



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 330 082**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/00** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01970656 .3**  
96 Fecha de presentación : **06.09.2001**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1317479**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.06.2003**

54 Título: **Métodos y composiciones para enfermedades asociadas con la amiloidosis.**

30 Prioridad: **06.09.2000 US 230391 P**  
**12.12.2000 US 255033 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.12.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.12.2009**

73 Titular/es: **Aventis Pharma S.A.**  
**20, avenue Raymond Aron**  
**92165 Antony Cédex, FR**  
**Université Louis Pasteur de Strasbourg**

72 Inventor/es: **Nicolau, Yves, Claude**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 330 082 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para enfermedades asociadas con la amiloidosis.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere de manera general a la detección, tratamiento, o prevención de enfermedades. Específicamente, la presente invención se refiere a la detección, tratamiento o prevención de amiloidosis o enfermedades asociadas al amiloide.

10 **Antecedentes de la invención**

15 La amiloidosis incluye diversas enfermedades caracterizadas por una acumulación de material amiloide en los órganos o tejidos corporales. Esta acumulación puede dañar funciones vitales. Las enfermedades asociadas a la amiloidosis incluyen enfermedad de Alzheimer (EA), síndrome de Down, parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, y diabetes de tipo 2. La amiloidosis localizada está asociada con el deterioro cognitivo (amiloidosis cerebral senil; enfermedad de Alzheimer), cardiopatía (amiloidosis cardíaca senil), tumores endocrinos (cáncer de tiroides), y diabetes de tipo 2, enfermedades que se han encontrado en millones de estadounidenses.

20 Varios daños específicos de los depósitos de amiloide en el cerebro están relacionados con los depósitos del péptido, péptido A $\beta$  (péptido amiloide  $\beta$ ). Las enfermedades neurológicas asociadas a los depósitos del péptido A $\beta$  incluyen la enfermedad de Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandés), y el parkinsonismo-demencia de Guam. Las placas de péptido A $\beta$  también se producen en personas que han experimentado traumatismo craneal y una enfermedad coronaria crítica.

25 La enfermedad más común relacionada con el deterioro cognitivo o la demencia es la enfermedad de Alzheimer (EA). Este trastorno está caracterizado por pérdida neuronal, ovillos neurofibrilares, y placas neuríticas comprendidas de péptido A $\beta$ . Debido a la naturaleza de la amiloidosis cerebral, el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer antes de la muerte es difícil, y el desarrollo de terapias u otros tratamientos para la enfermedad de Alzheimer han sido difíciles de encontrar. Muchas terapias propuestas son incapaces de cruzar la barrera hematoencefálica en cantidades necesarias para un tratamiento eficaz.

30 En la actualidad se cree que las placas de amiloide en el cerebro están compuestas en su mayor parte de péptido A $\beta$ , una proteína de 4 kD, de 39-43 aminoácidos de longitud. El péptido A $\beta$  se expresa mediante un gen situado en el cromosoma 21, y deriva de la escisión proteolítica del interior de una proteína celular mucho mayor (770 restos), proteína precursora del amiloide (APP). Después de la escisión, el péptido A $\beta$  polimeriza en filamentos de amiloide, que sucesivamente se agregan en depósitos de placas de amiloide. En el cerebro, estos filamentos y agregados son tóxicos para las neuronas, y se piensa que están relacionados con los síntomas causales asociados a la EA.

40 La incapacidad para examinar los depósitos de amiloide de la EA en pacientes antes de la muerte, dificulta la capacidad de los investigadores para estudiar la EA y desarrollar tratamientos eficaces con el objetivo de prevenir o anular la formación de placas de amiloide en el cerebro. El daño a las neuronas del sistema nervioso central debido a la EA comienza años antes de que los síntomas clínicos sean evidentes. La prevención de la amiloidosis en el cerebro impediría el desarrollo de la EA. Un enfoque similar para prevenir o tratar la formación de la placa de amilina en los  
45 pacientes con diabetes de tipo 2 sería también beneficioso.

Otras investigaciones han identificado una serie de mutaciones que provocan la enfermedad de Alzheimer hereditaria (FAD), de un modo autosómico dominante. Todas las mutaciones conocidas de FAD aumentan la producción o absoluta o relativa de los péptidos A $\beta$  más patógenos con 42 aminoácidos. Estas mutaciones surgen o en el mismo gen APP, afectando los sitios diana en la APP en los que se produce la escisión proteolítica, o en uno de los dos genes de la presenilina, los productos proteínicos que afectan directamente o, más probablemente, indirectamente el procesamiento de APP. La etapa temprana de la escisión en la EA está seguida de la polimerización del péptido a filamentos de amiloide, que sucesivamente se agregan en los depósitos de placas de amiloide visibles que caracterizan los cerebros de individuos con EA. Estos filamentos, o posiblemente los protofilamentos intermedios, son tóxicos para  
55 las neuronas, y se piensa que conducen a los ovillos neurofibrilares, pérdida de sinapsis, y neurodegeneración, que sirven de base al deterioro de las funciones cognitivas de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

Además de la producción del péptido A $\beta$  (péptido amiloide  $\beta$ ), otras etapas importantes están implicadas en la ruta patógena que conduce a la EA. Estudios tanto genéticos como bioquímicos asignan un papel clave a un grupo de proteínas auxiliares que funcionan como "chaperonas patológicas". Una de tales proteínas es la antiproteasa antiq-  
60 motripsina, y otra es la proteína de transporte lipídico, apolipoproteína F, particularmente su forma alélica E4. Ambas proteínas favorecen la formación y maduración de placas de Alzheimer con su núcleo de filamentos de A $\beta$ . Específicamente, las chaperonas patológicas pueden demostrar *in vitro* que aceleran la polimerización de A $\beta$  en filamentos de amiloide neurotóxicos, y experimentos con ratones transgénicos apoyan su papel en favorecer la formación de  
65 amiloide *in vivo*. Ambas proteínas son componentes secundarios de los depósitos de amiloide, y se producen evidentemente como parte de una reacción de inflamación que surge en respuesta a los depósitos difusos iniciales del péptido A $\beta$ .

## ES 2 330 082 T3

En el documento de patente WO 99/27944 se describe un derivado palmitoilado del péptido A/0 1-42. Pero se obtuvieron resultados decepcionantes cuando fue administrado.

Lo que se necesita son métodos y composiciones para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades asociadas al amiloide.

### Sumario de la invención

La presente invención está dirigida a composiciones y métodos para el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades asociadas a la amiloidosis. De acuerdo con la presente invención, se proporcionan composiciones y métodos que son eficaces en la detección y tratamiento de depósitos de amiloide, especialmente depósitos de amiloide relacionados con enfermedades neurodegenerativas.

La presente invención comprende también métodos y composiciones que comprenden una vacuna que provoca una respuesta inmunitaria frente a proteínas, péptidos o fragmentos de amiloide, y previene, detiene o dificulta los depósitos de amiloide. La vacuna está comprendida de un antígeno, un fragmento de péptido amiloide o epítipo, que se proporciona preferiblemente en una bicapa liposómica. El antígeno está comprendido de un péptido amiloide  $\beta_{1-16}$  palmitoilado, y métodos de administración en una bicapa liposómica.

La invención proporciona también un método y composiciones para prevenir o mitigar los síntomas de enfermedades asociadas a la acumulación u organización molecular de proteína amiloide o placas de amiloide en general, que incluye la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un derivado de péptido o fragmento de péptido amiloide a un paciente.

La presente invención incluye una composición farmacéutica en una cantidad eficaz para prevenir, detener o dificultar uno o más síntomas de una enfermedad que implica una acumulación anormal u organización molecular de proteína, ensamblajes, fibrillas, filamentos, ovillos, o depósitos de placas de amiloide. La presente invención incluye un antígeno para estimular la producción de un anticuerpo monoclonal anti-amiloide, con la capacidad de disolver placas de amiloide. La presente invención proporciona también un método para tratar una enfermedad asociada a amiloidosis, que incluye la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de la vacuna a un paciente.

