é capaz de manter e estabilizar uma conformação definida do antígeno, particularmente uma conformação que é caracterizada por uma proporção equilibrada de porções de espiral aleatória, α -helicoidal e de β -foliada. Esta conformação definida leva à indução de uma resposta imune forte e elevadamente específica sob introdução em um animal ou um humano.

Em outra modalidade da invenção a composição de vacina de acordo com a invenção pode compreender em adição a um antígeno de peptídeo A β , particularmente o antígeno de peptídeo A β da invenção como aqui antes descrito, um inibidor de ativação de complemento. A invenção assim se refere a uma composição de vacina e a um método para produzir uma tal composição para o tratamento de doenças e distúrbios que são causados ou estão associados com amilóide ou proteínas tipo-amilóide incluindo amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI) compreendendo um fragmento de peptídeo da parte N-terminal do peptídeo A β , particularmente

um fragmento de peptídeo A β consistindo de um segmento único ou repetitivo de entre 7 e 16 resíduos de aminoácido contíguos, especialmente de entre 13 e 16 resíduos de aminoácido contíguos, particularmente da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de resíduos 1-16, 1-15, 1-14, e 1-13 da parte N-terminal do peptídeo A β , mais particularmente de resíduo 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, incluindo seus fragmentos funcionalmente equivalentes, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β como antes mencionado aqui ligado em, ou incorporado ou reconstituído em um adjuvante/partícula carreador tal como, por exemplo, um lipossomo juntamente com um inibidor do sistema de complemento, particularmente um inibidor da rota de complemento selecionado do grupo consistindo de versões solúveis de proteínas regulatórias de membrana, anticorpos humanizados para proteínas de complemento, inibidores de molécula pequena atuando em vários estágios da rota de complemento e inibidores de molécula pequena atuando em vários estágios da rota de complemento.

Este segmento contínuo de 13 a 15 resíduos de aminoácido pode ser repetido no construto de acordo com a invenção entre 2 e 50 vezes, particularmente entre 2 e 30 vezes, mais particularmente entre 2 e 20 vezes, ainda mais particularmente entre 2 e 16 vezes, mas especialmente entre 2 e 10 vezes.

Em uma modalidade específica da invenção, o inibidor de ativação de complemento que é um componente da composição de vacina terapêutica como mencionado aqui antes é um composto selecionado do grupo consistindo de Receptor 1 de complemento solúvel de humano, anti-proteína C5 de complemento de humano tal como, por exemplo, um anticorpo monoclonal humanizado anti-C5 ou um fragmento de cadeia única de um anticorpo monoclonal humanizado, inibidor-N de C1-esterase Inibidor C1

Natural de humano.

Adicionalmente compreendida pela presente invenção é uma composição de vacina de acordo com a invenção como mencionado aqui antes, compreendendo em adição a um fragmento de peptídeo A β , particularmente o fragmento de peptídeo A β de acordo com a invenção, um efector alostérico de hemoglobina, que uma vez nas células vermelhas do sangue dispara um decréscimo da afinidade de hemoglobina/O₂ de tal modo que oxigênio seja liberado em uma maneira regulada subseqüentemente nos tecidos.

A invenção assim se refere a uma composição de vacina e um método para produzir uma tal composição para o tratamento de doenças e distúrbios que são causados ou estão associados com amilóide ou proteínas tipo-amilóide incluindo amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI) compreendendo um fragmento de peptídeo da parte N-terminal do peptídeo A β , particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de um segmento único ou repetitivo de entre 7 e 16 resíduos de aminoácido contíguos, especialmente de entre 13 e 16 resíduos de aminoácido contíguos, particularmente da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de resíduos 1-16, 1-15, 1-14, e 1-13 da parte N-terminal do peptídeo A β , mais particularmente de resíduo 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, incluindo seus fragmentos funcionalmente equivalentes, mas particularmente um fragmento de peptídeo A β como mencionado aqui antes que é modificado por resíduos de palmitoíla covalentemente ligados em cada

extremidade do peptídeo para resultar em entre 2 e 4, particularmente 4
resíduos de palmitoíla, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β
como antes mencionado aqui ligado em, ou incorporado ou reconstituído em
um adjuvante/partícula carreador tal como, por exemplo, um lipossomo junto
5 com um composto que dispara um decréscimo da afinidade de
hemoglobina/O₂ de tal modo que oxigênio é liberado subsequente para
os tecidos de órgão.

Este segmento contínuo de 13 a 15 resíduos de aminoácido
pode ser repetido no construto de acordo com a invenção entre 2 e 50 vezes,
10 particularmente entre 2 e 30 vezes, mais particularmente entre 2 e 20 vezes,
ainda mais particularmente entre 2 e 16 vezes, mas especialmente entre 2 e 10
vezes.

Em particular, compostos que podem ser adequadamente
usados dentro de uma composição de acordo com a invenção são aqueles
15 selecionados do grupo consistindo de uma droga antilipidêmica tal como, por
exemplo, ácido clofíbrico ou bezafibrato incluindo os derivados de
bezafibrato LR16 e L35, derivado de uréia tal como, por exemplo, ácido [2-
[4-[[[(aril-amino)-carbonil]-amino]-fenóxi]-2-metil-propiónico, um efetor
alostérico de hemoglobina.

20 O composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂ pode
ser adicionalmente um composto compreendendo um ligante aniônico para
um sítio alostérico de hemoglobina, no qual o ligante aniônico compreende
um anel de pirofosfato interno, opcionalmente juntamente com um cátion
não-tóxico tal como, por exemplo, Ca²⁺ e Na⁺.

25 Mais especialmente, a invenção refere-se a uma composição
de vacina terapêutica de acordo com a invenção como aqui antes mencionado,
compreendendo em adição ao fragmento de peptídeo A β de acordo com a
invenção derivados de hexafosfato de inositol (IHP) compreendendo um anel
de pirofosfato interno, opcionalmente juntamente com um cátion não-tóxico

tal como, por exemplo, Ca^{2+} e Na^{+} .

Em ainda outra modalidade uma composição de vacina de acordo com a invenção e como aqui antes mencionado é proporcionada compreendendo, em adição a um fragmento de peptídeo $\text{A}\beta$, particularmente o fragmento de peptídeo $\text{A}\beta$ de acordo com a invenção, uma combinação de um inibidor do sistema de ativação de complemento, particularmente um inibidor da rota de complemento selecionado do grupo consistindo de versões solúveis de proteínas regulatórias de membrana, anticorpos humanizados para proteínas de complemento, inibidores de molécula pequena atuando em vários estágios da rota de complemento e reguladores de complemento de humano expressados em animais transgênicos e um efector alostérico de hemoglobina que reduz a afinidade de hemoglobina/ O_2 de tal modo que mais oxigênio é liberado subsequente aos tecidos, em uma maneira regulada.

A invenção assim adicionalmente se refere a uma composição de vacina e a um método para produzir uma tal composição para o tratamento de doenças e distúrbios que são causados ou estão associados com amilóide ou proteínas tipo-amilóide incluindo amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI) compreendendo um fragmento de peptídeo da parte N-terminal do peptídeo $\text{A}\beta$, particularmente um fragmento de peptídeo $\text{A}\beta$ consistindo de um segmento único ou repetitivo de entre 7 e 16 resíduos de aminoácido contíguos, especialmente de entre 13 e 16 resíduos de aminoácido contíguos, particularmente da parte N-terminal do peptídeo $\text{A}\beta$, mas particularmente um fragmento de peptídeo $\text{A}\beta$ consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de resíduos 1-16, 1-15, 1-14, e

1-13 da parte N-terminal do peptídeo A β , mais particularmente de resíduo 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, incluindo seus fragmentos funcionalmente equivalentes, particularmente um fragmento de peptídeo A β como aqui antes mencionado que é modificado por resíduos de palmitoíla covalentemente ligados em cada extremidade do peptídeo para resultar em entre 2 e 4, particularmente 4 resíduos de palmitoíla, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β como antes mencionado aqui ligado em, ou incorporado ou reconstituído em um adjuvante/partícula carreador tal como, por exemplo, um lipossomo juntamente com um inibidor do sistema de complemento, particularmente um inibidor da ativação de complemento selecionado do grupo consistindo de versões solúveis de proteínas regulatórias de membrana, anticorpos humanizados para proteínas de complemento, inibidores de molécula pequena atuando em vários estágios da rota de complemento e reguladores de complemento de humano expressados em animais transgênicos e um composto, particularmente um efector alostérico de hemoglobina, que diminui a afinidade de hemoglobina/O₂ de tal modo que mais oxigênio é liberado subsequente aos tecidos, em uma maneira regulada.

Este segmento contínuo de 13 a 15 resíduos de aminoácido pode ser repetido no construto de acordo com a invenção entre 2 e 50 vezes, particularmente entre 2 e 30 vezes, mais particularmente entre 2 e 20 vezes, ainda mais particularmente entre 2 e 16 vezes, mas especialmente entre 2 e 10 vezes.

Em ainda outra modalidade, um método para o tratamento de uma condição ou doença amilóide-associada é proporcionado compreendendo a administração a um animal, particularmente a um mamífero, mas especialmente a um humano sofrendo de uma tal doença ou condição de uma composição de vacina terapêutica de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, particularmente de uma composição de vacina compreendendo um antígeno de peptídeo A β 1-15, mais particularmente um antígeno de

peptídeo A β 1-15 palmitoilado.

Em uma modalidade específica da invenção a administração de citada composição de vacina resulta principalmente na geração de anticorpos de subtipos não-inflamatórios, particularmente do subtipo não-inflamatório Th2 tais como, por exemplo, isotipos IgG1 e IgG2b.

Em uma outra modalidade específica, a administração de citada composição de vacina resulta principalmente na geração de anticorpos da subclasse IgG independente de célula-T, particularmente do isotipo IgG3.

Em ainda outra modalidade da invenção, a administração de citada composição de vacina não leva a um aumento significativo em marcadores de inflamação no cérebro, particularmente de marcadores de inflamação selecionados do grupo consistindo de IL-16, IL-6, IFN- γ e TNF α .

Em ainda outra modalidade da invenção, a administração de citada composição de vacina leva a um decréscimo significativo de A β 1-40 e A β 1-42 relacionados com placa, insolúvel no cérebro.

Em ainda outra modalidade da invenção, a administração de citada composição de vacina leva a uma redução significativa no nível de A β 1-42 solúvel no cérebro.

Em particular, a condição ou doença associada a amilóide é uma selecionada do grupo consistindo de doenças incluindo, mas não limitadas a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeldt Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início

na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular.

Mais particularmente, a condição ou doença associada com amilóide é Mal de Alzheimer.

5 Em ainda outra modalidade específica da invenção, um método para o tratamento de uma condição ou doença amilóide-associada é proporcionado de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, no qual a administração de citada composição de vacina a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição amilóide-associada
10 caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva leva a um aumento, particularmente a uma restauração completa na restauração da capacidade de memória cognitiva.

 Em ainda outra modalidade, um método para o tratamento de uma condição ou doença amilóide-associada é proporcionado compreendendo
15 a administração a um animal, particularmente a um mamífero, mas especialmente a um humano sofrendo de uma tal doença ou condição, uma composição de vacina terapêutica compreendendo um construto antigênico de acordo com a invenção e como aqui antes descrito e um inibidor do sistema de complemento, no qual a citada composição de vacina é particularmente
20 administrada de tal modo que o inibidor de complemento e o construto antigênico são administrados concomitante, intermitente ou seqüencialmente.

 Em uma modalidade específica, o inibidor de complemento é administrado antes da vacinação com o construto antigênico, particularmente dentro de uma janela de tempo iniciando até 20 horas antes da vacinação e
25 terminando imediatamente antes da vacinação.

 Em outra modalidade específica, o inibidor de complemento é administrado subsequente à vacinação com o construto antigênico dentro de uma janela de tempo iniciando imediatamente após a vacinação e terminando 1 dia após a aplicação da vacina.

Em ainda outra modalidade da invenção é proporcionado um método para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma condição ou doença amilóide-associada compreendendo usando uma composição de vacina de acordo com a invenção e como aqui antes descrito.

5 Estes e outros objetivos, características e vantagens da presente invenção se tornarão evidentes após uma revisão da seguinte descrição detalhada da modalidade descrita e das reivindicações anexadas.

Os termos “polipeptídeo”, “peptídeo”, e “proteína”, como aqui usados, são intercambiáveis e são definidos para significarem uma biomolécula composta de aminoácidos ligados por uma ligação peptídica.

O termo “peptídeos,” são cadeias de aminoácidos (tipicamente L-aminoácidos) cujos carbonos alfa estão ligados por intermédio de ligações peptídicas formadas por uma reação de condensação entre o grupo carboxila do carbono alfa de um aminoácido e o grupo amino do carbono alfa do outro aminoácido. O grupo amino terminal em uma extremidade da cadeia (i.e., a terminação amino) possui um grupo amino livre, enquanto que o aminoácido terminal na outra extremidade da cadeia (i.e., a terminação carboxila) possui um grupo carboxila livre. Como tal, o termo “terminação amino” (abreviada terminação-N) refere-se ao grupo alfa-amino livre no aminoácido na terminação amino do peptídeo, ou ao grupo alfa-amino (grupo imino quando participando em uma ligação peptídica) de um aminoácido em qualquer outra localização dentro do peptídeo. Similarmente, o termo “terminação carboxila” (abreviada terminação-C) refere-se ao grupo carboxila livre no aminoácido na terminação carboxila de um peptídeo, ou ao grupo carboxila de um aminoácido em qualquer outra localização dentro do peptídeo.

Tipicamente, os aminoácidos compondo um peptídeo são numerados na ordem, iniciando na terminação amino e aumentando na direção da terminação carboxila do peptídeo. Assim, quando um aminoácido é citado em “seguir” outro, aquele aminoácido é posicionado mais próximo da

terminação carboxila do peptídeo do que o aminoácido precedente.

O termo “resíduo” é aqui usado para se referir a um aminoácido que é incorporado em um peptídeo por uma ligação amida. Como tal, o aminoácido pode ser um aminoácido naturalmente ocorrente ou, se não limitado de outro modo, pode incluir análogos conhecidos de aminoácidos naturais que funcionam em uma maneira similar à dos aminoácidos naturalmente ocorrentes (i.e., miméticos de aminoácido). Além disso, um mimético de ligação amida inclui modificações de estrutura principal de peptídeo bem conhecidas por aquelas pessoas experientes na arte.

A frase “consistindo essencialmente de” é aqui usada para excluir quaisquer elementos que substancialmente alterariam as propriedades essenciais dos peptídeos aos quais a frase se refere. Assim, a descrição de um peptídeo “consistindo essencialmente de” exclui quaisquer substituições, adições ou deleções de aminoácido, que substancialmente alterariam a atividade biológica daquele peptídeo.

Ademais, uma pessoa experiente na arte reconhecerá que, como mencionado acima, adições, deleções ou substituições individuais que alteram, adicionam ou deletam um único aminoácido ou uma percentagem pequena de aminoácidos (tipicamente menos de 5%, mais tipicamente menos de 1%) em uma seqüência codificada são variações conservativamente modificadas onde as alterações resultam na substituição de um aminoácido por um aminoácido quimicamente similar. Tabelas de substituição conservativa proporcionando aminoácidos funcionalmente similares são bem conhecidas na arte. Os seguintes seis grupos contêm cada um os aminoácidos que são substituições conservativas de uns pelos outros:

- 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
- 2) Ácido Aspártico (D), Ácido Glutâmico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);

- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); e
- 6) Fenil-alanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W).

As frases “isolado” ou “biologicamente puro” referem-se ao material que está substancialmente ou essencialmente livre de componentes que normalmente acompanham-no como encontrados em seu estado nativo. Assim, os peptídeos aqui descritos não contêm materiais normalmente associados com seu ambiente *in situ*. Tipicamente, os peptídeos imunogênicos, isolados aqui descritos são pelo menos cerca de 80% puros, normalmente pelo menos 90%, e preferivelmente pelo menos 95% conforme medido por intensidade de banda sobre um gel corado com prata.

Homogeneidade ou pureza de proteína pode ser indicada por numerosos métodos bem conhecidos na arte, tal como eletroforese em gel de poliacrilamida de uma amostra de proteína, seguida por visualização sob coloração. Para certos propósitos resolução alta será necessária e HPLC ou meio similar para purificação será utilizado.

Quando os peptídeos imunogênicos são relativamente curtos em comprimento (i.e., menores do que cerca de 50 aminoácidos), são muitas vezes sintetizados usando técnicas de síntese química padrão de peptídeo.

Síntese em fase sólida na qual o aminoácido C-terminal da seqüência é ligado em um suporte insolúvel seguido pela adição seqüencial dos aminoácidos restantes na seqüência é um método preferido para a síntese química dos peptídeos imunogênicos aqui descritos. Técnicas para síntese em fase sólida são conhecidas por aquelas pessoas experientes na arte..

Alternativamente, os peptídeos imunogênicos aqui descritos são sintetizados usando metodologia de ácido nucleico recombinante. Geralmente, esta envolve a criação de uma seqüência de ácido nucleico que codifica o peptídeo, posicionando o ácido nucleico dentro de um cassete de expressão sob o controle de um promotor particular, expressando o peptídeo em um hospedeiro, isolando o peptídeo ou polipeptídeo expressado e, se

requerido, renaturando o peptídeo. Técnicas suficientes para guiar uma pessoa experiente através de tais procedimentos são encontradas na literatura.

5 Uma vez expressados, os peptídeos recombinantes podem ser purificados de acordo com procedimentos padrão, incluindo precipitação por sulfato de amônio, colunas de afinidade, cromatografia em coluna, eletroforese em gel e semelhante. Composições substancialmente puras de cerca de 50% a 95% de homogeneidade são mais preferidas para uso como agentes terapêuticos.

10 Uma pessoa experiente na arte reconhecerá que após a síntese química, purificação ou expressão biológica, os peptídeos imunogênicos podem possuir uma conformação substancialmente diferente das conformações nativas dos peptídeos constituintes. Neste caso, é muitas vezes necessário desnaturar e reduzir o peptídeo antiproliferativo e então fazer com
15 que o peptídeo retorne para a conformação preferida. Métodos de redução e de desnaturação de proteínas e de indução de redobramento são conhecidos por aquelas pessoas experientes na arte.

Antigenicidade da proteína purificada pode ser confirmada, por exemplo, pela demonstração de reação com soro imune, ou com anti-soros produzidos contra a própria proteína.

20 Os termos “um”, “uma”, “o”, e “a”, são aqui usados como definidos para significarem “um ou mais” e incluem o plural a não ser que o contexto seja inapropriado.

Os termos “detectar” ou “detectado” como aqui usados significam o uso de técnicas conhecidas para detecção de moléculas
25 biológicas tais como métodos imunoquímicos ou histológicos e referem-se à determinação qualitativa ou quantitativa da presença ou concentração da biomolécula sob investigação.

Por “isolado” quer-se dar o significado de uma molécula biológica livre de pelo menos alguns dos componentes com os quais ela

naturalmente ocorre.

Os termos “anticorpo” ou “anticorpos” como aqui usados são termos reconhecidos na arte e são entendidos para se referirem às moléculas ou fragmentos ativos de moléculas que se ligam em antígenos conhecidos, particularmente às moléculas de imunoglobulina e em porções imunologicamente ativas de moléculas de imunoglobulina, i.e moléculas que contêm um sítio de ligação que se liga imuno especificamente em um antígeno. A imunoglobulina de acordo com a invenção pode ser de qualquer tipo (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA e IgY) ou classe (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou subclasses de molécula de imunoglobulina.

“Anticorpos” são intencionados dentro do escopo da presente invenção para incluírem anticorpos monoclonais, policlonais, quiméricos, de cadeia única, biespecíficos, simianizados, de humano e humanizados bem como seus fragmentos ativos. Exemplos de fragmentos ativos de moléculas que se ligam em antígenos conhecidos incluem fragmentos Fab e F(ab')₂, incluindo os produtos de uma biblioteca de expressão de imunoglobulina Fab e fragmentos de ligação de epitopo de qualquer um dos anticorpos e fragmentos mencionados acima.

Estes fragmentos ativos podem ser derivados de um anticorpo da presente invenção por numerosas técnicas. Por exemplo, anticorpos monoclonais purificados podem ser clivados com uma enzima, tal como pepsina, e submetidos à filtração em gel de HPLC. A fração apropriada contendo os fragmentos Fab pode ser então colhida e concentrada por filtração em membrana e semelhante. Para descrição adicional de técnicas gerais para o isolamento de fragmentos ativos de anticorpos, veja por exemplo, Khaw, B. A. et al. J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982); Rousseaux et al. Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986.

Um “anticorpo humanizado” refere-se a um tipo de anticorpo engenhado possuindo suas CDRs derivadas de uma imunoglobulina doadora

de não-humano, as partes derivadas de imunoglobulina restantes da molécula sendo derivadas de uma (ou mais) imunoglobulina(s) de humano. Em adição, resíduos de suporte de molde podem ser alterados para preservação da afinidade de ligação. Métodos para obtenção de “anticorpos humanizados”
5 são bem conhecidos na arte. (veja, e.g., Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)).

Um “anticorpo humanizado” também pode ser obtido por uma nova abordagem de engenharia genética que permite a produção de anticorpos
10 policlonais afinidade-maturados semelhantes a de humano tais como, por exemplo, de coelhos. (<http://www.rctech.com/bioventures/therapeutic.php>).

