

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. _____ D. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-054157- -00009-0000

Fecha: 2013-03-08 16:44:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 19

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.-

Yo, **ALICIA LLOREDA RICAURTE**, mayor, vecina de esta ciudad, identificada con la cédula de ciudadanía número 39.690.713 de Usaquén, Representante Legal en Bogotá para todos los asuntos relacionados con la Propiedad Industrial de la sociedad **AC IMMUNE SA.**, organizada y existente de conformidad con las leyes de Suiza, domiciliada en Lausanne, Suiza, atentamente manifiesto a usted que interpongo **RECURSO DE REPOSICIÓN** contra la Resolución Número **1719**, dictada por el señor Superintendente de Industria y Comercio el 28 de Enero de 2013, en relación con la negación del privilegio de patente de invención para la solicitud en referencia, por una supuesta falta de **Nivel Inventivo** de dicha solicitud.

I. FUNDAMENTOS DE DERECHO

Me permito manifestar ante ese Despacho que el mencionado Recurso de Reposición encuentra fundamento en que el contenido de la Resolución Número **1719** evidencia que durante el examen técnico realizado a la solicitud denegada se realizó una evaluación incorrecta del objeto de la invención allí reclamada, sin considerarse su real alcance e importancia.

Es así que, a pesar de los argumentos proporcionados por el solicitante en el memorial de Octubre 22 de 2012 (en respuesta al Oficio No. **10015**), en la Resolución impugnada ese Despacho mantiene las objeciones con respecto al Nivel Inventivo de la solicitud, afirmando categóricamente que lo siguiente:

"En consecuencia, la persona versada en la materia, enfrentada a la necesidad de proporcionar un péptido β -amiloide alternativo, y a la luz de las enseñanzas del documento D2 según la cual un fragmento de péptido β -amiloide (1-16) proporciona una respuesta inmune significativa y los residuos de palmitoilo tienen una longitud apropiada para la inserción estable del péptido β -amiloide (1-16) dentro de la bicapa lipídica, incluiría los residuos de palmitoilo y escindiría uno de los aminoácidos de la estructura del péptido β -amiloide (1-16)".

En vista de lo anterior, a continuación me permito brindar argumentos técnicos que no sólo demostrarán a ese Despacho que la presente invención sí cumple con el requisito de Nivel Inventivo exigido por el Artículo 18 de la Decisión 486 de 2000, sino que además establecerán que el análisis realizado es incorrecto, toda vez que se interpreta de manera errónea tanto la invención como el arte previo; constituyéndose por lo tanto la negación de la solicitud en una clara violación al mencionado Artículo 18 de la Decisión Andina 486 de 2000.

Adicionalmente, me permito señalar que con el fin de clarificar aún más el objeto de la invención y resaltar las diferencias que existen con respecto al arte previo es deseo del solicitante modificar la solicitud, presentando un nuevo capítulo reivindicatorio, tal como se expone a continuación.

1. Modificaciones a la solicitud: Nuevo Capítulo Reivindicatorio

Antes de entrar a discutir los argumentos que demuestran la patentabilidad de la presente solicitud me permito manifestar que el solicitante, al amparo de lo estipulado por el Artículo 34 de la Decisión Andina 486 de 2000, ha modificado la solicitud presentando un nuevo capítulo reivindicatorio, que reemplaza al actualmente presentado, el cual delimita más claramente el objeto de la invención, haciendo que sean aún más evidentes las características distintivas de la invención.

En conexión con este nuevo capítulo reivindicatorio me permito resaltar que no se constituye de ninguna manera en una ampliación del alcance de la solicitud, tal como fue originalmente presentada, toda vez que cuenta con pleno sustento en la descripción de la solicitud y en el capítulo reivindicatorio actualmente presentado, tal como se resume a continuación:

- **Reivindicación 1.** Tiene como base la reivindicación 19 actualmente presentada, donde se ha clarificado que el fragmento del péptido β -amiloide se selecciona del grupo que consiste en los residuos 1-15, 1-14 y 1-13, tal como lo indica la reivindicación 21 actualmente presentada.

• **Reivindicaciones 2 a 27.** Se basan respectivamente las reivindicaciones 22 a 47 actualmente presentadas, modificadas en su preámbulo en concordancia con la nueva reivindicación 1 y cuya dependencia se ha ajustado a la nueva numeración.

Consecuentemente, el nuevo capítulo reivindicatorio está constituido por **22 reivindicaciones** las cuales enfocan la reclamación en una realización preferida de la invención: la construcción antigénica que comprende un fragmento del péptido β -amiloide en concordancia con las enseñanzas de la descripción tal como ha sido presentada.

En vista de este hecho, y a la luz de la facultad que la Decisión Andina 486 otorga al solicitante mediante las disposiciones que establece el Artículo 34 de la misma:

"Artículo 34.- El solicitante de una patente podrá pedir que se modifique la solicitud en cualquier momento del trámite. La modificación no podrá implicar una ampliación de la protección que correspondería a la divulgación contenida en la solicitud inicial.

Del mismo modo, se podrá pedir la corrección de cualquier error material."
(Énfasis añadido)

Resulta claro que la presentación del mencionado nuevo capítulo reivindicatorio está amparada bajo la legislación Andina, y por lo tanto muy comedidamente solicito a ese Despacho tener en consideración dicho nuevo capítulo reivindicatorio en su análisis del presente Recurso.

2. Principales características de la invención denegada

Ahora bien, con el fin de contextualizar los motivos por los cuales ese Despacho realiza una incorrecta valoración y evaluación del arte previo, me permito señalar a continuación las principales características y ventajas técnicas de la materia revelada en la solicitud de patente negada.

