

VACUNAS TERAPEUTICAS ANTI-ABETA

CAMPO DE LA INVENCION

La invención está relacionada con vacunas terapéuticas anti-abeta y su uso en el tratamiento y la prevención de enfermedades. Las vacunas incorporan antígenos peptídicos para células B derivados de A β y epítomos para células T.

DESCRIPCION

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno degenerativo progresivo y devastador que se caracteriza por la pérdida de funciones cognitivas, incluyendo la memoria, así como la pérdida de la capacidad de realizar actividades diarias regulares. La EA afecta a aproximadamente 40 millones de pacientes en todo el mundo, y la cantidad se incrementa rápidamente a medida que la población envejece. El cambio neuropatológico principal en el cerebro de los pacientes con EA es la muerte neuronal, principalmente en las regiones relacionadas con la memoria y la cognición (Soto, 1999). Una de las características patológicas más notables de la EA es la presencia abundante de placas amiloides beta (A β) en el cerebro de los individuos enfermos (Soto, 1999). Las placas A β están formadas por péptidos A β con una longitud de entre 39 y 43 aminoácidos, que en su forma natural no patológica adoptan una conformación de espiral aleatoria. Durante la transición al estado patológico, se transforman principalmente en estructuras secundarias de láminas β , que se agregan espontáneamente en depósitos insolubles.

Se considera que los pocos tratamientos actualmente disponibles para la EA tienen una acción principalmente sintomática. A pesar de los esfuerzos significativos realizados en el desarrollo de tratamientos a lo largo de los años, hasta la fecha no se ha aprobado ningún tratamiento modificador de la

enfermedad para la EA. Se han realizado esfuerzos para desarrollar tratamientos inmunoterapéuticos que neutralicen las placas A β patológicas en el cerebro enfermo a largo plazo (Winblad, 2014). Las vacunas tienen la ventaja de estimular el sistema inmune para producir grupos de anticuerpos ligeramente diferentes pero muy específicos, y de ser necesario, la respuesta puede ser evocada nuevamente mediante vacunas adicionales.

Sin embargo, un abordaje de inmunización activa (vacunación) contra A β tiene diversas complicaciones de importancia. Amiloide beta es lo que se conoce como un auto-antígeno, al cual el cuerpo humano está expuesto constantemente. Por ende, resulta difícil romper la tolerancia inmune e inducir una respuesta mediada por anticuerpos. Además, resulta difícil inducir una respuesta inmune fuerte ante una vacuna en personas ancianas y enfermas, tales como los pacientes con EA, debido a su sistema inmune debilitado y la disminución en la cantidad de células inmunes.

A pesar de estas complicaciones, en un estudio inicial, una vacuna A β 1-42 de longitud completa (AN1792) indujo una respuesta mediada por anticuerpos y tuvo una eficacia prometedora, con una velocidad de deterioro cognitivo menor en los pacientes tratados con ella, en comparación con los tratados con un placebo (Gilman, 2005). Sin embargo, 6% de los pacientes tratados desarrollaron meningoencefalitis, una reacción inflamatoria atribuida a una respuesta mediada por células T contra la vacuna A β 1-42 de longitud completa (Orgogozo, 2003).

Otra vacuna anti-A β conocida, ACI-24, contiene una secuencia de 15 aminoácidos con una identidad completa con la secuencia humana 1-15 de A β (WO2007/068411). Este antígeno peptídico está unido a un portador liposomal

para estimular los anticuerpos contra A β y evitar la meningoencefalitis y las hemorragias (Muhs, 2007, Pihlgren, 2013). La selección del péptido A β 1-15 como antígeno se basó en la lógica de que esta secuencia contiene un epítipo para células B pero carece de un sitio reactivo fuerte para las células T ante A β 1-42 de longitud completa (Monsonogo, 2003), la causa potencial de las reacciones inflamatorias indeseables. Se ha comprobado que ACI-24 actúa mediante la activación simultánea de un receptor de células B específico para A β 1-15 y el receptor tipo Toll 4 (TLR4), activado por monofosforil lípido A (MPLA), un coadyuvante presente en la vacuna ACI-24 (Pihlgren, 2013).