O termo “anticorpo monoclonal” é também bem conhecido na arte e refere-se a um anticorpo que é produzido em massa em laboratório a partir de um único clone e que reconhece apenas um antígeno. Anticorpos
15 monoclonais são tipicamente preparados pela fusão de uma célula-B produtora de anticorpo, normalmente de vida curta, em uma célula de crescimento rápido, tal como uma célula de câncer (algumas vezes referida como uma célula “imortal”). A célula híbrida resultante, ou hibridoma, multiplica-se rapidamente, criando um clone que produz quantidades grandes
20 do anticorpo.

“Anticorpo funcionalmente equivalente” é entendido dentro do escopo da presente invenção para se referir a um anticorpo que substancialmente compartilha pelo menos uma propriedade funcional maior com um anticorpo acima mencionado e aqui descrito compreendendo:
25 especificidade de ligação em proteína β -amilóide, particularmente na proteína A β 1-42, e mais particularmente na região epitópica 4-16 da proteína A β 1-42, imunorreatividade *in vitro*, inibição de agregação dos monômeros de A β 1-42 nos quais fibrilas poliméricas de massa molecular alta e/ou desagregação de fibrilas poliméricas A β 1-42 pré-formadas, e/ou uma propriedade de quebra

de β -foliada e alívio dos efeitos dos distúrbios associados com amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeld Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular, quando profilática ou terapêuticamente administrado. Os anticorpos podem ser de qualquer classe tal como IgG, IgM, ou IgA, etc ou de qualquer subclasse tal como IgG1, IgG2a, etc e outras subclasses mencionadas aqui acima ou conhecidas na arte.

Ademais, os anticorpos podem ser produzidos por qualquer método, tal como exibição de fago, ou produzidos em qualquer organismo ou linhagem celular, incluindo bactérias, inseto, mamífero ou outro tipo de célula ou de linhagem celular que produz anticorpos com características desejadas, tal como anticorpos humanizados. Os anticorpos também podem ser formados pela combinação de uma porção Fab e uma região Fc de espécies diferentes.

O termo “antígeno” refere-se a uma entidade ou a um seu fragmento que pode induzir uma resposta imune em um organismo, particularmente um animal, mais particularmente um mamífero incluindo um humano. O termo inclui imunógenos e regiões responsáveis pela antigenicidade ou determinantes antigênicos.

Como aqui usado, o termo “solúvel” significa parcial ou completamente dissolvido em uma solução aquosa.

Também como aqui usado, o termo “imunogênico” refere-se às substâncias que ocasionam ou intensificam a produção de anticorpos, células-T e outras células imunes reativas direcionadas contra um agente imunogênico e contribuem para uma resposta imune em humanos ou animais.

Uma resposta imune ocorre quando um indivíduo produz anticorpos suficientes, células-T e outras células imunes reativas contra composições imunogênicas da presente invenção administradas para moderarem ou aliviarem o distúrbio a ser tratado.

O termo “hibridoma” é reconhecido na arte e é entendido por aquelas pessoas experientes na arte para se referir a uma célula produzida pela fusão de uma célula produtora de anticorpo e uma célula imortal, e.g. uma célula de mieloma múltiplo. Esta célula de híbrida é capaz de produzir um fornecimento contínuo de anticorpo. Veja a definição de “anticorpo monoclonal” acima e os Exemplos abaixo para uma descrição mais detalhada do método de fusão.

O termo “carreador” como aqui usado significa uma estrutura na qual o peptídeo antigênico ou construto supramolecular pode ser incorporado em ou pode estar associado com, deste modo apresentando ou expondo peptídeos antigênicos ou parte do peptídeo ao sistema imune de um humano ou animal. Qualquer partícula que pode ser adequadamente usada em terapia de animal ou humano tal como, por exemplo, uma vesícula, a partícula ou um corpo particulado pode ser usado como um carreador dentro do contexto da presente invenção.

O termo “carreador” adicionalmente compreende métodos de liberação nos quais composições de construto antigênico supramolecular compreendendo o peptídeo antigênico podem ser transportadas para sítios desejados por mecanismos de liberação. Um exemplo de um tal sistema de

liberação utiliza metais coloidais tal como outro coloidal.

Proteínas carreadoras que podem ser usadas nas composições de construto antigênico supramolecular da presente invenção incluem, mas não são limitadas a, proteína ligante de maltose “MBP”; albumina de soro
5 bovino “BSA”; hemocianina de lapa “KLH”; ovalbumina; flagelina; tiroglobulina; albumina de soro de qualquer espécie; gama-globulina de qualquer espécie; células singeneicas; células singeneicas possuindo antígenos; e polímeros de D- e/ou L- aminoácidos.

No construto antigênico supramolecular de acordo com a
10 presente invenção, o lipossomo pode possuir uma função dual pelo fato de que podem ser usado como um carreador compreendendo o construto supramolecular como aqui antes descrito e, ao mesmo tempo, função como um adjuvante para aumentar ou estimular a resposta imune dentro do animal ou humano alvo a ser tratado com a vacina terapêutica de acordo com a
15 invenção. Também é para ser entendido que as composições de construto antigênico supramolecular da presente invenção podem adicionalmente compreender adjuvantes adicionais incluindo, mas não limitados a, hemocianina de lapa (KLH), albumina de soro bovino (BSA) e outros adjuvantes tal como, por exemplo, lipídeo A, alume, fosfato de cálcio,
20 interleucina 1, e/ou microcápsulas de polissacarídeos e proteínas, mas particularmente um lipídeo A desintoxicado, tal como monofosforil- ou difosforil-lipídeo A, ou alume, outros conservantes, diluentes, emulsificadores, estabilizadores, e outros componentes que são conhecidos e usados em vacinas da arte anterior. Além disso, qualquer sistema adjuvante
25 conhecido na arte pode ser usado na composição da presente invenção. Tais adjuvantes incluem, mas não são limitados a, adjuvante incompleto de Freund, adjuvante completo de Freund, manana acetilada β -(1,4)-ligada polidispersada (“Acemannan”), TITERMAX® (adjuvantes de copolímero de polioxietileno-polioxipropileno da CytRx Corporation), Adjuvantes de lipídeo

modificado da Chiron Corporation, adjuvantes de derivado de saponina da Cambridge Biotech, Bordetella pertussis morta, o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas, ânions poliméricos grandes tal como sulfato de dextrano, e geles inorgânicos tais como alume, hidróxido de alumínio, ou fosfato de alumínio.

Ademais, o termo “quantidade efetiva” refere-se à quantidade de composição antigênica/imunogênica que, quando administradas a um humano ou animal, ocasiona uma resposta imune. A quantidade efetiva é prontamente determinada por uma pessoa experiente na arte seguindo procedimentos rotineiros.

O termo “construto antigênico supramolecular” refere-se a um construto antigênico de acordo com a presente invenção e como aqui antes descrito. Em particular, “construto antigênico supramolecular” refere-se a um construto antigênico compreendendo um antígeno de peptídeo A β de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, especialmente um fragmento de peptídeo A β da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 15), mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13), ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14, especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3, cujo peptídeo antigênico is apresentado ligado em, ou incorporado ou reconstituído em um carreador tal como, por exemplo, uma vesícula, uma molécula ou corpo particulado mas, particularmente, um

lipossomo. Mais particularmente, o peptídeo antigênico de acordo com a invenção é modificado por um grupo lipofílico ou hidrofóbico, que facilita a inserção na bicamada lipídica do carreador de lipossomo/adjuvante imune, particularmente por um grupo lipofílico ou hidrofóbico incluindo, mas não limitado a, um ácido graxo, um triglicerídeo ou um fosfolipídeo, mas especialmente um ácido graxo, um triglicerídeo ou um fosfolipídeo, no qual a estrutura principal de carbonos de ácido graxo possui pelo menos 10 átomos de carbono que funciona como uma âncora para o peptídeo na bicamada de lipossomo e possui uma dimensão que leva o peptídeo a ser posicionado e estabilizado em proximidade íntima da superfície de lipossomo.

Por exemplo, as composições de construto antigênico supramolecular de acordo com a invenção podem ser parenteralmente administradas, mas particularmente intraperitonealmente, intravenosamente, subcutaneamente e intramuscularmente em uma faixa de aproximadamente 1,0 µg a 10,0 mg por paciente, embora esta faixa não é intencionada para ser limitante. A quantidade real de composição requerida para ocasionar uma resposta imune variará para cada paciente individual dependendo da imunogenicidade da composição administrada e da resposta imune do indivíduo. Conseqüentemente, a quantidade específica administrada a um indivíduo será determinada por experimentação rotineira e baseada no treinamento e na experiência de uma pessoa experiente na arte.

O construtos antigênicos supramoleculares de acordo com a presente invenção pode ser usado para a preparação de uma composição de vacina para induzir uma resposta imune em um organismo, em particular um animal ou humano, para a prevenção, o tratamento ou o alívio dos efeitos de amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por

uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeld Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular, mas particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI).

Assim um objetivo da presente invenção é proporcionar um método para a prevenção, o tratamento ou o alívio dos efeitos de amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeld Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular, mas particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação

cognitiva suave (MCI), pela administração de um construto antigênico supramolecular de acordo com a presente invenção, mas particularmente uma composição de vacina compreendendo tais construtos antigênicos supramoleculares de acordo com a invenção a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, afetado por um tal distúrbio e assim em
5 necessidade de um tal tratamento.

Em outra modalidade da presente invenção é proporcionado um método para a preparação de uma composição de vacina para induzir uma resposta imune em um organismo, em particular um animal ou humano
10 afetado por um tal distúrbio, doença ou condição e assim em necessidade de um tal tratamento, para a prevenção, o tratamento ou o alívio dos efeitos de amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como
15 Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que
20 estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeld Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular, mas
25 particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI) Em ainda uma outra modalidade da presente invenção é portanto proporcionado um método para a preparação de uma composição para a prevenção, o tratamento ou o alívio dos efeitos de amiloidose, um

grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeldt Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular, mas particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), compreendendo formulação de um anticorpo de acordo com a invenção em uma forma farmacêuticamente aceitável.

Em uma modalidade específica, a presente invenção faz uso de uma preparação antigênica que resulta em exposição e estabilização intensificadas de uma conformação de antígeno preferida, que enfim leva a uma resposta imune elevadamente específica e resulta na geração de anticorpos com propriedades únicas.

Em uma modalidade, a presente invenção proporciona composições imunogênicas compreendendo um construto antigênico supramolecular compreendendo antígeno de peptídeo β -amilóide de acordo com a invenção e como aqui antes descrito representativo da parte N-terminal do peptídeo β -amilóide, cujo peptídeo antigênico é modificado de tal modo que é capaz de manter e estabilizar uma conformação definida do antígeno, particularmente uma conformação que é caracterizada por uma proporção

equilibrada de porções de espiral aleatória, α -helicoidal e de β -foliada. Esta conformação definida leva à indução de uma resposta imune forte e elevadamente específica sob introdução em um animal ou um humano.

Um modo de alcançar a formação e a estabilização da conformação desejada do peptídeo antigênico é pela apresentação do peptídeo antigênico ligado em, ou incorporado ou reconstituído, parcial ou totalmente, em um carreador tal como, por exemplo, uma vesícula, uma molécula ou corpo particulado ou qualquer outro meio que possa adequadamente servir como um carreador/adjuvante para o peptídeo antigênico. Em uma modalidade específica da invenção, o peptídeo antigênico é ligado em, ou incorporado ou reconstituído no carreador através de interações fracas, tais como, por exemplo, interação de van der Waals, hidrofóbica ou eletrostática, ou uma combinação de duas ou mais das citadas interações, de tal modo que um peptídeo seja apresentado com uma conformação específica, que é mantida e estabilizada pela restrição de citado peptídeo antigênico em sua liberdade de movimento tridimensional de modo que mudanças conformacionais sejam evitadas ou severamente restringidas.

Quando uma vesícula, uma partícula ou um corpo particulado é usado como um carreador/adjuvante tal como, por exemplo, um lipossomo, a composição do peptídeo antigênico pode ser escolhida de tal modo que sua carga efetiva total seja idêntica àquela da superfície do carreador/adjuvante na qual o peptídeo está ligado. Forças de repulsão eletrostática sendo efetivas entre a superfície carregadora/adjuvante identicamente carregada e o peptídeo antigênico, mas particularmente a superfície carregadora identicamente carregada e os resíduos de aminoácido constituindo o peptídeo antigênico e mais particularmente a superfície carregadora identicamente carregada e os resíduos de aminoácido identicamente carregados compreendidos no peptídeo antigênico, pode fazer com que o peptídeo antigênico adquira uma conformação definida, elevadamente específica e estabilizada que garante

uma atividade biológica alta. como um resultado, o peptídeo antigênico é exposto e apresentado em uma conformação que é elevadamente biologicamente ativa pelo fato de que permite que o sistema imune do organismo alvo livremente interaja com os determinantes antigênicos contidos no construto antigênico na conformação biologicamente ativa, que leva a uma resposta imune forte e conformação-específica, resultando em, por exemplo, um título de anticorpo alto no organismo alvo.

Por coordenação cuidadosa das cargas efetivas totais do peptídeo antigênico por um lado e do carreador no qual o peptídeo se torna ligado, incorporado ou reconstituído por outro lado, o peptídeo antigênico é apresentado exposto sobre, ou em íntima proximidade da, superfície carregadora em uma conformação que é induzida e estabilizada pelas forças de repulsão eletrostática sendo efetivas entre a superfície carregadora identicamente carregada e o peptídeo antigênico, mas particularmente a superfície carregadora identicamente carregada e os resíduos de aminoácido constituindo o peptídeo antigênico e mais particularmente a superfície carregadora identicamente carregada e os resíduos de aminoácido identicamente carregados compreendidos no peptídeo antigênico. Isto resulta em uma apresentação do construto antigênico de tal modo que está livremente acessível ao maquinário de defesa imune do organismo alvo e assim é capaz de induzir uma resposta imunogênica forte e elevadamente específica sob administração a um animal ou um humano. A resposta imunogênica pode ser adicionalmente aumentada pelo uso de um lipossomo como um carreador, cujo lipossomo pode funcionar como um adjuvante para aumentar ou estimular a resposta imune dentro do animal ou humano alvo a ser tratado com a vacina terapêutica de acordo com a invenção. Opcionalmente, o lipossomo pode, em adição, conter um outro adjuvante tal como, por exemplo, lipídeo A, alume, fosfato de cálcio, interleucina 1, e/ou microcápsulas de polissacarídeos e proteínas, mas particularmente a lipídeo A

desintoxicado, tal como monofosforil- ou difosforil-lipídeo A, ou alume.

Em uma modalidade específica da invenção um peptídeo antigênico de acordo com a invenção e aqui antes descrito, particularmente um peptídeo antigênico cuja carga efetiva total é negativa, é usado reconstituído em um lipossomo, particularmente um lipossomo cujos constituintes são escolhidos de tal modo que uma carga efetiva total do grupo cabeça do lipossomo é negativa. Em particular, o lipossomo é composto de constituintes selecionados do grupo consistindo de dimiristoil-fosfatidil-colina (DMPC), dimiristoil-fosfatidil-etanol-amina (DMPEA), dimiristoil-fosfatidil-glicerol (DMPG) e colesterol e, opcionalmente, adicionalmente contém monofosforil lipídeo A ou qualquer outro adjuvante que pode ser adequadamente usado dentro do escopo da presente invenção tal como, por exemplo, alume, fosfato de cálcio, interleucina 1, e/ou microcápsulas de polissacarídeos e proteínas.

Em outra modalidade específica da invenção um antígeno de peptídeo modificado de acordo com a invenção e como aqui antes descrito é proporcionado covalentemente ligado em uma molécula de tipo âncora que é capaz de inserir no carreador/adjuvante fixando deste modo o peptídeo no carreador/adjuvante e apresentando-o sobre ou intimamente próximo da superfície de uma molécula de carreador/adjuvante de tal modo que forças eletrostáticas podem se tornar efetivas como aqui antes descrito.

Quando lipossomos são usados como um carreador/adjuvante, o construto de peptídeo antigênico geralmente possui uma cauda hidrofóbica que se insere dentro da membrana de lipossomo quando é formado.

Adicionalmente, peptídeos antigênicos podem ser modificados para conterem uma cauda hidrofóbica de modo que possa ser inserida dentro do lipossomo.

Os construtos antigênicos supramoleculares da presente invenção geralmente compreendem peptídeos modificados para intensificação

do efeito antigênico no qual tais peptídeos podem ser modificados por peguilação (usando poli(etileno-glicol) ou poli(etileno-glicol) modificado), ou modificado via outros métodos tal como por ácido palmítico como aqui antes descrito, poli-aminoácidos (por exemplo poli-glicina, poli-histidina), poli-sacarídeos (por exemplo poli(ácido galacturônico), poli(ácido láctico), poliglicolídeo, quitina, quitosano), polímeros sintéticos (poliamidas, poliuretanos, poliésteres) ou co-polímeros (eg. poli(ácido metacrílico) e N-(2-hidróxi)-propil-metacrilamida) e semelhante.

Em uma modalidade específica da invenção, são proporcionados peptídeos antigênicos de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, que são modificados para conterem uma cauda hidrofóbica de modo que os citados peptídeos podem ser inseridos no lipossomo. Em particular, o peptídeo β -amilóide pode ser modificado por um grupo lipofílico ou hidrofóbico que facilita a inserção na bicamada lipídica do carreador/adjuvante. Os grupos lipofílicos ou hidrofóbicos da presente invenção podem ser ácidos graxos, triglicerídeos e fosfolipídeos, particularmente ácidos graxos, triglicerídeos e fosfolipídeos, nos quais a estrutura principal de carbonos de ácido graxo possui pelo menos 10 átomos de carbono particularmente grupos lipofílicos possuindo ácidos graxos com uma estrutura principal de carbonos de pelo menos aproximadamente 14 átomos de carbono e até aproximadamente 24 átomos de carbono, mais particularmente grupos hidrofóbicos possuindo uma estrutura principal de carbonos de pelo menos 14 átomos de carbono. Exemplos de grupos hidrofóbicos incluem, mas não são limitados a, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolênico e colesterol ou DSPE. Em uma modalidade específica da invenção o grupo hidrofóbico é ácido palmítico.

Palmitoilação, embora proporcione uma âncora para o peptídeo na bicamada de lipossomo, devido ao comprimento relativo reduzido

do grupo de ácido graxo C16:0 faz com que o peptídeo seja apresentado exposto sobre ou em proximidade íntima da superfície de lipossomo. Portanto, as células processando o antígeno terão que capturar o lipossomo inteiro com o peptídeo.

5 Em outra modalidade da invenção, PPOR EXEMPLO é usado na preparação de um construto supramolecular, no qual a terminação de PPOR EXEMPLO livre é covalentemente ligada em uma molécula de fosfatidil-etanol-amina (onde o ácido graxo pode ser: mirístico, palmítico, esteárico, oleico etc. ou combinação dos mesmos). Esta estrutura
10 supramolecular pode ser reconstituída em lipossomos consistindo de fosfolipídeos e colesterol (fosfatidil-etanol-amina, fosfatidil-glicerol, colesterol em razões molares variadas. Outros fosfolipídeos podem ser usados. Lipídeo A é usado em uma concentração de aproximadamente 40 µg/pmol de fosfolipídeos.

15 Ainda outro objetivo da presente invenção é a provisão de composições de vacina compreendendo construtos antigênicos supramoleculares compreendendo um peptídeo antigênico de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, cujo peptídeo é modificado de modo a intensificar o efeito antigênico no qual tal peptídeo, particularmente um
20 fragmento de peptídeo Aβ da parte N-terminal do peptídeo Aβ, mas particularmente um fragmento de peptídeo Aβ consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ2), 1-16(Δ4), 1-16(Δ5), 1-16(Δ6), 1-16(Δ8), 1-16(Δ9), 1-16(Δ10); 1-16(Δ12), 16(Δ13), 16(Δ14), 1-16(Δ15), 1-15(Δ2), 1-15(Δ4), 1-15(Δ5), 1-15(Δ6), 1-15(Δ8), 1-15(Δ9), 1-15(Δ10); 1-15(Δ12), 15(Δ13),
25 15(Δ14), um antígeno de peptídeo Aβ1-16(Δ16), mais particularmente um antígeno de peptídeo Aβ1-16(Δ14) ou Aβ1-16(Δ13), ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo Aβ1-14, especialmente um antígeno de peptídeo Aβ1-15, mas especialmente um fragmento de peptídeo Aβ

consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3, é modificado via peguilação (usando poli(etileno-glicol) ou poli(etileno-glicol) modificado), ou modificado via outros métodos tais como por poli-aminoácidos (e.g. poliglicina, polihistidina), poli-sacarídeos (e.g. poli(ácido galacturônico), poli(ácido láctico), poliglicolídeo, quitina, quitosano), polímeros sintéticos (poliamidas, poliuretanos, poliésteres) ou co-polímeros (poli(ácido metacrílico) e N-(2-hidróxi) propil metacrilamida) e semelhante.

Em outra modalidade da invenção, o antígeno de peptídeo β -amilóide de acordo com a invenção e como aqui antes descrito é um fragmento de peptídeo A β palmitoilado da parte N-terminal do peptídeo A β , mas particularmente um fragmento de peptídeo A β palmitoilado consistindo de resíduos de aminoácido selecionado do grupo consistindo de 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 15) palmitoilado, mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13) palmitoilado, ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14 palmitoilado, especialmente um antígeno de peptídeo A β 1-15 palmitoilado, mas especialmente um fragmento de peptídeo A β palmitoilado consistindo de resíduos de aminoácido 1-15 como dado em SEQ ID NO: 1, e 1-16(Δ 14) como dado em SEQ ID NO: 3, modificadas por resíduos de palmitoíla covalentemente ligados em cada extremidade do peptídeo para resultar em entre 2 e 4, particularmente 4 resíduos, reconstituído em um lipossomo. Este construto palmitoilado antigênico pode ser usado para o tratamento de uma amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e com o objetivo de aliviar os sintomas associados com

a doença ou para restaurar uma condição verificada em indivíduos saudáveis que não estão afetados pela doença.