La presente solicitud se relaciona con un constructo antigénico que comprende un fragmento del péptido β -amiloide que consiste de una extensión sencilla o repetitiva de entre 13 y 15 residuos de aminoácido contiguos del extremo N-terminal del péptido β -amiloide y una porción lipofílica o hidrofóbica unida al residuo aminoácido terminal del péptido β -amiloide más puro, donde el antígeno de péptido β -amiloide se produce por un método novedoso de dos pasos, el cual es desarrollado por la presente invención.

Dicho constructo, tal como es descrito en la nueva reivindicación 1 comprende específicamente residuos contiguos de aminoácidos de la parte N terminal del péptido A β , los cuales se seleccionan del grupo que consiste de los residuos 1-15, 1-14 y 1-13 de dicho péptido.

Adicionalmente, dicho péptido se obtiene por dos pasos: (a) construir el fragmento del péptido β -amiloide por síntesis de péptidos estándar automatizada sobre resina y (b) modificar el fragmento del péptido β -amiloide ya formado por un injerto sobre resina de una porción lipofílica o hidrofóbica sobre los residuos de aminoácidos del péptido ya formado.

En conexión con lo anterior es pertinente resaltar que de manera ventajosa este método de obtención conduce a un producto con un grado de pureza superior al exhibido por péptidos similares del arte previo.

Así mismo, la construcción de la invención proporciona de manera ventajosa una alta actividad frente a la enfermedad de Alzheimer en modelo murino, produciendo una respuesta inmune altamente específica y brindando beneficios como una restauración completa de la capacidad de memoria en los ratones tratados cuando se compara con ratones sanos no tratados, no transgénicos, de tipo salvaje.

En este sentido me permito resaltar que estas propiedades mejoradas de la construcción de la invención fueron comprobadas por el solicitante, tal como lo evidencia la descripción de la solicitud y los datos adicionales proporcionados en respuesta al primer requerimiento técnico, y dichas propiedades no pueden de ninguna manera ser evidentes a partir de las enseñanzas del arte previo, lo que será demostrado a continuación.

3. Consideraciones técnicas frente a las enseñanzas del arte previo.

Habiendo ya contextualizado el objeto y el impacto que tiene la solicitud denegada, me permito reiterar que el objeto de dicha solicitud es a todas luces inventiva con respecto a las enseñanzas del arte previo citado en la Resolución Número **1719**, esto es, 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)**.

Con el fin de demostrar este hecho, a continuación me permito exponer las principales razones que harían que la persona versada en la materia no pudiera de ninguna forma obtener la materia reclamada en la solicitud de negada partiendo de los citados documentos D1 y D2 evidenciando así la incorrecta interpretación que

realiza ese Despacho del arte previo, interpretación que lo lleva a concluir de forma errónea con respecto a la patentabilidad de la solicitud.

3.1. Ese Despacho no toma en consideración todas las características distintivas de la construcción antigénica de la invención como lo es el método particular por el cual se obtiene el fragmento del péptido β -amiloide allí empleado.

En primer lugar me permito señalar que ese Despacho realiza una interpretación errónea del objeto de la presente solicitud, pasando por alto características fundamentales de la invención que contribuyen a obtener el efecto técnico mejorado que dicha invención proporciona.

En este sentido me permito resaltar que la Tabla 1, de la página 3 de la Resolución número **1719** realiza un resumen de las características técnicas de la construcción antigénica de la reivindicación 19 (nueva reivindicación 1) señalando que estas estarían contenidas dentro de las revelaciones de D1 y D2, sin tomar en consideración una característica fundamental de la invención como es el método de obtención del péptido antigénico, el cual sería reconocido por la persona versada en la materia como un elemento esencial de la invención.

De esta forma, como se expuso anteriormente, el método para producir el péptido antigénico de la invención comprende los pasos de: (a) construir el fragmento del péptido β -amiloide por síntesis de péptidos estándar automatizada sobre resina y (b) modificar el fragmento del péptido β -amiloide ya formado por un injerto sobre resina de una porción lipofílica o hidrofóbica sobre los residuos de aminoácidos del péptido ya formado.

Con respecto a este método me permito resaltar que conduce a un producto que es muy distinto de aquel reportado en los documentos D1 y D2, por ejemplo en que este está esencialmente libre de sub-productos contaminantes, los cuales tienen un impacto negativo en las propiedades inmunogénicas del antígeno.

En este sentido considero relevante señalar que **dado que la forma de obtención del antígeno tiene una influencia directa en el potencial inmunogénico de dicho antígeno, este método resulta ser una característica técnica esencial de la construcción inmunogénica de la invención.**

Es así como el método para obtener el péptido de la invención implica el acople de los aminoácidos en la resina uno a uno en una síntesis en fase sólida convencional, es decir se empieza uniendo a la resina el primer residuo protegido, y luego de la desprotección de dicho residuo se acopla el segundo residuo protegido,

hasta realizar el acople de los 13, 14 o 15 residuos de aminoácido totales de la cadena. Una vez la cadena peptídica esté completa con el último residuo acoplado se realiza la modificación al realizar sobre una resina el injerto de una porción lipofílica o hidrofóbica a los residuos de la región amino terminal del péptido ya formado.

Contrario a lo anterior, el proceso revelado en los documentos D1 y D2 comienza con el anclaje sobre la resina de un aminoácido ya modificado, esto es, una lisina ϵ -palmitoilada, luego de este anclaje, se realiza la síntesis de péptidos convencional en fase sólida automática del péptido A β antigénico (ver párrafo [0110], D1, y segundo párrafo, página 2333, D2).