La presente invención comprende también métodos para fabricar composiciones que comprenden antiseros dirigidos contra el epítipo de las composiciones de vacuna de la presente invención. Estas composiciones de antiseros son capaces de disolver agregados de amiloide que comprenden el epítipo o antígeno (por ejemplo amiloide  $\beta$ ). Las composiciones de antiseros son eficaces en el tratamiento o prevención de la acumulación de la proteína amiloide o la formación de ensamblajes, fibrillas, filamentos, ovillos, o depósitos de placas de amiloide y, por lo tanto, enfermedades asociadas a la amiloidosis.

La invención comprende además métodos y composiciones para prevenir o mitigar los síntomas de enfermedades asociadas a la acumulación u organización molecular de proteína amiloide o placas de amiloide, que incluyen la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de antiseros a un paciente.

La presente invención es particularmente útil en el tratamiento de enfermedades asociadas al amiloide, preferiblemente enfermedades asociadas a amiloide  $\beta$ , que incluyen enfermedad de Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandés), y el complejo de Parkinson-demencia de Guam, u otras enfermedades que implican una acumulación anormal u organización molecular de proteína, ensamblajes, fibrillas, filamentos, ovillos, o depósitos de placas de amiloide.

Este y otros objetos, características, y ventajas de la presente invención serán evidentes después de una revisión de la siguiente descripción detallada de las realizaciones descritas y de las reivindicaciones adjuntas.

### Breve descripción de las figuras

La figura 1 es el péptido amiloide  $\beta$  1-16 ( $A\beta_{1-16}$ ) anclado en la bicapa liposómica mediante lisinas palmitoiladas unidas a ambos extremos del péptido  $A\beta$  1-16.

Figura 2(a). Ruta sintética de dipalmitoil-lisina, usando una palmitoilación directa descrita en los ejemplos 2 y 3.

Figura 2(b). Ruta sintética de dipalmitoil-lisina, usando ésteres activados descritos en los ejemplos 2 y 3.

Figura 2(c). Ruta sintética en fase sólida del extremo C descrita en el ejemplo 3.

La figura 3 es un espectro de masas de bombardeo con átomos rápidos (FAB) del éster de palmitoil de la N-hidroxisuccinimida. Son visibles el pico esperado a 623 Da (MH+) y la ausencia del pico del éster activado (354 Da).

La figura 4 es un espectro de  $^1\text{H}$  RMN del éster de palmitoil de la N-hidroxisuccinimida. Son visibles las señales esperadas.

La figura 5 representa la desagregación de las fibras de amiloide  $\beta$  por el 6C6 = anticuerpo monoclonal (mAB) y mediante sueros de ratones inmunizados con A $\beta$  palmitoilado (1-16) reconstituido en liposomas.

### Descripción detallada

5 La presente invención está dirigida a composiciones y métodos para el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades asociadas a depósitos de amiloide. Las composiciones preferidas de la presente invención incluyen composiciones que comprenden proteínas de fusión capaces de afectar depósitos de amiloide que pueden cruzar la barrera hematoencefálica, y composiciones que son eficaces para provocar una respuesta inmunitaria de epítomos de depósitos de amiloide. Los métodos preferidos de la presente invención comprenden el uso de las composiciones para diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades asociadas a depósitos de amiloide, y para fabricar y usar péptidos amiloides modificados y construcciones moleculares de genes amiloides.

15 Un ejemplo de una de las enfermedades asociadas a los depósitos de amiloide es la enfermedad de Alzheimer, EA. Por definición, la EA se diagnostica por medio del examen del tejido cerebral, usualmente en la autopsia. El "criterio mínimo microscópico" recomendado actualmente para el diagnóstico de la EA está basado en el número de placas neuríticas encontradas en el cerebro. Los núcleos amiloides de estas placas neuríticas están compuestos de proteína amiloide  $\beta$ , a la que también se hace referencia en la presente invención como péptido amiloide  $\beta$ , que está dispuesto en una configuración beta de hoja plegada de manera predominante. Las placas de amiloide en el cerebro se demuestran por tinción de cortes del cerebro con tioflavina S o rojo Congo. El amiloide teñido con rojo Congo se caracteriza por un aspecto dicroico, mostrando un color de polarización verde amarillento. La fijación dicroica es el resultado de la estructura beta de hoja plegada de las proteínas amiloides.

25 Es muy difícil diagnosticar la enfermedad de Alzheimer antes de la muerte, para desarrollar tratamientos farmacológicos, o para tratar la EA. Se ha sugerido un cribado para la detección del genotipo de la apolipoproteína E como una ayuda en el diagnóstico de la EA. Surgen dificultades con esta tecnología, sin embargo, porque el alelo 4 de la apolipoproteína E es solamente un factor de riesgo para la EA, no un marcador de la enfermedad. Está ausente en muchos pacientes de la EA, y presente en muchos ancianos que no presentan demencia. Se han desarrollado métodos de inmunanálisis para detectar la presencia de marcadores neuroquímicos en pacientes de EA, y para detectar una proteína amiloide relacionada con la EA en el líquido cefalorraquídeo. No se ha probado que estos métodos para diagnosticar la EA detecten la EA en todos los pacientes, particularmente en las etapas tempranas de la enfermedad. También son relativamente invasivos, necesiéndose una punción lumbar. Recientemente, se ha usado péptido A $\beta$  radiomarcado para marcar placas de tipo difuso, compacto y neurítico en cortes de cerebro con EA. Estos péptidos, sin embargo, no cruzan normalmente la barrera hematoencefálica en las cantidades necesarias para un diagnóstico por la imagen.

35 El rojo Congo puede usarse para diagnosticar la amiloidosis *in vivo* en tejidos parenquimatosos no cerebrales. Pero el rojo Congo no es adecuado probablemente para el diagnóstico *in vivo* de depósitos de amiloide  $\beta$  en el cerebro, ya que solamente pueden penetrar en el parénquima cerebral cantidades muy pequeñas, aproximadamente 0,03% de una dosis inyectada de rojo Congo yodado. Se han propuesto compuestos radioyodados de bisdiazobencidina relacionados con el rojo Congo, tales como benzo-naranja R y azul directo 4, como útiles *in vitro* e *in vivo* para detectar la presencia y localización de depósitos de amiloide en un órgano de un paciente. Sin embargo, como el rojo Congo, todos los compuestos contienen grupos de ácido sulfónico fuertemente ácidos, que limitan fuertemente la entrada de estos compuestos en el cerebro.

45 También se ha procurado desarrollar anticuerpos monoclonales como sondas para un diagnóstico por la imagen de placas de amiloide. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos contra la región del extremo N (1-28) del amiloide  $\beta$  se unen a los ensamblajes de amiloide  $\beta$  formados *in vitro*, conduciendo a la desagregación de las fibrillas y a la restauración parcial de la solubilidad del amiloide  $\beta$ . También se ha encontrado que algunos de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el amiloide  $\beta$  (1-28) soluble inhiben la agregación fibrilar del péptido amiloide  $\beta$  *in vitro*. El éxito de estas pruebas, sin embargo, ha sido limitado debido a la dificultad de conseguir que estas moléculas grandes crucen la barrera hematoencefálica. Hasta la presente invención, el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades asociadas al amiloide han tenido poco éxito.

55 La presente invención comprende métodos y composiciones para diagnosticar y tratar enfermedades y procedimientos en los que interviene la formación de depósitos de amiloide anormales, tales como placas de amiloide. Un aspecto de la invención comprende métodos de administración de composiciones que comprenden una proteína de fusión en una dosis suficiente para detectar, y preferiblemente disolver, placas de amiloide. Otro aspecto comprende métodos para fabricar y usar composiciones que comprenden una vacuna o composiciones de antisueros. La presente invención es útil en detectar y tratar enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer. También es útil en detectar y tratar placas de amiloide en la demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandés) y en el complejo de Parkinson-demencia de Guam, y en otras enfermedades asociadas al amiloide.