Em certas modalidades, o construtos antigênicos supramoleculares da presente invenção compreendem uma seqüência de peptídeo antigênico como aqui antes descrito, covalentemente ligada em lisina peguilada - pelo menos uma em cada terminação mas particularmente 1 ou 2 em cada formulação. O comprimento da cadeia de PPOR EXEMPLO (poli(etileno-glicol)) pode variar de $n = 8$ a $n = 150.000$ ou mais, particularmente de $n = 10$ a $n = 80.000$, mais particularmente de $n = 10$ a $n = 10.000$. Em uma modalidade específica da invenção o comprimento da cadeia de PPOR EXEMPLO é não maior do que $n = 45$, particularmente entre $n = 5$ e $n = 40$, mais particularmente entre $n = 10$ e $n = 30$, e ainda mais particularmente $n = 10$.

Lipossomos que podem ser usados nas composições da presente invenção incluem aqueles conhecidos por uma pessoa experiente na arte. Qualquer um dos lipídeos padrão úteis para preparar os lipossomos pode ser usado. Lipossomos de bicamada e de multicamadas padrão podem ser usados para preparar composições da presente invenção. Embora qualquer método de preparação de lipossomos conhecido por uma pessoa experiente na arte possa ser usado, os lipossomos mais preferidos são preparados de acordo com o método de Alving et al., Infect. Immun. 60:2438-2444, 1992, aqui incorporado como referência. O lipossomo opcionalmente pode conter um adjuvante ou e imunomodulador ou ambos. Um imunomodulador preferido é lipídeo A, particularmente um lipídeo A desintoxicado tal como, por exemplo, monofosforil- ou difosforil-lipídeo A.

O lipossomo pode possuir uma função dual pelo fato de que pode ser usado como um carreador compreendendo o construto supramolecular como aqui antes descrito e, ao mesmo tempo, função como um adjuvante para aumentar ou estimular a resposta imune dentro do animal

ou humano alvo a ser tratado com a vacina terapêutica de acordo com a invenção. Opcionalmente, o lipossomo pode, em adição, conter um outro adjuvante ou e imunomodulador ou ambos tal como, por exemplo, lipídeo A, alume, fosfato de cálcio, interleucina 1, e/ou microcápsulas de polissacarídeos e proteínas, mas particularmente a lipídeo A, mais particularmente a lipídeo A desintoxicado, tal como monofosforil- ou difosforil-lipídeo A, ou alume.

Em particular, amiloidose relacionada com a idade incluindo distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeld Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular, mas particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), é tratada pela administração de um construto antigênico supramolecular de acordo com a presente invenção, mas particularmente de uma composição de vacina compreendendo tais construtos antigênicos supramoleculares de acordo com a invenção a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, afetado por um tal distúrbio e assim em necessidade de um tal tratamento mas especialmente Mal de Alzheimer, cuja manifestação sintomática é evidenciada por um esquecimento brando a até uma total perda de memória.

A composição da presente invenção compreendendo um construto antigênico supramolecular de acordo com a invenção e como aqui

antes descrito pode ser preparada na forma de uma solução líquida, ou de uma suspensão injetável, se não em uma forma sólida adequada para solubilização antes da injeção no contexto de, por exemplo, um kit para fazer uso da presente composição, como descrito abaixo.

5 A composição da presente invenção compreendendo um construto antigênico supramolecular é administrada a um humano ou animal sofrendo de uma doença amilóide-associada para induzir uma resposta imune em citado humano ou animal para aliviar os sintomas associados com a doença ou para restaurar uma condição encontrada em indivíduos saudáveis
10 que não estão afetados pela doença.

 As composições da presente invenção são administradas a um humano ou animal por qualquer uma das rotas de administração apropriadas. Em geral, a composição pode ser administrada por rotas tópica, oral, retal, nasal ou parenteral (por exemplo, intravenosa, subcutânea, ou intramuscular).
15 Em adição, a composição pode ser incorporada em matrizes de liberação prolongada tais como polímeros biodegradáveis, os polímeros sendo implantados na vizinhança de onde a liberação é desejada, por exemplo, no sítio de um tumor. O método inclui a administração de uma dose única, administração de doses repetidas em intervalos de tempo predeterminados, e
20 administração prolongada por um período de tempo predeterminado.

 Em particular, a composição de peptídeo antigênico de acordo com a invenção é administrada por injeção parenteral, particularmente por injeção intraperitoneal, intravenosa, subcutânea e intramuscular.

 A dosagem da composição dependerá da condição sendo
25 tratada, da composição particular usada, e de outros fatores clínicos tais como peso, tamanho e condição do paciente, área superficial corporal, o composto ou composição particular a ser administrado(a), outras drogas sendo concorrentemente administradas, e a rota de administração.

 A composição de vacina terapêutica de acordo com a invenção

pode ser administrada em combinação com outras substâncias biologicamente ativas e procedimentos para o tratamento de doenças. As outras substâncias biologicamente ativas podem ser parte da mesma composição já compreendendo a vacina terapêutica de acordo com a invenção, na forma de uma mistura, na qual a vacina terapêutica e a outra substância biologicamente ativa são intermisturadas em ou com o mesmo carreador e/ou solvente farmacêuticamente aceitável ou podem ser proporcionadas separadamente como parte de composições separadas, que podem ser oferecidas separadamente ou juntamente na forma de um kit de partes.

A composição de vacina terapêutica de acordo com a invenção pode ser administrada concomitantemente com a outra substância biologicamente ativa ou outras substâncias biologicamente ativas, intermitente ou seqüencialmente. Por exemplo, a composição de vacina terapêutica de acordo com a invenção pode ser administrada simultaneamente com uma primeira substância biologicamente ativa adicional ou seqüencialmente após ou antes da administração da vacina terapêutica. Se um esquema de aplicação é escolhido onde mais do que uma substância biologicamente ativa adicional é administrada juntamente com a pelo menos uma vacina terapêutica de acordo com a invenção, os compostos ou substâncias podem ser parcialmente administrados, simultaneamente, parcialmente seqüencialmente em várias combinações.

Outro objetivo da presente invenção é proporcionar misturas de uma vacina terapêutica de acordo com a invenção e, opcionalmente, uma ou mais outras substâncias biologicamente ativas, bem como métodos de uso de uma vacina terapêutica de acordo com a invenção, ou suas misturas incluindo composições compreendendo a citada vacina terapêutica ou misturas de vacinas terapêuticas para a prevenção e/ou o tratamento terapêutico e/ou o alívio dos efeitos de amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo

amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade tal como doenças incluindo, mas não limitadas a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, 5 debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeld 10 Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular.

As misturas de acordo com a invenção podem compreender, em adição a uma vacina terapêutica de acordo com a invenção, uma 15 substância biologicamente ativa tal como, por exemplo, compostos conhecidos usados na medicação de amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com amilóide ou proteína tipo-amilóide tal como a proteína A β envolvida em Mal de Alzheimer incluindo um anticorpo produzido contra um antígeno de peptídeo imunogênico, particularmente um 20 anticorpo produzido contra um antígeno imunogênico apresentado na forma de um construto antigênico supramolecular, mais particularmente um anticorpo de acordo com a presente invenção e como aqui descrito.

Em outra modalidade da invenção, o outro composto ou substância biologicamente ativa também pode ser um agente terapêutico que 25 pode ser usado no tratamento de doenças e distúrbios que são causados ou estão associados com amilóide ou proteínas tipo-amilóide incluindo amiloidose causada por amilóide β ou pode ser usado na medicação de outros distúrbios neuronais.

O outro composto ou substância biologicamente ativa pode

exercer seu efeito biológico pelo mesmo mecanismo da ou por mecanismo similar ao da vacina terapêutica de acordo com a invenção ou por um mecanismo de ação não relacionado ou por uma multiplicidade de mecanismos de ação relacionados e/ou não relacionados.

5 Geralmente, o outro composto biologicamente ativo pode incluir intensificadores de neurotransmissão, drogas psicoterapêuticas, inibidores acetilcolina-esterase, bloqueadores de canal de cálcio, aminas biogênicas, tranqüilizadores de benzodiazepina, intensificadores de síntese, armazenagem ou liberação de acetilcolina, agonistas de receptor pós-sináptico
10 de acetilcolina, inibidores de monoamina-oxidase-A ou -B, antagonistas de receptor de N-metil-D-aspartato-glutamato, drogas antiinflamatórias não-esteroidais, antioxidantes, e antagonistas de receptor serotoninérgico.

Em particular, a mistura de acordo com a invenção pode compreender pelo menos um outro composto biologicamente ativo
15 selecionado do grupo consistindo de compostos contra estresse oxidativo, compostos anti-apoptóticos, quelantes de metal, inibidores de reparo de DNA tal como pirenzepina e metabólitos, ácido 3-amino-1-propano-sulfônico (3APS), 1,3-propano-dissulfonato (1,3PDS), ativadores de secretase, inibidores de β - e γ -secretases, proteínas tau, neurotransmissor, quebradores
20 de β -foliada, moléculas antiinflamatórias, ou inibidores de colinesterase (ChEIs) tal como tacrina, rivastigmina, donepezil, e/ou galantamina e outras drogas e suplementos nutritivos, juntos com uma vacina terapêutica de acordo com a invenção e, opcionalmente, um carreador e/ou um diluente e/ou um excipiente farmacologicamente aceitável.

25 Em uma outra modalidade, as misturas de acordo com a invenção podem compreender niacina ou memantina juntas com a vacina terapêutica de acordo com a invenção e, opcionalmente, um carreador e/ou um diluente e/ou um excipiente farmacologicamente aceitável.

Em ainda outra modalidade da invenção são proporcionadas

misturas que compreendem “antipsicóticos atípicos” tais como, por exemplo clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol ou olanzapina para o tratamento de sintomas psicóticos positivos e negativos incluindo alucinações, ilusões, distúrbios de pensamento (manifestados por incoerência marcante, descarrilhamento, tangencialidade), e comportamento bizarro ou desorganizado, bem como anedonia, afeto ausente, apatia, e supressão social, junto com uma vacina terapêutica de acordo com a invenção e, opcionalmente, um carreador e/ou um diluente e/ou um excipiente farmaceuticamente aceitável.

Em uma modalidade específica da invenção, as composições e misturas de acordo com a invenção e como aqui antes descrito compreendem a vacina de acordo com a invenção e a substância biologicamente ativa, respectivamente, em uma quantidade terapêutica ou profilaticamente ativa.

Outros compostos que podem ser adequadamente usados em misturas em combinação com a vacina de acordo com a invenção são descritos, por exemplo, em WO 2004/058258 (veja especialmente páginas 16 e 17) incluindo alvos de droga terapêutica (página 36-39), ácidos alcanosulfônicos e ácido alcanol-sulfônico (páginas 39-51), inibidores de colinesterase (páginas 51-56), antagonistas de receptor de NMDA (páginas 56-58), estrogênios (páginas 58-59), drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (páginas 60-61), antioxidantes (páginas 61-62), agonistas de receptores ativados por proliferadores de peroxisoma (PPAR) (páginas 63-67), agentes abaixadores de colesterol (páginas 68-75); inibidores de amiloide (páginas 75-77), inibidores de formação de amiloide (páginas 77-78), quelantes de metal (páginas 78-79), antipsicóticos e antidepressivos (páginas 80-82), suplementos nutricionais (páginas 83-89) e compostos aumentadores da disponibilidade de substâncias biologicamente ativas no cérebro (veja páginas 89-93) e pró-drogas (páginas 93 e 94), cujo documento é aqui incorporado como referência, mas especialmente os compostos mencionados nas páginas

indicadas acima.

É longamente conhecido que vacinação de um hospedeiro animal ou humano com uma proteína de hospedeiro norma pode levar ao desenvolvimento de auto- anticorpos direcionados contra a proteína de hospedeiros resultando em distúrbios coletivamente conhecidos como distúrbios autoimunes. A β e sua proteína precursora são tais proteínas normais. Uso destas proteínas de hospedeiro em uma vacinação portanto tem o potencial de criar efeitos colaterais indesejados. Há alguma evidência na literatura de que A β pode ativar uma resposta neuro-inflamatória que pode ser parcialmente causada por uma sobre-ativação do sistema de complemento, que já está elevadamente ativado em pacientes sofrendo de Mal de Alzheimer ou outras doenças neurodegenerativas.

A β de humano em sua conformação de β -foliada é um ativador poderoso do sistema de complemento de humano. Fortemente se liga em cauda de colágeno do complemento de humano Clq. Sobre-ativação do sistema de complemento pode resultar em inversão do sistema de defesa natural do hospedeiro e levar à autodestruição de células e tecidos incluindo neurônios e seus processos. Por exemplo, o complexo de ataque de membrana (MAC) que é parte do sistema de defesa do hospedeiro e protege o hospedeiro contra bactérias e vírus invasores pela inserção de si mesmo em citadas bactérias e vírus, sob sobre-ativação ele mesmo pode se inserir nas células hospedeiras e causar autodestruição. Sobre-ativação pode adicionalmente levar à estimulação de microglia para produzirem compostos tóxicos tais como radicais livres de oxigênio e proteases nocivas.

Assim um outro objetivo da presente invenção é prevenir que efeitos colaterais potenciais tais como complicações neurológicas causadas pela vacinação em um animal ou humano sofrendo de uma doença autoimune com um autoantígeno, que tem o potencial para adicionalmente estimular um sistema de complemento já sobre-ativado. Isto pode ser conseguido dentro do

escopo da presente invenção pela administração de um antígeno de peptídeo A β , particularmente um antígeno de peptídeo A β palmitoilado, mais particularmente o antígeno de peptídeo A β 1-15 palmitoilado, mas especialmente o antígeno de peptídeo de peptídeo A β 1-15 palmitoilado (ACI-
5 24, A β 1-15) em combinação com um inibidor de complemento.

Assim outra modalidade da invenção é a provisão de uma composição de vacina compreendendo em adição a um antígeno de peptídeo A β , particularmente o antígeno de peptídeo A β de acordo com a invenção e aqui antes descrito; um inibidor do sistema de complemento.

10 O inibidor de complemento pode ser um composto selecionado do grupo consistindo de Receptor 1 de complemento solúvel de humano, anti-anti-proteína C5 de complemento de humano tal como, por exemplo, um anticorpo monoclonal anti-C5 humanizado ou um fragmento de cadeia única de um anticorpo monoclonal humanizado, inibidor-N de C1-esterase e
15 Inibidor de C11 de Humano Natural.

Ênfase recente sobre co/morbidez de A β e doença cerebrovascular, a ligação entre A β e aterosclerose, debilitação cognitiva associada com angiopatia de amilóide, patologia microvascular cerebral significativa, e depuração deficiente de A β através da Barreira
20 Hematoencefálica em Mal de Alzheimer, tudo indica que o distúrbio vascular é uma característica importante de neurodegeneração crônica em Mal de Alzheimer. (Zlokovic, B.: (2005) Trends in Neurosciences 28, 202-208). Portanto, disfunção neurovascular poderia ter um papel maior na patogênese de Mal de Alzheimer.

25 Há uma evidência ampla de uma forte associação entre o declínio cognitivo em Mal de Alzheimer e distúrbio cerebrovascular (Torre, de la, J. C.: (2004) Neurol. Res. 26, 517-524, Gorelick, P. B.: (2004) Stroke 35, 2620-2622). Densidade microvascular reduzida, números aumentados de vasos fragmentados, mudança marcante de diâmetros de vaso, etc. têm sido

descritos em Mal de Alzheimer (Bailey, T. L. et al: (2004) Neurol. Res. 26, 573-578 Farkas, E., e Luiten, P. G.: (2001) Prof. Neurobiol. 64, 575-611).

Vários estudos, incluindo o estudo de Rotterdam baseado em população grande (Greenberg, S. M et al: (2004) Stroke 35, 2616-2619) têm
5 mostrado que fatores de risco vascular podem ser responsáveis pelo declínio cognitivo em idosos - levando à denominada “demência vascular”. Vários fatores de risco para Mal de Alzheimer e demência vascular se sobrepõem, incluindo ataques de isquemia transiente, aterosclerose, doença cardíaca, viscosidade sérica alta, etc.

10 Demência vascular ocorre como um resultado de dano no tecido cerebral após privação de oxigênio causada por vasos sanguíneos estreitados ou bloqueados no cérebro e é a segunda forma mais freqüente de demência. Pacientes freqüentemente sofrem de ambos Mal de Alzheimer e demência vascular. É estimado que 1,7 milhões de pessoas na EU e 55.000
15 pessoas nos USA sofrem de demência vascular.

Uma terapia restauradora de pressão de O₂ normal no cérebro, a despeito da debilitação de fluxo sanguíneo possui o potencial de significativamente influenciar a evolução de Mal de Alzheimer e de dramaticamente reduzir a demência vascular.

20 Assim ainda outra modalidade da invenção é a provisão de uma composição de vacina que compreende em adição a um antígeno de peptídeo A β , particularmente o antígeno de peptídeo A β de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, um composto que dispara um decréscimo da afinidade de hemoglobina/O₂ de tal modo que oxigênio é
25 liberado subseqüentemente para os tecidos de órgão.

Em particular, o composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂ pode ser um composto selecionado do grupo consistindo de uma droga antilipídêmica tal como, por exemplo, ácido clofíbrico ou bezafibrato incluindo os derivados de bezafibrato LR16 e L35, derivado de

uréia tal como, por exemplo, ácido [2-[4-[(aril-amino)-carbonil]-amino]-fenóxi]-2-metil-propiónico, um efetor alostérico de hemoglobina tal como, por exemplo, 2,3-difosfo-glicerato (DPG), hexaquisfosfato de inositol (IHP), e fosfato de piridoxal.

5 Mais particularmente, o composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂ pode ser um composto compreendendo um ligante aniônico para um sítio alostérico de hemoglobina, na qual o ligante aniônico compreende um anel de pirofosfato interno, opcionalmente juntamente com um cátion não-tóxico.

10 Ainda mais particularmente, o composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂ é um derivado de hexafosfato de inositol (IHP) compreendendo pelo menos um anel de pirofosfato interno, opcionalmente juntamente com um cátion não-tóxico.

Com o objetivo de capturar os efeitos benéficos oferecidos por
15 um inibidor de complemento e um composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂ para aliviar os efeitos potencialmente nocivos de um sistema de complemento sobre-ativado e de distúrbios cerebrovasculares, respectivamente, a presente invenção proporciona uma composição de vacina na qual um antígeno de peptídeo A β , particularmente o antígeno de peptídeo
20 A β de acordo com a invenção e aqui antes descrito, é compreendido em combinação com um inibidor do sistema de complemento e um composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂, particularmente um efetor alostérico de hemoglobina.

A composição de vacina de acordo com a invenção
25 compreendendo um antígeno de peptídeo A β , particularmente o antígeno de peptídeo A β de acordo com a invenção e aqui antes descrito, pode ser administrada concomitantemente, intermitentemente ou seqüencialmente com um inibidor de complemento e/ou um composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂ para aliviar os efeitos potencialmente nocivos de um sistema

de complemento sobre-ativado e de distúrbios cerebrovasculares, respectivamente. Por exemplo, a composição de vacina de acordo com a invenção pode ser administrada simultaneamente com um inibidor de complemento ou seqüencialmente após ou antes a administração da vacina. Se
5 um esquema de aplicação é escolhido no qual um inibidor de complemento e um composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂, particularmente um efetor alostérico de hemoglobina, são administrados juntos com a pelo menos um vacina de acordo com a invenção, os compostos ou substâncias podem ser parcialmente administrados simultaneamente, parcialmente
10 seqüencialmente em várias combinações.

Outro objetivo da presente invenção é a provisão de misturas de uma vacina de acordo com a invenção e um inibidor de complemento e/ou um composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂, particularmente um efetor alostérico de hemoglobina, bem como de métodos de uso de uma
15 vacina de acordo com a invenção, ou suas misturas incluindo composições compreendendo citada vacina ou misturas de uma vacina de acordo com a invenção e um inibidor de complemento e/ou um composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂, particularmente um efetor alostérico de hemoglobina, para a prevenção e/ou o tratamento terapêutico e/ou o alívio dos
20 efeitos de amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade tal como doenças incluindo, mas não limitadas a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (Mal de Alzheimer), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral
25 hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeld Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início

na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular.

O peptídeo amilóide 1-15 modificado pode ser sintetizado seguindo o método relatado em Nicolau et. al. (2002) Proc Natl. Acad. Sci USA 99, 2332-2337. A abordagem relatada em Nicolau et al envolve a modificação do peptídeo antigênico por um enxerto sobre resina de um grupo lipofílico ou hidrofóbico, em resíduos de aminoácido terminais de um peptídeo pré-formado. Em particular, um aminoácido protegido, particularmente um aminoácido Fmoc-protégido, é ligado em uma resina usando química de copulação conhecida. O grupo protetor é removido e um segundo resíduo de aminoácido protegido é copulado. Síntese de peptídeo automática padrão usando química de proteção conhecida, particularmente química de Fmoc/tBu, e grupos protetores de cadeia lateral padrão são então usados pra sintetizar o peptídeo antigênico A β , particularmente o peptídeo antigênico A β 1-15 por copulação em aminoácidos 1 a 15 de proteína amilóide A β 1-42 para produzir o fragmento de peptídeo com uma seqüência dada em SEQ ID NO:1. Em uma etapa final dois outros aminoácidos protegidos são copulados no fragmento de peptídeo em crescimento. Os grupos Mtt podem ser então seletivamente clivados e copulados em ácido palmítico. Após lavagem da resina, o grupo protetor é removido e a resina é simultaneamente clivada, seguido por desproteções de cadeia lateral usando metodologia padrão. O produto final pode ser então obtido em pureza alta e sua identidade é confirmada por métodos conhecidos na arte tal como, por exemplo, espectrometria de massa com ionização por pulverização de elétrons.

