

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

ABOGADOS

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ L. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-054157- -00006-0000

Fecha: 2012-10-22 16:25:06 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 23

Re: PI.-AC IMMUNE SA.-Solicitud de Patente de Invención en Fase Nacional PCT para "MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA USO TERAPÉUTICO Y DIAGNÓSTICO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES Y TRANSTORNOS CAUSADOS POR O ASOCIADOS CON AMILOIDE O PROTEÍNAS SIMIL AMILOIDE".-Clase A61K 39/00.-Expediente número 08-054.157.-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista de 8 de Junio de 2012 y a mi memorial solicitando plazo de Septiembre 5 de 2012.

2. Con el fin de responder las objeciones expuestas por el Señor Examinador en su Concepto Técnico correspondiente al Oficio No. **10015**, en relación con la reclamación de materia exceptuada de patentabilidad, la presencia de Reivindicaciones relativas a Usos, la Claridad del capítulo reivindicatorio, la Unidad de Invención, y el Nivel Inventivo de la presente solicitud, me permito dirigir su atención a las siguientes modificaciones y argumentos técnicos por medio de los cuales no sólo se superan completamente dichas objeciones sino que además se establece de manera incontrovertible la patentabilidad de la solicitud en estudio.

3. **CAPÍTULO REIVINDICATORIO.**

Con respecto al capítulo reivindicatorio actualmente presentado, el Señor Examinador señala que este no sería claro toda vez que se reclama un método sin hacer referencia a pasos específicos, y se busca proteger un anticuerpo que no estaría inequívocamente definido.

Tomando en consideración estas objeciones me permito manifestar que es deseo del solicitante presentar **un nuevo capítulo reivindicatorio**, que reemplaza al anterior, el cual se refiere de forma clara y concisa a realizaciones preferidas de la invención en concordancia con las revelaciones de la descripción de la solicitud.

En conexión con el mencionado nuevo capítulo reivindicatorio me permito resaltar que este no se constituye de ninguna manera en una ampliación al alcance de la invención, tal como fue originalmente presentada, toda vez que este se refiere a realizaciones particulares de la invención de acuerdo con las enseñanzas de la descripción, tal como se expone a continuación:

- **Reivindicación 1.** Tiene como base la reivindicación 1 actualmente presentada, modificada para clarificar los pasos del método de la invención en concordancia con lo revelado en la página 74 y en el ejemplo 1 de la página 82 de la descripción de la solicitud.
- **Reivindicaciones 2 a 18.** Corresponden respectivamente a las reivindicaciones 2 a 18 actualmente presentadas.
- **Reivindicación 19.** Tiene como base la reivindicación 24 actualmente presentada, modificada de acuerdo con la nueva reivindicación 1.
- **Reivindicaciones 20 a 32.** Se basan respectivamente en las reivindicaciones 25 a 37 actualmente presentadas donde su dependencia se ha hecho congruente con la nueva numeración.
- **Reivindicaciones 33 y 34.** Tienen como base la reivindicación 38 actualmente presentada.
- **Reivindicaciones 35 a 46.** Se basan en las reivindicaciones 39 a 50 actualmente presentadas donde su dependencia se ha hecho congruente con la nueva numeración.
- **Reivindicación 47.** Tiene como base la reivindicación 109 actualmente presentada, incluyendo las características particulares del anticuerpo reclamado que son reveladas en las páginas 30 y 108 de la descripción de la solicitud.

De esta forma, el nuevo capítulo reivindicatorio está constituido por **47 reivindicaciones** que se refieren de manera clara y concisa a realizaciones preferidas de la presente solicitud.

Con respecto al mencionado nuevo capítulo reivindicatorio, me permito señalar que este es totalmente claro al reclamar los métodos, las composiciones y el anticuerpo de la presente invención, superando así completamente las objeciones presentadas por el Señor Examinador a este respecto y por lo tanto dicho capítulo se

enmarca completamente dentro de lo preceptuado en el Artículo 30 de la Decisión Andina 486 de 2000.

4. **EXCEPCIÓN A LA PATENTABILIDAD.**

De otra parte, el Señor Examinador indica que las reivindicaciones 51 a 63 y 85 a 106 actualmente presentadas no son patentables dado que se refieren a métodos de tratamiento.

Sobre este particular me permito señalar que, como se expuso en el numeral anterior del presente memorial, en virtud del nuevo capítulo reivindicatorio las mencionadas reivindicaciones 51 a 63 y 85 a 106 han sido **eliminadas** de la reclamación y ninguna de las nuevas reivindicaciones está dirigida a métodos de tratamiento.

5. **REIVINDICACIONES RELATIVAS A USOS.**

De manera similar, el Señor Examinador objeta las reivindicaciones 78 a 84, 107 y 108 actualmente presentadas, toda vez que estas reclaman usos de los compuestos de la invención.

En este sentido, me permito resaltar que las señaladas reivindicaciones 78 a 84, 107 y 108 fueron **eliminadas** y no hacen parte del nuevo capítulo reivindicatorio adjunto al presente memorial.

6. **UNIDAD DE INVENCION.**

De otra parte, el Señor Examinador señala que la solicitud en estudio carecería de unidad de invención, dado que según su opinión esta se refiere al menos a tres grupos inventivos según sea el fragmento de péptido β -amiloide involucrado o los componentes adicionales de la composición.

A este respecto me permito resaltar que **el nuevo capítulo reivindicatorio anexo al presente memorial se refiere en particular a métodos para obtener el fragmento de péptido β -amilode que consiste de una porción sencilla o repetitiva de 13-15 residuos de la parte N-terminal y a composiciones de vacunas que comprenden la construcción de este péptido, por lo que todo el mencionado nuevo capítulo reivindicatorio está cobijado bajo el mismo concepto inventivo.**

Consecuentemente, el resaltado nuevo capítulo reivindicatorio se ajusta completamente a las exigencias del Artículo 25 de la Decisión Andina 486 de 2000.

7. **NIVEL INVENTIVO.**

Finalmente, el Señor Examinador considera que la presente solicitud carecería de altura inventiva con respecto a las enseñanzas de los documentos **US2002156036 (D1)**, y **Claude, N. et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, Vol. 99, No. 4, 2332-2337 (D2)**.

En conexión con estos documentos el Señor Examinador asegura que para la persona versada en la materia sería evidente modificar el péptido A β revelado en D1 y D2 con la expectativa de obtener una respuesta inmune aumentada, máxime cuando D2 revela que un péptido β -amiloide 1-16 pegilado unido con residuos de palmitoil que es altamente inmunogénico.

Sobre este particular **me permito señalar que aun cuando los documentos D1 y D2 revelan péptidos β -amiloides modificados con palmitoil como posibles inmunógenos, estos documentos no indican o sugieren que al disminuir el número de residuos de dichos péptidos se podrían obtener propiedades mejoradas en la respuesta inmune y mucho menos que el nuevo método de obtener estos péptidos permitiría una mayor pureza y con esto una inmunogenicidad controlada.**

Así, los documentos D1 y D2 revelan la administración de un péptido A β 1-16 palmitoilado reconstituido dentro de un liposoma a ratones NOBRA transgénicos, los cuales presentan placas A β en el páncreas. Dentro de dichos documentos, los autores especulan sobre el posible uso terapéutico del péptido palmitoilado para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, **D1 y D2 no proporcionan una evidencia concluyente que demuestre dicho efecto terapéutico, y por lo tanto la persona versada en la materia no encontraría utilidad en emplear este tipo de modificación y mucho menos de reducir el número de residuos en el péptido allí revelado.**

En efecto, en D2 se expresan dudas con respecto a que tan apropiado es el modelo de ratones NOBRA considerando que después de la vacunación los anticuerpos pueden alcanzar fácilmente las placas en el páncreas porque no es necesario cruzar la barrera sangre-cerebro:

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

"La ausencia del obstáculo de la barrera sangre-cerebro a ser cruzada por los anticuerpos para alcanzar las placas pancreáticas en los ratones NORBA puede reducir el valor de nuestro modelo, sin embargo." (Primera columna, líneas 16 a 18, página 2337, D2).

De esta forma, al reconocer la condición de que los anticuerpos generados por la vacunación deben atravesar la barrera sangre-cerebro la persona versada en la materia tendría dudas sobre la efectividad de emplear la vacunación como una estrategia terapéutica contra enfermedades neurodegenerativas asociadas a las placas β -amiloides, máxime cuando D2 no es contundente cuando plantea la conclusión de su estudio: *"Los resultados aquí descritos sugieren un **posible** papel terapéutico y profiláctico de la vacunación con fragmentos A β químicamente modificados reconstituidos en liposomas."* (Segunda columna, último párrafo, página 2337, D2, resaltado fuera de texto).