Consecuentemente el método por medio del cual se obtiene el péptido que hace parte de la construcción antigénica de la invención difiere significativamente de aquel revelado en D1 y D2 dado que en la solicitud denegada se emplean aminoácidos sin modificar y a partir de ellos se sintetiza el péptido deseado, y es luego de tener la cadena peptídica completa que se realiza se realiza el injerto sobre resina de la porción lipofílica.

Tal como se discutió en mi memorial de Octubre 22, 2012, el Reporte Experimental 1 evidencia que al emplear el método de la presente invención se obtiene un producto significativamente más puro que aquel que se produce por el método seguido por D1. En efecto, la mayor impureza individual identificada por HPLC para el producto de la invención es significativamente menor (7%) que aquella que se encuentra en el producto obtenido por la metodología de D1 (14%).

Más aún, se ha encontrado que el proceso de acuerdo con D1 conduce a un producto sustancialmente contaminado con impurezas de características tales que no pueden ser removidas por métodos convencionales de purificación aplicables en producción.

Es así como se ha mostrado que la aproximación sintética de Pal1-16 descrita en D1 resulta en al menos dos impurezas importantes que eluyen en HPLC con un tiempo de retención (23.7 min y 27.9 min) que es muy similar al encontrado para el péptido Pal1-16 (27.0 min):

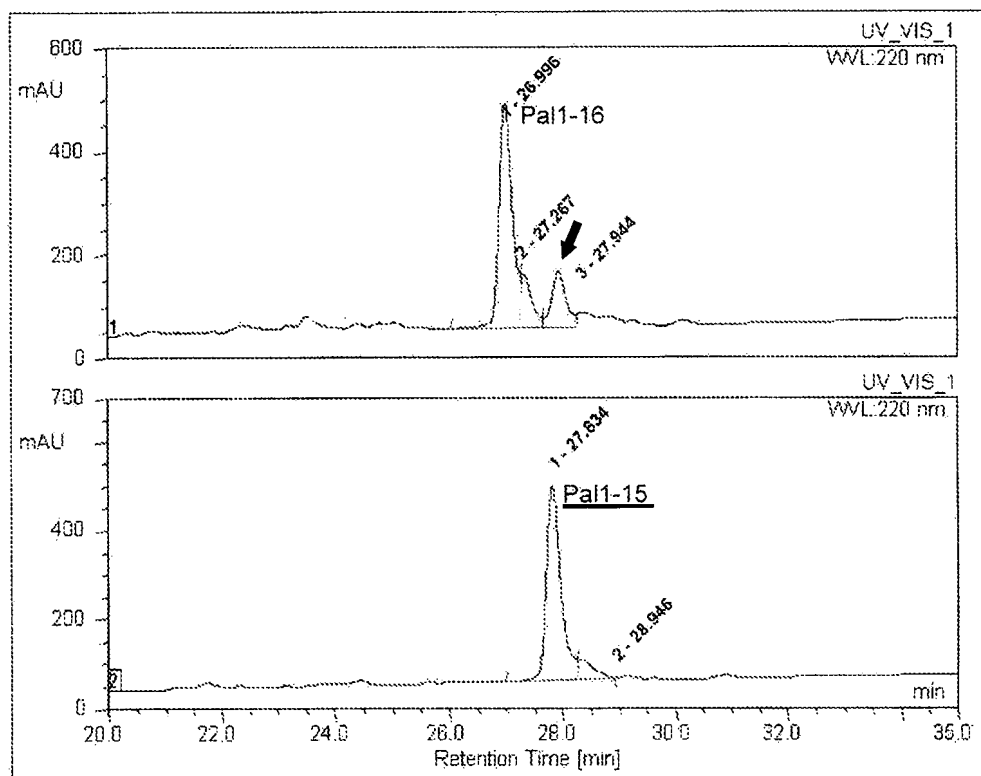


Figure 1: Typical HPLC chromatograms of Pal1-16 (batch SP072030F) and Pal1-15 (batch SP011547J)

Esto significa que el método sintético de la invención para producir Pal 1-15 conduce al efecto sorprendente e inesperado de una significativa mayor pureza del producto, más aún, dicho método proporciona un producto que es diferente de aquellos obtenibles por el método de D1 o D2 en que carece de las mencionadas impurezas importantes.

En conexión con este hecho me permito reiterar que, como sería claro para la persona versada en la materia, la pureza del péptido antigénico tiene una influencia significativa en la respuesta inmune que este vaya a generar, y por lo tanto, el método de obtención del antígeno resulta ser una característica técnica esencial que permite describir y delimitar de manera más clara la invención.

Así mismo me permito señalar que para dicha persona versada en la materia resultaría evidente que dada la complejidad del proceso de síntesis de un péptido y que la cadena peptídica generalmente presenta enrollamientos una vez está completamente sintetizada, generalmente la estrategia seguida para obtener péptidos modificados es introducir el aminoácido ya modificado dentro del proceso de síntesis, como se realiza en D1 y D2, tratando de evitar así posibles bajos rendimientos al realizar la modificación una vez se tiene la cadena peptídica completa ya sintetizada.

Consecuentemente, resulta indiscutible que la manera en que se obtiene el péptido antigénico se constituye en una característica esencial que permite una definición completa de la invención.

De otra parte, me permito resaltar que dentro de su análisis de las características esenciales de la presente invención ese Despacho ignora además el hecho que el péptido reclamado está confinado a los residuos de aminoácidos 13 a 15 del extremo N-terminal del péptido β -amiloide, lo que implica que se evita el residuo 16 el cual, cómo sería reconocido por la persona versada en la materia, es el primer residuo del epítoto de células T.