O grupo lipofílico ou hidrofóbico de acordo com a presente invenção pode ser um ácido graxo, um triglicerídeo ou um fosfolipídeo no qual a estrutura principal de carbonos de ácido graxo possui pelo menos 10 átomos de carbono. Particularmente, o grupo lipofílico ou hidrofóbico é um ácido graxo com uma estrutura principal de carbonos de pelo menos

aproximadamente 14 átomos de carbono e até aproximadamente 24 átomos de carbono, com cada número individual de átomo de carbono caindo dentro desta faixa também sendo parte da presente invenção. Mais particularmente, o grupo lipofílico ou hidrofóbico possui uma estrutura principal de carbonos de pelo menos 14 átomos de carbono, mas especialmente 16 átomos de carbono. Exemplos de grupos hidrofóbicos incluem, mas não são limitados a, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico, e ácido linolênico. Em uma modalidade específica da presente invenção o grupo lipofílico ou hidrofóbico is ácido palmítico.

Antígenos lipossomais de acordo com a invenção podem ser então preparados como descrito em Nicolau et al., 2002. O peptídeo antigênico amilóide A β modificado, particularmente o peptídeo antigênico A β 1-15 modificado pode ser reconstituído em um construto consistindo de lipossomos, particularmente lipossomos feitos de dimiristoil-fosfatidil-colina (DMPC), dimiristoil-fosfatidil-etanol-amina (DMPEA), dimiristoil-fosfatidil-glicerol (DMPG) e colesterol, opcionalmente contendo monofosforil-lipídeo A.

Em uma modalidade específica da invenção lipossomos com lipídeo A são usados como adjuvante para preparar a vacina anti-amilóide. Dimiristoil-fosfatidil-colina, -glicerol e colesterol são misturados, particularmente em uma razão molar de 0,9:1,0:0,7. Um imunomodulador forte tal como, por exemplo, monofosforil-lipídeo A é então adicionado em uma concentração adequada, particularmente em uma concentração de entre 30 e 50 mg por mmol, mais particularmente a 40 mg por mmol de fosfolipídeos. O peptídeo antigênico A β modificado é então adicionado em uma razão molar de peptídeo para fosfolipídeos de entre 1:30 e 1:200, particularmente em uma razão molar de entre 1:50 e 1:120, mais particularmente of 1:100. Solventes são removidos, por exemplo por evaporação, e o filme resultante é hidratado com solução tampão estéril tal

como, por exemplo PBS.

Lipossomos também podem ser preparados pela técnica de injeção de fluxo cruzado como descrita, por exemplo, em Wagner et al (2002) Journal of Liposome Research Vol 12(3), pp 259-270. Durante a injeção de
5 soluções de lipídeo em um sistema tampão aquoso, lipídeos tendem a formar “precipitados”, seguido por auto-arranjo em vesículas. O tamanho da vesícula obtida depende de fatores tais como a concentração de lipídeo, a velocidade de agitação, a velocidade de injeção, e a escolha de lipídeos. O sistema de preparação pode consistir de um módulo de injeção de fluxo cruzado, vasos
10 para a fase polar (e.g. uma solução tampão PBS), um vaso de solução de etanol/lipídeo e um dispositivo de pressão, mas particularmente um dispositivo de pressão de nitrogênio. Embora a solução aquosa ou polar seja bombeada através do módulo de injeção de fluxo cruzado a solução de etanol/lipídeo é injetada na fase polar com pressões variadas aplicadas.

15 Para determinar a imunogenicidade do construto antigênico A β modificado um animal adequado selecionado do grupo consistindo de camundongos, ratos, coelhos, porcos, aves, etc., mas particularmente camundongos, especialmente camundongos C57BL/6 são imunizados com o peptídeo antigênico. Imunogenicidade do construto antigênico é determinada
20 por sondagem de amostras de soro em intervalos de tempo adequados após imunização usando um imunoensaio tal como, por exemplo, um ensaio ELISA:

O construto antigênico modificado, particularmente o construto antigênico palmitoilado e, mais particularmente o construto de A β 1-
25 15 palmitoilado é usado para a imunização de um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de sintomas associados com amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa de amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios neuronais tais como Mal de

Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeldt Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular, mas particularmente uma doença ou condição caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI) ou qualquer outra doença amilóide-associada.

O construto antigênico supramolecular de acordo com a presente invenção, mas particularmente uma composição de vacina compreendendo um tal construto antigênico supramolecular de acordo com a invenção é administrado a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, por quaisquer rotas de administração padrão. Em geral, a composição pode ser administrada por rotas de administração tópica, oral, retal, nasal ou parenteral (por exemplo, intravenosa, subcutânea, ou intramuscular). Em adição, a composição pode ser incorporada em matrizes de liberação prolongada tais como polímeros biodegradáveis, os polímeros sendo implantados na vizinhança onde a liberação é desejada, por exemplo, no sítio de um tumor. O método de administração de uma dose única, administração de doses repetidas em intervalos de tempo predeterminados, e administração prolongada por um período de tempo predeterminado.

Em uma modalidade específica da invenção o construto antigênico de acordo com a invenção, particularmente uma composição de vacina compreendendo o citado construto antigênico em uma forma

farmaceuticamente aceitável, é administrado em doses repetidas, em particular em 1 a 15 doses, mais particularmente em 2 a 10 doses, mais particularmente em 3 a 7 doses e ainda mais particularmente em 4 a 6 doses, em intervalos de tempo de entre 1 e 10 semanas, particularmente em intervalos de tempo de entre 1 e 6 semanas, mais particularmente em intervalos de tempo de entre 1 e 4 semanas, e ainda mais particularmente em intervalos de tempo de entre 2 e 3 semanas. A resposta imune é monitorada por retirada de amostra de soro em um tempo adequado aos o reforço, particularmente 3 a 10 dias após o reforço, mais particularmente 4 a 8 dias após o reforço e mais particularmente 5 a 6 dias após o reforço e determinação da imunogenicidade do construto antigênico usando metodologia conhecida, particularmente um dos imunoenaios comumente usados tal como, por exemplo, um ensaio de Imunização ELISA com o construto antigênico de acordo com a invenção, mas particularmente com uma composição de vacina compreendendo o construto antigênico de acordo com a invenção em uma forma farmaceuticamente aceitável leva a uma resposta imune significativa e elevadamente específica no animal ou humano tratado.

As composições de construto antigênico supramolecular da presente invenção são administradas a um humano ou animal para induzir imunidade aos agentes antigênicos tais como organismos infecciosos ou aos aspectos antigênicos de outras condições patológicas tal como agregação β -amilóide (Mal de Alzheimer) ou distúrbios hiper-proliferativos tal como câncer. O animal ou humano imunizado desenvolve anticorpos circulantes contra o organismo infeccioso, reduzindo ou inativando deste modo sua capacidade para estimular doença.

As composições da presente invenção também podem ser usadas para produzir anticorpos direcionados contra peptídeos antigênicos. Anticorpos resultantes são administrados a indivíduos para passivamente

imunizá-los contra uma variedade de doenças ou distúrbios, incluindo mas não limitados a, doenças associadas com proteína amilóide.

Assim, em uma modalidade específica da invenção, as composições de construto antigênico supramolecular da presente invenção são usadas para produzir um painel de anticorpos monoclonais ou policlonais que são específicos para vários distúrbios, incluindo por exemplo, Mal de Alzheimer. Anticorpos são preparados por métodos bem conhecidos por aquelas pessoa experientes na arte.

A composições da presente invenção são administradas a um humano ou animal por qualquer meio apropriado, preferivelmente por injeção. Por exemplo, um peptídeo antigênico modificado reconstituído em lipossomos é administrado por injeção subcutânea. Se internamente produzidos ou proporcionados de fontes externas, os anticorpos circulantes ligam-se em antígeno e reduzem ou inativam sua capacidade para estimular doença.

Em certas modalidades, os construtos antigênicos supramoleculares compreendem, um peptídeo possuindo a seqüência de aminoácidos de β -amilóide. Os peptídeos também podem compreender ou corresponder ao peptídeo amilóide beta e seus fragmentos ativos. Adicionalmente, os peptídeos úteis para a presente invenção adicionalmente compreendem A β .

É adicionalmente proporcionado um método para a produção de um anticorpo incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais de acordo com a presente invenção, particularmente um método para a produção de um anticorpo monoclonal incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais de acordo com a invenção, cujo método compreende a produção de anticorpos mas particularmente anticorpos monoclonais contra um construto antigênico supramolecular compreendendo um peptídeo

antigênico correspondendo à seqüência de aminoácidos antígeno de peptídeo A β de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, mas particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 15), mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13), ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14, mas especialmente o peptídeo β -amilóide A β 1-15, modificado com grupos hidrofóbicos tal como, por exemplo, ácido palmítico ou um grupo hidrofílico tal como, por exemplo, poli(etileno-glicol) (PEG) ou uma combinação de ambos, no qual os citados grupos hidrofóbico e hidrofílico, respectivamente, é covalentemente ligado em cada terminação de peptídeo antigênico através de pelo menos um, particularmente através de 1 ou 2 aminoácidos copulados no resíduo de aminoácido terminal em cada extremidade do peptídeo antigênico, tal como, por exemplo, lisina ou qualquer outro aminoácido ou análogo de aminoácido adequado capaz de servir como um dispositivo conector para copulação dos grupos hidrofóbico e hidrofílico no fragmento de peptídeo tal como, por exemplo, ácido glutâmico e cisteína.

O anticorpo, particularmente o anticorpo monoclonal, obtenível pelo citado método é capaz, sob administração a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de debilitação de memória, de reter ou aumentar a capacidade de memória cognitiva no animal tratado, mamífero ou humano. Um outro aspecto da invenção é a provisão de um anticorpo incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais, ou, mais particularmente, um anticorpo monoclonal incluindo qualquer seu anticorpo funcionalmente equivalente ou quaisquer suas partes funcionais, que tem sido produzido contra um construto antigênico supramolecular compreendendo um peptídeo antigênico correspondendo à seqüência de aminoácidos do antígeno de peptídeo A β de acordo com a invenção e como aqui antes descrito, mas particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-16(Δ 15), mais particularmente um antígeno de

peptídeo A β 1-16(Δ 14) ou A β 1-16(Δ 13), ainda mais particularmente um antígeno de peptídeo A β 1-14, mas especialmente o peptídeo β -amilóide A β 1-15, modificado com um grupo hidrofóbico tal como, por exemplo, ácido palmítico ou um grupo hidrofílico tal como, por exemplo, poli(etileno-glicol) (PEG) ou uma combinação de ambos, no qual os citados grupos hidrofóbico e hidrofílico, respectivamente, são covalentemente ligados em cada uma das terminações do peptídeo antigênico através de um aminoácido tal como, por exemplo, lisina ou qualquer outro aminoácido ou análogo de aminoácido adequado capaz de servir como uma molécula de ligação. Quando um PPOR EXEMPLO é usado como o grupo hidrofílico, as terminações de PPOR EXEMPLO livres são covalentemente ligadas em fosfatidil-etanol-amina ou qualquer outro composto adequado para funcionar como o elemento de âncora para embeber construto antigênico na bicamada de um lipossomo.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: Síntese de antígeno de peptídeo tetra(palmitoil-lisina)-A β 1-15

1.1 Protocolo de síntese 1:

O peptídeo amilóide 1-15 palmitoilado foi sintetizado seguindo um método previamente relatado melhorado (Nicolau et. al. 2002). Esta nova abordagem envolveu o enxerto sobre resina de ácido palmítico nos resíduos de Lys terminais do peptídeo pré-formado em vez de uma síntese em fase sólida em etapas incorporando o aminoácido modificado Fmoc-Lys(Pal)-OH. Esta abordagem nova melhora a eficiência de copulação e dá um produto de pureza consideravelmente mais alta. Assim, o aminoácido ortogonalmente protegido Fmoc-Lys(Mtt)-OH foi ligado em uma resina Wang usando química de copulação de HBTU. O grupo Fmoc foi removido usando piperidina 20% em DMF e um segundo resíduo de Fmoc-Lys(Mtt)-OH foi copulado. Síntese de peptídeo automática padrão usando química de Fmoc/tBu e grupos protetores de cadeia lateral padrão foi então usada para

copular nos seguintes 15 aminoácidos. Finalmente, os últimos dois aminoácidos copulados foram Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Os grupos Mtt foram então seletivamente clivados usando TFA 1% em diclorometano e então copulados em ácido palmítico usando HBTU. Após a lavagem da resina, o grupo Fmoc foi removido com piperidina 20% em N,N-Dimetil-formamida (DMF) e finalmente clivagem de resina e desproteções de cadeias laterais simultâneas foram realizadas usando TFA sob condições padrão. Trituração de etil-éter frio deu o produto como um sólido branco. Espectrometria de massa com ionização por pulverização eletrônica confirmou a identidade do produto (m/z esperada: 1097,9 ($[M]3+$); verificado: 1096,8 ($[M-3H]3+$), sem outros peptídeos tri-, di- ou mono-palmitoilados detectados.

1.2 Protocolo de síntese 2:

Uma abordagem alternativa pode ser usada para a síntese de antígeno de peptídeo tetra(palmitoil-lisina)-A β 1-15 baseada em enxerto sobre resina de ácido palmítico nos resíduos de lisina terminais do peptídeo pré-formado. Assim, sobre a 2-cloro-tritil-resina foi copulado o aminoácido Fmoc-Lys(ivDde)-OH ortogonalmente protegido. Após a desproteção de Fmoc um segundo Fmoc-Lys(ivDde)-OH foi copulado seguido por 15 rodadas de síntese automática padrão de peptídeo usando a química de Fmoc/tBu e grupos protetores de cadeia lateral de aminoácido padrão. Após a copulação dos últimos dois resíduos Fmoc-Lys(ivDde)-OH, o grupo Fmoc foi removido usando piperidina 20% em DMF e a terminação-N foi protegida com um grupo Boc usando Bicarbonato de terc-butila. Os grupos protetores ivDde foram então quimiosseletivamente removidos sob tratamento com hidrazina 3% em DMF e então ácido palmítico foi copulado nestes quatro resíduos de lisina usando HBTU utilizando duas copulações de 18h cada. Após a lavagem da resina, as cadeias laterais foram desprotegidas usando TFA/TIPS sob condições padrão. Trituração do etil-éter frio deu os produtos como um sólido branco. MALDI-T confirmou a identidade do produto sem

outros peptídeos tri-, di- ou mono-palmitoilados detectados.

As vacinas de lipossomos vacinas foram preparadas usando um método como descrito em US6843942 e EP1337322.

EXEMPLO 2: Síntese de antígeno de peptídeo lipídeo-PEG

5 β -amilóide N- e C- terminal

Palmitoilação, embora proporcione uma âncora para o peptídeo na bicamada de lipossomo, devido ao comprimento reduzido relativo do grupo de ácido graxo C16:0 faz com que o peptídeo praticamente resida sobre a superfície de lipossomo. Portanto, células processando o antígeno
10 terão de capturar todo o lipossomo com o peptídeo, o que resultaria em uma resposta imune mais lenta em termos relativos.

Para intensificar a resposta imune, outro âncora/espaçador tem sido aplicado para reconstituir o peptídeo no lipossomo, e.g. poli(etileno-
glicol) (PEG). PPOR EXEMPLO foi covalentemente ligado no resíduo de
15 lisina ligado em ambas as terminações do peptídeo. Na outra extremidade da cadeia (PEG_n=70) fosfatidil-etanol-amina (PEA) foi covalentemente ligada para funcionar como o elemento ancorador na bicamada de lipossomo. Assim, o lipossomo ainda funciona como um adjuvante e o peptídeo estando suficientemente longe da bicamada pode ser processado sozinho e assim
20 aumenta sua imunogenicidade em comparação com o antígeno palmitoilado.

Metodologias para a monopeguilação de peptídeos na posição-
 α -N são conhecidas e amplamente usadas. PEGuilação sítio-específica em
resíduos de aminoácido internos, N- ou C-terminais de peptídeos de tamanho
médio também tem sido descrita seguindo as abordagens de enxerto de
25 peptídeo ou de fase sólida.

Com o objetivo de se evitarem os problemas com impedimento estérico, a reação foi realizada em fase de solução. A abordagem bem sucessiva envolveu a síntese de seqüências de peptídeo usando as proteções de cadeia lateral de aminoácido padrão Fmoc/tBu. Para aquelas seqüências de

peptídeo contendo resíduos internos de Lys ou His (1-16, 1-15), uma Lys(ivDde) ortogonalmente protegido foi adicionado em cada uma das terminações. Uma Gly adicional foi adicionada na terminação-C para facilitar a síntese. O grupo Fmoc foi removido com piperidina 20% em DMF e N-acetilado usando anidrido acético. Clivagem seletiva dos grupos ivDde foi realizada com hidrato de 3% em DMF por 1 h. A 2-cloro-tritil-resina foi favorecida sobre a resina Wang mais amplamente usada porque a primeira provou-se mais resistente à hidrazinólise. Ademais, a 2-cloro-tritil-resina é extremamente sensível a ácido e assim, diferentemente da resina Wang, permite o isolamento de peptídeos protegidos. De fato, foi necessário realizar a reação de copulação na fase de solução porque a copulação do peptídeo ligado em resina no reagente de lipídeo peguado pré-ativado DSPE-PEG-SPA não produziu qualquer produto de copulação. Assim a clivagem seletiva da resina sob condições brandas (ácido acético/trifluoro-etanol/diclorometano, 1:1:8, 1 h, rt) deu os peptídeos internamente protegidos.

Copulações em fase de solução foram realizadas bem sucessivamente com o peptídeo derivado da sequência 1-16, 1-15 em DSPE-PEG-SPA em DMSO e excesso de base. As reações foram então interrompidas pela adição de excesso de etanol-amina por 2 horas e a solução foi liofilizada.

Putificação por HPLC (coluna C4 de fase reversa semi-preparativa) deu entre 50 e 70% de pureza dos conjugados de PEG-lipídeo N- e C-terminais cujas identidades foram confirmadas por MALDI. Cada sequência mostrou variação considerável na facilidade da reação de copulação e condições foram ajustadas conseqüentemente (temperatura, número de equivalentes molares DSPE-PEG-SPA, tempo). Para a separação excesso de DSPE-PEG-SPA da purificação por HPLC do produto desejado é aplicado. Separação dos produtos mono- e di-copulados antes das desproteções de cadeia lateral finais pode ser realizada usando cromatografia de troca

catiônica. Subseqüentes desproteções de cadeia lateral de peptídeo e separação de excesso de DSPE-PEG-SPA extinto leva ao isolamento dos conjugados desejados com uma pureza aceitável.

Antígenos peguilados e palmitoilados:

A β 1-15 (ACI-24)

H₂N-Lys-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Lys-Lys-OH

A β 1-16 (ACI-01)

Ac-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Lys-Gly-OH

A β 1-16(Δ 94) (ACI-02)

Ac-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Lys-Gly-OH

A β 22-35(ACI-11)

Ac-Lys-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Val-Gly-Ser(tBu)-Asn(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Lys-Gly-OH

A β 29-40 (ACI-12)

Ac-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Lys-Gly-OH

EXEMPLO 3: Análise de estrutura e de conformação

3.1 Análise de conformação do antígeno reconstituído

Para ancorar o antígeno A β 1-15 sobre a superfície de lipossomo uma série de lisinas palmitoilada foi usada em cada extremidade do peptídeo como previamente descrito (Nicolau, C. et al, 2002).

Tem sido mostrado que o ácido graxo do ácido palmítico contém 16 átomos de carbono possui o comprimento apropriado para inserção

estável na bicamada de lipossomo. Neste construto o peptídeo está praticamente jazendo sobre a superfície do lipossomo devido ao comprimento do grupo de ácido graxo C16. Em uma tentativa para se ter o peptídeo antigênico associado com o lipossomo-lipídeo A em uma conformação diferente, outro âncora/espaçador tem sido usado para reconstituir o peptídeo A β 1-16 (ACI-01) em lipossomos, a saber poli(etileno-glicol) (PPOR EXEMPLO com 77 unidades repetitivas). A influência do espaçador entre a âncora lipossomal e o peptídeo A β sobre a conformação secundária da seqüência amilóide reconstituída em lipossomos foi medida por Dicroísmo Circular (Figura 1 a). O A β 1-16 PEGuilado parece ser estar numa conformação de proteína não estruturada ou de espiral aleatória (sinal negativo a 210nm e lentamente se aproximando do eixo zero até 260nm) enquanto que o peptídeo A β 1-15 palmitoilado contém uma proporção significativa de conformação de β -foliada (sinal positivo até 210 nm, cruzando o eixo zero então e se aproximando de novo dele até 260 nm). Portanto parece que a proximidade mais íntima do peptídeo palmitoilado da superfície lipossomal pode impor uma conformação secundária definida. Isto é potencialmente devido às interações eletrostáticas do peptídeo com a superfície de lipossomo, que aparentemente não é possível com o peptídeo PEGuilado.