Las células B se activan para proliferar y producir inmunoglobulina (Ig) mediante el entrecruzamiento de los receptores de Ig en su superficie. Para incrementar la producción de anticuerpos, puede proveerse una segunda señal mediante una célula auxiliar T activada por un epítipo para células T. Los epítopos para células T, presentados por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (en el antígeno leucocitario humano (HLA)) en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC), promueven la diferenciación de células T auxiliares conocidas que pueden producir IFN γ e IL-4. Mediante la liberación de citoquinas y señales coestimuladoras entre las células T y B activadas, se incrementan las respuestas mediadas por anticuerpos y el cambio de clases. Después de una vacunación primaria, las células T vírgenes proliferan y se diferencian en células efectoras. Una fracción pequeña de estas células forman el grupo de células T de memoria de larga vida, que pueden proliferar rápidamente al reencontrarse con el péptido conocido después de aplicar una vacuna de refuerzo (Sallusto, 2010). Los llamados epítopos para células T “universales” son específicos para las células T presentes en la gran

mayoría de poblaciones humanas. En general, se originan a partir de antígenos a los que los seres humanos están normalmente expuestos durante su vida (por ejemplo, tétanos, influenza, etcétera). La capacidad de un epítipo para células T de activarlas es el resultado de al menos dos propiedades complementarias: (i) la afinidad de unión al surco del HLA, es decir, la fuerza de la unión, y (ii) la capacidad de unirse a diversos haplotipos de HLA de manera promiscua, es decir, la capacidad de abarcar poblaciones humanas muy diversas, con relación a las diferencias en la expresión de las moléculas del HLA.

Existe la necesidad de desarrollar una vacuna anti-A β que sea altamente inmunogénica y mantenga un buen perfil de seguridad. Esta necesidad fue satisfecha al incorporar un epítipo para células T universal en la vacuna liposomal ACI-24. Debido a que la vacuna ACI-24 presenta A β 1-15 en la superficie de liposomas, los inventores consideraron que la inclusión de epítopos para células T universales en la superficie de liposomas sería la primera vía seleccionada para mejorar la eficacia de la vacuna. Sin embargo, mediante la inclusión de epítopos para células T universales en la superficie de liposomas sorprendentemente no pudo incrementarse (o incrementarse sustancialmente) la eficacia de la vacuna. Por consiguiente, según se explica en la presente, se adoptó un abordaje de encapsulación con el que se obtuvo una eficacia superior. Se comprobó que mediante la incorporación de un epítipo para células T universal en una vacuna liposomal se incrementa (o se incrementa sustancialmente) la eficacia de la vacuna y se mantiene un buen perfil de seguridad mediante una activación de células T no dirigida hacia A β . Sin embargo, hubo diversos desafíos en el desarrollo de este abordaje. En primer lugar, los epítopos para células T universales desarrollados tendieron a ser

hidrófobos, lo que dificultó la encapsulación en los liposomas. En segundo lugar, para mejorar la inmunogenicidad, tendieron a combinarse múltiples epítomos para células T universales. Sin embargo, el rendimiento de la síntesis de péptidos y la tasa de éxito se redujeron a medida que se incrementó la longitud de los péptidos. En tercer lugar, la carga de los epítomos para células T universales seleccionados influyó en la eficiencia de la encapsulación y las condiciones experimentales requeridas para asegurarla, debido a que la membrana liposomal está cargada negativamente.

Por consiguiente, en la invención se provee una composición de vacuna liposomal que comprende

- (a) un antígeno peptídico para células B derivado de amiloide β ($A\beta$) presentado en la superficie del liposoma; y
- (b) un péptido que comprende un epítomo para células T universal encapsulado en el liposoma.