Por lo tanto, **a pesar del hecho que D1 y D2 emplean péptidos β -amiloide 1-16 modificados por la unión de ácido palmitóico como posibles inmunógenos contra placas amiloides, estos mismos documentos señalan que los datos allí revelados no son totalmente concluyentes, lo que harían que la persona versada en la materia no tuviera suficiente motivación para tomar como punto de partida sus enseñanzas.**

En conexión con lo anterior me permito señalar que a la luz del arte previo el problema a ser resuelto puede ser visto como la provisión de un péptido A β antigénico que pueda ser empleado en el tratamiento en humanos de enfermedades neurodegenerativas asociadas a placas amiloides, considerando que la respuesta inmune generada por dicho péptido debe ser lo suficiente para asegurar que los anticuerpos generados sean capaces de atravesar la barrera sangre-cerebro.

En este sentido la presente solicitud proporciona un péptido antigénico A β 1-13 a 1-15, que se prepara por una nueva metodología, el cual proporciona péptidos con una respuesta inmune mejorada. De esta forma, los fragmentos A β de 13 a 15 residuos de la presente invención ventajosamente evitan la presencia de un epítipo de células T en el antígeno, el cual puede conducir a una respuesta inmune inflamatoria en el cerebro del paciente, tal como lo señala el Ejemplo 6.2 de las páginas 92 a 95 de la descripción de la solicitud: *"ACI-24 resultó principalmente en los isotipos IgG1 y IgG2, ambos subtipos Th2 predominantemente no inflamatorios, así como también en IgG3, la cual es una subclase de IgG independiente de células T. Con la excepción de un animal vacunado con ACI-24, ambas vacunas indujeron únicamente niveles muy bajos de IgG2a (Th1)".*

Sumado a lo anterior me permito llamar la atención a ese Despacho al hecho que **dado que el método por el cual es obtenido el péptido de la invención es totalmente distinto a aquel empleado por el arte previo, este método es en parte responsable de proporcionar dichas ventajas en la respuesta inmunogénica elicitada, tanto así que un péptido producido convencionalmente de ninguna manera habría resuelto el problema planteado por la presente solicitud.**

Así, y tal como lo señala el nuevo capítulo reivindicatorio adjunto al presente memorial, el método de la invención comprende un primer paso de síntesis del péptido sobre una resina, y una posterior modificación del péptido, aún sobre la resina, para injertar un residuo lipofílico o hidrofóbico a los residuos terminales del péptido. En este sentido me permito resaltar que esta nueva metodología proporciona de manera sorprendente una incrementada pureza del producto final y consecuentemente una antigenicidad mejorada del péptido.

Por su parte, los documentos D1 y D2 claramente indican que el péptido allí revelado es obtenido mediante la modificación de la Lisina terminal acoplándola a un residuo lipofílico y luego anclando el aminoácido modificado a la resina. Posterior a esto, se realizan los 16 ciclos de introducción de cada uno de los aminoácidos de la cadena del péptido A β , y en un paso final, se introduce un segundo aminoácido modificado.

Contrario a esto, en la presente invención el péptido A β se preforma sobre la resina y solamente es modificado por la introducción del residuo lipofílico o hidrofóbico una vez la síntesis haya terminado y cuando el péptido se encuentra aún sobre la resina.

En este sentido me permito resaltar que esta novedosa metodología permite una significativamente mejor eficiencia de acoplamiento y por lo tanto conduce a un producto mucho más puro, tal como lo señala la página 82 de la descripción de la solicitud.

En conexión con lo anterior, me permito además señalar que esta mayor pureza del péptido de la invención fue comprobada por el solicitante tal como lo indica el reporte experimental 1 (Experimental Report 1) anexo al presente memorial.

Dicho reporte realiza un análisis cromatográfico tanto del péptido de la invención, Pal1-15, como del péptido revelado en D1 y D2, Pal1-16, donde dicho péptido de la invención fue sintetizado de acuerdo con el método reivindicado mientras que el péptido Pal 1-16 se obtuvo por el método descrito en el arte previo.

Dicho análisis muestra cómo la aproximación sintética de Pal1-16 revelada en D1 y D2 resulta en al menos dos impurezas principales, las cuales eluyen por HPLC con un tiempo de retención similar al del péptido deseado, Pal1-16, y por lo tanto sería muy poco probable una remoción de dichas impurezas en un proceso de manufactura a gran escala:

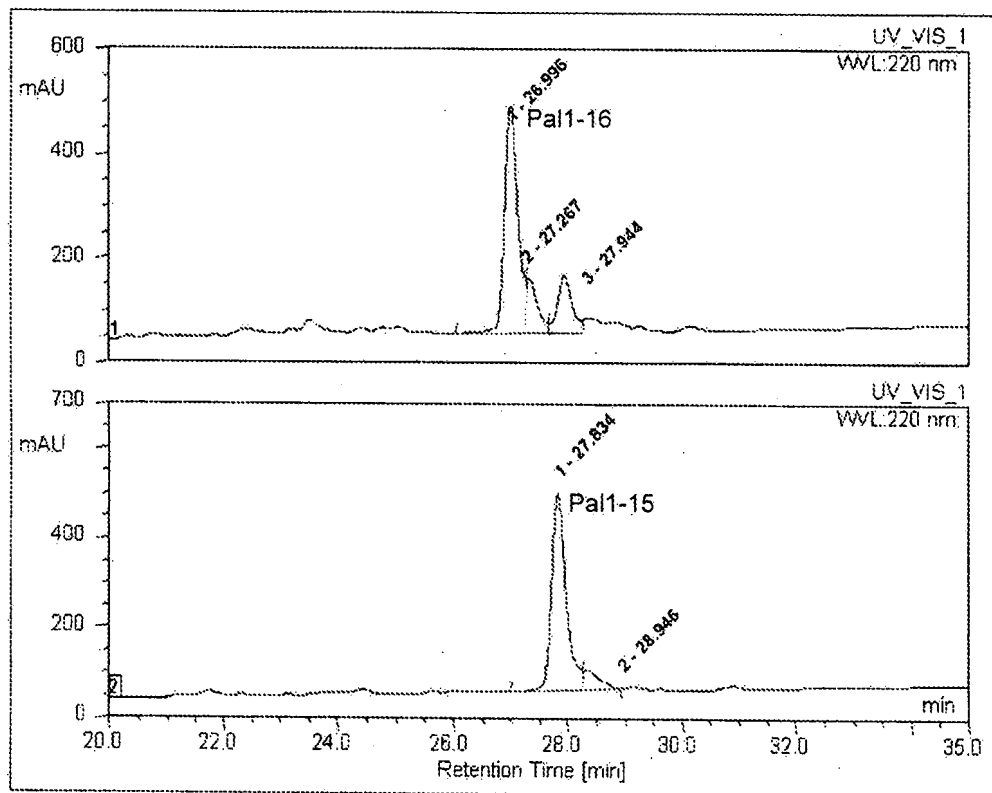


Figure 1: Typical HPLC chromatograms of Pal1-16 (batch SP072030F) and Pal1-15 (batch SP011547J)

Sumado a esto, de la tabla 3 del mencionado reporte es evidente que la pureza promedio determinada por HPLC y LC-MS respectivamente para el péptido de la invención, Pal1-15 se encuentra entre 76% y 77%, dependiendo del método analítico empleado, mientras que para el péptido del arte previo, Pal1-16 se alcanza una pureza únicamente del 53%.

Como consecuencia de lo anterior, **me permito resaltar que resulta claro que el método desarrollado por la presente solicitud es superior que el del arte previo para producir un fragmento inmunogénico del péptido A β amiloide, dado que se obtiene un producto con un significativamente mayor grado de pureza. Más aún cuando se sintetizan los dos péptidos, Pla1-15 y Pla1-16 por la misma metodología, las diferencias en pureza son muy pequeñas.**

Así mismo, la superioridad del método sintético desarrollado en la presente invención con respecto al revelado en el arte previo es demostrado cuando se sintetiza el mismo péptido de la solicitud, Pal1-15 por las dos metodologías, encontrando que por el método de la invención se obtiene una pureza de 76% mientras que por el procedimiento de D1 y D2 se obtiene una pureza a penas del 37% (Ver tabla 6 del mencionado reporte 1).

En este sentido considero pertinente resaltar que dentro del estado del arte es un hecho conocido que la baja pureza de los péptidos puede resultar en una respuesta de anticuerpos insuficiente o inaceptable, por lo que resulta altamente ventajoso proporcionar un producto inmunogénico y una composición que tengan una pureza significativamente superior a la presentada en el arte previo, tanto en la pureza del péptido no modificado como en la pureza del péptido injertado con palmitoilo.