3.2 Análise de estrutura de β -amilóide 1-15 palmitoilado reconstituído em lipossomos

Para analisar a influência de moléculas ligadoras diferentes sobre a conformação do peptídeo β -Amilóide 1-15 reconstituído em lipossomos foi realizada uma análise por RMN (Figuras 1b e 1c). Aqui ácido palmitoílico e poli(etileno-glicol) (PPOR EXEMPLO com n=77), respectivamente, foram usados como a molécula ligadora ou âncora no lipossomo.

Para estudos de RMN as amostras incluindo os peptídeos

amilóide 1-15 palmitoilado (ACI-24) e antígeno A β 1-16 peguilado (ACI-01) reconstituídos em lipossomos foram homogeneizados por agitação vigorosa e a concentração da solução foi aumentada por centrifugação (3.000 rpm por 3*90 minutos a 4°C) e as pelotas úmidas resultantes foram transferidas para rotores MAS. Amostras adicionais foram preparadas por suspensão das preparações de peptídeo ACI-01 e ACI-24 em uma concentração de 1 mM em tampão PBS em pH 7,2, bem como em solução 4 mM no mesmo tampão da sequência de peptídeo sem o ligador. 10% de D2O foram adicionados em cada amostra.

Espectros de ^1H HR-MAS RMN foram registrados em um espectrômetro Bruker Avance 500 operando em uma frequência de 500,13 MHz (11.4T) equipado com uma sonda de ressonância tripa de 4 mm ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^2\text{H}$) HR-MAS. Cada amostra foi introduzida em rotores de ZrO_2 de 4 mm equipados com insertos cilíndricos de 50 μL . Para todos os experimentos de RMN as amostras foram centrifugadas em uma frequência igual à largura espectral (6250 Hz) que elimina as bandas laterais de giro do espectro. Os espectros de RMN de próton unidimensional foram adquiridos com ambas pré-saturação e sequência de Watergate (Piotto, M. et al (1992); Piotto, M., et al (2005)) e pelo acúmulo de 1.000-1.500 varreduras. A temperatura do ar de suporte fluindo para dentro da sonda foi ajustada em 295K para garantir 298K na amostra.

Figuras 1 b e 1 c demonstram as diferenças em espectros de RMN unidimensional de peptídeo β -amilóide palmitoilado e peguilado. Duas diferenças significativas em 8,00 e 8,25 ppm puderam ser observadas. Devido ao fato de que ambos os peptídeos possuem exatamente a mesma sequência de aminoácidos, exceto a 16^a lisina, estas diferenças em 8,00 e 8,25ppm indicam diferenças em estrutura secundária porque a Lisina não deve dar um sinal positivo nesta área de espectro de resíduos de aminoácido aromático.

Pôde ser demonstrado pelos espectros de RMN de próton

unidimensional na área de resíduos de aminoácido aromático que o projeto específico de construto supramolecular de acordo com a presente invenção resulta em um peptídeo amilóide antigênico com uma estrutura secundária significativa, elevadamente específica e única quando reconstituída em lipossomos, que difere de moléculas ligadoras diferentes. Isto poderia significar que o ligador/âncora força e fixa o peptídeo em uma estrutura secundária certa ou definida que é dependente da molécula ligadora usada. No caso de uso destas moléculas como uma vacina para ativar imunização é provável que os anticorpos produzidos contra estes antígenos estruturalmente diferentes sejam específicos para antígeno e para conformação.

Os dados prévios obtidos por ELISA e ORT (tarefa de reconhecimento de objeto um teste de memória cognitiva) após imunização de camundongos APP x PS-1 com antígenos A β 1-15 palmitoilado e A β 1-16 peguilado (veja Exemplo abaixo) mostram que o antígeno palmitoilado restaura a debilitação de memória neste modelo de Mal de Alzheimer embora ambos demonstrassem imunogenicidade. O mecanismo potencial pelo qual os dois antígenos apresentando o mesmo peptídeo causam dois anticorpos funcionais diferentes *in vivo*, está mais provavelmente ligado à estrutura secundária diferente do peptídeo apresentado causado pela tecnologia de ligador.

EXEMPLO 4: Quantificação de peptídeo reconstituído externa e internamente orientado

A quantidade de peptídeo reconstituído em ACI-01 e ACI-24 foi estabelecida por um ensaio baseado em fluorescamina (FLA) que reage especialmente com aminas primárias para formar adutos covalente elevadamente fluorescentes (Udenfriend, S. et al, 1972). Reação de FLA com a terminação-N do peptídeo Pal1-15 em ACI-24 e com Lys-16 em ACI-01 é antecipada.

Com o objetivo de separar os peptídeos livres daqueles nos

lipossomos, amostras foram submetidas à ultracentrifugação e os sobrenadantes resultantes foram analisados para conteúdo de peptídeo usando o ensaio de FLA. Peptídeos livres não foram detectáveis em nos sobrenadantes quer ACI-01 quer ACI-24.

Marcação das frações pelotizadas com FLA mostrou seletividade muito alta para reação com o peptídeo nos lipossomos tanto para ACI-24 quanto para ACI-01. Com o objetivo de determinar o peptídeo total presente sobre as superfícies de lipossomo, os ensaios foram repetidos na presença de Triton X-100 (2% em PBS) para separar as bicamadas lipídicas. Isto resultou em um aumento significativo na marcação; revelando que aproximadamente 63 % de peptídeo está exposto sobre a superfície da membrana. Por outro lado, marcação de ACI-01 com FLA apenas alcança um platô em FLA 1,2 mM no qual a concentração da emissão é idêntica quando o ensaio é realizado quer na ausência quer na presença de Triton X-100. Isto demonstra que todo o peptídeo está exposto sobre a superfície da vacina PEGuilada ACI-01.

EXEMPLO 5: Comparação de imunogenicidade de antígenos peguilados e palmitoilados em camundongos C57BL/6 de tipo selvagem (ELISA)

Antígenos lipossomais foram preparados como descrito (Nicolau et al., 2002). Os antígenos peguilados A β 1-16(014), A β 4-11 e palmitoilado A β 1-15 foram reconstituídos em um construto consistindo de lipossomos feitos de dimiristoil-fosfatidil-colina (DMPC), dimiristoil-fosfatidil-etanol-amina (DMPEA), dimiristoil-fosfatidil-glicerol (DMPG) e colesterol (razões molares de 0,9: 0,1: 0,1: 0,7) contendo monofosforil-lipídeo A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a 40mg/mM de fosfolipídeos.

Os antígenos peguilados A β 1-16(014), A β 4-11 e palmitoilado A β 1-15 (ACI-24) foram usados para a imunização em camundongos C57BL/6 em intervalos de 2 semanas. 10-12 Animais foram imunizados com

cada antígeno. Soros foram retirados 5 dias após os reforços e ELISA foram conduzidos com várias diluições dos soros. Resultados comparativos mostrando a imunogenicidade de antígenos diferentes são apresentados.

Os dados de ELISA mostraram que PEG-A β 1-16(Δ 14) lipossomal é significativamente mais imunogênico do que A β 1-15 palmitoilado. ALUME adicional não aumentou a imunogenicidade de PEG-A β 1-16(Δ 14) nos camundongos. A resposta a anticorpo induzida por PEG-A β 4-11 foi mais lenta em comparação com PEG-A β 1-16(Δ 14).

Devido à questão de tradução da resposta imune mais rápida em uma capacidade de memória maior o antígeno peguilado foi comparado com o antígeno palmitoilado em modelo de Mal de Alzheimer em camundongos transgênicos duplos.

Um modelo alternativo pode ser usado como descrito em US6843942 e EP1337322.

EXEMPLO 6: Comparação de imunogenicidade de antígenos peguilados versus palmitoilados em modelo de mal de Alzheimer em camundongos (ELISA)

6.1 Para estudos de imunização *in vivo* de camundongos APP717 C57BL/6 x PS-1 A246E FVB (APPxPS-1) foram individualmente engaiolados, duplamente cegamente randomizados, combinados por idade e genotipificados por PCR.

Camundongos fêmeas adultos (3-4 meses) foram usados de uma cepa de camundongo transgênico duplo expressando ambos Proteína Precursor Amilóide mutante de humano (APP-V717I) e presenilina-1 mutante de humano (PS1-A246E) ambas sob o controle do promotor de gene thyl de camundongo e em genótipo residual F1 (FVB x C57BI). Todos os camundongos foram genotipificados por reação em cadeia de polimerase (PCR) na idade de 3 semanas e cada camundongo foi unicamente marcado. Todos os camundongos foram genotipificados duas vezes durante a duração

de sua vida por uma segunda PCR realizada no início do estudo, e antes da randomização cega em diferentes grupos experimentais. Os camundongos tiveram livre acesso à água e à ração de camundongo padrão (Muracon-G, Trouw Nutrition, Gent, Bélgica). Os camundongos foram alojados sob um ritmo de dia-noite revertido em gaiolas metálicas padrão, de acordo com a legislação local sobre o bem estar animal. 5 d antes do início do teste de comportamento, os camundongos foram engaiolados em gaiolas de macrolon Tipo 2 e transportados para o laboratório de comportamento para se aclimatizarem e se habituarem ao ambiente do laboratório de teste.

6.2 Imunização

Lipossomos com lipídeo A foram usados como adjuvante para preparar a vacina anti-amilóide (Nicolau et al., 2002). Dimiristoil-fosfatidilcolina, -glicerol e colesterol foram misturados em uma razão molar de 0,9:1,0:0,7. Monofosforil-lipídeo A, um imunomodulador forte, foi adicionado em uma concentração de 40 mg por mmol de fosfolipídeos. Os peptídeos palmitoilados e peguilados foram adicionados em uma razão molar peptídeo para fosfolipídeos de 1:100.

Solventes foram evaporados, e o filme resultante foi hidratado com PBS estéril (pH 7,3) para uma concentração final de fosfolipídeo de 4 mmol.

Os antígenos palmitoilados (ACI-24, A β 1-15) e peguilados (ACI-01, A β 1-16) foram usados para a imunização em camundongos APPxPS-1 em intervalos de 2 (5 inoculações i.p.). Em cada grupo experimental, 10 animais foram imunizados com cada antígeno por injeção intraperitoneal (200 μ L por injeção, contendo 8 mmoles de peptídeos). Lipossomos vazios serviram como controle. Soros foram retirados em intervalos regulares (bissemanalmente) e também 5 dias após o reforço e um ELISA anti-amilóide foram conduzidos com várias diluições dos soros. Resultados comparativos mostrando a imunogenicidade dos antígenos

diferentes são apresentados.

Resposta imune significativa poderia ser alcançada tanto em camundongos APPxPS-1 imunizados com antígeno A β /lipossomo palmitoilado quanto em camundongos APPxPS-1 imunizados com antígeno A β /lipossomo peguilado cinco dias após a sexta inoculação de antígeno. Mas em contraste com a resposta imune em camundongos C57BL/6 saudáveis o antígeno peguilado não produziu um título de anticorpo maior do que o do antígeno palmitoilado no modelo de doença.

A resposta imune de IgG específica anti A β aumentou mais rapidamente com ACI-24, atingindo o pico após 5 semanas. Ambas as vacinas ocasionaram isotipos e classes de imunoglobulina significativamente diferente, com o antígeno palmitoilado ACI-24 resultando em títulos mais altos de IgG, em oposição a ACI-01 PEGuilado ocasionando mais anticorpos da classe IgM. As amostras de sangue finais de todos os animais também foram analisadas para seu isotipo IgG. (Figura 2) anticorpos IgG e IgM específicos para A β 1-42 foram identificados por ELISA. Placas foram revestidas com 10 μ g/mL de Amilóide β 1-42 durante a noite a 4°C. Após lavagem de cada cavidade com Tween 20 0,05% em PBS e bloqueio com BSA 1%, diluições seriais de soros foram adicionadas nas placas e incubadas a 37°C por 2 horas. Após lavagem, as placas foram incubadas com uma Ig anti-camundongo conjugada com fosfatase (IgG, anticorpo inteiro, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) ou anticorpos específicos para isotipo (IgM, IgG1, IgG2a e IgG3, adquiridos da Pharmingen BD, San Diego, CA, USA e Ig2b de Zymed Laboratories, San Francisco, CA) por 2 h a 37°C. Após a lavagem final, as placas foram incubadas com PNPP (para-nitro-fenil-fosfato), o substrato de fosfatase, e lidas a 405 nm usando uma leitora de placa de ELISA. Resultados são expressados por referência às diluições seriais de uma coleção titulada dos camundongos adultos imunizados ou de diluições seriais de um anticorpo comercialmente disponível (6E10,

Chemicon International, Temecula, CA, USA). Alternativamente, resultados são expressados como O.D. em uma diluição onde soros não estavam em nível de saturação (Tabela 1).

Tabela 1.

	IgG1 Contr ole	ACI- 01	ACI- 24	IgG2 a Contr ole	ACI- 01	ACI- 24	IgG2 b Contr ole	ACI- 01	ACI- 24
Médi a	0,1	0,11	1,33	0,15	0,22	0,55	0,59	1,81	2,88
SD	0,01	0,02	0,98	0,03	0,03	0,77	0,12	1,23	0,82

	IgG3 Controle	ACI- 01	ACI-24
Média	0,1	0,63	2,05
SD	0,00	0,22	0,39

ACI-24 resultou principalmente nos isotipos e IgG1 e IgG2b, ambos subtipos Th2 predominantemente não-inflamatórios, e também em IgG3, que é uma subclasse de IgG independente de célula-T. Com exceção de um animal vacinado com ACI-24, ambas as vacinas induziram apenas níveis baixos de IgG2a (Th1).

Mapeamento de epítipo dos anticorpos resultantes foi realizado por ELISA usando uma biblioteca de peptídeos compreendendo um total de 33 peptídeos biotinilados cobrindo a seqüência de aminoácidos completa de A β 1-42 enquanto que um peptídeo β completo biotinilado serviu como controle positivo. Imunização com ambas as vacinas, ACI-01 e ACI-24, resultou em anticorpos anti-A β com os mesmos epítopos definidos pelos aminoácidos 1-9 de A β (peptídeo1). Em adição, analisamos a dependência conformacional eventual pela medição da ligação específica dos anti-soros anti-A β resultantes para A β polimérico, pela adaptação do ensaio ELISA sobre fibras A β 1-42. A imunização com ACI-24 produziu títulos significativamente mais altos de anticorpos anti-A β reconhecendo fibras A β 1-42 do que anti-soros produzidos por camundongos imunizados com ACI-01

(Tabela 2). Dos resultados obtidos segue que a imunização com ACI-01 e ACI-24 produziu respostas imunes que diferiram não apenas em seu título, as subclasses e isotipos-Ig mas também em sua especificidade conformacional.

Tabela 2.

	Controle	ACI-01	ACI-24
SEM	2049,0±46,7	3426,2±221,9	7770,6±2090,1
Estatística ANOVA		p< 0,05	p< 0,01

EXEMPLO 7: Comparação de antígenos peguilados versus palmitoilados em capacidade de reconhecimento em um modelo de Mal de Alzheimer em camundongos (ORT)

7.1 Impacto sobre melhoria de capacidade de memória não-espacial dependente de hipocampo, no modelo de Mal de Alzheimer em camundongo APP x PS1

Para analisar o impacto sobre a melhoria de capacidade de memória não-espacial dependente de hipocampo, no modelo de Mal de Alzheimer em camundongo APP x PS1 no decorrer do tempo de imunização de 3 meses por vacinação ativa de anti-A β 1-16/1-15 usando os antígenos palmitoilados (ACI-24, A β 1-15) e peguilados (ACI-01, A β 1-16), um teste de reconhecimento de objeto (ORT) foi essencialmente realizado como descrito (Tang et al. 1999; Rampon et al. 2000). Análise estatística foi feita pelo uso de Teste de Comparação Múltipla de Turkey-Kramer ANOVA (Moechars,D.et al (1999) e (1996)). Este teste foi realizado usando o GraphPad InStat versão 3.06 para Windows, Software GraphPad, San Diego Califórnia USA, www.graphpad.com.

Resumidamente, um horário de imunização de três meses foi instalado de seis inoculações bissemanais com ACI-01 e ACI-24. Um grupo de camundongos recebeu lipossomos vazios como controle. Os camundongos foram habituados por 1 h em uma caixa de campo aberto Plexiglas (52 cm x 52 cm x 40 cm) com paredes verticais pretas e um piso translúcido fracamente iluminado por uma lâmpada posicionada sob a caixa. No dia seguinte os

animais foram posicionados na mesma caixa e submetidos a um teste de aquisição de 10 min. Durante este teste os camundongos foram posicionados individualmente no campo aberto na presença de objeto A (mármore ou dado), e foi medido o tempo gasto para explorar o objeto A (quando o focinho do animal foi direcionado na direção do objeto a uma distância < 1 cm). Durante um teste de retenção de 10 (segundo teste), que foi realizado 3 h mais tarde, um novo objeto (objeto B: mármore ou dado) foi posicionado junto com o objeto familiar (objeto A) no campo aberto. O tempo (t_A e t_B) que o animal demorou explorando os dois objetos foi registrado. O índice de reconhecimento (RI), definido como a razão do tempo gasto explorando o objeto novo sobre o tempo gasto explorando ambos os objetos [$(t_B/(t_A + t_B)) \times 100$] foi usado para medir a memória não-espacial. Análise estatística foi feita usando ANOVA de fator único como descrito ((Moechars et al. 1999; Moechars et al. 1996)).

Os antígenos palmitoilado (ACI-24) e peguilado (ACI-01) foram usados para a imunização em camundongos APPxPS-1 em intervalos de 2 semanas. 10 Animais de três meses de idade foram imunizados i.p. com cada antígeno (200 μ L por cada injeção i.p. e 100 μ g de peptídeo) e lipossomo vazio serviu como controle. Soros foram tirados 5 dias após o reforço e ELISA foram conduzidos com várias diluições dos soros. Resultados comparativos mostram a imunogenicidade dos antígenos diferentes.

A capacidade cognitiva de camundongos APPxPS-1 imunizados com antígenos A β , palmitoilado (ACI-24) e peguilado (ACI-01), foi avaliada em um paradigma de memória de reconhecimento visual não-espacial, pela sujeição deles a uma tarefa de reconhecimento de objeto que é conhecida dependente da atividade hipocampal ((Tang et al. 1999), (Rampon et al. 2000)). Basicamente, três horas após o treinamento para familiarizar todos os camundongos com um dado objeto, eles foram testados para retenção pela confrontação deles com um objeto novo, ao lado de e em

adição ao familiar.

A capacidade de memória cognitiva ou retenção de camundongos APP x PS-1 pôde ser significativamente aumentada por imunização com antígeno A β 1-15 palmitoilado (ACI-24) comparado com os camundongos APP x PS-1 tratados como controle ($76,1 \pm 3,9\%$ versus $49,1 \pm 4,5\%$ para controle; Tabela 3). Isto prova que os camundongos imunizados com ACI-24 reconheceram e se lembraram do objeto original por pelo menos 3 horas, deduzindo deste modo que a motivação deles e a capacidade de exploração deles estavam intactas como camundongos saudáveis combinados em idade, sexo e raça, quando comparados com camundongos de tipo selvagem saudáveis não-transgênicos e não-tratados ($61,8 \pm 5,1\%$). Embora o peptídeo ACI-01 seja apenas um aminoácido C-terminal mais longo (a 16^a Lisina) do que o peptídeo ACI-24 e apenas a tecnologia de ligador é diferente entre estas vacinas, imunização com antígeno A β 1-16 peguilado (ACI-01) não demonstra qualquer restauração de memória ($45,6 \pm 6,2\%$) comparável com ACI-24.

Tabela 3.

	Controle	ACI-01	ACI-24	Saudável
SEM	$49,1 \pm 4,5$	$45,6 \pm 6,2$	$76,1 \pm 3,9$	$61,8 \pm 5,1$
Estatística		n.s.* versus controle	$p < 0,05$ versus controle	n.s,* versus controle

n.s.*: não significativo

7.2 Contribuição potencial das classes de anticorpo diferentes IgM e IgG para a funcionalidade cognitiva

Para analisar a contribuição potencial das classes de anticorpo IgM e IgG para a funcionalidade cognitiva, uma análise de correlação foi realizada.

Anticorpos IgM não se correlacionam com a capacidade de memória ($r^2=0,2333$) mas os anticorpos da classe IgG resultantes correlacionaram-se aproximadamente ($r^2=0,857$) para o grau de capacidade de memória (índice ORT) em duas fases. Entre um Índice ORT de 0 a 20 uma relação mais linear foi observada enquanto que em um Índice ORT maior do

que 20 a correlação entra em uma fase de saturação. Isto poderia indicar que anticorpos IgM que não passam pela barreira hematoencefálica não contribuem para a restauração de memória. Em contraste, anticorpos IgG cruzam a barreira hematoencefálica dependendo de sua subclasse e são ligados para a melhoria de memória.

Para avaliar a capacidade da imunização com ACI-24 para modificar a quantidade de peptídeos β -amilóides solúveis e insolúveis no cérebro de camundongos APPxPS-1, A β 1-40 e A β 1-42 de humano foram medidos por ELISA específico na fração solúvel dos homogeneizados cerebrais. Kits de ELISA comercialmente disponíveis foram usados (Amilóide β 40 ou β 42 ELISA, The Genetics Company, Zurique, Suíça). O ELISA realizado de acordo com o protocolo do fabricante. Quantificação do conteúdo de A β das amostras foi obtida por comparação da absorbância com a curva padrão preparada com A β 1-40 ou A β 1-42 sintético (Tabela 4)

Tabela 4.