Una composición de vacuna particularmente preferida comprende una vacuna ACI-24 modificada para incluir un péptido que comprende un epítomo para células T universal encapsulado en el liposoma. Un liposoma es un ejemplo de portador. De esta manera, el portador generalmente es un liposoma, pero puede ser cualquier portador apropiado para presentar el antígeno peptídico derivado de $A\beta$ en la superficie mediante un mecanismo similar al empleado por los liposomas (donde el antígeno peptídico derivado de $A\beta$ adopta una conformación predominante de láminas β) y también encapsular un péptido que comprende un epítomo para células T universal. Los ejemplos abarcan vesículas y cuerpos particulados.

Un “epítopo para células T universal” es un epítopo que es específico para las células T que están presentes en la mayoría de las poblaciones humanas. Comúnmente se origina a partir de antígenos a los que los seres humanos están normalmente expuestos durante su vida. Los ejemplos abarcan los antígenos que son incorporados rutinariamente en vacunas. Los ejemplos específicos abarcan los epítomos para células T presentes en el tétanos, la influenza y la difteria y también la hemocianina de lapa californiana (KLH) y Virus de Epstein Barr (EBV). La capacidad “universal” de un epítopo para células T de activarlas es el resultado de al menos dos propiedades complementarias: (i) la afinidad de unión al surco del HLA, es decir, la fuerza de la unión, y (ii) la capacidad de unirse a diversos haplotipos de HLA de manera promiscua, es decir, la capacidad de abarcar poblaciones humanas muy diversas, con relación a las diferencias en la expresión de las moléculas del HLA. Los epítomos para células T universales pueden unirse a la mayoría de los alelos del MHC de la clase II presentes en las poblaciones humanas. Por consiguiente, los epítomos para células T universales incluidos en las composiciones de vacunas de la invención pueden estimular una respuesta mediada por células T CD4. Los epítomos para células T universales incluidos en las composiciones de vacunas de la invención pueden estimular una respuesta mediada por células T auxiliares que incrementa la producción de anticuerpos (con especificidad por A β) por parte de las células B.

Los epítomos para células T universales incluidos en las composiciones de vacunas de la invención típicamente se sintetizan en fases sólidas. Por ende, en algunas formas de realización, los epítomos para células T universales se sintetizan en fases sólidas. Debido a estos y otros detalles relacionados con la encapsulación, en algunas formas de realización no limitativas, el péptido que

comprende un epítipo para células T universal tiene una longitud no superior a 85, 80, 75 ó 70 aminoácidos. La longitud mínima de un péptido que es un epítipo para células T para asegurar una inmunogenicidad suficiente típicamente es de aproximadamente 10 aminoácidos. Por lo tanto, para garantizar que se genere un epítipo para células T suficientemente inmunogénico, la longitud mínima del péptido típicamente es de aproximadamente 10 aminoácidos. En algunas formas de realización, el péptido tiene una longitud de al menos 20 aminoácidos. En otras formas de realización, el péptido tiene una longitud de entre 30 y 60 aminoácidos: esto se basa en la longitud mínima preferida para los epítopos para células T universales y la preferencia por un péptido que comprende al menos dos, tres o cuatro epítopos para células T universales (unidos).

También se determinó que los epítopos para células T universales útiles en la presente invención típicamente son hidrófobos. Esto implica otros desafíos para la síntesis, la purificación y la encapsulación en liposomas, debido a las interacciones con los lípidos. El porcentaje de hidrofobicidad se calcula dividiendo la cantidad total de aminoácidos hidrófobos (Phe, Ile, Leu, Met, Val, Trp, Ala y Pro) por la cantidad total de aminoácidos en cualquiera de los péptidos generales que comprenden epítopos para células T universales (cuando se consideran los péptidos en general) o los epítopos para células T individuales (cuando se considera cada epítipo para células T universal por separado) y multiplicando el resultado por 100. En la presente, los aminoácidos hidrófobos abarcan leucina (Leu), isoleucina (Ile), fenilalanina (Phe), triptófano (Trp), valina (Val), metionina (Met), prolina (Pro) y alanina (Ala).