En conexión con lo anterior me permito señalar que, como se expuso anteriormente, la nueva reivindicación 1 incluye la clarificación con respecto a que la construcción antigénica comprende los residuos 1 a 15 o 1 a 14 o 1 a 13 del péptido β -amiloide y por lo tanto de ninguna manera podría contener el mencionado residuo 16.

En este sentido me permito resaltar que **esta se constituye en una diferencia significativa con el arte previo, toda vez que no se está simplemente "escindiendo un aminoácido" de forma arbitraria, como lo asegura ese Despacho, sino que se están obteniendo moléculas que permiten una respuesta inmune satisfactoria, toda vez que al evitar el residuo 16 del extremo N-terminal del péptido β -amiloide, el péptido de la solicitud denegada contiene únicamente un epítoto de células B y está libre de epítopes de células T, lo que, como sería evidente para la persona versada en la materia, conlleva a una respuesta inmune tipo Th1 más atenuada y así evita el desarrollo de efectos colaterales severos como, por ejemplo, meningoencefalitis.**

Consecuentemente, resulta innegable que la construcción que es objeto de la solicitud denegada posee características técnicas esenciales que no fueron consideradas de forma adecuada por ese Despacho al realizar su evaluación de nivel inventivo de la presente invención.

3.2. La construcción de la invención si proporcionan una ventaja técnica con respecto a lo existente en el arte previo, tal como fue comprobado por el solicitante.

Ahora bien, en la Resolución impugnada ese Despacho afirma que no existiría ningún efecto técnico al emplear la construcción antigénica que comprende de 13 a 15 aminoácidos con respecto al fragmento de péptido β -amiloide que se conocía previamente en D1, señalando además que el problema técnico que resuelve la presente invención sería la modificación del fragmento del péptido β -amiloide conocido de D1 con el fin de proporcionar un péptido alternativo.

Sumado a lo anterior, la Resolución impugnada indica que los ejemplos de la solicitud denegada serían contradictorios y no permitirían evidenciar el efecto técnico proporcionado por la invención.

Sobre este particular me permito resaltar que este señalamiento comprueba la incorrecta interpretación que realiza ese Despacho de las enseñanzas de la solicitud denegada, toda vez que no reconoce que los resultados presentados comprueban la actividad mejorada de la construcción reclamada.

Es así como, tal como se indicó en mi memorial de Octubre 22, 2012, **el péptido de la invención posee una actividad biológica mejorada conduciendo a una restauración completa de la capacidad de memoria en los ratones tratados cuando se compara con ratones sanos no tratados, no transgénicos, de tipo salvaje.**

En particular, me permito señalar que el ejemplo 7.1 de la página 95 de la descripción de la solicitud muestra que la construcción antigénica de la invención mejora significativamente la capacidad de memoria no espacial, dependiente de hipocampo en modelo murino APP x PS1 de enfermedad de Alzheimer en un periodo de tiempo de 3 meses.

En efecto, esta mejor respuesta inmunogénica es confirmada en los resultados obtenidos por el solicitante y que se presentaron junto con el ya referenciado memorial de Octubre 22, 2012, 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.

De esta forma, el mencionado reporte experimental 2 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.

Por otro lado me permito resaltar que **si bien los ejemplos revelados dentro de la descripción de la solicitud están encaminados a comprobar hechos distintos, estos de ninguna manera pueden ser interpretados como contradictorios, toda vez que todos conducen a la misma conclusión: la construcción de la invención proporciona una respuesta inmune altamente**

específica que permite la restauración de la capacidad de memoria en modelo murino de la enfermedad de Alzheimer.

Es así como el Ejemplo 5 de la página 90 de la descripción de la solicitud muestra que el péptido palmitoilado de la invención brinda una respuesta más específica que el péptido 1-16 pegilado, lo que la persona versada en la materia claramente reconocería como benéfico, toda vez que una respuesta inmunogénica exagerada puede conducir a efectos colaterales indeseados, tal como se expuso anteriormente (la construcción de la invención tiene una respuesta Th1 más atenuada).

Así mismo, el Ejemplo 6 de la página 91 comprueba que existe una producción mayor de IgGs superior (1, 2a y 2b) al inocular la construcción de la invención (ACI-24) que al emplear el antígeno pegilado (ACI-01), lo que implica una respuesta inmune secundaria y específica como consecuencia de dicha construcción de la invención.

Por su parte, contrario a lo afirmado por la Resolución impugnada, el ya referenciado Ejemplo 7 de la descripción de la solicitud en su Tabla 3 (página 97, descripción de la solicitud) comprueba cómo el 76,1 % (+/- 3,9%) de los individuos tratados con la construcción de la invención (ACI-24) recuperan la capacidad de memoria cognitiva, porcentaje que es muy superior al obtenido con el péptido pegilado (ACI-01) el cual no da un resultado que resulte significativamente mejor que el control.

Consecuentemente, me permito resaltar que la afirmación por ese Despacho con respecto a que *"los péptidos de esta solicitud no proporcionan propiedades mejoradas en la respuesta inmune"* (página 5, Resolución Número **1719**) resulta totalmente injustificada, toda vez que se ha demostrado tanto dentro de la descripción de la solicitud como en los Reportes Experimentales que fueron allegados a mi resaltado memorial de Octubre 22 de 2012 que los constructos de la invención sin lugar a dudas conducen a una respuesta inmune altamente específica con propiedades benéficas como la completa restauración de la capacidad de memoria en el modelo murino de la enfermedad de Alzheimer.