65 La presente invención comprende además otros métodos y composiciones para prevenir o tratar enfermedades y procesos asociados a la amiloidosis. Un aspecto adicional de la invención comprende la administración de composiciones que comprenden una vacuna en una dosis suficiente para provocar una respuesta inmunitaria frente a epítomos amiloides, tales como proteínas o péptidos, particularmente los que se encuentran en placas, ovillos u otros depósitos. También comprende la administración de composiciones que comprenden antisueros dirigidos contra epítomos amiloi-

des o regiones inmunógenas, en una dosis suficiente para combatir la amiloidosis. Esta invención es particularmente útil para diagnosticar, prevenir y tratar enfermedades neurodegenerativas asociadas a los depósitos de amiloide, a las que también se hace referencia como enfermedades asociadas al amiloide, tales como enfermedad de Alzheimer, y otros trastornos asociados a la amiloidosis localizada, tales como la diabetes de tipo 2.

5 La presente invención está dirigida también a métodos para inhibir la producción de amiloidosis del tipo de Alzheimer en un mamífero, que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un péptido amiloide modificado capaz de provocar una respuesta inmunitaria, en los que la respuesta inmunitaria previene, dificulta o disminuye la cantidad de depósitos de amiloide. La mitigación de síntomas relacionados con la amiloidosis, seguido de  
10 la administración de derivados de péptidos amiloides, tales como los descritos en la presente invención, resulta de la estimulación de las respuestas inmunitarias apropiadas de modo que la acumulación o formación de los agregados de amiloide se modifica, retarda o impide de manera significativa.

15 Los trastornos o enfermedades asociadas al amiloide incluyen, pero no están limitados a, diabetes de tipo 2, amiloide A (reactivo), amiloidosis secundaria, poliserositis familiar recurrente, nefropatía amiloide familiar con urticaria y sordera (síndrome de Muckle-Wells), amiloide de cadena ligera lambda o amiloide de cadena ligera kappa (idiopático, mieloma o asociado a una macroglobulinemia), A beta 2M (hemodiálisis crónica), ATTR (polineuropatía amiloide familiar (portuguesa, japonesa, sueca), cardiomiopatía amiloide familiar (danesa), amiloide cardiaco aislado (amiloidosis senil sistémica), AIAPP o insulinoma de amilina, factor natriurético atrial (amiloide atrial aislado), procalcitonina  
20 (carcinoma medular de tiroides), gelsolina (amiloidosis familiar (finlandesa)), cistatina C (hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (islandesa)), AApo-A-I (polineuropatía amiloidótica familiar-Iowa), AApo-A-II (senescencia acelerada en ratones), sustancia amiloide asociada al fibrinógeno; y Asor o Pr P-27 (encefalopatía espongiiforme ovina, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, encefalopatía espongiiforme bovina), o en casos de personas que son homocigóticas para el alelo 4 de la apolipoproteína E.

#### 25 *Métodos y composiciones para vacunas*

Métodos y composiciones adicionales de la presente invención comprenden composiciones que comprenden al menos un péptido, fragmento o proteína modificados, preferiblemente suministrados en bicapas liposómicas tales  
30 como liposomas, que se usan en métodos para provocar una respuesta inmunitaria. Preferiblemente, estas respuestas inmunitarias son capaces de vencer la tolerancia inmunitaria a las proteínas "propias". Es deseable provocar tales respuestas inmunitarias frente a péptidos amiloides para tratar o prevenir la amiloidosis. Los productos de la respuesta inmunitaria se usan para afectar los depósitos de amiloide, preferiblemente solubilizando los agregados de amiloide. Los productos de la respuesta inmunitaria, que incluyen pero no están limitados a anticuerpos, antisueros, células  
35 estimuladas y factores celulares, y antígenos de naturaleza amiloidea modificada, péptidos, fragmentos o proteínas, están comprendidos en las composiciones de la presente invención.

Una realización preferida de la presente invención comprende composiciones de, y métodos para usar, un péptido modificado, preferiblemente  $A\beta_{1-16}$ , para provocar una respuesta inmunitaria. Los productos de la respuesta inmunitaria o la respuesta inmunitaria *in vivo* se usan para disolver o disolver parcialmente depósitos de amiloide. Es deseable provocar una respuesta inmunitaria frente al amiloide  $\beta$  1-16 ( $A\beta_{1-16}$ ). Un anticuerpo monoclonal, 6C6, desarrollado contra el mismo epítipo, el péptido amiloide  $\beta$  1-16, es capaz de solubilizar fibras y ovillos de amiloide  $\beta$  *in vitro*. Esta realización particular se refiere específicamente a la enfermedad de Alzheimer y trastornos asociados a agregados de  
45 amiloide  $\beta$ , pero esta invención incluye derivados de péptidos amiloides y su uso para provocar respuestas inmunitarias capaces de prevenir o dificultar trastornos asociados a la amiloidosis en general, y a enfermedades asociadas al amiloide.

Las composiciones preferidas comprenden péptidos que están modificados mediante unión covalente de restos, tales como restos lipófilos, tales restos son capaces de presentar el péptido en el exterior del agente de suministro, tal  
50 como por anclaje del péptido en la pared lipídica de un liposoma. Los métodos preferidos comprenden la administración en sujetos, tales como seres humanos, mamíferos u otros animales, por ejemplo, mediante inyección.

Las composiciones que comprenden liposomas con péptidos modificados se usan en métodos de vacunación y composiciones descritos en la presente invención, que comprenden antisueros que resultan de una respuesta inmunitaria a un antígeno, tienen utilidad terapéutica en el tratamiento de enfermedades asociadas al amiloide, preferiblemente  
55 EA. Las composiciones se administran preferiblemente al sujeto que tiene una enfermedad asociada al amiloide. Será evidente para los expertos en la técnica que pueden usarse vehículos, dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración y la concentración de las composiciones de vacuna o antisueros que se están administrando. Las composiciones de vacuna o antisueros pueden administrarse al sujeto mediante inyección (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular), o por otros métodos tales como infusión, para asegurar que la administración en el torrente sanguíneo es de una forma eficaz. Están incluidas vías adicionales de administración, para que se ejerzan los efectos  
60 terapéuticos locales así como los sistémicos.

Las dosis eficaces y métodos de administración para administrar las composiciones que comprenden las vacunas o antisueros pueden determinarse empíricamente, y tales determinaciones están dentro de la habilidad de un artesano. Los expertos en la técnica comprenderán que la dosis que se necesita depende del sujeto que recibe la proteína, la vía de administración, el tipo particular de antígeno peptídico usado y de otras sustancias que se están administrando, entre otras consideraciones.

Las composiciones de vacuna o antisueros pueden administrarse también al sujeto animal en combinación con cantidades eficaces de uno o más de otros agentes terapéuticos. Pueden administrarse de manera secuencial o al mismo tiempo con uno o más de los otros agentes terapéuticos. Las cantidades de composiciones de vacuna o antisueros y el agente terapéutico dependen del tipo de agentes terapéuticos usados, el trastorno que se está tratando, y el horario y vías de administración, entre otras consideraciones. Después de la administración de las composiciones de vacuna o antisueros al sujeto animal, se sigue el estado fisiológico del animal de varios modos bien conocidos por el médico experto.

Esta invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos, que no han de interpretarse de ningún modo como que imponen limitaciones a su alcance. A la inversa, ha de entenderse claramente que puede recurrirse a otras diversas realizaciones, modificaciones, y sus equivalentes que, después de leer la descripción en la presente invención, se les ocurran a los expertos en la técnica, sin apartarse del espíritu de la presente invención y/o el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

## 15 Ejemplos

### Ejemplo 1

#### 20 *Preparación de lisinas palmitoiladas para unas síntesis de péptidos en fase sólida*

Se usaron los siguientes métodos para preparar composiciones de vacunas. Se añadieron lisinas palmitoiladas a ambos extremos del péptido A $\beta$  1-16, para anclar el péptido amiloide  $\beta$  1-16 (A $\beta$ <sub>1-16</sub>) en la bicapa liposómica. Véase la figura 1.