En efecto esta mejor respuesta inmunogénica es confirmada en los resultados obtenidos por el solicitante y que se presentan junto a este memorial como el reporte experimental 2 ("Experimental Report"), en los cuales se comprueba que se obtiene una respuesta IgG anti-A β mejorada para el péptido de la invención, Pal1-15, cuando dicho péptido se produce por el método aquí reivindicado en comparación con Pal1-16. Dicha respuesta fue obtenida en ratones tipo salvaje (Wt) y ratones desnudos que tienen la mutación Foxn1^{nu} y tienen un número y función de células T reducidos debido a la carencia de un funcionamiento adecuado de la glándula tímica.

Dicho reporte experimental muestra claramente que la inmunización con la vacuna que comprende el péptido de la invención, ACI-24, tiene una mayor inmunogenicidad que la vacuna que comprende el péptido revelado en D1 y D2 (ACI-21), induciendo una respuesta IgG anti-A β superior.

En vista de lo anterior, me permito resaltar que los resultados aquí discutidos son una prueba fehaciente de que el novedoso método de la invención produce péptidos antigénicos que difieren significativamente de aquellos del arte previo tanto en composición como en comportamiento.

Así mismo es pertinente señalar que dentro del campo técnico de la invención sería evidente que un péptido antigénico que exhiba sólo una inmunogenicidad muy básica y una baja respuesta en ratones tipo salvaje y desnudos, como el péptido revelado en D1 y D2, Pal1-16, no es adecuado para emplearse dentro de una vacuna para el tratamiento de condiciones o enfermedades asociadas con amiloides caracterizadas por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva en un animal o un humano.

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Por su parte, el constructo de la presente invención mejora significativamente la capacidad de memoria no-espacial dependiente del hipocampo en un modelo murino APPxPS1 de enfermedad de Alzheimer, tal como lo muestra el ejemplo 7.1 de la página 95 de la descripción de la solicitud, donde después de un periodo de tres meses se obtiene una restauración completa de la capacidad de memoria en los ratones tratados, cuando se comparan con ratones tipo salvaje sanos no tratados y no transgénicos.

En este sentido me permito señalar que **este resultado es sorprendente, toda vez que nada dentro del estado del arte permite predecir dicho comportamiento, y por lo tanto, tanto las construcciones antigénicas como el método de la invención no pueden resultar evidentes frente al estado del arte más próximo, toda vez que dicho estado del arte no sugiere que al reducir el número de aminoácidos en el fragmento del péptido A β , y obtener dicho péptido por el método particular desarrollado por la invención se obtendría una respuesta inmunológica mejorada.**

En conexión con lo expuesto anteriormente, me permito referirme al señalamiento que hace el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina con respecto a las definiciones de "obvio" y "evidente" en la evaluación del Nivel Inventivo de una solicitud de patente*:

"Resulta pertinente, a los efectos del artículo 4 de la Decisión 344, definir qué se entiende por "obvio" y por "evidente" a fin de determinar qué se debe entender por nivel inventivo.

Lo obvio es aquello que salta a la vista de manera clara y directa; lo "que se encuentra o pone delante de los ojos, muy claro o que no tiene dificultad". Mientras que lo evidente consiste en la "certeza clara y manifiesta de la que no se puede dudar; cierto, claro, patente y sin la menor duda". De forma que algo que resulte obvio no es necesariamente evidente; empero lo que es evidente, es también obvio.

En este orden de ideas, se puede concluir que una invención goza de nivel inventivo cuando a los ojos de un experto medio en el asunto de que se trate, se necesita algo más que la simple aplicación de los conocimientos técnicos en la materia para llegar a ella, es decir, que de conformidad con el estado de la técnica el invento no sea consecuencia clara y directa de dicho estado."

* Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina, PROCESO 192-IP-2005

Dentro de este marco de ideas y a la luz de lo discutido en el presente memorial, me permito resaltar que al no "saltar a la vista de manera clara y directa" a partir de los documentos citados un constructo antigénico como el de la invención ni un método de obtener un péptido A β 1-15 como el aquí reclamado, y al no tenerse "certeza clara y manifiesta" a partir de las enseñanzas de dichos documentos que estos constructos tendrían propiedades superiores en inmunogenicidad y que el método brindaría péptidos significativamente más puros, es claro que estos documentos no pueden de ninguna manera afectar el Nivel Inventivo de la solicitud en estudio.

8. CONCLUSIÓN.

Para finalizar me permito resaltar que gracias al nuevo capítulo reivindicatorio presentado junto con este memorial, la reclamación de las realizaciones preferidas de la invención es totalmente clara y concisa, sin hacer referencia a usos o a métodos de tratamiento, y reivindicando únicamente materia que comparte el mismo concepto inventivo, y por lo tanto cumpliendo así con lo exigido por la Decisión Andina 486 de 2000.

Por otro lado, en virtud de los argumentos discutidos en relación a los documentos citados, se estableció de manera incontrovertible que ni los constructos ni el método que son objeto de la solicitud en estudio no podrían obtenerse de manera evidente a partir de las enseñanzas de estos documentos, y que la persona versada en la materia mucho menos podría a partir de estas revelaciones predecir el efecto de inmunogenicidad mejorada que exhiben los péptidos aquí desarrollados con respecto a los del arte previo, por lo que es indiscutible el Nivel Inventivo que conlleva la solicitud en estudio frente al arte previo más cercano.

9. Anexo me permito presentar:

- i) Copia de las páginas **114 y 120** que corresponde al **nuevo capítulo reivindicatorio**, que se discutió en el presente memorial, constituido por **47** reivindicaciones;
- ii) Reportes experimentales 1 y 2 referenciados dentro del texto; y
- iii) Recibos números 12-0097813, 12-0097801, 12-0095756 y 12-0095757, expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago de la tasa que causan las reivindicaciones 11 a 47 presentadas junto con este memorial.

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

10. En vista de lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de los argumentos y modificaciones presentados y conceder el privilegio de patente solicitado.

Señor Superintendente,


ALICIA LLOREDA RICAURTE
T. P. 53.215

Dirección para Notificaciones: notificacionespatentes@lloredacamacho.com

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una composición de vacuna terapéutica que comprende un fragmento peptídico antigénico A β que consiste en una extensión única o repetida de entre 13 y 15 residuos contiguos de aminoácidos de la parte N terminal del péptido A β , dicho método comprende los pasos de: (a) pre-formar el fragmento peptídico antigénico A β por síntesis de péptidos sobre resina estándar automatizada y (b) entonces modificar el fragmento peptídico antigénico A β preformado por un injerto sobre resina de un residuo lipofílico o hidrofóbico a los residuos aminoácidos terminales del péptido A β pre-formado.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la extensión contigua de 13 a 15 residuos de aminoácidos se obtiene a partir del fragmento N terminal 1-16 o 1-17 del péptido A β .
3. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la composición de vacuna terapéutica comprende un fragmento peptídico A β que consiste en una extensión única o repetida de entre 13 y 15 residuos contiguos de aminoácidos de la parte N terminal del péptido A β seleccionado del grupo que consiste en los residuos 1-15, 1-14, y 1-13.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la composición de vacuna terapéutica comprende un fragmento único o repetido de péptido A β seleccionado del grupo que consiste en antígeno peptídico A β ₁₋₁₅ dado en SEQ ID NO: 1 y A β _{1-16(Δ 14)} dado en SEQ ID NO: 3.
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el antígeno peptídico A β está modificado de manera que es capaz de mantener y estabilizar una conformación definida caracterizada por una proporción equilibrada de porciones α -helicoidal y/o lámina β y/o enrollamientos aleatorios.
6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el antígeno peptídico A β se presenta reconstituido en un portador tal

como, por ejemplo, una vesícula, un cuerpo particulado o molécula.

7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el antígeno peptídico A β se presenta reconstituido en un liposoma.

8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el antígeno peptídico A β es modificado por un residuo lipofílico o hidrofóbico que facilita la inserción en la bicapa lipídica del liposoma portador/coadyuvante.

9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la dimensión del residuo lipofílico o hidrofóbico en combinación con la carga neta global del péptido antigénico y del portador/coadyuvante al que se adosa el péptido, se incorpora o es reconstituido es tal que el péptido antigénico se expone, estabiliza y presenta en una conformación con alta actividad biológica, que permite al sistema inmune del organismo blanco interactuar libremente con los determinantes antigénicos contenidos en la construcción antigénica en su conformación expuesta, estabilizada y con alta actividad biológica, lo cual conduce a una fuerte respuesta inmune.

10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, en donde el residuo lipofílico o hidrofóbico es un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido.

11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el residuo lipofílico o hidrofóbico es un ácido graso, particularmente un ácido graso con un esqueleto carbonado de al menos 10 átomos de carbono.