3.2. Los documentos citados no conducen indefectiblemente a obtener la construcción que es objeto de la presente solicitud y mucho menos a predecir sus ventajas técnicas.

De otra parte, con respecto a la afirmación que hace ese Despacho con respecto a que los documentos D1 y D2 brindarían herramientas suficientes para que la persona versada en la materia obtenga de forma evidente la presente invención,

me permito señalar que aun cuando los documentos D1 y D2 revelan péptidos β -amiloides modificados con palmitoilo 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 método de obtener estos péptidos sería de crucial importancia para producir 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 estos péptidos particulares como inmunógenos y mucho menos de reducir el número de residuos en el péptido allí revelado y cambiar la metodología por la cual se obtienen dichos inmunógenos.**

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 hematoencefálica, que si debe ser atravesada en el organismo real a ser tratado por enfermedades como el Alzheimer:

"La ausencia del obstáculo de la barrera hematoencefálica 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 hematoencefálica la persona versada en la materia tendría dudas sobre la efectividad de emplear este tipo de sustancia 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 palmítico 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.

Así mismo, **dichos documentos no brindan sugerencias con respecto a la conveniencia de omitir el residuo 16 del extremo N-terminal del péptido β -amiloide y mucho menos sugieren una alternativa sintética para obtener el péptido palmitoilado, por lo que la persona versada en la materia, a la luz de sus enseñanzas no podría simplemente suponer de forma arbitraria que sería deseable reducir la longitud del péptido revelado en estos documentos y obtenerlo de manera distinta, toda vez que de ninguna manera tendría una expectativa razonable de que este tipo de modificaciones pudieran conducir a algún efecto técnico mejorado.**

Por lo tanto, resulta innegable que las enseñanzas de los documentos citados, D1 y D2, no guían a la persona versada en la materia a obtener una construcción antigénica como la que es reclamada por el capítulo reivindicatorio modificado en el presente memorial.

4. Requisitos exigidos por el Artículo 18, la evaluación del Nivel Inventivo de una Solicitud de patente.

Dentro del contexto de los argumentos discutidos anteriormente, me permito señalar que el Artículo 18 de la Decisión Andina 486 de 2000 exige de forma manifiesta que la invención no debe resultar obvia ni se debe poder derivar de forma evidente de lo existente en el arte previo, y por lo tanto es en este sentido que el examinador debe encaminar su análisis para sopesar si una solicitud es o no merecedora del beneficio de patente.

Así mismo, me permito llamar la atención a ese Despacho a que el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina se ha pronunciado con respecto a las definiciones de "obvio" y "evidente" en la evaluación del Nivel Inventivo de una solicitud de patente¹:

"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

¹ Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina, PROCESO 192-IP-2005

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."

Con respecto a este señalamiento me permito resaltar que resulta indiscutible que para la legislación Andina, para que exista afectación del requisito de Nivel Inventivo de una solicitud de patente, es necesario que la invención allí revelada sea derivable de forma clara y directa del arte previo, y que las enseñanzas de este arte previo sin lugar a dudas conduzcan a dicha invención.

Consecuentemente, para el caso que nos compete dado que a partir de las enseñanzas del arte previo no "salta a la vista de manera clara y directa" una construcción antigénica que comprenda específicamente fragmentos del péptido β -amiloide correspondientes a los residuos 1-15, 1-14 o 1-13 del extremo N-terminal, palmitoilados por injerto posterior a la síntesis de la cadena peptídica completa, y mucho menos a partir de las enseñanzas de dicho estado del arte se tiene "certeza clara y manifiesta" de que dicha construcción brindaría una respuesta inmune específica y una restauración completa de la capacidad de memoria en el modelo murino de la enfermedad de Alzheimer, es evidente que el arte previo no puede afectar el Nivel Inventivo de la solicitud en estudio.

II. CONCLUSIONES

Con base en los argumentos técnicos mostrados previamente, me permito manifestar ante ese Despacho que la materia revelada en la solicitud de patente en cuestión, especialmente como es ahora reclamada dentro del nuevo capítulo reivindicatorio, presenta un inequívoco carácter inventivo frente a las enseñanzas del arte previo citado en la Resolución Número **1719** aquí impugnada, cumpliendo así a cabalidad las disposiciones establecidas en el Artículo 18 de la Decisión Andina 486 de 2000, y por lo tanto demostrando ser merecedora del privilegio de patente requerido.

En efecto, dichos argumentos establecieron que la solicitud denegada no podría ser obtenida de manera evidente a partir de las enseñanzas de D1 y D2 máxime cuando las revelaciones de dichos documentos.

En este sentido, se ha demostrado a lo largo del presente memorial que los péptidos antigénicos de D1 y D2 se diferencian de los de la invención no sólo por tener una cadena peptídica más larga sino por la manera en la cual se hace la derivatización para introducir la porción lipofílica de ácido palmítico, la cual se realiza en dichos documentos incluyendo en la síntesis un aminoácido que ha sido previamente modificado, mientras que en la invención se realiza la modificación posterior a la construcción completa de la cadena peptídica.

Así mismo, se estableció que estas diferencias sí proporcionan un efecto técnico sorprendente con respecto al arte previo toda vez que el solicitante ha comprobado que la construcción de la invención brinda una respuesta inmune más específica, que permite evitar reacciones inmunes indeseadas, y conduce además la restauración de la capacidad de memoria en el modelo murino de la enfermedad de Alzheimer.

Como consecuencia de lo anterior, me permito resaltar que dado que la solicitud denegada sí se ajusta completamente a los requerimientos establecidos por la Decisión Andina 486, al negar el privilegio de patente ese Despacho claramente contraviene los Artículos 14 y 18 de dicha Decisión.