	A β Solúvel	A β 42 Solúvel	A β 40 Insolúvel	A β 42 Insolúvel
Controle	2,6 $\pm$ 0,6	3,1 $\pm$ 1,0	3,0 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,04
ACI-24	2,1 $\pm$ 0,8	2,1 $\pm$ 0,9	2,0 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,07
Estatística ANOVA	n.s.	p<0,01	p<0,05	p<0,05

n.s.* não significativo

Dados são expressados em média (A β ng/g de homogeneizado de cérebro $\pm$ SEM)

A imunização com ACI-24 levou a uma diminuição significativa de A β 1-40 e A β 1-42 relacionados com placa, insolúvel. Os níveis de A β 1-42 solúvel também foram significativamente reduzidos, enquanto que os níveis de A β 1-40 solúvel mostraram apenas uma tendência para diminuição

EXEMPLO 8: Imunização com ACI-01 e -24 não causa inflamação

A segurança de ambas as vacinas lipossomais, ACI-01 e ACI-

24, foi avaliada pela medição da produção local de citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α por ELISA específico. Os níveis de TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-1 β foram medidos em homogeneizados cerebrais totais usando ELISA de sanduíche de acordo com os manuais dos fabricantes (todos R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Resultados são expressados em $\mu\text{g/mL}$ por referência às diluições seriais das citocinas recombinantes. A extensão de células microgliais ativadas (MHCII) e astrogliose (GFAP) no cérebro na região do subiculum foi avaliada por imuno-histoquímica quantitativa.

Imunização com qualquer um de ACI-01 ou ACI-24 não aumentou significativamente os níveis de IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α no cérebro. Similarmente, não foram observadas diferenças em astrogliose sob imunização com ACI-24, enquanto que a extensão de microglia ativada mostrou uma tendência para diminuição após o período de imunização de três meses.

EXEMPLO 9: Manufatura de mAbs

Antígeno palmitoilado (ACI-24, A β 1-15) foi usado para a imunização em camundongos C57BL/6 em intervalos de 2 semanas. Animais foram imunizados com cada antígeno (vol. de injeção: 200 μL contendo 8 mmoles de peptídeo). A última injeção foi realizada 4 dias antes da morte dos animais. Após 5 reforços dos camundongos com títulos terapêuticos (quando uma diluição de 1:5.000 dos soros foi positiva em ELISA) foram selecionados para uma fusão. Células de baço foram colhidas dos animais imunizados e hibridomas foram gerados pela fusão de células de baço sensibilizadas com uma linhagem de célula de mieloma. A fusão dos linfócitos-B de camundongos dos baços foi conduzida com linhagem SP2-0 de células de mieloma (ATCC, Manassas, VA) usando os processos bem conhecidos de Kohler e Milstein (Nature 256: 495-497 (1975)) e Harlow e Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque 1988)).

As células foram induzidas para se fundirem pela adição de poli(etileno-glicol). As células híbridas resultantes são então clonadas na maneira convencional, e.g. usando diluição limitante clones de hibridoma produtos de IgG foram selecionados e testados para sua ligação específica em peptídeo A β 1-42 por ELISA e os clones resultantes, que produzem os anticorpos monoclonais desejados, foram cultivados.

Os hibridomas assim obtidos são quimicamente selecionados pela plaqueação das células em um meio de seleção contendo hipoxantina, aminopterina e timidina (HTA).

Hibridomas são subseqüentemente selecionados para a capacidade de produzir anticorpos monoclonais contra distúrbios ou doenças específicos amilóide-associados. Hibridomas produtores de anticorpos de interesse são clonados, expandidos e armazenados congelados para produção futura. O hibridoma preferido produz um anticorpo monoclonal possuindo o isotipo IgG, mais preferivelmente o isotipo IgG2.

EXEMPLO 10: Determinação de especificidade para anticorpo mACI-24-Ab4

Para analisar a especificidade do anticorpo ACI-24-Ab4, concentrações diferentes de fibrilas de amilóide 1-42, 1-40 e 1-38 pré-formadas foram aplicadas como manchas sobre Membrana de Nitrocelulose Hybond ECL (Amersham Biosciences). Após o bloqueio com leite em pó 10% e Tween 20 0,7%, as membranas foram incubadas com anticorpo primário a 20 μ g/mL por 2 h na RT. Após lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo IgG de ovelha anti-camundongo conjugado com peroxidase de rábano (Amersham Biosciences) por 1 h na RT, lavadas e incubadas com solução quimioluminescente seguida pela exposição da membrana ao filme de raios-X.

Para medir a ligação do mAb (mACI-24-Ab4) em fibras de amilóide β 1-42, fibras de A β 1-42, 1-40 e 1-38 foram pré-formadas por sete

dias a 37°C e aplicadas como manchas sobre a membrana. 20 µg/mL de anticorpo foi usado para medir a capacidade de ligação e o anticorpo ligado foi detectado por anticorpo IgG de ovelha anti-camundongo conjugado com peroxidase de rábano por exposição de 20 minutos.

Como poderia ser demonstrado por análise Dot Blot, o anticorpo mACI-24-Ab4 se liga em fibras de Aβ pré-formadas diferentes com sensibilidade diferente. O anticorpo exibe a sensibilidade de ligação mais alta em fibras Aβ1-42 do que em Aβ1-40 ou Aβ1-38. É capaz de detectar pelo menos 0,001 µg de fibras Aβ1-42 enquanto que o limite de detecção do anticorpo para fibras Aβ1-40 é de pelo menos 0,1 µg e para as fibras Aβ1-38 é de 1 µg, significando que a sensibilidade é 100 vezes a 1.000 vezes menor para estes tipos de fibras amilóides. Estes dados demonstram que o anticorpo ACI-24-Ab4 é pelo menos 100 vezes mais sensível a uma forma amilóide (1-42) que conhecidamente se torna insolúvel pela mudança da conformação secundária e sendo a maior parte das placas amilóides em cérebros de pacientes com Mal de Alzheimer.

EXEMPLO 11: Fracionamento por ultracentrifugação em gradiente de densidade

As propriedades de anticorpos monoclonais na imobilização de polimerização de fibra de Aβ1-42 e na desagregação de fibras de Aβ1-42 foram estudadas por ultracentrifugação em gradiente de densidade (Rzepecki et al., 2004) que é baseada no princípio da distribuição entre fibras de peptídeo resultantes de tamanhos diferentes após incubação com e sem os anticorpos seguido por uma análise de sedimentação em SDS-PAGE em um gradiente pré-formado (OptiPrep™). Análise simultânea de população de fibras Aβ pré-formadas, desagregação e inibição de propriedades de agregação dos anticorpos co-incubados, e a ligação dos anticorpos nas fibras são vantagens óbvias deste método.

Todos os anticorpos monoclonais produzidos contra Aβ1-75

(mACI-24-Ab4) foram analisados em ensaios de inibição e desagregação.

Para a inibição de agregação de A β 1-42, monômeros de A β 1-42 foram incubados com mAbs em duas razões molares diferentes (razão molar de monômero A β 1-42 trinta ou cem vezes mais alta do que MAb) com a concentração final de A β de 50 μ M. Após 24 horas de incubação a 37°C, amostras foram posicionadas em camada sobre um gradiente descontínuo de Optiprep™ e tubos foram centrifugados a 259.000 g por 3 horas a 4°C. 15 frações foram colhidas (140 μ L cada), fração 1 foi a fração menos densa do topo do gradiente e fração 15 foi a fração mais densa do fundo do gradiente. A pelota também foi colhida. As frações colhidas foram analisadas por SDS-PAGE com coloração de prata. A concentração de A β 1-42 para ensaios de inibição foi cinco vezes menor do que para ensaios de desagregação que diminuem a cinética de agregação de amilóide e garantem a medição dentro da fase linear.

Sem adição de mAb, o peptídeo A β foi agregado após tempo de incubação de 24 e a maior parte da proteína foi encontrada em frações 13 a pelota, (pelota, muito pouco em 12), demonstrando polimerização completa dos monômeros de peptídeo A β . Inibição significativa e bem sucessiva de agregação deve ser resultado em oligômeros ou fibras menores, que devem ser encontrados em frações com densidade menor. No ensaio de agregação mACI-24-Ab4 causou um deslocamento em bandas para a maior parte (banda mais forte) de 13 para 11 e 12 e uma solubilização significativa das bandas correndo em fração 13 para pelota. Isto significa que mACI-24-Ab4 exibe uma capacidade forte para inibir a polimerização de monômeros de peptídeo A β em fibras e revelou uma ligação específica nas fibras A β (fração 11 e 12).

Para a desagregação de fibrilas de A β 1-42 pré-formadas por co-incubação com MAbs (em duas razões molares diferentes 1:30 e 1:100, MAb + Monômero A β 1-42 com a concentração final de A β final de 246 μ M), as amostras foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após 24 horas as amostras

foram fracionadas por ultracentrifugação e separadas por SDS-PAGE como descrito acima e antes (Rzepecki et al., 2004).

Similar ao ensaio de agregação, polimerização de fibra completa pôde ser demonstrada pela distribuição de fibrilas de A β 1-42 sozinhas em frações 12 a P (pelota). Aqui deslocamentos de fibras na direção de frações de densidade menor indicaria atividade de desagregação do anticorpo, quando co-incubado com fibras pré-formadas. Adição de mACI-24-Ab4 em razão molar de 1:100 mostrou um deslocamento da maior parte das fibras amilóides de 12 para 11. Portanto mACI-24-Ab4 também indica uma atividade de desagregação forte.

EXEMPLO 12: Aplicação combinada de um antígeno palmitoilado e um inibidor de ativação de complemento em um teste de retenção de capacidade de reconhecimento em um modelo de Mal de Alzheimer em camundongo (ORT)

Com o objetivo de prevenir os efeitos colaterais potenciais tais como complicações neurológicas causadas por uma estimulação através de vacinação de um sistema de complemento já sobre-ativado, o antígeno palmitoilado (ACI-24, A β 1-15) é administrado em combinação com um inibidor de complemento selecionado do grupo consistindo de TP10 (Receptor 1 de complemento de humano solúvel), Eculizumab (anti- anti-proteína C5 de complemento de humano), Pexelizumab (anti- complemento C5), Inibidor C1 Natural Cetor® (C1-esteraseremmer-N) Inibidor C1 Natural de humano.

O inibidor de complemento é administrado antes da vacinação de um paciente humano com o antígeno palmitoilado (ACI-24, A β 1-15) e imediatamente depois.

Em um esquema de aplicação onde o inibidor de complemento é administrado antes da vacinação com o antígeno palmitoilado (ACI-24, A β 1-15), o composto inibidor é administrado em uma janela de tempo

começando até 20 horas antes da vacinação e terminando imediatamente antes da vacinação. (Esquema de Aplicação 1)

Em um esquema de aplicação onde o inibidor de complemento é administrado subsequente à vacinação com o antígeno palmitoilado (ACI-24, A β 1-15), o composto inibidor é administrado em uma janela de tempo iniciando imediatamente após a vacinação e terminando 1 dia após a aplicação da vacina. (Esquema de Aplicação 2)

12.1 TP10 (Receptor 1 de complemento de humano solúvel 1)

Em testes humanos com TP10 foi verificado que é preferível manter uma concentração de TP10 dentro de uma faixa de entre 100 μ g/mL e 160 μ g/mL por 24 horas após CPB. Com o objetivo de alcançar uma faixa de concentração é mais apropriado dar uma dose inicial de 10 mg/kg durante 0,5 hora seguida por 10 mg/kg durante 23,5 horas (Li JS, Am Heart J. 2004 Jan;147(1):173-80.)

A vacinação com antígeno palmitoilado (ACI-24, A β 1-15) é quer feita após uma concentração desejável de TP10 ter sido alcançada após o Esquema de Aplicação 1 quer, alternativamente, antes de a dose inicial de TP10 de 10 mg/kg ser aplicada de acordo com o Esquema de Aplicação 2.

12.2 Eculizumab (anti- anti-proteína C5 de complemento de humano)

Eculizumab (600 mg) é administrado por infusões a cada semana por quatro semanas, seguido por uma semana mais tarde por uma dose de 900-mg e então por outras doses de 900 mg semana sim semana não até semana 12 (Hillmen P, N Engl J Med. 2004 Feb 5;350(6):552-9.).

Para tratamento de longa duração Eculizumab pode ser administrado em uma dose de 900 mg a cada 12 a 14 dias. (Hill A, Blood. 2005 Oct 1;106(7):2559-65. Epub 2005 Jun 28.)

A vacinação com antígeno palmitoilado (ACI-24, A β 1-15) é quer feita após a primeira dose de 600 mg de Eculizumab ter sido

administrada seguindo o Esquema de Aplicação 1 quer, alternativamente, antes da dose inicial de 600 mg de Eculizumab ser dada de acordo com o Esquema de Aplicação 2.

Em alguns casos pode ser mais apropriado aplicar o Esquema de Aplicação 1 apenas após a semana 4, quando as primeiras 4 rodadas de administração de Eculizumab estão terminadas e uma concentração estável no estado de equilíbrio é alcançada no corpo humano.

12.3 Pexelizumab (anti-complemento C5)

Pexelizumab é dado intravenosamente em um bolo a 2,0 mg/kg durante 10 minutos cuja administração de bolo pode ser seguida por uma infusão de 1,0 mg/kg durante 20 horas (<http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/106/23/2986-a>) ou de 0,05 mg/kg/hora por 24 horas.

A vacinação com antígeno palmitoilado (ACI-24, A β 1-15) é quer feita após o primeiro bolo de 2,0 mg/kg de Pexelizumab ter sido administrado seguindo o Esquema de Aplicação 1 quer, alternativamente, antes de o bolo inicial de 2,0 mg/kg de Pexelizumab ser dado de acordo com o Esquema de Aplicação 2.

Em alguns casos pode ser mais apropriado aplicar o Esquema de Aplicação 1 apenas após a segunda aplicação por infusão estar completa e uma concentração estável no estado de equilíbrio é alcançada no corpo humano.

12.4 Inibidor C1 de humano natural

O inibidor C1 é administrado em doses de 6,25 a 100 U/kg (van Doom MB, Allergy Clin Immunol. 2005 Oct;116(4):876-83. Epub 2005 Aug 8.)

Alternativamente, um concentrado de inibidor de C1 esterase pasteurizado pode ser administrado em doses de entre 500 e 1000 IU (De Serres J, Transfus Apher Sci. 2003 Dec;29(3):247-54.); (Bork K, Arch Intern

Med. 2001 Mar 12;161(5):714-8.)

Inibidor C1 também pode ser dado intravenosamente em uma infusão de 1 hora, partindo com 6.000 IU, seguido por 3.000 IU, 2.000 IU, e 1.000 IU em intervalos de 12 horas (Caliezi C, Crit Care Med. 2002 Aug;30(8):1722-8.)

Finalmente, o inibidor C1 é administrado intravenosamente a cada terceiro dia como um concentrado de inibidor aquecido por vapor em uma concentração de 25 unidades de plasma per quilograma de peso corporal (Waytes AT, N Engl J Med. 1996 Jun 20;334(25):1630-4.).

A vacinação com antígeno palmitoilado (ACI-24, A β 1-15) é quer feita após o inibidor C1 ter sido administrado seguindo o Esquema de Aplicação 1 quer, alternativamente, antes de a dose inicial de inibidor C1 ser dada de acordo com o Esquema de Aplicação 2.

12.5 Inibidor C1 natural Cetor® (C1-esteraseremmer-N)

O C1-esteraseremmer-N ou Cetor® é administrado em uma dosagem de 1.000 U, 1.500 U ou 2.000 U e mais tarde na mesma dose do outro produto é administrado.

A vacinação com antígeno palmitoilado (ACI-24, A β 1-15) é quer feita após a 2ª dose seguindo o Esquema de Aplicação 1 quer, alternativamente, antes da dose inicial de 1.000 U, 1.500 U ou 2.000 U de C1-esteraseremmer-N ou Cetor® ser dada de acordo com o Esquema de Aplicação 2.

Referência de arquivo de agente ou de requerente L3018 PCT BS	Número do Pedido Internacional Pedido PCT Novo
--	---

INDICAÇÕES RELACIONADAS COM O MICROORGANISMO DEPOSITADO OU OUTRO MATERIAL BIOLÓGICO
(Regra PCT 13 bis)

A. As indicações feitas abaixo referem-se ao microorganismo ou outro material biológico depositado referido na descrição na página <u>23</u> linha <u>8</u> .	
B. IDENTIFICAÇÃO DO DEPÓSITO	
outros depósitos são identificados em uma folha adicional ☐	
Nome da instituição de depósito DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VONMIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH	
Endereço da instituição de depósito <i>(incluindo código postal e país)</i> Mascheroder Weg 1 b 38124 Braunschweig DE	
Data de depósito Dezembro 8, 2005 (08/12/2005)	Número de acesso DSM ACC2756
C. Indicações adicionais <i>(deixar em branco se não aplicável)</i>	esta informação é continuada em uma folha adicional ☐
Requerente faz uso da Regra 28(4) ECP	
D. Estados designados aos quais são feitas indicações <i>(se as indicações não forem para todos os estados designados)</i>	
EP	
E. FORNECIMENTO SEPARADO DE INDICAÇÕES <i>(deixar em branco se não aplicável)</i>	
As indicações listadas abaixo serão submetidas ao International Bureau mais tarde <i>(especificar a natureza geral das indicações por exemplo, "Número de Acesso do Depósito")</i>	

Para uso apenas do escritório receptor

☒ Esta folha foi recebida com o pedido internacional
oficial autorizado Gorge, Olivier

Para uso apenas do International Bureau

☐ Esta folha foi recebida pelo International Bureau em: 23 dec 2006
oficial autorizado PETER WIMMER

Figuras

Figura 1a: Desenho e caracterização biofísica de duas vacinas lipossomais contendo imunógenos de peptídeo com os primeiros aminoácidos 15 (ACI-24, A β 1-15) e 16 (ACI-01, A β 1-16) do peptídeo amilóide β 1-42 de comprimento total. b) ACI-01 contém A β 1-16 flanqueado com o resíduo de lisina PEGuilado em cada lado que transporta DSPE servindo como âncora lipossomal na outra extremidade de cadeia de PPOR EXEMPLO (a). Para ACI-24 (b), dois resíduos de lisina palmitoilada terminal foram covalentemente ligados em cada extremidade de A β 1-15 para reconstituir e ancorar o antígeno no lipossomo (a). c) Espectros de CD dos dois antígenos reconstituídos no lipossomo. ACI-01 exibe espectros indicativos de conformação de proteína não estruturada e aleatoriamente espiralada (sinal negativo até 210 nm e lentamente se aproxima de eixo zero até 260 nm) enquanto que espectros de ACI-24 contêm uma proporção significativa de estrutura beta (sinal positivo até 210 nm, cruzando o eixo zero e então se aproximando dele de novo até 260 nm). Para análise de espectros CD amostras de beta-amilóide (ACI-01 e-24) foram reconstituídas em lipossomo e sonicadas pelo uso de um sonicador de sonda em uma concentração de peptídeo de 0,9865 mg/mL (1 ml em PBS). Espectros CD foram registrados em um Dichrograph (JASCO J-810) com uma cubeta de célula de quartzo de comprimento de caminho óptico de 0,1 cm. A janela espectral foi de 190-260 nm em uma velocidade de varredura de 20 nm/min a 25°C e dados brutos foram expressados em elipticidade em unidade θ (mdeg).

Figura 1b: A região espectral de ^1H incluindo os prótons de amida de peptídeo e as cadeias laterais aromáticas de espectros de RMN por giro de ângulo mágico de A. a vacina ACI-01, B. a vacina ACI-24, C. ACI-01 1 mM, D. ACI-24 1 mM e E. peptídeo Ab1-15 4 mM em tampão PBS, pH 7,2.

Figura 1c: Espectros de ^1H RMN unidimensional de 9 a 5,5

ppm de beta-Amilóide 1-15 peguado (preto) e palmitoído (azul). Peptídeos foram sintetizados, covalentemente ligados em ácido palmítico ou em PEG respectivamente e reconstituídos em PBS. Para análise de RMN, amostras foram centrifugadas e foi registrado um espectro total de 9 a 0,2 ppm.

Figura 2: Análise de títulos específicos de amilóide nos soros de camundongos APPxPS1 imunizados com antígenos PEGuado (ACI-01) ou palmitoído (ACI-24) em lipossomos comparados com camundongos imunizados com lipossomos vazios (controle). a) Imunização com ACI-24 gerou níveis altos de anticorpos IgG específicos para amilóide (a, esquerda) apenas após duas imunizações e três semanas após a primeira semana e alcançou um máximo após 5 semanas. Enquanto que imunização com ACI-01 gerou níveis altos de anticorpos IgM específicos para amilóide (a, direita) com um máximo após 7 semanas mas apenas níveis baixos de IgG comparado com ACI-24 (a, esquerda, $p < 0,5$).

Depósito:

As seguintes linhagens de célula de hibridoma foram depositadas no “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)” em Braunschweig, Mascheroder WEG 1 B, 38124 Braunschweig, sob as condições do Tratado de Budapeste:

Designação da linhagem de hibridoma	Designação de anticorpo	Data de depósito	Número de acesso
EJ 7H3	mACI-24-Ab4	08 Dezembro 2005	DSM ACC2756

Referências

- Alving et al., Infect. Immun. 60:2438-2444, 1992
 Bork K, Arch Intern Med. 2001 Mar 12;161(5):714-8
 Caliezi C, Crit Care Med. 2002 Aug;30(8):1722-8.
 De Serres J, Transfus Apher Sci. 2003 Dec;29(3):247-54
 Doom MB van, Allergy Clin Immunol. 2005 Oct;116(4):876-83.
 Epub 2005 Aug 8 Harlow e Lane (Antibodies: A Laboratory Manual

(Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque 1988)

FYLAKTAKIDOU, K.C., LEHN, J.-M. GREFERATH, R.
NICOLAU, C., "Inositol tripyrophosphate: a new membrane permeant
allosteric effector of haemoglobin", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 1605-
5 1608, 2005.