12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el residuo hidrofóbico es ácido palmítico.

13. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en donde la preparación de liposoma contiene un coadyuvante.

14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el coadyuvante es lípido A, particularmente lípido A detoxificado, tales como monofosforil o difosforil-lípido A o alúmina.

15. Un método para producir una composición de vacuna terapéutica que comprende usar un péptido antigénico inmunogénico para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide, en donde el antígeno peptídico β -amiloide es un péptido antígeno palmitoilado modificado $A\beta_{1-15}$ por adosar covalentemente residuos de aminoácidos palmitoilados, particularmente entre 2 y 4, más particularmente 4 residuos, reconstituidos en un liposoma.

16. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el péptido antigénico $A\beta_{1-15}$ es modificado por dos residuos palmitoilados de aminoácidos adosado covalentemente al terminal N y C del péptido, respectivamente.

17. Un método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el péptido antigénico $A\beta_{1-15}$ es modificado por 4 residuos de aminoácidos palmitoilados, dos de los cuales se adosan covalentemente a los terminales N y C del péptido, respectivamente.

18. Un método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde dos o más moléculas de péptido antigénico palmitoilado $A\beta_{1-15}$ modificado por residuos palmitoilos adosados covalentemente, particularmente uno o dos residuos, en cada extremo del péptido están reconstituidos en un único liposoma.

19. Una construcción antigénica que comprende un fragmento peptídico antigénico $A\beta$ que consiste en una extensión única o repetida de entre 13 y 15 residuos contiguos de aminoácidos de la parte N terminal del péptido $A\beta$ y un residuo lipofílico o hidrofóbico se adosa a los residuos aminoácidos terminales del péptido $A\beta$, donde el péptido $A\beta$ es (a) pre-formado por síntesis de péptidos sobre resina estándar automatizada y (b) entonces modificado por un injerto sobre resina de un residuo lipofílico o hidrofóbico a los residuos aminoácidos terminales del péptido $A\beta$ pre-formado.

20. Una construcción antigénica de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la extensión contigua de 13 a 15 residuos de aminoácidos se obtiene del fragmento N terminal 1-16 o 1-17 del péptido $A\beta$.

21. Una construcción antigénica de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el fragmento peptídico $A\beta$ consiste de una extensión única o repetida de

entre 13 y 15 residuos contiguos de aminoácidos de la parte N terminal del péptido A β seleccionado del grupo que consiste en residuos 1-15, 1-14, y 1-13.

22. Una construcción antigénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en donde la composición de vacuna terapéutica comprende un fragmento único o repetido de péptido A β seleccionado del grupo que consiste en antígeno peptídico A β ₁₋₁₅ dados en SEQ ID NO: 1 y A β ₁₋₁₆(Δ 14) dados en SEQ ID NO: 3.

23. Una construcción antigénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, en donde el antígeno peptídico A β está modificado de manera tal que es capaz de mantener y estabilizar una conformación definida caracterizada por una proporción equilibrada de las porciones α -helicoidal y/o de lámina β y/o de enrollamientos aleatorios.

24. Una construcción antigénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23, en donde el antígeno peptídico A β se presenta adosado o reconstituido en un portador/coadyuvante tal como, por ejemplo, una vesícula, un cuerpo particulado o molécula.

25. Una construcción antigénica de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el antígeno peptídico A β se presenta reconstituido en un liposoma.

26. Una construcción antigénica de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el antígeno peptídico A β es modificado por un resto lipofílico o hidrofóbico que facilita la inserción en la bicapa lipídica del liposoma portador.

27. Una construcción antigénica de acuerdo con la reivindicación 25, en donde la dimensión del resto lipofílico o hidrofóbico en combinación con la carga neta global del péptido antigénico y del portador al que el péptido se adosa, incorpora o reconstituye de tal manera que el péptido antigénico es expuesto al solvente y presentado en una conformación que es biológicamente activa pues permite al sistema inmune del organismo blanco interactuar libremente con los determinantes antigénicos contenidos en la construcción antigénica, lo cual conduce a una fuerte respuesta inmunogénica y en consecuencia, a un elevado título de anticuerpo en el organismo blanco.

28. Una construcción antigénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 27, en donde el resto lipofílico o hidrofóbico es un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido.

29. Una construcción antigénica de acuerdo con la reivindicación 28, en donde el resto lipofílico o hidrofóbico es un ácido graso, particularmente un ácido graso con un esqueleto carbonado de al menos 10 átomos de carbono.

30. Una construcción antigénica de acuerdo con la reivindicación 29, en donde el resto hidrofóbico es ácido palmítico.

31. Una construcción antigénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 30, en donde la preparación de liposoma contiene un coadyuvante o un inmunomodulador.

32. Una construcción antigénica de acuerdo con la reivindicación 31, en donde el inmunomodulador es lípido A, particularmente lípido A detoxificado tal como monofosforil o difosforil lípido A o alúmina.

33. Una composición de vacuna que comprende una construcción antigénica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 19 a 32.

34. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 33 que comprende un antígeno peptídico $A\beta_{1-15}$ para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide.

35. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 34, en donde el antígeno peptídico $A\beta_{1-15}$ es modificado de manera tal que es capaz de mantener y estabilizar una conformación definida caracterizada por una proporción equilibrada de porciones de enrollamiento aleatorio, hélice α y lámina β .

36. Una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 34 ó 35, en donde el antígeno peptídico $A\beta_{1-15}$ se presenta adosado a un portador tal como, por ejemplo, una vesícula, un cuerpo particulado o molécula.

37. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 36, en donde el antígeno peptídico $A\beta_{1-15}$ se presenta reconstituido en un liposoma.

38. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 37, en donde el antígeno peptídico $A\beta_{1-15}$ es modificado por un resto lipofílico o hidrofóbico que facilita la inserción en la bicapa lipídica hidrofóbica del liposoma portador/coadyuvante.

39. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 38, en donde la dimensión del resto lipofílico o hidrofóbico provee un ancla para el péptido en la bicapa del liposoma en combinación con la carga neta global del péptido antigénico y del portador al cual el péptido se adosa, incorpora o reconstituye de manera tal que el péptido antigénico es expuesto al solvente y presenta una conformación biológicamente activa pues permite que el sistema inmune del organismo blanco interactúe libremente con los determinantes antigénicos contenidos en la construcción antigénica, lo cual conduce a una fuerte respuesta inmunogénica y, en consecuencia, un elevado título de anticuerpos en el organismo blanco.

40. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 39, en donde el resto lipofílico o hidrofóbico es un ácido graso, triglicérido o fosfolípido.

41. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 40, en donde el esqueleto carbonado de ácidos grasos tiene al menos 10 átomos de carbono.

42. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 41, en donde el resto hidrofóbico es ácido palmítico.

43. Una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 33 a 42, en donde la preparación de liposoma contiene un coadyuvante y/o un inmunomodulador.

44. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 43, en donde el inmunomodulador es lípido A detoxificado, tal como monofosforil o difosforil lípido A.

45. Una composición de vacuna que comprende un péptido antigénico inmunogénico para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide, en donde el antígeno peptídico β -amiloide es un antígeno peptídico palmitoilado $A\beta_{1-5}$ modificado por residuos palmitoilo adosados covalentemente, particularmente entre 2 y 4, más particularmente 4 residuos, en cada extremo del péptido reconstituido en un liposoma.

46. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 45, en donde dos o más moléculas de antígeno peptídico palmitoilado $A\beta_{1-15}$ modificado por residuos palmitoilo adosados covalentemente en cada extremo del péptido están reconstituidos en un único liposoma.

47. Un anticuerpo o una mezcla de anticuerpos dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcional equivalente o partes funcionales del mismo y tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por una línea celular de hibridoma EJ7H3, depositado en diciembre 8 de 2005 como DSM ACC2756.

EXPERIMENTAL REPORT 1

Comparison of Pal1-15 and Pal1-16 peptide manufacturability

Objective and Design of study

The objective of this study was to compare the manufacturability of the peptides Pal1-15 and Pal1-16. Firstly the efficiency of synthesising Pal1-15 and Pal1-16 peptides according to the methodologies described in the respective patent applications WO 2007/068411 (AC Immune) and WO 2002/021141 (Sanofi-Aventis) was compared. Secondly the efficiency of manufacturing Pal1-15 and Pal1-16 peptides following the same synthetic methodology described in WO 2007/068411 was compared. Finally, the synthesis of Pal1-15 following the two different protocols in the two patents were compared. In each case peptide manufacturability was assessed according to peptide purity and identity of product impurities.