Se adoptaron dos estrategias, y se sintetizaron dos tetrapalmitoil-péptidos por medio de un sintetizador de péptidos Applied Biosystems: 1) El extremo N tiene dos restos de palmitoil (es decir,  $\alpha,\epsilon$ -dipalmitoil-lisina), mientras que en el extremo C se insertaron de manera secuencial dos a-palmitoil-lisinas; 2) se insertan cuatro a-palmitoil-lisinas, dos en cada extremo. Para la síntesis automática en fase sólida del péptido, se protegió en el N el primer aminoácido, una a-palmitoil-lisina, y se ancló en la resina de alcohol 4-alcoxibencílico por medio de un enlace de éster. Se prefirió el grupo fluorenilmetoxi-carbonilo (Fmoc) como el grupo protector de la a-amina para la lisina y sus derivados. Los métodos para preparar tales componentes básicos son conocidos. Véanse las figuras 2a y b.

### Ejemplo 2

#### 35 *Anclaje de Fmoc-Lys(Pal) en la resina de alcohol alcoxibencílico*

Se hizo reaccionar la Fmoc-Lys(Pal)OH (de BACHEM) con la resina de alcohol alcoxibencílico (de BACHEM) en presencia de diciclohexilcarbodiimida (DCC, Aldrich) y dimetilaminopiridina (DMAP, Aldrich) en cloruro de metileno seco, recién destilado, conforme al método optimizado por G. Lu *et al.*, *J. Org. Chem.*, 46, 3433 (1981). Después de agitación durante tres horas a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró y se lavó a fondo diez veces con cloruro de metileno seco. Para asegurar una reacción completa, la resina obtenida se hizo reaccionar una vez más con una porción nueva de FmocLys(Pal)OH, en presencia de DCC y DMAP en cloruro de metileno seco, a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, después de filtración y lavado con cloruro de metileno, la resina se secó a vacío. El espectro de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) del producto muestra las bandas esperadas para el enlace de éster a 1720 cm<sup>-1</sup>, para el grupo NH a 3327 cm<sup>-1</sup> y para el grupo carbonilo de amida a 1626 cm<sup>-1</sup>. Todas estas bandas están ausentes en el espectro de FT-IR de la resina de alcohol alcoxibencílico de partida. La cantidad final fue de 227 mg con una carga de aproximadamente 0,5 mmoles/g. Véase la figura 6(c).

### 50 Ejemplo 3

#### *Síntesis en fase sólida*

Se añadió a la resina la segunda resina palmitoilada, por medio de FmocLys(Pal)OH después de la desprotección (retirada del grupo Fmoc). Luego, se llevaron a cabo 16 ciclos de síntesis para el amiloide  $\beta$ . Para fines de ensayos, se escindió luego una pequeña cantidad de este péptido de la resina, y se investigó mediante espectrometría de masas por electropulverización (ES-MS). La mezcla de reacción en bruto muestra la presencia de tres péptidos, siendo el componente principal el deseado, con picos a 896,9, 673,0 y 538,0 Da, que corresponden a los iones moleculares cargados +3, +4 y +5, respectivamente. El ión molecular está ausente en el espectro, pero puede inferirse de esta serie a 2687,86 Da. Los otros dos componentes corresponden a péptidos con una o dos lisinas palmitoiladas menos (diferencia de masas de 367 Da), con iones moleculares que se infieren a 2321,43 y 1953,87 Da. Esto indica que el acoplamiento de FmocLys(Pal)OH fue incompleto.

La  $\alpha,\epsilon$ -dipalmitoil-lisina se acopló al resto de la resina sin escindir. Incluso tiempos prolongados de acoplamiento (durante la noche a temperatura ambiente) dejaron material sin reaccionar (ensayo de la ninhidrina) debido a la baja solubilidad en DMF de la lisina dipalmitoilada. Después de la escisión de la resina, el espectro de ES-MS muestra que el tetrapalmitoil-péptido (M<sup>+</sup> = 3292,43) está presente solamente en aproximadamente 20%.

## ES 2 330 082 T3

En un segundo experimento, para evitar el acoplamiento lento con  $\alpha,\varepsilon$ -dipalmitoil-lisina, después de completarse los 16 ciclos que aprehendieron los restos de amiloide  $\beta$  en las dos primeras palmitoil-lisinas, se insertaron dos palmitoil-lisinas secuenciales al final, llevándose a cabo el acoplamiento dos veces para cada una. El espectro de ES-MS después de la escisión de la resina (con ácido trifluoroacético (TFA)) muestra los picos deseados del tetrapalmitoil-péptido como el M4+ a 855,4 Da y el M5+ a 05,4 que correspondían a un ión molecular de 3421,65. Este péptido equivale a aproximadamente 35% de la mezcla, siendo el principal componente un péptido con dos restos menos de Lys(Pal) (M+ a 2688,58 Da). Un componente secundario tenía un resto más ausente (M+ a 2560,42 Da).

La mezcla de péptidos estaba compuesta del péptido tetrapalmitoilado deseado y de péptidos a los que faltaban restos de palmitoil, haciendo de este modo la doble inserción en los liposomas improbable. Por lo tanto, se decidió usar las mezclas para la preparación de liposomas.

### Ejemplo 4

#### Preparación de $\alpha,\varepsilon$ -dipalmitoil-lisina

La palmitoilación directa de lisina con cloruro de palmitoil en una reacción de Schotten-Baumann con hidróxido sódico acuoso, a una escala de 20 g, condujo a un material que contenía cantidades apreciables de ácido palmítico y que no pudo separarse de la  $\alpha,\varepsilon$  dipalmitoil-lisina deseada. Tuvo que adoptarse un método indirecto siguiendo los procedimientos de H. Kiwada, *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 2935-39 (1987); Y. Lapidat, *et al.*, *J. Lipid Res.*, 9, 142-44 (1967).

El éster de palmitoil de la N-hidroxisuccinimida se sintetizó en primer lugar a partir de ácido palmítico (Fluka), N-hidroxisuccinimida (Aldrich), en presencia de DCC (Aldrich) en acetato de etilo con un rendimiento de 77%. Este éster activado se hizo reaccionar posteriormente con la sal sódica de lisina en tetrahydrofurano acuoso. El producto en bruto obtenido después de la filtración y lavado con agua contenía todavía algo de éster activado sin reaccionar, como lo demuestran los espectros de RMN de protón y de masas con bombardeo con átomos rápidos (FAB). La recristalización con cloroformo proporcionó una muestra pura de 640 mg. Su espectro de masas FAB muestra el pico esperado a 623 Da (MH+) y la ausencia del pico para el éster activado (354 Da). Véanse las figuras 3 y 4.

### Ejemplo 5

#### Reconstitución de los péptidos palmitoilados en liposomas

Se usaron liposomas con lípido A como auxiliares, en un intento de romper la tolerancia inmunitaria del ratón a A $\beta$  1-16. Se prepararon mezclando dimiristoil-fosfatidilcolina, dimiristoil-fosfatidil-glicerol, y colesterol (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, EE.UU.) en razones molares de 0,9, 0,1:0,7. Se añadió lípido A monofosforilado, un inmunomodulador fuerte (IASL Biologicals, Campbell, CA, EE.UU.) en una concentración de 40 mg por mmol de fosfolípidos. Tosi *et al.*, *Biochem. Mophys. Res. Com.*, 212, 494-500 (1995). Los péptidos palmitoilados se añadieron con una razón molar con relación a los fosfolípidos de 1:100 y 1:200. Los disolventes se evaporaron. La película resultante, después de hidratación con disolución salina tamponada con fosfato estéril (PBS, pH 7,4) con una concentración final de fosfolípidos de 4 mM, se homogeneizó adicionalmente mediante agitación orbital. La suspensión de liposomas se mezcló con Alum estéril 15 minutos antes de la inyección (9:1 vol:vol, Rehydrogel, HYA, Rebeis Inc, Berkley Heights, NJ).