III. SOLICITUD

En vista de todo lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las argumentaciones presentadas y revocar la Resolución Número **1719** impugnada para conceder el privilegio de patente solicitado.

IV. PODER

En este punto me permito mencionar ante ese Despacho que el documento que acredita mi calidad de Representante Legal en Bogotá para asuntos relativos a la Propiedad Industrial de la sociedad peticionaria fue presentado junto con mi memorial de Septiembre 17 de 2008.

V. ANEXOS

Anexo me permito presentar me permito presentar:

- (i) Copia de las páginas **114 a 117** que corresponden al nuevo capítulo reivindicatorio discutido en el presente memorial, el cual consta de **27** reivindicaciones;
- (ii) Copia de los Reportes experimentales 1 y 2 que se presentaron junto con el memorial de Octubre 22 de 2012.

VI. DOMICILIO

Mi dirección es Calle 72 No. 5-83, Piso 6º, Bogotá D.C.

Señor Superintendente,



ALICIA LLORED A RICAURTE

T.P. 53.215

REIVINDICACIONES

1. Una construcción antigénica 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 , seleccionado del grupo que consiste de los residuos 1-15, 1-14 y 1-13 y un residuo lipofílico o hidrofóbico se adosa a los residuos aminoácidos terminales del péptido A β , donde el péptido A β es (a) pre-formado por síntesis de péptidos estándar automatizada sobre resina y (b) entonces modificado por un injerto sobre resina de un residuo lipofílico o hidrofóbico a los residuos aminoácidos terminales del péptido A β pre-formado.
2. La construcción antigénica de acuerdo con la reivindicación 1, 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.
3. La construcción antigénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, 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.
4. La construcción antigénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 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.
5. La construcción antigénica de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el antígeno peptídico A β se presenta reconstituido en un liposoma.
6. La construcción antigénica de acuerdo con la reivindicación 3, 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.

7. La construcción antigénica de acuerdo con la reivindicación 6, 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.

8. La construcción antigénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en donde el resto lipofílico o hidrofóbico es un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido.

9. La construcción antigénica de acuerdo con la reivindicación 8, 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.

10. La construcción antigénica de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el resto hidrofóbico es ácido palmítico.

11. La construcción antigénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en donde la preparación de liposoma contiene un coadyuvante o un inmunomodulador.

12. La construcción antigénica de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el inmunomodulador es lípido A, particularmente lípido A detoxificado tal como monofosforil o difosforil lípido A o alumbre.

13. Una composición de vacuna que comprende una construcción antigénica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

14. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 13 que comprende un antígeno peptídico $A\beta_{1-15}$ para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide.

15. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 14, 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 .

16. La composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15, 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.

17. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el antígeno peptídico $A\beta_{1-15}$ se presenta reconstituido en un liposoma.

18. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 17, 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.

19. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 18, 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.

20. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el resto lipofílico o hidrofóbico en un ácido graso, triglicérido o fosfolípido.

21. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el esqueleto carbonado de ácidos grasos tiene al menos 10 átomos de carbono.

22. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el resto hidrofóbico es ácido palmítico.

23. La composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 22, en donde la preparación de liposoma contiene un coadyuvante y/o un inmunomodulador.

24. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 23, en donde el inmunomodulador es lípido A detoxificado, tal como monofosforil o difosforil lípido A.

25. 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.

26. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 25, 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.

27. 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

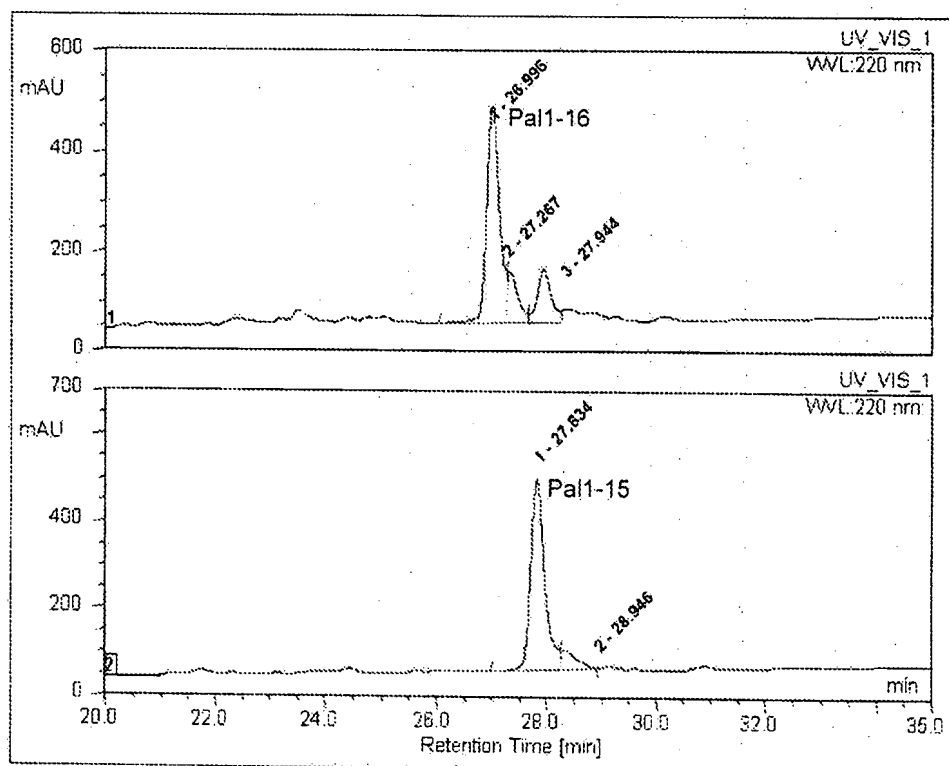


Figure 1: Typical HPLC chromatograms of Pal1-16 (batch SP072030F) and Pal1-15 (batch SP011547J)