Methods

Synthesis of Peptides

All peptides were synthesized by NeoMPS (Strasbourg, France) according to the protocols described in the relevant patents. For each synthetic methodology investigated (method A: WO 2007/068411 (protocol 1), and method B: WO 2002/021141), three independent peptide syntheses were performed in order to assess the repeatability of the syntheses thus generating a total of nine peptides (Table 1).

Table 1: Peptide batches synthesised using method A or B

Peptide	Synthesis method	Peptide batch code
Pal1-15	A	SP011547H
		SP011547I
		SP011547J
Pal1-16	A	SP072030G
		SP072030H
		SP072030I
	B	SP072030B
		SP072030D
		SP072030F

Analysis of Peptides

HPLC

Peptide purity was determined by HPLC. Aliquots of each sample were diluted in 20% HFIP in acetonitrile to a concentration of 0.5 mg/ml prior to injection. The HPLC conditions applied are as shown below:

Solvent A: 79.9 % Acetonitrile, 20 % H₂O, 0.1 % TFA

Solvent B: 99.9 % Isopropanol, 0.1 % TFA

Column: PLRP-S 5µm, 300 Å, 250mm x 4.6mm

Flow rate: set at 0.7ml/min

Column temperature: set at 60°C

UV detection: set at 220nm

Gradient:

Time (min)	% solvent B
0	20
40	100
45	100
45.1	20
50	20

LC-MS

In order to identify the impurities, peptides were analysed by LC-MS (M-Scan SA, Switzerland) using a Waters Alliance HT2795 system connected to a Waters Q-TOF micro instrument.

Aliquots of each sample were diluted in acetic acid prior to injection onto a C5 reversed phase column. The LC conditions applied are as shown below.

Solvent A: 1ml TFA in 1000ml H₂O
 Solvent B: 1ml TFA in 50ml H₂O and 950ml Isopropanol
 Column: Jupiter C₅ 5µm, 300Å, 150mm x 2mm
 Flow rate: set at 400µl/min
 Column temperature: set at 50°C
 UV detection: set at 205nm

Gradient:

Time (min)	% solvent B
0	0
40	100

Electrospray ionization mass spectrometry was performed using the following conditions:

Ionisation mode: ES positive
 Capillary voltage: set at 3500V
 Cone voltage: set at 40V
 Source temperature: set at 120°C
 Desolvation temperature: set at 350°C
 Cone gas flow: set at 50L/hr
 Desolvation gas flow: set at 600L/hr

Calibration of the instrument was performed using Csl according to an SOP. Mass accuracy was better than ± 0.2 Da/e for the major m/z signals observed prior to sample analyses.

Results

i) Comparison of synthetic methodologies A (to Pal1-15) and B (to Pal1-16)

	Method A	Method B
Pal1-15	x	
Pal1-16		x

In order to compare the synthetic methodologies A and B for the manufacture of Pal1-15 and Pal1-16 peptides respectively, three Pal1-15 peptides as well as three Pal1-16 peptides were synthesised and their purity assessed by both HPLC and LC-MS. Table 3 shows that the syntheses of both Pal1-15 and Pal1-16 were highly reproducible between the three batches analysed for each peptide. Analysis by either HPLC or by LC-MS gave similar results showing that synthesis method A for the manufacture of Pal1-15 gave a significantly higher average purity (76 %) than that of method B used for the manufacture of Pal1-16 (53 %). In addition the largest single impurity identified by HPLC using synthetic method A was significantly lower (7 %) than that found using method B (14 %). As can be seen in Figure 1, the large impurities observed

following synthetic methodology B have retention times (27.3 min and 27.9 min) very similar to that found for Pal1-16 (27.0 min).

Table 3: Summary of peptide purity determination using HPLC and LC-MS

Peptide	Synthesis method	Peptide batch code	Purity (%) HPLC	Largest single impurity (%) HPLC	Purity (%) LC-MS	Largest single impurity (%) LC-MS
Pal1-15	A	SP011547H	82	4	80	Not resolved
		SP011547I	71	9	70	Not resolved
		SP011547J	76	8	82	Not resolved
		Average	76	7	77	N/A
Pal1-16	B	SP072030B	56	15	68	Not resolved
		SP072030D	50	14	51	11
		SP072030F	53	14	41	16
		Average	53	14	53	14

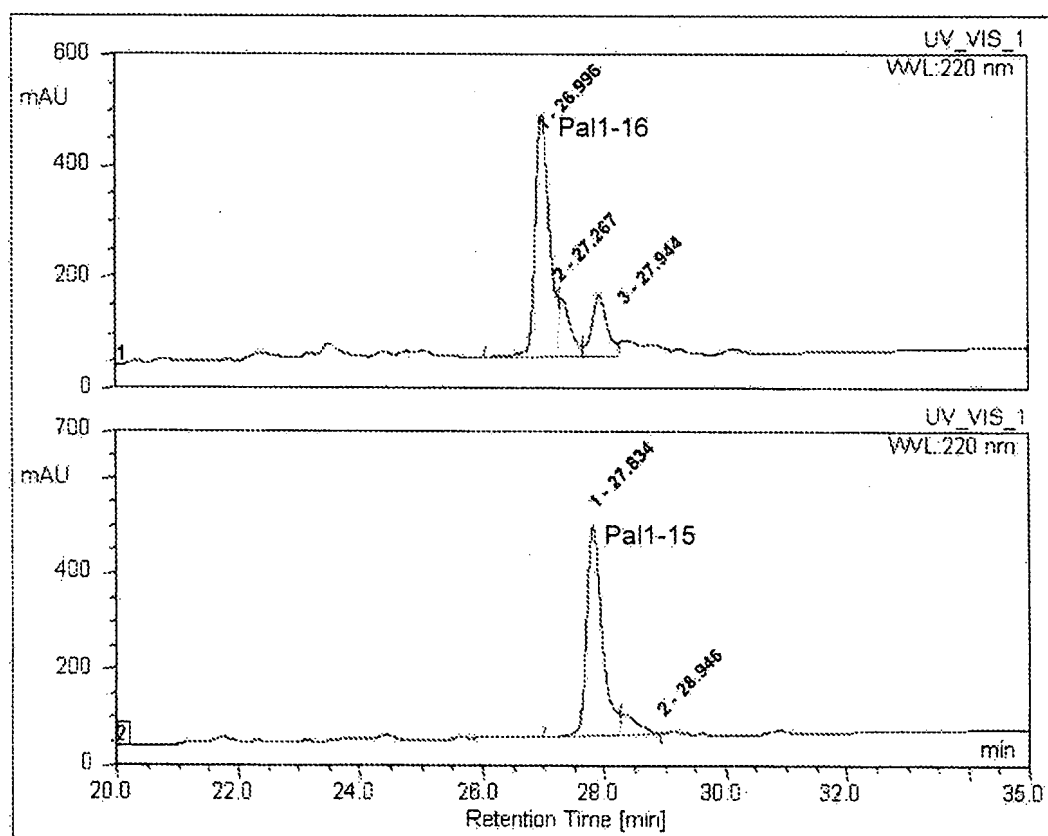


Figure 1: Typical HPLC chromatograms of Pal1-16 (batch SP072030F) and Pal1-15 (batch SP011547J)

Peptide impurities were identified by ESI-MS. While impurities which are readily resolved from the target peptide (Pal1-15 or Pal1-16) could be removed by HPLC purification, impurities which have similar retention times will be very difficult to remove and thus are of high importance with regard to manufacture.

Table 4 shows the monoisotopic m/z values for the major impurities identified having retention times similar to the corresponding target peptides. For Pal1-16 similar impurities were observed in two out of three peptides (batches SP072030B and SP072030F) (Table 4). In the batch SP072030D the major impurity (10.8 %) was found to correspond to two species which could not be resolved by LC (Appendix Figure 3) but could be identified by MS as Pal1-16 lacking His, and Pal1-16 lacking Arg (Table 4).

For each of the three batches of Pal1-15 peptides synthesised an impurity was identified close to Pal1-15 as being Pal1-15 containing an additional His and Asp residues. This impurity is poorly resolved under the LC conditions applied. An additional impurity was identified in all three batches of Pal1-15 as being Pal1-15 lacking either Gln or Lys. In two of these batches this peak was sufficiently resolved to quantify and was found to be present in only low amounts 1.2% for batch SP011547H, and 1.5 % for batch SP011547J (Appendix1 Figure 2).

Table 4: Summary of major impurities identified in Pal1-16 and Pal1-15 batches by LC-MS.