### Ejemplo 6

#### Inmunización de ratones

Se inmunizaron ocho ratones BALB/c (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, EE.UU.) mediante 6 inoculaciones i.p. en intervalos de dos semanas, con 200  $\mu$ l de la suspensión del péptido palmitoilado-liposoma/Alum. Un grupo de 3 ratones fue inmunizado conforme al mismo protocolo sólo con PBS/Alum. Otro grupo de 3 ratones fue inmunizado conforme a este protocolo, con fosfolípidos 4 mM en PBS y Alum, sin A $\beta$  1-16 palmitoilado. Se recogió sangre de la vena de la cola 4 días después de la inyección. La sangre recogida (10-30  $\mu$ l) se diluyó inmediatamente con 10  $\mu$ l de PBS y 5  $\mu$ l de heparina. Las muestras se centrifugaron, se retiró el suero, y se ensayaron en un análisis ELISA.

Un segundo grupo de 19 ratones transgénicos (NORBA, Hoechst Marion Roussel, Bridgewater, NJ) de diferentes edades, presentaban de manera constitutiva placas de amiloide  $\beta$  en sus páncreas. Fueron inmunizados usando el mismo protocolo descrito anteriormente. Antes de ser sacrificados, los ratones NORBA inmunizados recibieron una 5ª inmunización. Se recogió sangre, y se analizó para detectar anticuerpos anti-amiloide  $\beta$  en un análisis ELISA.

Además, 12 ratones B57131/6 fueron inmunizados como se ha descrito anteriormente. En este grupo se usaron para inyección liposomas y amiloide  $\beta$  (1-16) palmitoilado, liposomas; mezclados con amiloide  $\beta$  (42-1) "scrambled" y liposomas. Se añadió Alum como anteriormente. Como testigos adicionales, se inmunizaron 3 ratones con liposomas y amiloide  $\beta$  (1-16) palmitoilado, pero sin Alum. Se recogió sangre, y se ensayó como se ha descrito.

## ES 2 330 082 T3

### Ejemplo 7

#### Experimentos ELISA (enzimoinmunoanálisis de absorción)

5 Se revistieron placas para microvaloración con 50  $\mu$ l de disolución de amiloide  $\beta$  1-28 (1 mg/ml), durante la noche a 40°C. Siguió el bloqueo de los pocillos con 200  $\mu$ l de seroalbúmina bovina (BSA)/PBS (BSA al 0,5%) durante dos horas a 37°C, antes de lavar con 200  $\mu$ l de PBS/Tween 20 al 0,005%.

10 Se incubaron diversas diluciones de suero (1:100-1:100.000) durante 2 horas a 37°C. Las placas se lavaron luego dos veces con 200  $\mu$ l de PBS/Tween 20 al 0,005%, antes de añadir 50  $\mu$ l de un anticuerpo caprino anti-ratón (conjugado con fosfatasa alcalina) en una dilución 1:30.000. Después de 2 horas a 37°C, los pocillos se lavaron como se ha descrito anteriormente. Luego, se añadieron 100  $\mu$ l del sustrato (pNPP, fosfato de p-nitrofenilo, 1 comprimido en 5 ml de agua destilada), y se determinó la absorción a 405 nm mediante un lector de ELISA 30-60 min más tarde.

15 Después de la tercera inyección con liposomas/amiloide  $\beta$  (1-16) palmitoilado, los análisis ELISA mostraron una respuesta inmunitaria significativa en los ratones Balb/c vacunados. Los anticuerpos fueron específicos para el antígeno inyectado. Las  $DO_{405}$  de las diluciones 1:5000 de los sueros recogidos fueron de 10 a 20 veces superiores a las de los testigos, que fueron diluciones de ratones sin tratar. De este modo, este procedimiento de inmunización provocó una respuesta inmunitaria frente a  $A\beta$  1-16 en ratones. No se detectó respuesta inmunitaria en los ratones que habían  
20 recibido las inmunizaciones testigo.

Se usó el mismo protocolo de inmunización para la inoculación de ratones transgénicos NORBA, para estudiar la unión a, y posiblemente la disolución de, placas de amiloide  $\beta$  en sus páncreas *in vivo*. Se inmunizaron 19 ratones transgénicos (NORBA, Hoechst Marion Roussel, Bridgewater, NJ) de diferentes edades, que presentaban de manera  
25 constitutiva placas de amiloide  $\beta$  en sus páncreas. Antes de ser sacrificados, los ratones NORBA inmunizados recibieron una séptima inmunización. Se recogió sangre, y se analizó para detectar anticuerpos anti-amiloide  $\beta$  en un análisis ELISA. En las diluciones 1:5,000 de los sueros, la  $DO_{405}$  fue 10 veces superior a la de los testigos. Los ratones NORBA testigos no mostraron ningún anticuerpo anti- $A\beta$  en sus sueros. El tercer grupo de ratones C57B1/6 inmunizados que recibieron  $A\beta$  1-16 así como el  $A\beta$  42-1 "scrambled" y como testigos, liposomas sin péptido, alcanzó un valor  
30 cuantitativo diez veces superior en una dilución 1:10,000 de los sueros frente a los testigos. Véanse las tablas 1 y 2.

TABLA 1

*ELISA de sueros de ratones Balb/c y C57B1/6 inmunizados*

Antígeno	amiloide $\beta$ (1-16) Palm./ liposomas, lípido A en C57B1/6	amiloide $\beta$ (42-1) "scrambled"/ liposomas, lípido A	liposomas, lípido A	amiloide $\beta$ (1-16) Palm./ liposomas, lípido A en Balb/c	animal sin tratar Balb/c
10000*	0,16	0,06	0,011	-	-
5.000	0,22	0,01	0,012	0,22	0,01
2500	0,46	0,024	0,060	0,30	0,04
1000	0,61	0,011	0,041	0,31	0,03
500	0,99	0,044	0,039	0,46	0,04
100	-	-	-	0,60	0,03

Dilución para  $DO_{405}$ : 1-\* anticuerpo secundario: anticuerpo caprino anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina. Sustrato (pNPP)- fosfato de p-nitrofenilo. El análisis se llevó a cabo después de la 3. (C57BV6) y después de la 4.

(Balb/c) inyección de refuerzo. Se inyectaron 3 animales para cada antígeno/auxiliares.

## ES 2 330 082 T3

TABLA 2

*Respuesta inmunitaria en ratones inoculados con amiloide  $\beta$  (1-16) palmitoilado, amiloide  $\beta$  (42-1) "scrambled" en combinación con liposomas/lípido A y Alum y liposomas sin amiloide*

5

10

15

20

Antígeno	A $\beta$ 1-16 Palm.	A $\beta$ 42-1	Fosfolípidos
Número de ratones C57B1/6 con un valor positivo en una dilución 1:10000 de sueros	2/3 después de 5 inyecciones	0/3	0/3
Número de ratones Balb/c con un valor positivo en una dilución 1:5000 de sueros	3/3 después de 4 inyecciones		0/3
Número de ratones NORBA transgénicos con un valor positivo en una dilución 1:5000 de sueros	7/9 (Aventis) después de 7 inyecciones		
*La DO405 fue diez veces la de los testigos (sólo fosfolípidos)			

### Ejemplo 8

25

#### *Investigación patológica de los ratones C57B1/6 inmunizados*

Los ratones C57B1/6 inmunizados fueron sometidos a una investigación patológica después de que hubo finalizado el procedimiento de inmunización. Se analizaron cortes de riñón, hígado, médula ósea, páncreas, bazo, y cerebro.