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	3.7	3125.9	- ArgHis
			2nd tail		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

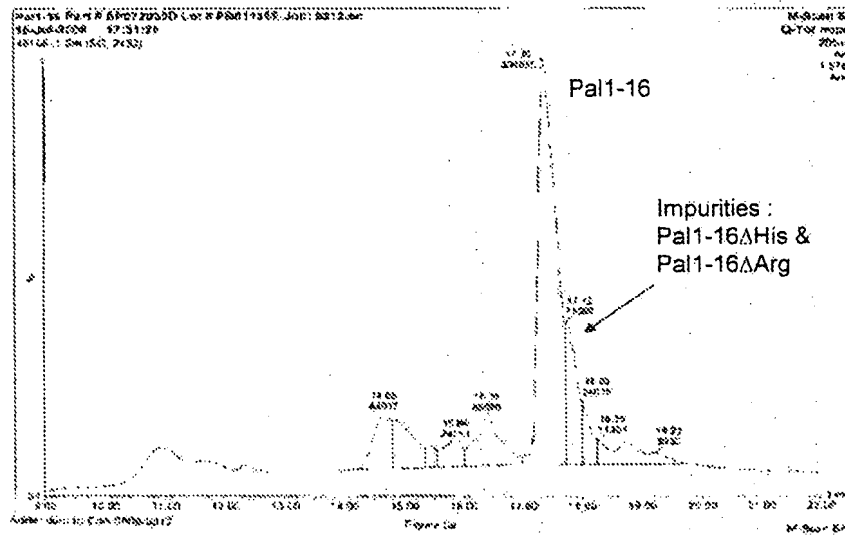


Figure 2: LC-MS analysis of Pal1-16 synthesised according to method B

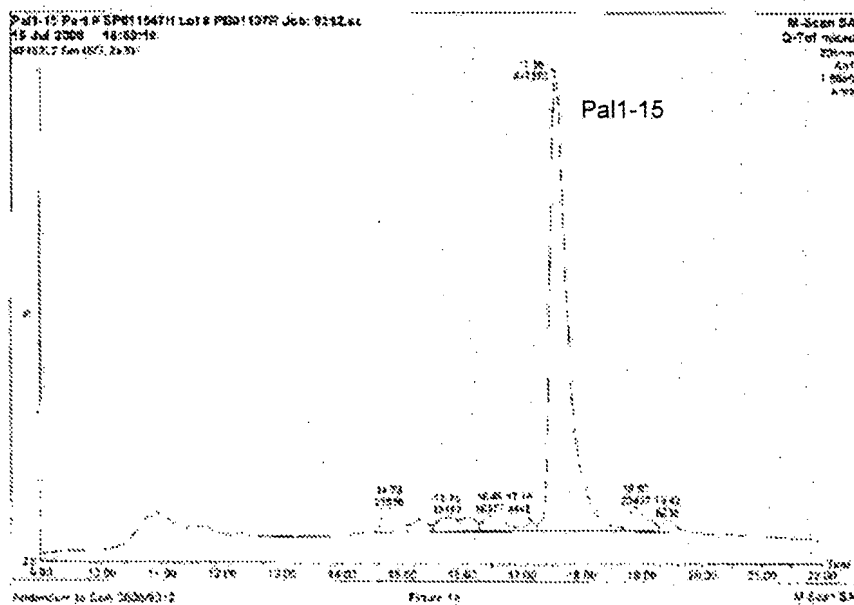


Figure 3: LC-MS analysis of Pal1-15 synthesised according to method A

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 ($A\beta$)1-16) and ACI-24 (containing palmitoylated $A\beta$ 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- $A\beta$ -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 $A\beta$ 1-15 (Product # SP011547H, NeoMPS, France) or Palmitoylated $A\beta$ 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 (130µg/mL), Pal1-16 (135µg/mL). Added quantities of DMPC/DMPG/cholesterol/MPLA were 2410/272/1069/135 µg/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. $A\beta$ 1-42-specific IgG antibody titers were determined by ELISA. On day 56 animals were sacrificed and blood and spleens were collected.

Quantification of $A\beta$ -specific antibodies

$A\beta$ 1-42-specific IgG antibodies were determined by ELISA. Plates were coated with 10 µg/ml of $A\beta$ 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