Hodgson et al., *Bio/Technology*, 9:421 (1991)

Khaw, B. A. et al. *J. Nucl. Med.* 23:1011-1019 (1982)

Kohler e Milstein (*Nature* 256: 495-497 (1975))

Moechars, D., Dewachter, I., Lorent, K., Reverse, D.,
10 Baekelandt, V., Naidu, A., Tesseur, I., Spittaels, K., Haute, C.V., Checler, F.,
Godaux, E., Cordell, B. e Van Leuven, F.: 1999, *J. Biol. Chem.* 274, 6483-
6492.

Moechars, D., Lorent, K., De Strooper, B., Dewachter, I., &
Van Leuven, F. "Expression in brain of amyloid precursor protein mutated in
15 the alpha-secretase site causes disturbed behavior, neuronal degeneration and
premature death in transgenic mice". *EMBO J.* 15, 1265-1274 (1996).

Hill A, *Blood*. 2005 Oct 1;106(7):2559-65. Epub 2005 Jun 28.

Hillmen P, *N Engl J Med*. 2004 Feb 5;350(6):552-9.

Li J S, *Am Heart J*. 2004 Jan;147(1):173-80

20 Moechars, D., Lorent, K., De Strooper, B., Dewachter, I. e
Van Leuven, F.: 1996, *EMBO J.* 15, 1265-1274.

Nicolau, C., Greferath, R., Balaban, T. S., Lazarte, J. E., e
Hopkins, R. J. (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2332-2337.

Piotto, M., Saudek, V., & Sklenar, V. "Gradient-tailored
25 excitation for single-quantum RMN spectroscopy of aqueous solutions". *J.*
Biomol. RMN 2, 661-665 (1992).

Piotto, M., Elbayed, K., Wieruszeski, J. M., & Lippens, G.
"Practical aspects of shimming a high resolution magic angle spinning
probe". *J. Magn Reson.* 173, 84-89 (2005).

Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032
 (1989) Rampon, C., Tang, Y.P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyin, M. e Tsien,
 J.Z.: 2000, Nat. Neurosci. 3, 238-244.

Rzepecki et al., 2004 Rousseaux et al. Methods Enzymology,
 5 121:663-69, Academic Press, 1986.

Tang, Y.P., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner,
 G.A., Zhuo, M., Liu, G. e Tsien, J. Z.: 1999, Nature 401, 63-69.

B Teisseire, C Ropars, M C Villeréal, e C Nicolau, “Long-
 term physiological effects of enhanced O₂ release by inositol hexaphosphate-
 10 loaded erythrocytes” Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 October; 84(19): 6894-
 6898

Teisseire B, Ropars C, Villeréal MC, Nicolau C. “Long-term
 physiological effects of enhanced O₂ release by inositol hexaphosphate-
 loaded erythrocytes”. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Oct; 84(19) 6894-
 15 6898.

Udenfriend, S. et al. “Fluorescamine: a reagent for assay of
 amino acids, peptides, proteinss, and primary amines in the picomole range”.
 Science 178, 871-872 (1972). Wagner et al (2002) Journal of Liposome
 Research Vol 12(3), pp 259 - 270

Waytes AT, N Engl J Med. 1996 Jun 20; 334(25):1630-4 US-P
 20 6843942 EPA 1337322

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> AC Immune S.A.
 <120> Vacina terapêutica
 <130> L3018 PCT
 <150> EP 05027091.7
 <151> 2005-12-12
 <150> EP 06009098.2
 <151> 2006-05-02
 <160> 6
 <170> PatentIn versão 3.1
 <210> 1
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> peptídeo antigênico A β 1-15
 <400> 1
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln 15
 <210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> peptídeo antigênico A β 1-16
 <400> 2
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys 16
 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> peptídeo antigênico A β 1-16 (Δ 14)
 <400> 3
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His Gln Lys 15
 <210> 4
 <211> 8 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> peptídeo antigênico A β 4-11
 <400> 4
 Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu 8
 <210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> peptídeo antigênico A β 22-35
 <400> 5
 Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu 13
 <210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> peptídeo antigênico A β 29-40
 <400> 6
 Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val 12

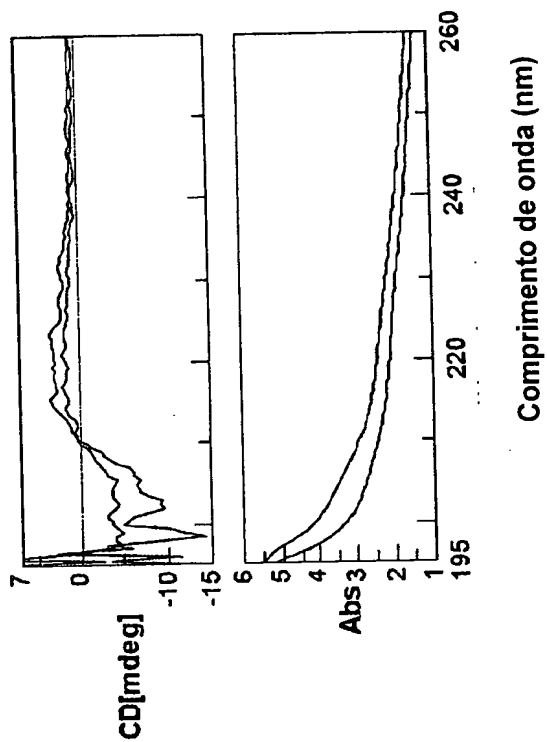


Fig 1 ab

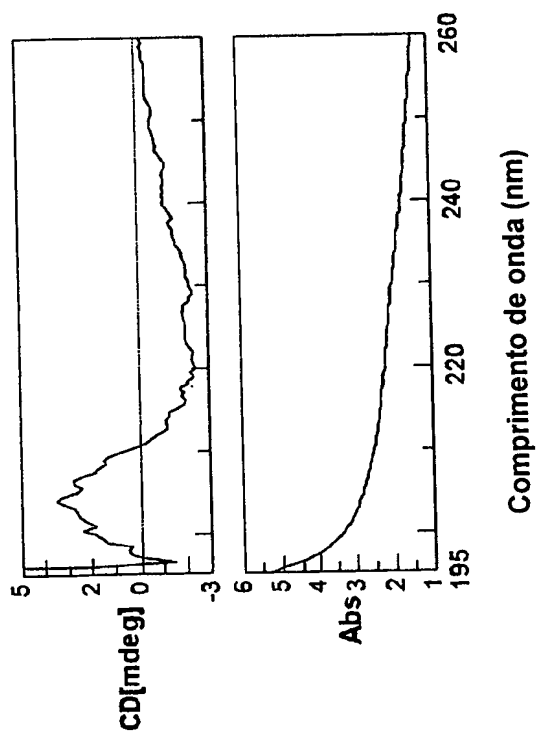
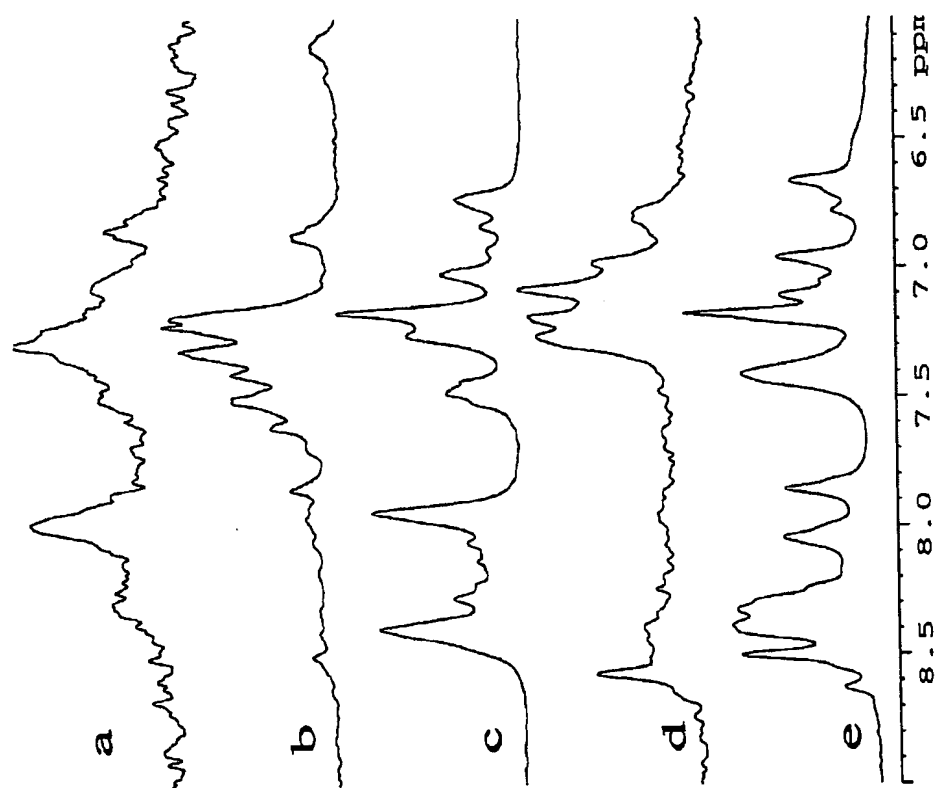
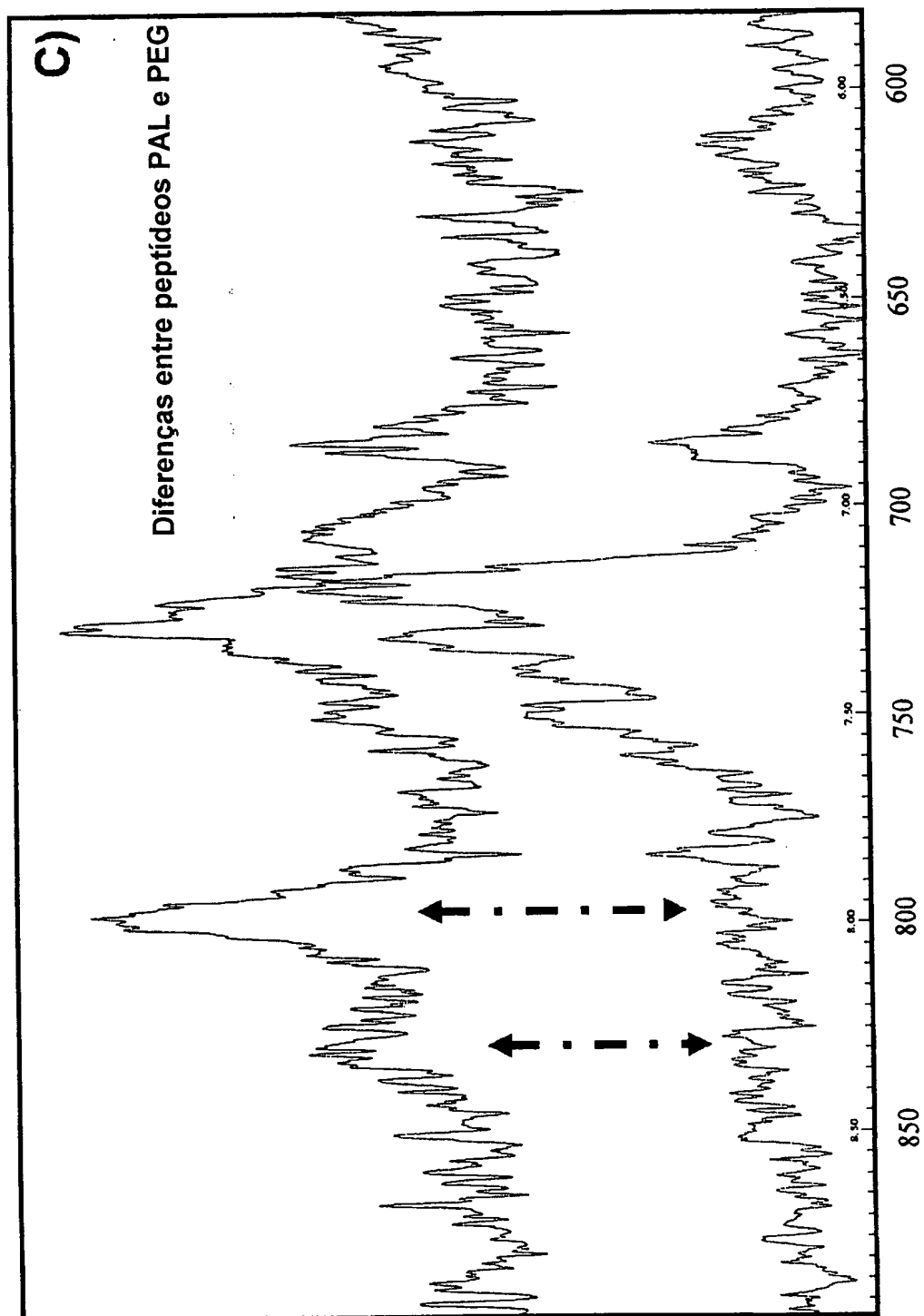


Fig 1 aa

**FIG 1b**

**FIG 1c**

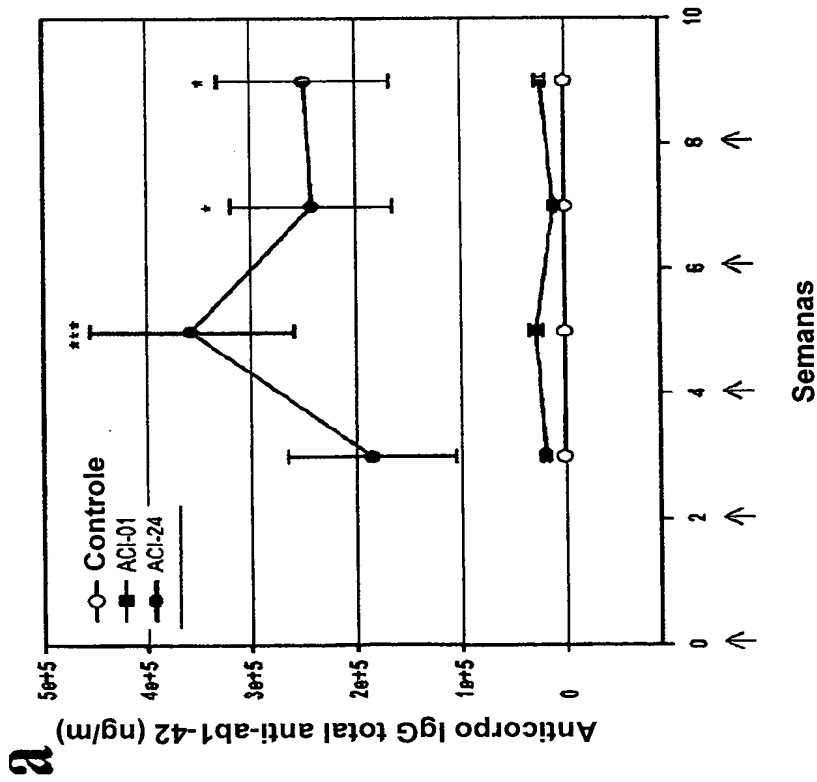


Fig 2 a

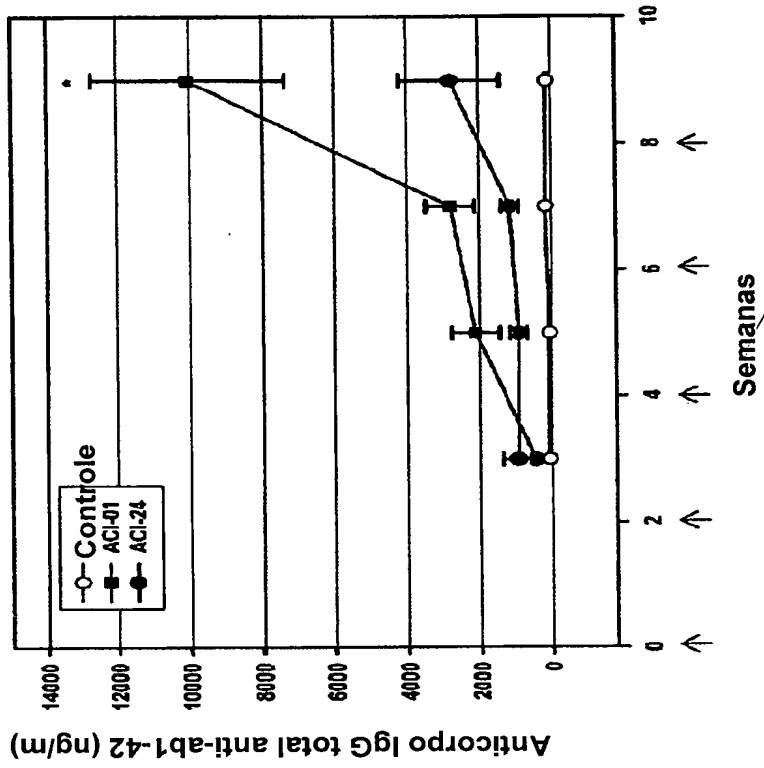


Fig 2 b

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir uma composição de vacina terapêutica, caracterizado pelo fato de compreender o uso de um fragmento de peptídeo antigênico A β consistindo de um segmento único ou repetitivo de entre 13 e 15 resíduos de aminoácido contíguos da parte N-terminal do peptídeo A β para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o segmento contíguo de 13 a 15 resíduos de aminoácido é obtido do fragmento N-terminal 1-16 ou 1-17 do peptídeo A β .

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a composição de vacina terapêutica compreende um fragmento de peptídeo A β consistindo de um segmento único ou repetitivo de entre 13 e 15 resíduos de aminoácido contíguos da parte N-terminal do peptídeo A β selecionado do grupo consistindo de resíduos 1-15, 1-14, e 1-13.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a composição de vacina terapêutica compreende um fragmento de peptídeo A β único ou repetitivo selecionado do grupo consistindo de antígeno de peptídeo A β ₁₋₁₅ como dado em SEQ ID NO: 1 e A β _{1-16(Δ ,14)} como dado em SEA ID NO: 3.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o antígeno de peptídeo A β é modificado de tal modo que é capaz de manter e estabilizar uma conformação definida caracterizada por uma proporção equilibrada de porções de espiral randômica e/ou de β -foliada e/ou α -helicoidal.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o antígeno de peptídeo A β é apresentado reconstituído em um carreador tal como, por exemplo, uma vesícula, uma molécula ou corpo particulado.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o antígeno de peptídeo A β é apresentado reconstituído em um lipossomo.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o antígeno de peptídeo A β é modificado por um grupo lipofílico ou hidrofóbico que facilita a inserção dentro da bicamada lipídica do adjuvante/carreador de lipossomo.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a dimensão do grupo lipofílico ou hidrofóbico em combinação com a carga efetiva total do peptídeo antigênico e do carreador/adjuvante no qual o peptídeo torna-se ligado, incorporado ou reconstituído é tal que o peptídeo antigênico é exposto, estabilizado e apresentado em uma conformação elevadamente biologicamente ativa, que permite que o sistema imune do organismo alvo livremente interaja com os determinantes antigênicos contidos no construto antigênico em sua conformação exposta, estabilizada e elevadamente biologicamente ativa, que leva a uma resposta imune forte.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 9, caracterizado pelo fato de que o grupo lipofílico ou hidrofóbico é um ácido graxo, um triglicerídeo ou um fosfolipídeo.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o grupo lipofílico ou hidrofóbico é um ácido graxo, particularmente um ácido graxo com uma estrutura principal de carbono de pelo menos 10 átomos de carbono.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o grupo hidrofóbico é ácido palmítico.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 12, caracterizado pelo fato de que a preparação de lipossomo contém um adjuvante.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o adjuvante é lipídeo A, particularmente lipídeo A desintoxicado, tal como monofosforil ou difosforil lipídeo A ou alume.

15. Método para produzir uma composição de vacina terapêutica, caracterizado pelo fato de compreender o uso de um peptídeo antigênico imunogênico para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide, no qual o antígeno de peptídeo 3-amilóide é um antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ palmitoilado modificado por resíduos de aminoácido palmitoilados covalentemente ligados, particularmente entre 2 e 4, mais particularmente 4 resíduos, reconstituído em um lipossomo.

16. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ é modificado por 2 resíduos de aminoácido palmitoilados covalentemente ligados nas terminações-N e -C do peptídeo, respectivamente.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ é modificado por 4 resíduos de aminoácido palmitoilados, dois dos quais são covalentemente ligados nas terminações-N e -C do peptídeo, respectivamente.

18. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que 2 ou mais moléculas de antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ palmitoiladas modificadas por resíduos de palmitoíla covalentemente ligados, particularmente um ou dois resíduos, em cada extremidade do peptídeo são reconstituídas em um lipossomo único.

19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que a condição ou doença associada com amilóide é uma selecionada do grupo consistindo de doenças incluindo, mas não limitadas a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave

(MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeldt Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a condição ou doença associada com amilóide é Mal de Alzheimer.

21. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a condição associada com amilóide é caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva em um animal, particularmente um mamífero ou um humano.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o tratamento de um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição associada com amilóide caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva leva a um aumento na retenção da capacidade de memória cognitiva.

23. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o tratamento de um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição associada com amilóide caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva leva a uma restauração completa da capacidade de memória cognitiva.

24. Construto antigênico, caracterizado pelo fato de compreender um fragmento de peptídeo antigênico A β consistindo de um segmento único ou repetitivo de entre 13 e 15 resíduos de aminoácido contíguos da parte N-terminal do peptídeo A β para o tratamento de uma

condição ou doença associada com amilóide.

25. Construto antigênico de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o segmento contíguo de 13 a 15 resíduos de aminoácido é obtido do fragmento N-terminal 1-16 ou 1-17 do peptídeo A β .

26. Construto antigênico de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a composição de vacina terapêutica compreende um fragmento de peptídeo A β consistindo de um segmento único ou repetitivo de entre 13 e 15 resíduos de aminoácido contíguos da parte N-terminal do peptídeo A β selecionado do grupo consistindo de resíduos 1-15, 1-14, e 1-13.

27. Construto antigênico de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 26, caracterizado pelo fato de que a composição de vacina terapêutica compreende um fragmento de peptídeo A β único ou repetitivo selecionado do grupo consistindo de antígeno de peptídeo A β ₁₋₁₅ como dado em SEQ ID NO: 1 e A β _{1-16(Δ 14)} como dado em SEA ID NO: 3.

28. Construto antigênico de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 27, caracterizado pelo fato de que o antígeno de peptídeo A β é modificado de tal modo que é capaz de manter e estabilizar uma conformação definida caracterizada por uma proporção equilibrada de porções de espiral randômica e/ou de β -foliada e/ou α -helicoidal.

29. Construto antigênico de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 28, caracterizado pelo fato de que o antígeno de peptídeo A β é apresentado ligado em ou reconstituído em um adjuvante/carreador tal como, por exemplo, uma vesícula, uma molécula ou corpo particulado.

30. Construto antigênico de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o antígeno de peptídeo A β é apresentado reconstituído em um lipossomo.

31. Construto antigênico de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o antígeno de peptídeo A β é modificado por

um grupo lipofílico ou hidrofóbico que facilita a inserção na bicamada lipídica do carreador de lipossomo.

32. Construto antigênico de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a dimensão do grupo lipofílico ou hidrofóbico em combinação com a carga efetiva total do peptídeo antigênico e do carreador no qual o peptídeo torna-se ligado incorporado ou reconstituído é tal que o peptídeo antigênico é exposto ao solvente e apresentado em uma conformação que é biologicamente ativa pelo fato de que permite que o sistema imune do organismo alvo livremente interaja com os determinantes antigênicos contidos no construto antigênico, que leva a uma resposta imunogênica forte e, conseqüentemente, um título de anticorpo alto no organismo alto.

33. Construto antigênico de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 32, caracterizado pelo fato de que o grupo lipofílico ou hidrofóbico é um ácido graxo, um triglicerídeo ou um fosfolipídeo.

34. Construto antigênico de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o grupo lipofílico ou hidrofóbico é um ácido graxo, particularmente um ácido graxo com uma estrutura principal de carbono de pelo menos 10 átomos de carbono.

35. Construto antigênico de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o grupo hidrofóbico é ácido palmítico.

36. Construto antigênico de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 35, caracterizado pelo fato de que a preparação de lipossomo contém um adjuvante ou um imunomodulador.

37. Construto antigênico de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o imunomodulador é lipídeo A, particularmente lipídeo A desintoxicado tal como monofosforil ou difosforil lipídeo A ou alume.

38. Composição de vacina, caracterizada pelo fato de

compreender um antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide.

39. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 38, caracterizada pelo fato de que o antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ é modificado de tal modo que é capaz de manter e estabilizar uma conformação definida caracterizada por uma proporção equilibrada de porções de espiral randômica, α -helicoidal e de β -foliada.

40. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 ou 39, caracterizada pelo fato de que o antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ é apresentado ligado em um carreador tal como, por exemplo, uma vesícula, uma molécula ou corpo particulado.

41. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 40, caracterizada pelo fato de que o antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ é apresentado reconstituído em um lipossomo.

42. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 41, caracterizada pelo fato de que o antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ é modificado por um grupo lipofílico ou hidrofóbico que facilita a inserção na bicamada lipídica hidrofóbica do adjuvante/carreador de lipossomo.

43. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 42, caracterizada pelo fato de que a dimensão do grupo lipofílico ou hidrofóbico proporcionando uma âncora para o peptídeo na bicamada de lipossomo em combinação com a carga efetiva total do peptídeo antigênico e do carreador no qual o peptídeo torna-se ligado, incorporado ou reconstituído de modo que o peptídeo antigênico seja exposto ao solvente e apresentado em uma conformação que é biologicamente ativa pelo fato de que permite que o sistema imune do organismo alvo livremente interaja com os determinantes antigênicos contidos no construto antigênico, que leva a uma resposta imunogênica forte e, conseqüentemente, um título de anticorpo alto no organismo alto.

44. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de que o grupo lipofílico ou hidrofóbico é um ácido graxo, triglicerídeos ou fosfolipídeos.

45. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 44, caracterizada pelo fato de que a estrutura principal de carbono de ácido graxo possui pelo menos 10 átomos de carbono.

46. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 45, caracterizada pelo fato de que o grupo hidrofóbico é ácido palmítico.

47. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 41 a 46, caracterizada pelo fato de que a preparação de lipossomo contém um adjuvante e/ou um imunomodulador.

48. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 47, caracterizada pelo fato de que o imunomodulador é lipídeo A desintoxicado, tal como monofosforil ou difosforil lipídeo A.

49. Composição de vacina, caracterizada pelo fato de compreender um peptídeo antigênico imunogênico para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide, na qual o antígeno de peptídeo β -amilóide é um antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ palmitoilado modificado por resíduos de palmitoíla covalentemente ligados, particularmente entre 2 e 4, mais particularmente 4 resíduos, em cada extremidade do peptídeo reconstituído em um lipossomo.

50. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 49, caracterizada pelo fato de que 2 ou mais moléculas de antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ palmitoiladas modificadas por resíduos de palmitoíla covalentemente ligados em cada extremidade do peptídeo são reconstituídas em um lipossomo único.

51. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que, sob administração a um animal, particularmente um mamífero, mas especialmente um humano,

resulta principalmente na geração de anticorpos de subtipos não-inflamatórios.

52. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 51, caracterizada pelo fato de que os citados anticorpos são do subtipo Th2 não-inflamatório, particularmente de isotipo IgG1 e IgG2b.

53. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que, sob administração a um animal, particularmente um mamífero, mas especialmente um humano, resulta principalmente na geração de anticorpos da subclasse IgG independente de célula-T.

54. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 53, caracterizada pelo fato de que os citados anticorpos são do isotipo IgG3.

55. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que, sob administração a um animal, particularmente um mamífero, mas especialmente um humano não leva a um aumento significativo em marcadores de inflamação no cérebro.

56. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 53, caracterizada pelo fato de que os citados marcadores são selecionados do grupo consistindo de IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α .

57. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que, sob administração a um animal, particularmente um mamífero, mas especialmente um humano leva a um decréscimo significativo de A β 1-40 e A β 1-42 relacionados com placas, insolúveis, no cérebro.

58. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que, sob administração a um animal, particularmente um mamífero, mas especialmente um humano leva a uma redução significativa no nível de A β 1-42 solúvel no cérebro.

59. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de ser para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide em um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma tal condição.

5 60. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 59, caracterizada pelo fato de que a condição ou doença associada com amilóide é uma selecionada do grupo consistindo de doenças incluindo, mas não limitadas a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo
10 doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva,
15 esclerose múltipla; mal de Creutzfeldt Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular.

20 61. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 60, caracterizada pelo fato de que a condição ou doença associada com amilóide é Mal de Alzheimer.

25 62. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que, sob administração a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição associada com amilóide caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva leva a um aumento na retenção da capacidade de memória cognitiva.

63. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que, sob administração

a um animal, particularmente um mamífero, mas especialmente a um humano, sofrendo de uma condição associada com amilóide caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva leva a uma restauração completa da capacidade de memória cognitiva.

5 64. Composição de vacina, caracterizada pelo fato de compreender um antígeno de peptídeo A β para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide juntamente com um inibidor do sistema de complemento.

10 65. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 64, caracterizada pelo fato de que o antígeno de peptídeo A β é um antígeno de peptídeo A β_{1-15} .

15 66. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 65, caracterizada pelo fato de compreender um peptídeo antigênico imunogênico para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide, na qual o antígeno de peptídeo β -amilóide é um antígeno de peptídeo A β_{1-15} palmitoilado modificado por resíduos de palmitoíla covalentemente ligados, particularmente entre 2 e 4, mais particularmente 4 resíduos, em cada extremidade do peptídeo reconstituído em um lipossomo juntamente com um inibidor do sistema de complemento.

20 67. Composição de vacina, caracterizada pelo fato de compreender um antígeno de peptídeo A β para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide juntamente com um composto, particularmente um efector alostérico de hemoglobina, que dispara uma liberação de oxigênio regulada, intensificada para os tecidos.

25 68. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 67, caracterizada pelo fato de que o antígeno de peptídeo A β é um antígeno de peptídeo A β_{1-15} .

69. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 68, caracterizada pelo fato de compreender um peptídeo antigênico imunogênico

para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide, na qual o antígeno de peptídeo β -amilóide é um antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ palmitoilado modificado por resíduos de palmitoíla covalentemente ligados, particularmente entre 2 e 4, mais particularmente 4 resíduos, em cada
5 extremidade do peptídeo reconstituído em um lipossomo juntamente com um composto, particularmente um efector alostérico de hemoglobina, que dispara uma liberação de oxigênio regulada, intensificada para os tecidos.

70. Composição de vacina, caracterizada pelo fato de compreender um antígeno de peptídeo $A\beta$ para o tratamento de uma condição
10 ou doença associada com amilóide juntamente com um inibidor do sistema de complemento e um composto particularmente um efector alostérico de hemoglobina, que dispara uma liberação de oxigênio regulada, intensificada para os tecidos.

71. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 70,
15 caracterizada pelo fato de que o antígeno de peptídeo $A\beta$ é um antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$.

72. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 71, caracterizada pelo fato de compreender um peptídeo antigênico imunogênico para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide, na
20 qual o antígeno de peptídeo β -amilóide é um antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ palmitoilado modificado por resíduos de palmitoíla covalentemente ligados, particularmente entre 2 e 4, mais particularmente 4 resíduos, em cada extremidade do peptídeo reconstituído em um lipossomo juntamente com um inibidor do sistema de complemento e um composto modulador de afinidade
25 de hemoglobina/ O_2 , particularmente um efector alostérico de hemoglobina, que dispara uma liberação de oxigênio regulada, intensificada para os tecidos.

73. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 64 a 66 e 70 a 72, caracterizada pelo fato de que o inibidor de complemento é um composto selecionado do grupo consistindo de Receptor 1

de complemento solúvel de humano, anti-proteína C5 de complemento humana tal como, por exemplo, um anticorpo anti-C5 monoclonal humanizado ou um fragmento de cadeia única de um anticorpo monoclonal humanizado, inibidor-N de C1-esterase Inibidor C1 Natural de humano.

5 74. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 69 e 70 a 72, caracterizada pelo fato de que o composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂ é um composto selecionado do grupo consistindo de uma droga antilipidêmica tal como, por exemplo, ácido clofibrico ou bezafibrato incluindo os derivados de bezafibrato LR16 e L35, 10 derivado de uréia tal como, por exemplo, ácido [2-[4[[[aril-amino)-carbonil]-amino]-fenóxi]-2-metil-propiónico, um efetor alostérico de hemoglobina tal como, por exemplo, 2,3-difosfo-glicerato (DPG), hexaquisfosfato de inositol (IHP), e fosfato de piridoxal.

15 75. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 69 e 70 a 72, caracterizada pelo fato de que o composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂ é um composto compreendendo um ligante aniônico para um sítio alostérico de hemoglobina, na qual o ligante aniônico compreende um anel de pirofosfato interno, opcionalmente juntamente com um cátion não-tóxico.

20 76. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 75, caracterizada pelo fato de que o composto modulador de afinidade de hemoglobina/O₂ é um derivado de hexafosfato de inositol (IHP) compreendendo pelo menos um anel de pirofosfato interno, opcionalmente juntamente com um cátion não-tóxico.

25 77. Composição de vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 64 a 75, caracterizada pelo fato de que o antígeno de peptídeo β-amilóide compreende um construto antigênico como definido em qualquer uma das reivindicações 24 a 37.

78. Uso de um fragmento de peptídeo antigênico Aβ

consistindo de um segmento único ou repetitivo de entre 13 e 15 resíduos de aminoácido contíguos da parte N-terminal do peptídeo A β , caracterizado pelo fato de ser para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide.

5 79. Uso de um antígeno de peptídeo A β como definido nas reivindicações 2 a 23 ou um construto antigênico como definido em qualquer uma das reivindicações 24 a 37, caracterizado pelo fato de ser para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide.

10 80. Uso de um antígeno de peptídeo A β de acordo com a reivindicação 79, caracterizado pelo fato de que a condição ou doença associada com amilóide é uma selecionada do grupo consistindo de doenças incluindo, mas não limitadas a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, 15 debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeld 20 Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular.

 81. Uso de um antígeno de peptídeo A β de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que a condição ou doença 25 associada com amilóide é Mal de Alzheimer.

 82. Uso de um antígeno de peptídeo A β de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que a condição associada com amilóide é caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, em debilitação cognitiva suave (MCI) em um animal,

particularmente um mamífero ou um humano.

83. Uso de um antígeno de peptídeo A β de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que o tratamento de um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição associada com amilóide caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva leva a um aumento na retenção da capacidade de memória cognitiva.

84. Uso de um antígeno de peptídeo A β de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que o tratamento de um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição associada com amilóide caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva leva a uma restauração completa da capacidade de memória cognitiva.

85. Método para tratar uma condição ou doença associada com amilóide, caracterizado pelo fato de compreender a administração a um animal, particularmente a um mamífero, mas especialmente a um humano, sofrendo de uma tal doença ou condição de uma composição de vacina terapêutica como definida em qualquer uma das reivindicações 38 a 77.

86. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a composição de vacina compreende um antígeno de peptídeo A β_{1-15} , particularmente um antígeno de peptídeo A β_{1-15} palmitoilado.

87. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a administração de citada composição de vacina resulta principalmente na geração de anticorpos de subtipos não-inflamatórios.

88. Método de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que os citados anticorpos são do subtipo Th2 não-inflamatório, particularmente de isotipo IgG1 e IgG2b.

89. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a administração de citada composição de vacina resulta

principalmente na geração de anticorpos da subclasse IgG independente de célula-T.

90. Método de acordo com a reivindicação 89, caracterizado pelo fato de que os citados anticorpos são do isotipo IgG3.

5 91. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de não levar a um aumento significativo em marcadores de inflamação no cérebro.

92. Método de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que os citados marcadores são selecionados do grupo consistindo
10 de IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF α .

93. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a administração de citada composição de vacina leva a um decréscimo significativo de A β 1-40 e A β 1-42 relacionados com placas, insolúveis, no cérebro.

15 94. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a administração de citada composição de vacina leva a uma redução significativa no nível de A β 1-42 solúvel no cérebro.

95. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 94, caracterizado pelo fato de que a condição ou doença associada com
20 amilóide é uma selecionada do grupo consistindo de doenças incluindo, mas não limitadas a, distúrbios neuronais tais como Mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), demência de corpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral
25 hereditária com amiloidose (tipo Dutch); o complexo de Parkinson-Demência de Guam; bem como outras doenças que estão baseadas em ou associadas com proteínas tipo-amilóide tais como paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla; mal de Creutzfeldt Jacob, mal de Parkinson, demência relacionada com HIV, ALS (esclerose lateral amiotrófica), Diabetes de Início

na Vida Adulta; amiloidose cardíaca senil; tumores endócrinos, e outras, incluindo degeneração macular.

96. Método de acordo com a reivindicação 95, caracterizado pelo fato de que a condição ou doença associada com amilóide é Mal de Alzheimer.

97. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 94, caracterizado pelo fato de que a administração de citada composição de vacina a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição associada com amilóide caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva leva a um aumento na retenção da capacidade de memória cognitiva.

98. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 94, caracterizado pelo fato de que a administração de citada composição de vacina a um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição associada com amilóide caracterizada por uma perda de capacidade de memória cognitiva leva a uma restauração completa da capacidade de memória cognitiva.

99. Método para significativamente aumentar a retenção ou capacidade de memória cognitiva de um mamífero, caracterizado pelo fato de ser por imunização com uma composição de vacina terapêutica como definida em qualquer uma das reivindicações 38 a 77.

100. Método de acordo com a reivindicação 99, caracterizado pelo fato de que a composição de vacina compreende um antígeno de peptídeo A β ₁₋₁₅, particularmente um antígeno de peptídeo A β ₁₋₁₅ palmitoilado.

101. Método para induzir uma resposta imune em um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição associada com amilóide caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tal como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), caracterizado pelo fato de ser pela administração ao citado animal ou humano

de uma composição de vacina terapêutica como definida em qualquer uma das reivindicações 38 a 77 de tal modo que a retenção ou capacidade de memória cognitiva do animal ou humano tratado é aumentada.

102. Método para induzir uma resposta imune em um animal, particularmente um mamífero ou um humano, sofrendo de uma condição associada com amilóide caracterizada por uma perda da capacidade de memória cognitiva tais como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI), caracterizado pelo fato de ser por administração ao citado animal ou humano de uma composição de vacina terapêutica compreendendo um antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$, particularmente um antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ palmitoilado de tal modo que a capacidade de memória cognitiva do animal ou humano tratado é completamente restaurada.

103. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a composição de vacina como definida em qualquer uma das reivindicações 64 a 77 é administrada de tal modo que o inibidor de complemento e o construto antigênico são administrados concomitante, intermitente ou seqüencialmente.

104. Método de acordo com a reivindicação 103, caracterizado pelo fato de que o inibidor de complemento é administrado antes da vacinação com o construto antigênico, para dentro de uma janela de tempo iniciando de até 20 horas antes da vacinação e terminando imediatamente antes da vacinação.

105. Método de acordo com a reivindicação 103, caracterizado pelo fato de que o inibidor de complemento é administrado subsequente à vacinação com o construto antigênico dentro de uma janela de tempo iniciando imediatamente após a vacinação e terminando 1 dia após a aplicação da vacina.

106. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 103 a 105, caracterizado pelo fato de que a composição de vacina compreende

um antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$, particularmente um antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ palmitoilado.

107. Método para preparar um medicamento para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide, caracterizado pelo fato de compreender o uso da composição de vacina como definida em qualquer uma das reivindicações 38 a 77.

108. Método para produzir um medicamento para o tratamento de uma condição ou doença associada com amilóide, caracterizado pelo fato de compreender o uso de um peptídeo antigênico imunogênico, no qual o antígeno de peptídeo β -amilóide é um antígeno de peptídeo $A\beta_{1-15}$ palmitoilado modificado por resíduos de aminoácido palmitoilados covalentemente ligados, particularmente entre 2 e 4, mais particularmente 4 resíduos, reconstituído em um lipossomo.

109. Anticorpo ou mistura de anticorpos, caracterizado(a) pelo fato de ser obténível de um animal imunizado com a composição de vacina como definida em qualquer uma das reivindicações 31 a 43.

110. Anticorpo de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de ser um anticorpo monoclonal ou um derivado do mesmo.

RESUMO

“MÉTODO PARA PRODUZIR UMA COMPOSIÇÃO DE VACINA TERAPÊUTICA, CONSTRUTO ANTIGÊNICO, COMPOSIÇÃO DE VACINA, USOS DE UM FRAGMENTO DE PEPTÍDEO ANTIGÊNICO ABETA, DE UM ANTÍGENO DE PEPTÍDEO ABETA OU UM CONSTRUTO ANTIGÊNICO, MÉTODOS PARA TRATAR UMA CONDIÇÃO OU DOENÇA ASSOCIADA COM AMILÓIDE, PARA SIGNIFICATIVAMENTE AUMENTAR A RETENÇÃO OU CAPACIDADE DE MEMÓRIA COGNITIVA DE UM MAMÍFERO, PARA INDUZIR UMA RESPOSTA IMUNE EM UM ANIMAL, PARA PREPARAR E PRODUZIR UM MEDICAMENTO PARA O TRATAMENTO DE UMA CONDIÇÃO OU DOENÇA ASSOCIADA COM AMILÓIDE, E, ANTICORPO OU MISTURA DE ANTICORPOS”

15 A presente invenção refere-se aos métodos e às composições para o uso diagnóstico e terapêutico no tratamento de doenças e de distúrbios que são causados por ou estão associados com proteínas amilóide ou tipo-amilóide incluindo amiloidose. Em particular, a presente invenção proporciona novos métodos e composições para gerar uma resposta imune elevadamente específica e elevadamente efetiva em um organismo, mas
20 particularmente dentro de um animal, particularmente um mamífero ou um humano, que é capaz de prevenir ou de aliviar amiloidose, ou os sintomas associados com amiloidose, um grupo de doenças e distúrbios associados com formação de placa amilóide incluindo amiloidose secundária e amiloidose relacionada com a idade incluindo, mas não limitado a, distúrbios
25 neurológicos tal como mal de Alzheimer (AD), incluindo doenças ou condições caracterizadas por uma perda de capacidade de memória cognitiva tal como, por exemplo, debilitação cognitiva suave (MCI).