30

### Ejemplo 9

#### *Investigación inmunohistoquímica del páncreas de ratones NORBA vacunados.*

35

40

45

Fueron inmunizados 23 ratones NORBA de diferentes edades con A $\beta$  (1-16) palmitoilado reconstituido en liposomas, con animales amiloide- $\beta$ -positivos y amiloide- $\beta$ -negativos, como se ha descrito (19 ratones), o sólo con liposomas (4 ratones). Estos animales tenían las placas de amiloide  $\beta$  en el páncreas en vez de en el cerebro. Los ratones vacunados se sacrificaron después de la 7<sup>a</sup> inyección, se recogieron sus páncreas y se conservaron en formalina. Los fragmentos de páncreas conservados se sumergieron en una disolución de sacarosa para prepararlos para cortes congelados. Los cortes delgados obtenidos se analizaron mediante tioflavina T, un colorante fluorescente específico para tinción de agregados de amiloide  $\beta$  (Vassar y Culling, 1959), para detectar amiloide  $\beta$  en la superficie del páncreas. Los cortes se analizaron también usando anticuerpo anti amiloide  $\beta$  marcado con FITC (Accurate Chemical Co., Westbury, CT). La unión de los "autoanticuerpos" de ratón a las placas de amiloide  $\beta$  se analizó con anticuerpos de conejo contra la IgG de ratón, marcados con FITC.

50

55

Se llevó a cabo un estudio histológico de cortes de páncreas teñidos con tioflavina T de ratones transgénicos NORBA, vacunados con A $\beta$  (1-16) palmitoilado reconstituido en liposomas. El tejido pancreático teñido de un animal amiloide- $\beta$ -negativo mostró una fluorescencia de fondo débil y difusa con algunas manchas brillantes que representaban vasos. Las células acinares eran completamente oscuras. Un animal de 18 meses de edad con placas de amiloide  $\beta$  completamente desarrolladas mostró una fluorescencia intensa por todas las partes de los campos de las células acinares. También hubo áreas fluorescentes muy brillantes que indicaban vasos sanguíneos más grandes. Un ratón de 18 meses de edad con placas de amiloide  $\beta$  completamente desarrolladas, que fue vacunado y examinado 4 meses después de la primera inoculación, mostró áreas focales (zonas localizadas) de fluorescencia entre células acinares, pero de modo predominante muchas zonas localizadas de células acinares no fluorescentes. Los resultados mostraron que la vacunación o disgregó las placas de amiloide  $\beta$  o anulaban su depósito.

60

La evaluación cuantitativa de la intensidad de fluorescencia media en cada corte teñido con tioflavina usando un programa informático de análisis de luminosidad, indicó que los cortes de páncreas de animales NORBA vacunados de 19 meses de edad mostraron menos de 25% de la fluorescencia de gran intensidad que los mismos animales sin vacunar. Un muestreo de estas cuantificaciones se muestra en la tabla 3.

65

TABLA 3

Tanto por ciento de intensidades de fluorescencia en cortes pancreáticos teñidos con tioflavina de ratones NORBA, vacunados y sin vacunar

Animal	% de alta intensidad	% de intensidad intermedia	% de baja intensidad
Ratón testigo A $\beta$ <sup>-</sup>	0	11,65 +/-1,6	88,5+/-9,1
Ratón de 18 meses de edad sin vacunar A $\beta$ <sup>+</sup>	3,271+/-0,3	34,62+/-3,5	62,11+/-6,1
Ratón de 18 meses de edad vacunado A $\beta$ <sup>+</sup>	0,74+/-0,07	34,63 +/- 3,5	64,63 +/-6,4

5

10

15

20

25

Cada valor es la media de 5 recuentos. Resulta que la vacunación reduce notablemente (más de 70%) la fluorescencia de alta intensidad en los cortes de páncreas teñidos con tioflavina de los ratones transgénicos NORBA que desarrollaron completamente placas de amiloide  $\beta$ . La fluorescencia de intensidad intermedia y baja, que es inespecífica ya que también es detectada en los testigos negativos, permanece inalterada tras la vacunación. No hay una alta intensidad de fluorescencia en los testigos negativos.

30

35

Se llevaron a cabo experimentos *in vitro* para investigar el mecanismo mediante el cual los “autoanticuerpos” disgregan las placas. Se prepararon agregados de amiloide  $\beta$  usando la secuencia A $\beta$  (1-28), incubando durante 7 días a 37°C en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH=7,1. Esta es la secuencia usada para la inmunización de los ratones. Estos depósitos fueron detectables por tinción con tioflavina T (“Th T”). Th T tiñe depósitos de tipo amiloide, y muestra una emisión de fluorescencia intensificada a 482 nm, y un nuevo pico de excitación a 450 nm cuando se añade a una suspensión de preparaciones de hojas  $\beta$  agregadas (Solomon *et al.*(1997) PNAS 94, 4109-4112). La figura 5 muestra de manera comparativa la desagregación de fibras de amiloide  $\beta$  mediante el anticuerpo monoclonal 6C6, y mediante sueros de ratones inmunizados con A $\beta$  (1-16) palmitoilado reconstituido en liposomas.

40

45

Resulta que ambos anticuerpos tienen propiedades solubilizantes, pero los anticuerpos monoclonales tienen un efecto significativamente más fuerte que el suero de los ratones inmunizados, que contiene anticuerpos policlonales.

Cualquier patente u otra publicación mencionada en esta memoria descriptiva son indicativas de los niveles de los expertos en la técnica con la que está relacionada. Un experto en la técnica apreciará fácilmente que la presente invención se adapta bien para llevar a cabo los objetos, y obtener los fines y ventajas mencionados y los intrínsecos. Los presentes ejemplos junto con los métodos, procedimientos, tratamientos, composiciones, y compuestos específicos descritos en la presente invención, son representativos actualmente de realizaciones preferidas, y no tienen la finalidad de limitar el alcance de la invención. Los expertos en la técnica conocerán o serán capaces de descubrir muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en los ejemplos anteriores, usando solamente experimentos habituales.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende al menos un péptido amiloide  $\beta$  1-16 palmitoilado anclado en una bicapa liposómica.
2. La composición conforme a la reivindicación 1, en la que la capa liposómica es un liposoma.
- 10 3. La composición conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el resto de palmitoilo es una lisina palmitoilada.
4. La composición conforme a la reivindicación 3, en la que las lisinas palmitoiladas se añaden al extremo C del péptido amiloide  $\beta$  1-16.
- 15 5. La composición conforme a la reivindicación 4, en la que se añaden dos lisinas palmitoiladas al extremo C del péptido amiloide  $\beta$  1-16.
6. La composición conforme a la reivindicación 3, en la que las lisinas palmitoiladas se añaden al extremo N del péptido amiloide  $\beta$  1-16.
- 20 7. La composición conforme a la reivindicación 6, en la que se añaden dos lisinas palmitoiladas al extremo N del péptido amiloide  $\beta$  1-16.
8. La composición conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 6, en la que las lisinas palmitoiladas se añaden al extremo C y al extremo N del péptido amiloide  $\beta$  1-16.
- 25 9. La composición conforme a una cualquier de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el péptido amiloide  $\beta$  1-16 palmitoilado comprende cuatro restos de palmitoilo.
10. La composición conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que se añaden dos lisinas palmitoiladas al extremo C del péptido amiloide  $\beta$  1-16, y se añaden dos lisinas palmitoiladas al extremo N del péptido amiloide  $\beta$  1-16.
- 30 11. Una composición farmacéutica que comprende una composición conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y un vehículo.
- 35 12. Un medicamento que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 40 13. Uso de una composición conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para fabricar un medicamento para el tratamiento de enfermedades asociadas al amiloide.
14. Uso conforme a la reivindicación 13, en la que la enfermedad asociada al amiloide es la enfermedad de Alzheimer.
- 45 15. Uso conforme a la reivindicación 13, en el que las enfermedades asociadas al amiloide comprenden diabetes de tipo 2, amiloide A (reactivo), amiloidosis secundaria, poliserositis familiar recurrente, nefropatía amiloide familiar con urticaria y sordera (síndrome de Muckle-Wells), amiloide de cadena ligera lambda o amiloide de cadena ligera kappa (idiopático, mieloma o asociado a una macroglobulinemia), A beta 2M (hemodiálisis crónica), ATTR (polineuropatía amiloide familiar (portuguesa, japonesa, sueca), cardiomiopatía amiloide familiar (danesa), amiloide cardiaco aislado (amiloidosis senil sistémica), AIAPP o insulinoma de amilina, factor natriurético atrial (amiloide atrial aislado), procalcitonina (carcinoma medular de tiroides), gelsolina (amiloidosis familiar (finlandesa)), cistatina C (hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (islandesa)), AApo-A-I (polineuropatía amiloidótica familiar-Iowa), AApo-A-II (senescencia acelerada en ratones), sustancia amiloide asociada al fibrinógeno; y Asor o Pr P-27 (encefalopatía espongiiforme ovina, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, encefalopatía espongiiforme bovina), y personas que son homocigóticas para el alelo 4 de la apolipoproteína E.
- 50
- 55
- 60
- 65