Peptide	Synthesis method	Peptide batch code	UV rt (min.)	Peak Area (%)	Observed monoisotopic mass (m/z)	Assignment
Pal1-15	A	SP011547H	17.58	79.7	3291.1	Pal1-15
			17.58	Not resolved	3543.2	+ HisAsp
			1st tail		3371.1	n.a.
			17.58	1.2	3162.9	- Gln (or - Lys)
		SP011547I	17.57	70.0	3291.0	Pal1-15
			17.57	Not resolved	3543.2	+ HisAsp
			1st tail		3371	n.a.
			17.57	Not resolved	3162.8	- Gln (or - Lys)
		SP011547J	17.56	81.5	3291.0	Pal1-15
			17.56	Not resolved	3371.0	n.a.
			1st tail		3543.2	+ HisAsp
			17.56	1.5	3162.9	- Gln (or - Lys)
Pal1-16	B	SP072030B	17.34	67.5	3419.2	Pal1-16
			17.34	Not resolved	3671.2	+ HisAsp
					3499.1	n.a.
					3291.1	- Gln or - Lys
			17.34	Not resolved	2663.8	n.a.
		SP072030D	17.36	51.4	3419.0	Pal1-16
			17.36	10.8	3282.0	- His
			1st tail		3262.9	- Arg
			17.36		3125.9	- ArgHis
			2nd tail	3.7	2988.9	- ArgHisHis
		SP072030F	17.37	41.1	3419.2	Pal1-16
			17.37	16.0	3291.0	- Gln or - Lys
					3163.0	- GlnLys (or - LysLys)
					3671.2	+ HisAsp
			17.37	9.3	3026.1	n.a.

ii) Comparison of Pal1-15 and Pal1-16 peptides for efficiency of manufacture

	Method A	Method B
Pal1-15	x	
Pal1-16	x	

In order to compare the relative efficiencies of manufacture of Pal1-15 and Pal1-16, three batches of Pal1-16 were synthesised under identical conditions used to prepare Pal1-15 (method A). Purity was determined by HPLC as for Pal1-15 peptides. Table 5 shows that the three Pal1-16 peptides show essentially identical purities with an average purity of 68 % which is just slightly lower than that found for the Pal1-15 peptides (76 %). Likewise the average largest single impurity found for the Pal1-16 peptides was found to be comparable to that found for the Pal1-15 peptides (5 and 7 % respectively).

Table 5: Summary of peptide purity determination by HPLC following peptide synthesis according to method A

Peptide	Synthesis method	Peptide batch code	Purity (%) HPLC	Largest single impurity (%) HPLC
Pal1-15	A	SP011547H	82	4
		SP011547I	71	9
		SP011547J	76	8
		Average	76	7
Pal1-16	A	SP072030G	67	5
		SP072030H	68	5
		SP072030I	68	6
		Average	68	5

iii) Comparison of synthetic route to Pal1-15

	Method A	Method B
Pal1-15	x	x
Pal1-16		

In order to compare the synthetic routes described in patent WO 2007/068411 (method A) with that described in patent WO 2002/021141 (method B), both protocols were applied to the synthesis of the same peptide Pal1-15. As can be seen in Table 6, synthesis of Pal1-15 according to method B gave very low purity (< 25%) for two of the three syntheses. One synthesis gave a product of higher purity albeit still inferior to all three syntheses following synthetic method A.

Table 6: Summary of peptide purity determination by HPLC following Pal1-15 synthesis according to methods A or B

Peptide	Synthesis method	Peptide batch code	Purity (%) HPLC	Largest single impurity (%) HPLC
Pal1-15	A	SP011547H	82	4
		SP011547I	71	9
		SP011547J	76	8
		Average	76	7
	B	SP011547L	22	25
		SP011547N	66	12
		SP011547O	23	25
		Average	37	21

The lower purity of peptides obtained following method B can be explained by the difficulty to couple amino acids during solid-phase peptide synthesis onto the growing peptide chain when the peptide contains the large Palmitic acid moiety. This sterically demanding group hinders the efficiency of coupling amino acids such that a proportion of peptide lack Lys(Pal) amino acids resulting in deletion sequences as reported by Balaban et al (Ref).

Conclusions

Synthesis of Pal1-15 following the protocol described in patent WO 2007/068411 gives a product with significantly higher purity than that of Pal1-16 obtained following the synthetic approach described in patent WO 2002/021141. In addition, the synthetic approach to Pal1-16 resulted in at least two major impurities which elute by HPLC with a similar retention time as Pal1-16. The synthetic method (A) to Pal1-15 is thus superior to that of Pal1-16 in terms of achieving higher product purity, whereas only a modest difference in product purity was observed between Pal1-15 and Pal1-16 when the same synthetic methodology was applied to both peptides. The superiority of synthetic method described in patent WO 2007/068411 over WO 2002/021141 is highlighted by the synthesis of the same peptide Pal1-15 following the two different procedures. This comparison revealed that the method in patent WO 2007/068411 is vastly superior to that of WO 2002/021141 both in terms of final product purity and in synthesis reproducibility – both critical parameters for the production process, particularly for up-scaling to process industrialization.

APPENDIX

Supplementary Figures

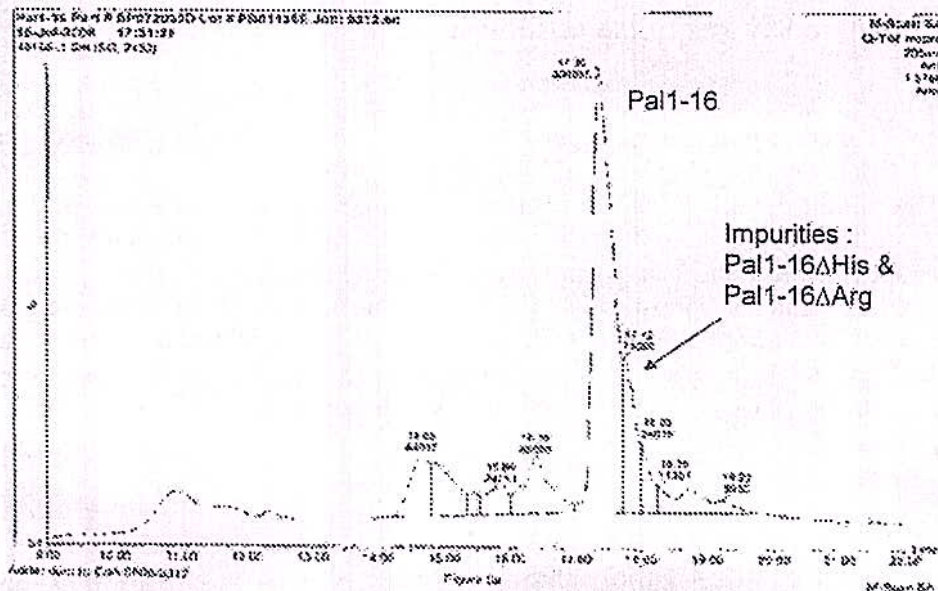


Figure 2: LC-MS analysis of Pal1-16 synthesised according to method B

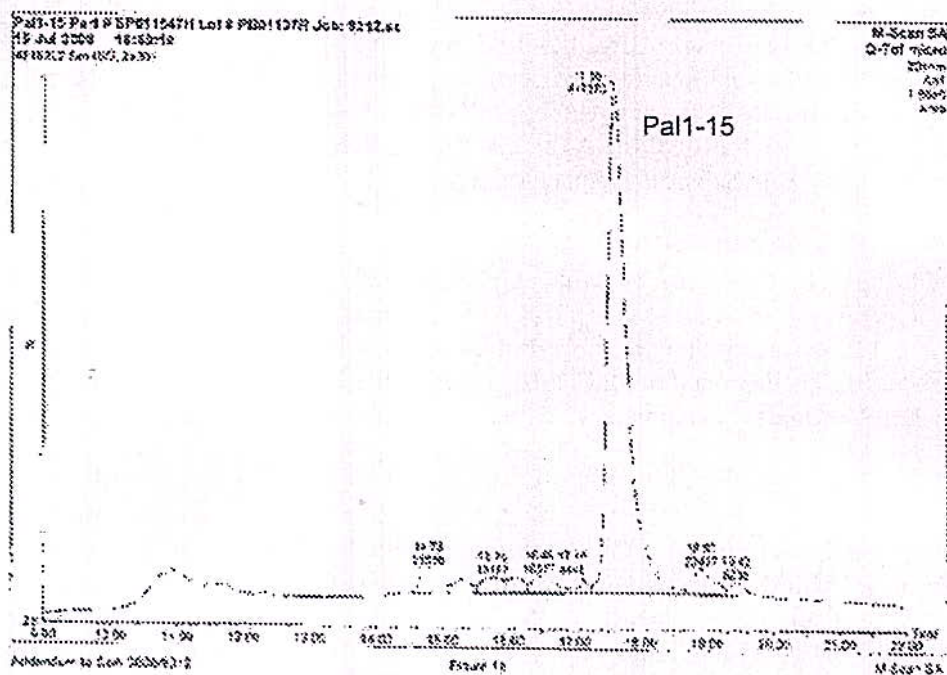


Figure 3: LC-MS analysis of Pal1-15 synthesised according to method A

EXPERIMENTAL REPORT 2

Antibody response in female nude mice

Objective and Design of study

The objective of this study was to compare the immunogenicity of ACI-21 (containing palmitoylated Amyloid-beta (A β)1-16) and ACI-24 (containing palmitoylated A β 1-15) in wildtype (Wt) mice. A second objective of this study was to analyze whether the antibody response induced by ACI-24 and ACI-21 are T-cell independent by immunizing nude mice with ACI-21 and ACI-24. The nude mice carry the *Foxn1*tm mutation and have reduced T cell number and function due to the lack of a properly functioning thymic gland.