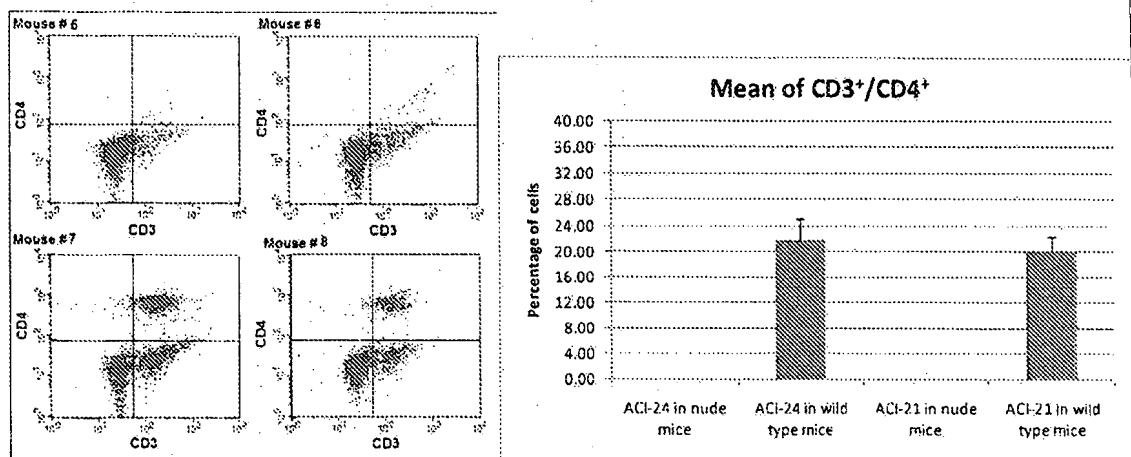
Results

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.

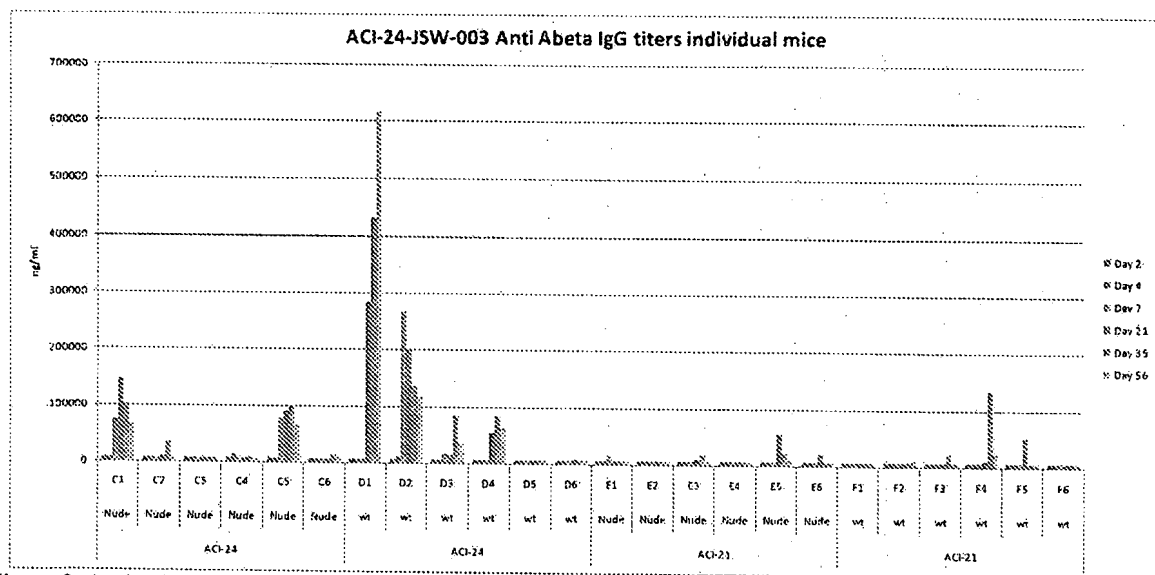
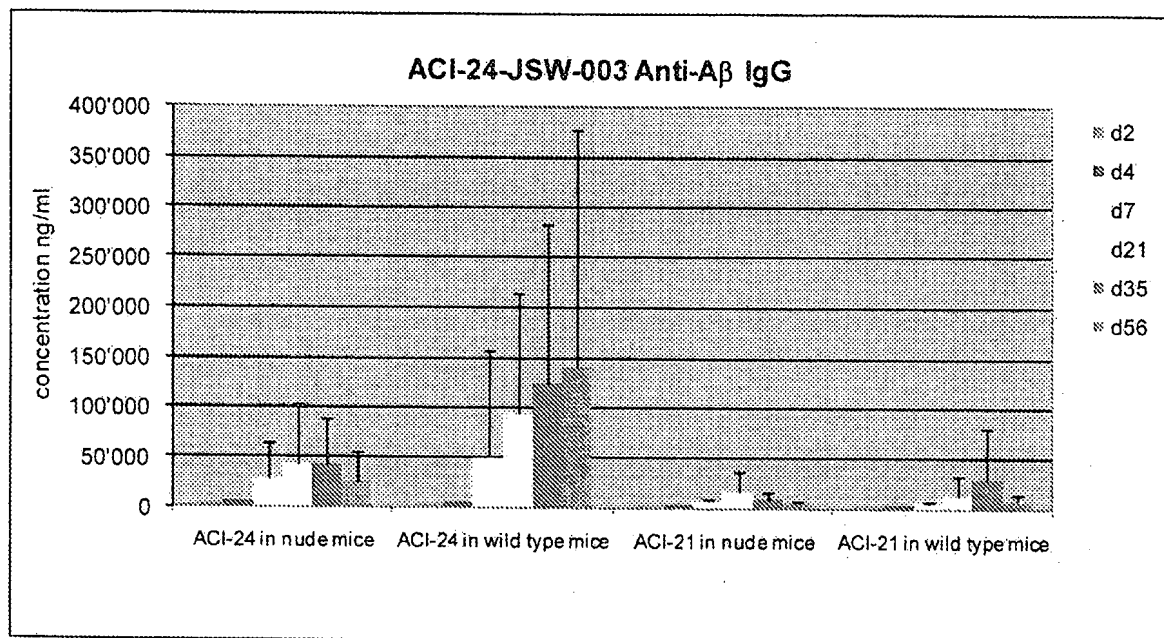


Figure 2. Anti-A β IgG antibodies in mice immunized with ACI-24 or ACI-21.

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.