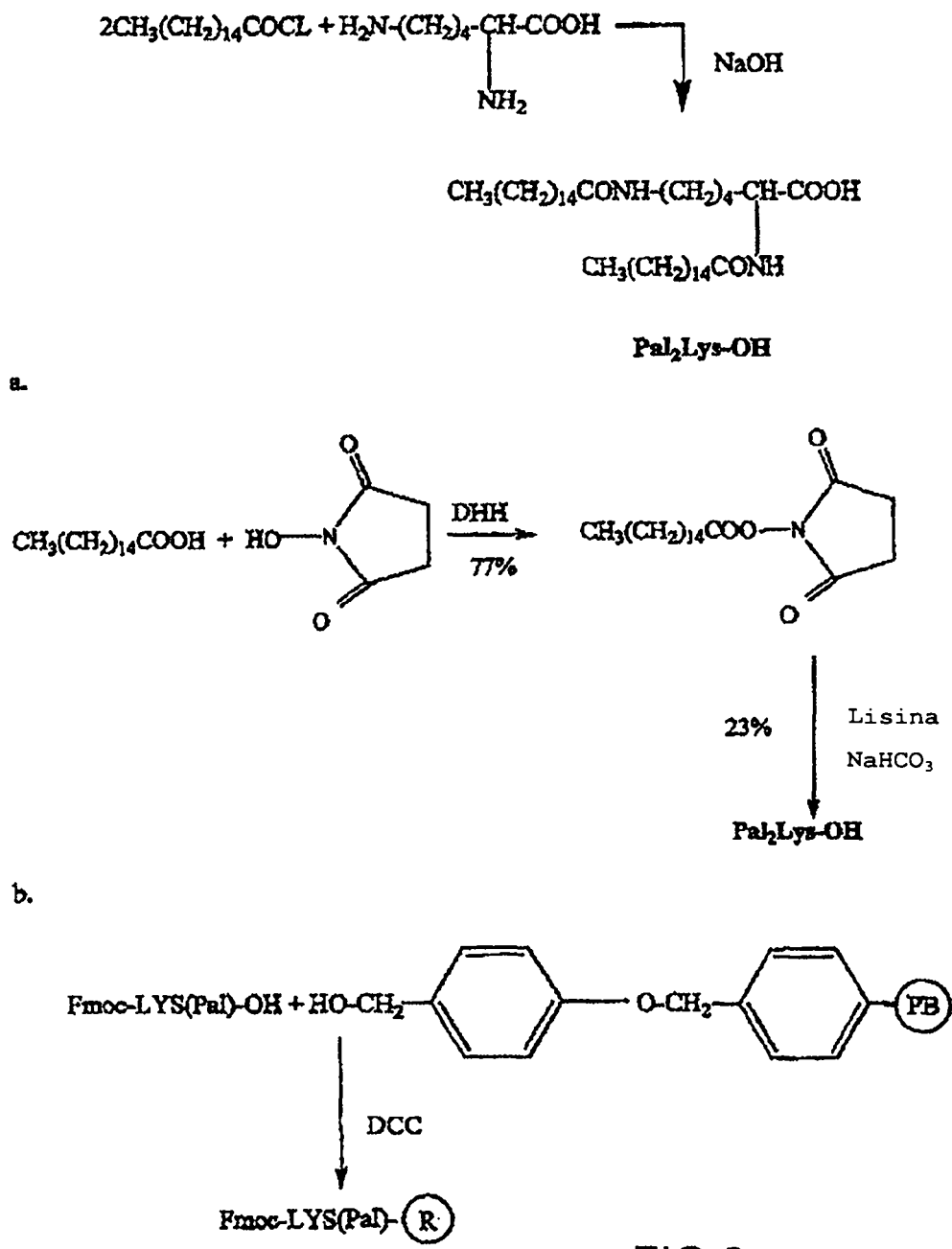


FIG.2

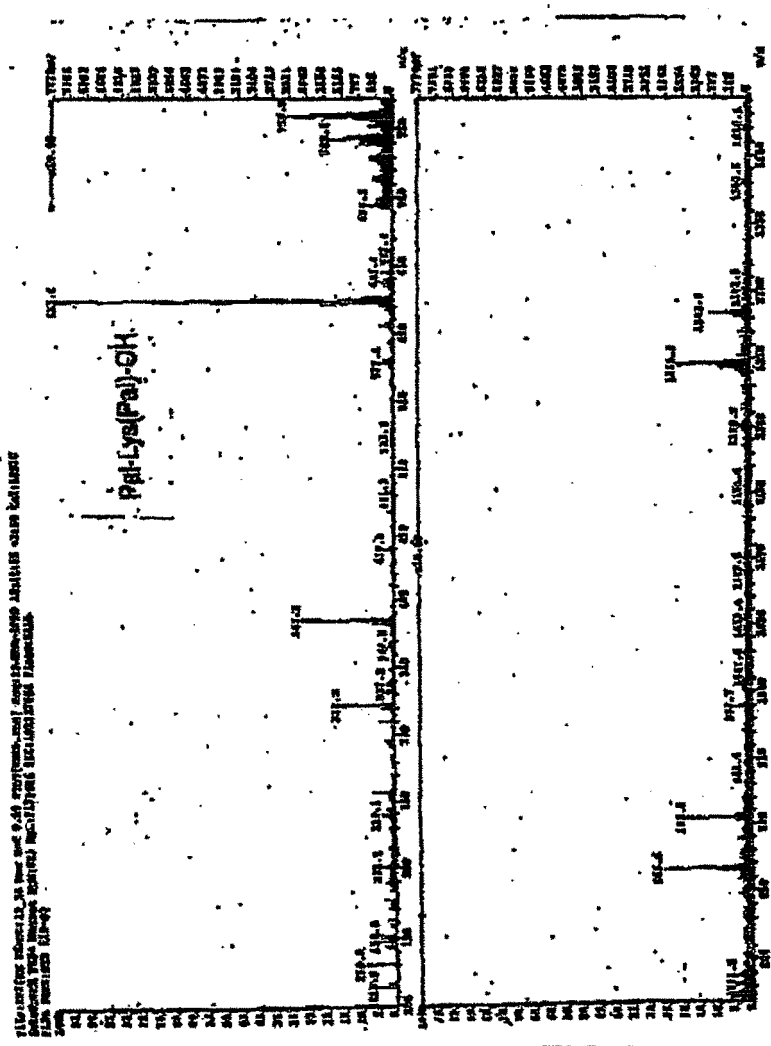


FIG.3

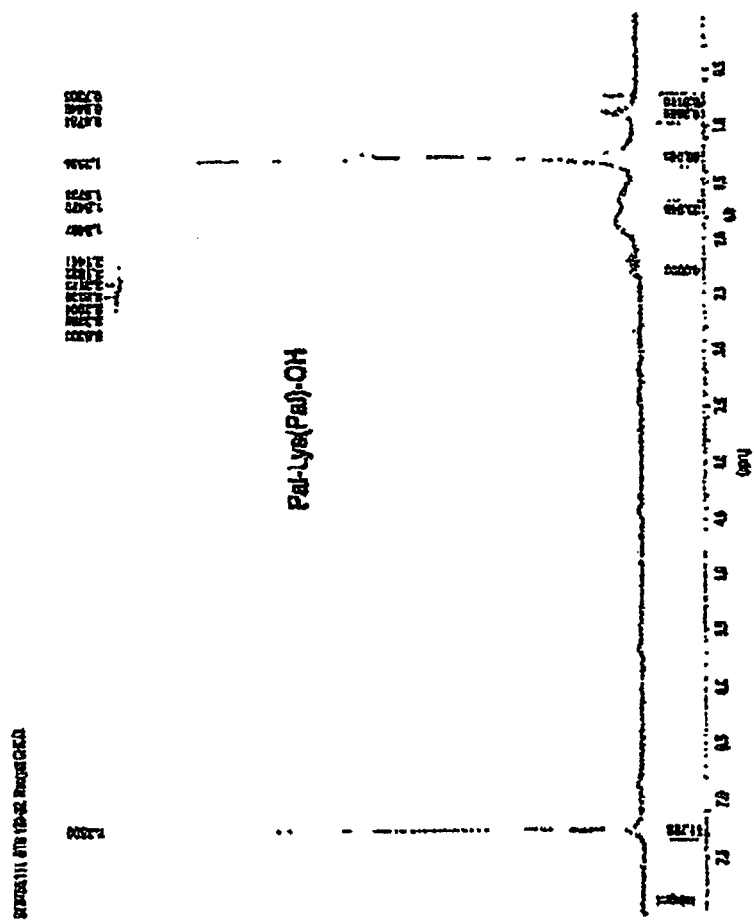


FIG.4

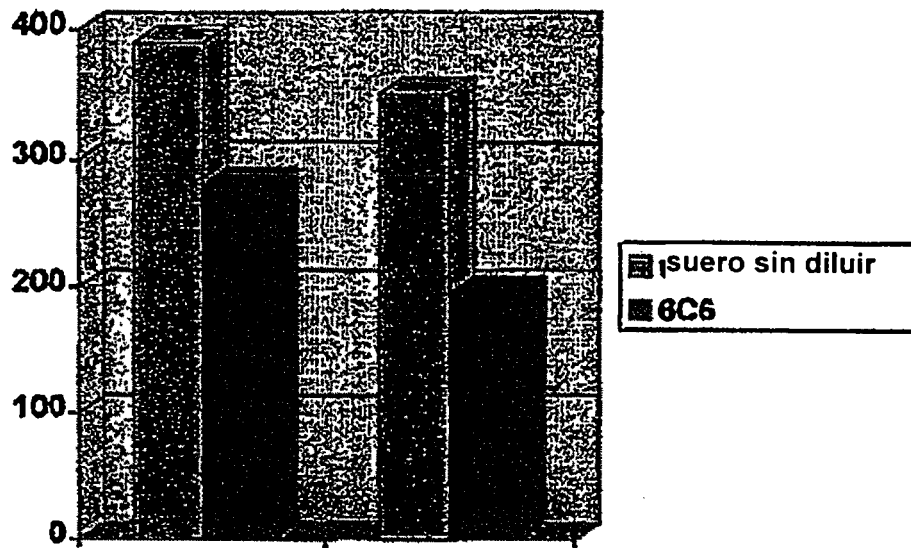


FIG.5

# ES 2 330 082 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Aventis Pharma S.A.

5 <120> Métodos y composiciones para enfermedades asociadas con la amiloidosis

<130> 14723-0112WP 49055-263528

10 <150> US 60/255,033

<151> 2000-12-12

<150> US 60/230,391

15 <151> 2000-09-06

<160> 3

20 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 333

25 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Anticuerpo monoclonal 6C6 sintético

<220>

35 <221> CDS

<222> (1)..(333)

<223>

40 <400> 1

	atg gat gtg ctc atg acc cag acg ccg ctc agc ctg ccg gtg agc ctg	48
	Met Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu	
	1 5 10 15	
45	ggc gat cag gcg agt att tct tgc cgt tcc agc cag aac att atc cat	96
	Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Ile His	
	20 25 30	
50	agc aac ggc aat acc tat ctg gaa tgg tac ctg cag aaa ccc ggc cag	144
	Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln	
	35 40 45	
55	agc ccg aaa ctg ctg att tat aaa gtg agc aac cgc ttt agc ggt gtg	192
	Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val	
	50 55 60	
60	ccg gat cgt ttt agc ggc agt ggt agc ggc acc gat ttt acc ctg aaa	240
	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys	
	65 70 75 80	
65	att aaa aag gtg gaa gcg gaa gat ctg ggc att tat tat tgc ttt caa	288
	Ile Lys Lys Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln	
	85 90 95	
65	ggg agc cat gtg ccg ctg acc ttt ggc gcg ggc acc aaa ctc gag	333
	Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu	
	100 105 110	

ES 2 330 082 T3

<210> 2

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Murinae gen. sp.

<400> 2

10 Met Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu  
 1 5 10 15

15 Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Ile His  
 20 25 30

20 Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45

25 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val  
 50 55 60

30 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys  
 65 70 75 80

35 Ile Lys Lys Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln  
 85 90 95

40 Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu  
 100 105 110

<210> 3

<211> 209

<212> DNA

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido sintético

50

<400> 3

55 agatctgata cgcgaaatt aatagcactc actatagggg aattgtgagc ggataacaat 60  
 tccctctag aaataatttt gtttacttta agaaggagat ataccatggc tagcatgact 120  
 ggtggacagc aaatgggtcg gatccgaatt cgagctccgt cgacaagctt gcggccgcac 180  