Nude mice with a C57BL/6 background and corresponding littermates at an age of 11 or 13 weeks were injected subcutaneously (s.c.). Mice were immunized 3 times with 2 week intervals and were bled at 6 time points after the first immunization. Total anti-A β -IgG responses were measured by ELISA. To verify the absence of T-helper cells in the nude mice, the percentage of CD3⁺ CD4⁺ cells was evaluated by fluorescence-activated cell sorter (FACS).

Methods

Preparation of the vaccines ACI-21 and ACI-24

Palmitoylated A β 1-15 (Product # SP011547H, NeoMPS, France) or Palmitoylated A β 1-16 (Product # SP072030D, NeoMPS, France) were reconstituted in liposomes consisting of dimyristoyl phosphatidyl choline (DMPC), dimyristoyl phosphatidyl glycerol (DMPG), cholesterol and Monophosphoryl Lipid A (Avanti Polar Lipids, Inc. AL, USA) at molar ratios 9: 1: 7:0.2. The vaccines were prepared by solubilizing all the components in chloroform, evaporating to give a thin film and then rehydrating with PBS. The vaccine preparations ACI-24 containing Pal1-15 (batch ACI-24-090813-A) or ACI-21 containing Pal1-16 (batch ACI-21-090813-A) were stored at 2-8°C. Added quantities of peptides were as follows: Pal1-15 (130 μ g/mL), Pal1-16 (135 μ g/mL). Added quantities of DMPC/DMPG/cholesterol/MPLA were 2410/272/1069/135 μ g/mL. The vaccine preparation, ACI-24 (batch: ACI-24-090813-A) and ACI-21 (batch: ACI-21-090813-A) were prepared by AC Immune and shipped to JSW Life Sciences GmbH (Austria).

Immunizations

At JSW Life Sciences, nude mice (*B6.Cg-Foxn1*tm/J) with a C57BL/6 background and corresponding littermates (6 mice/group) received s.c. injections of ACI-24 or ACI-21 on three occasions with a 2-week interval between each administration (day 0, 14, 28) according to Table 1. Plasma samples from the facial vein/artery were collected 7 days before and 2, 4, 7, 21, 35 and 56 days after the first injections. A β 1-42-specific IgG antibody titers were determined by ELISA. On day 56 animals were sacrificed and blood and spleens were collected.

Quantification of A β -specific antibodies

A β 1-42-specific IgG antibodies were determined by ELISA. Plates were coated with 10 μ g/ml of A β 1-42 (Bachem, Bubendorf, Switzerland) overnight at 4°C. After washing with 0.05% Tween 20 in PBS and blocking with 1% BSA, serial dilutions of sera were added to the plates and incubated at 37°C for 2 hour. After washing, plates were incubated with alkaline phosphatase (AP) conjugated anti-mouse IgG antibody (Jackson ImmunoResearch West Grove, PA, USA) for 2 hours at 37°C. After final washing, plates were incubated with AP substrate (pNPP) and read at 405 nm using an ELISA plate reader. Results are expressed by reference to serial dilutions of a commercial available antibody (6E10, Covance, Emeryville, CA, USA).

CD3 /CD4 cell quantification

Mouse blood samples were lysed with ammonium chloride until cleared, then centrifuged at 400x g for 7 minutes and pellets were resuspended in PBS containing EDTA. Then cells were blocked with CD16/CD32

blocking reagent and stained with CD4 (PE conjugate) and CD3 (PE-Cy5) antibodies for 30 min at 4°C. Samples were washed with PBS, resuspended in fixative solution (DB Cellfix diluted 1:40 in BD FACS Flow) and acquired on a BD FACS Calibur cytometer. The percentage of gated cells, which stained positive for CD3⁺ and CD4⁺ (T-helper cells) was evaluated.

Table 1. Allocation of mice to different groups.

Group	No of animals and gender	Treatment/ Volume ^a	Vaccine batch	Process	Route of Administration ^b	Dose level Quantity of Pall-15 or Pall-16 µg/dose ^c	Quantity of MPLA µg/dose ^c
C	6 nude female mice	ACI-24 0.2 ml	ACI-24- 090813-A		s.c.	16.6	14.4
D	6 Wt female mice	ACI-24 0.2 ml	ACI-24- 090813-A		s.c.	16.6	14.4
E	6 nude female mice	ACI-21 0.2 ml	ACI-21- 090813-A		s.c.	23	18.8
F	6 Wt female mice	ACI-21 0.2 ml	ACI-21- 090813-A		s.c.	23	18.8

^a: theoretical volume

^b: s.c.: subcutaneous

^c: measured quantity determined after analysis

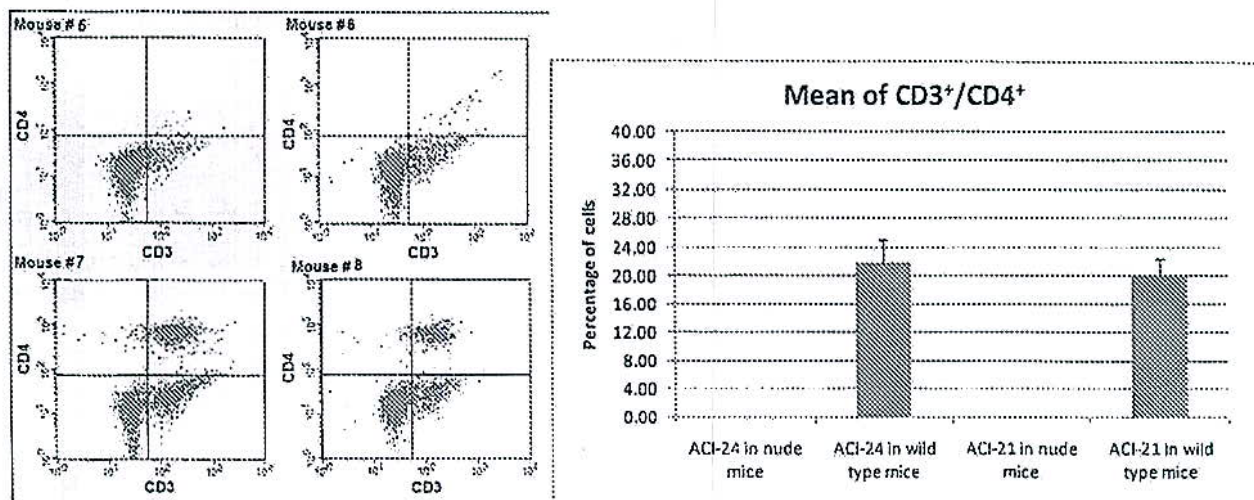
Results

General Observations

None of the animals died prematurely and no side effects due to the treatment had to be reported. For all B6.Cg-Foxn1^{nu}/J animals, the typical nude phenotype was present, while the Wt (wild type) littermates had a normal fur.

CD3⁺/CD4⁺ cell quantification

CD3⁺/CD4⁺ staining followed by FACS analysis revealed significant reduction in T-helper cell counts (CD3⁺/CD4⁺ cells) in nude mice, compared to Wt animals (Figure 1).



Mouse#5 and 6: nude mice
 Mouse#7 and 8: wild type mice

Figure 1. CD3⁺CD4⁺ quantification by FACS in nude and wildtype mice treated with ACI-24 or ACI-21.

The percent gated cells, which were stained positive for CD3 and CD4, of nude mice receiving either ACI-21 or ACI-24 and Wt mice receiving either ACI-21 or ACI-24. Each column represents mean and SD for groups of 6 mice. Right panel: schematic representation of FACS analysis in two mice of nude and Wt groups.

Immune response analysis

The anti-A β IgG titers of Wt were analyzed to study the immunogenicity of ACI-21 and ACI-24. In Wt mice the ACI-24 vaccine induced a robust anti-A β IgG response whereas the antibody response induced by ACI-21 was lower. There was a significant difference between ACI-24 and ACI-21 in Wt mice at day 56 (Figure 2; 2-way ANOVA immunization: $P < 0.01$).