 60 tcgagcacca ccaccaccac caccactga 209

65

## ES 2 330 082 T3

### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Aventis Pharma S.A.

5

<120> Métodos y composiciones para enfermedades asociadas con la amiloidosis

<130> 14723-0112WP 49055-263528

10

<150> US 60/255,033

<151> 2000-12-12

15

<150> US 60/230,391

<151> 2000-09-06

<160> 3

20

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

25

<211> 333

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Anticuerpo monoclonal 6C6 sintético

<220>

35

<221> CDS

<222> (1)..(333)

<223>

40

45

50

55

60

65

ES 2 330 082 T3

<400> 1

5 atg gat gtg ctc atg acc cag acg ccg ctc agc ctg ccg gtg agc ctg  
48  
Met Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu  
1 5 10 15

10 ggc gat cag gcg agt att tct tgc cgt tcc agc cag aac att atc cat  
96  
Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Ile His  
15 20 25 30

20 agc aac ggc aat acc tat ctg gaa tgg tac ctg cag aaa ccc ggc cag  
144  
Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45

25 agc ccg aaa ctg ctg att tat aaa gtg agc aac cgc ttt agc ggt gtg  
192  
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val  
30 50 55 60

35 ccg gat cgt ttt agc ggc agt ggt agc ggc acc gat ttt acc ctg aaa  
240  
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys  
65 70 75 80

40 att aaa aag gtg gaa gcg gaa gat ctg ggc att tat tat tgc ttt caa  
288  
Ile Lys Lys Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln  
45 85 90 95

50 ggt agc cat gtg ccg ctg acc ttt ggc gcg ggc acc aaa ctc gag  
333  
Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu  
100 105 110

55 <210> 2

<211> 111

<212> PRT

60 <213> Murinae gen. sp.

65

ES 2 330 082 T3

<400> 2

5 Met Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu  
1 5 10 15

10 Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Ile His  
20 25 30

15 Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45

20 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val  
50 55 60

25 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys  
65 70 75 80

30 Ile Lys Lys Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln  
85 90 95

35 Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu  
100 105 110

<210> 3

<211> 209

40 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Plásmido sintético

<400> 3

50 agatctgatc ccgcgaaatt aatcagactc actatagggg aattgtgagc ggataacaat  
60

55 tcccctctag aaataatddd gtttacttta agaaggagat ataccatggc tagcatgact  
120

60 ggtggacagc aaatgggtcg gatccgaatt cgagctccgt cgacaagctt gcggccgcac  
180

65 tcgagcacca ccaccaccac caccactga  
209