The anti-A β IgG titers of nude were analyzed to study whether the response induced by ACI-24 or ACI-21 was independent on T cell function. The ACI-24 vaccine induced an anti-A β IgG response in nude mice. There was a significant difference between the antibody response induced by ACI-24 in Wt mice and nude mice at day 56 (Figure 2; 2-way ANOVA immunization: $P < 0.05$). The ACI-21 induced a low anti-A β IgG response in nude mice similar to what was seen in Wt mice.

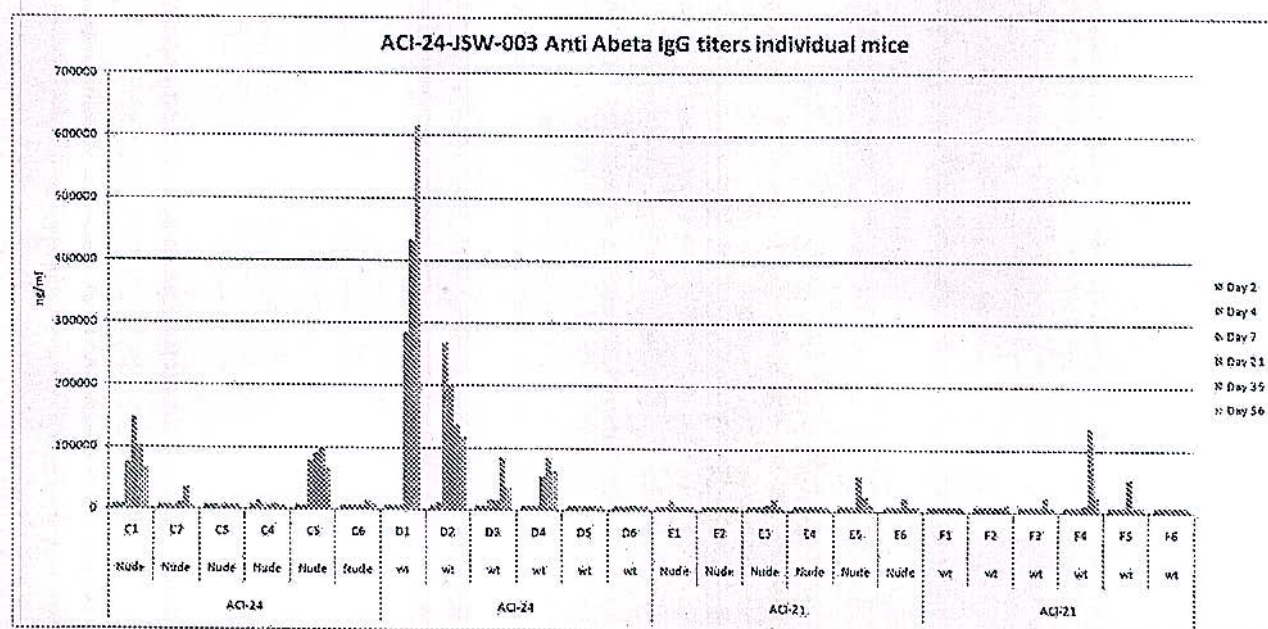
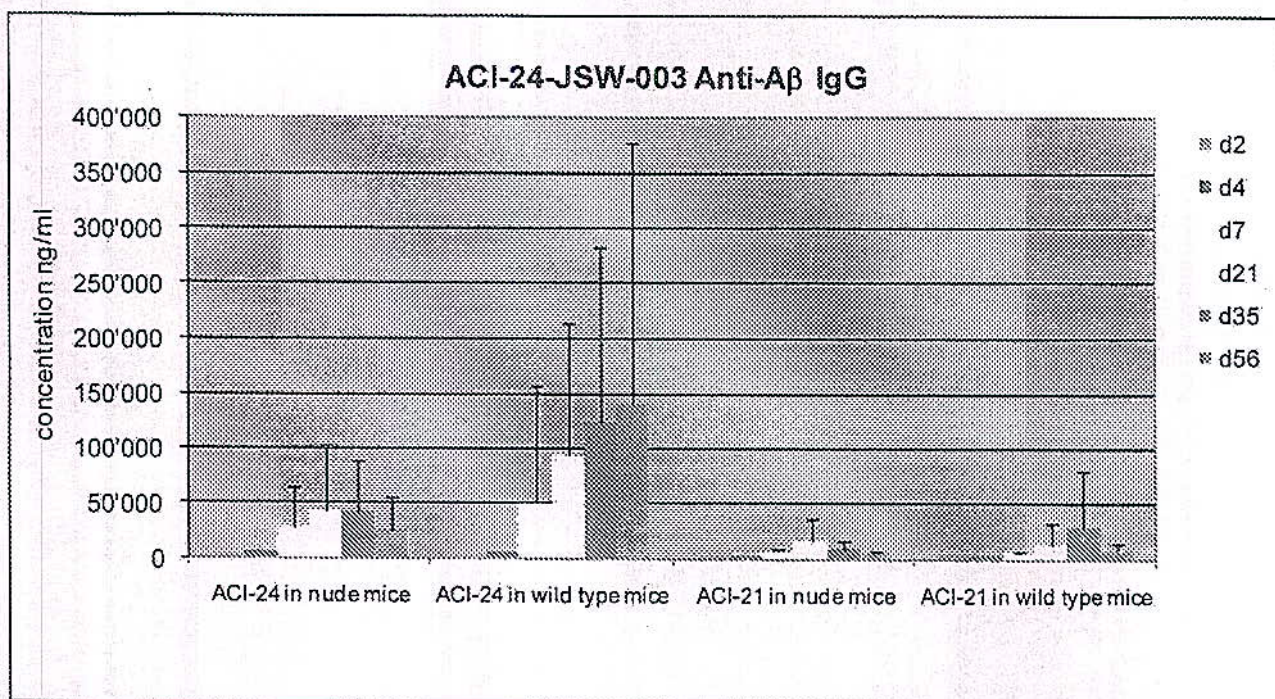


Figure 2. Anti-A β IgG antibodies in mice immunized with ACI-24 or ACI-21.

Analysis of anti-A β IgG antibodies in the plasma of nude and Wt mice receiving either ACI-24 or ACI-21 vaccines 2, 4, 7, 21, 35 and 56 days after the first immunization. Results are expressed as mean + standard deviation obtained in groups of 6 mice in the upper graph and as individual data in the lower graph.

Conclusion

The anti-A β IgG response in Wt mice was higher for ACI-24 than ACI-21. Thus, ACI-24 showed a stronger immunogenicity than ACI-21. ACI-24 vaccine induced an anti-A β IgG response also in nude mice but the response was lower than in Wt mice. ACI-21 induced a low antibody response in both nude and Wt mice.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0097813

Bogotá D.C., Septiembre 25 de 2012 - 08:10:30

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A. NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	455230705	24/09/2012	4.725.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				\$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-054157- -00006-0000

Fecha: 2012-10-22 16:25:06 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 23

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Septiembre 25 de 2012 - 08:10:35

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0097801	
				Bogotá D.C., Septiembre 25 de 2012 - 08:10:30	
RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.				NI 830.022.145	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	455230705	24/09/2012	4.725.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO	
6 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	180.000.00	
				\$180.000.00	
=====					
SON: **CIENTO OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: _____			SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO		
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
			No. 08-054157- -00006-0000		
			Fecha: 2012-10-22 16:25:06 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR		
			Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI		
			Act. 523 RESPUESTA Folios: 23		
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
Septiembre 25 de 2012 - 08:10:34					

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0095756	
				Bogotá D.C., Septiembre 18 de 2012 - 09:11:19	
RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.				NI 830.022.145	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	455230694	17/09/2012	26.690.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO	
15	50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	450.000.00
					\$450.000.00
=====					
SON: **CUATROCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO					
					
No. 08-054157- -00006-0000					
Fecha: 2012-10-22 16:25:06 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR					
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI					
Act. 523 RESPUESTA Folios: 23					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
Septiembre 18 de 2012 - 09:11:30					

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0095757	
				Bogotá D.C., Septiembre 18 de 2012 - 09:11:19	
RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.				NI 830.022.145	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	455230694	17/09/2012	26.690.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO	
15	50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	450.000.00
					\$450.000.00
=====					
SON: **CUATROCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**					
Responsable: _____					
-***-					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO					
					
No. 08-054157- -00006-0000					
Fecha: 2012-10-22 16:25:06 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR					
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI					
Act. 523 RESPUESTA Folios: 23					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
Septiembre 18 de 2012 - 09:11:30					