Por ende, un péptido que comprende un epítipo para células T universal generalmente comprende al menos 30% de aminoácidos hidrófobos. Esto

implica que al menos 30% de los aminoácidos en los péptidos en general que comprenden epítomos para células T universales son aminoácidos hidrófobos. La mayoría de los péptidos con epítomos para células T universales evaluados comprendieron hasta 50% de aminoácidos hidrófobos. En algunos casos, un péptido puede comprender al menos 35%, 40%, 45% o 50% de aminoácidos hidrófobos.

Para mejorar la inmunogenicidad, se prefiere que una composición de vacuna comprenda al menos dos epítomos para células T universales diferentes encapsulados en el liposoma. Debido a la capacidad de los liposomas, en combinación con la hidrofobicidad de los péptidos y las limitaciones en la síntesis, cada epítomo para células T universal idealmente tiene una longitud de no más de 30 aminoácidos, preferiblemente no más de 20 aminoácidos, aun más preferiblemente aproximadamente 10-20 aminoácidos. Según se explica más detalladamente en la presente, los inventores determinaron que los epítomos para células T universales más largos pueden recortarse eficazmente hasta una longitud de 10-20 aminoácidos sin modificar su inmunogenicidad. Los péptidos recortados se diseñaron seleccionando la subsecuencia más inmunogénica y más corta, típicamente con una longitud de aproximadamente 15 aminoácidos, en la secuencia de cada epítomo para células T, en función de las zonas activas predichas in silico. Hay diversos programas informáticos para ayudar a realizar este análisis, incluyendo la plataforma de detección de inmunogenicidad EpiVax (<http://www.epivax.com>). Otros ejemplos abarcan SYFPEITHI (Hans-Georg Rammensee, Jutta Bachmann, Niels Nikolaus Emmerich, Oskar Alexander Bachor, Stefan Stevanovic: SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs, Immunogenetics (1999), 50:213-219, <http://www.syfpeithi.com>), SVMHC

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16844990>) y la base de datos IEDB (Vita, R., Overton, J. A., Greenbaum, J. A., Ponomarenko, J., Clark, J. D., Cantrell, J. R., Wheeler, D. K., Gabbard, J. L., Hix, D., Sette, A., Peters, B., The immune epitope database (IEDB) 3.0, Nucleic Acids Res., 9 de Octubre de 2014, pii: gku938 (publicación electrónica anticipada), PubMed PMID: 25300482, <http://www.iedb.org/>).

En algunas formas de realización, cada epítipo para células T universal comprende al menos 30% de aminoácidos hidrófobos. Esto implica que al menos 30% de los aminoácidos en el epítipo para células T universal son aminoácidos hidrófobos. Para determinados epítipos, la proporción de aminoácidos hidrófobos puede alcanzar 80%. En algunos casos, puede haber al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% o 80% de aminoácidos hidrófobos. En algunas formas de realización, la proporción máxima de aminoácidos hidrófobos puede ser de 80%, lo que implica que el rango más amplio de aminoácidos hidrófobos abarca entre 30% y 80%.

Para obtener una inmunogenicidad mejorada y resolver los inconvenientes prácticos relacionados con la encapsulación, una composición de vacuna puede comprender dos, tres o cuatro epítipos para células T universales diferentes encapsulados en portadores. Cuando se encapsulan cantidades grandes de epítipos para células T universales diferentes (especialmente 3 ó 4), es preferible recortarlos hasta una longitud de aproximadamente 10-20 aminoácidos, tal como aproximadamente 15 aminoácidos. Se prefiere la inclusión de múltiples epítipos para células T universales diferentes en los mismos péptidos encapsulados. Por lo tanto, las construcciones de péptidos sintéticos que contienen múltiples epítipos para

células T universales diferentes representan una implementación preferida de la invención. En determinadas formas de realización, el péptido comprende al menos dos epítopos para células T universales diferentes. En formas de realización más específicas, el péptido comprende dos, tres o cuatro epítopos para células T universales. Cuando hay al menos dos epítopos para células T universales en una construcción peptídica sintética, puede unírseles mediante conectores. Los conectores se emplean para unir físicamente epítopos para células T universales de manera tal de no perjudicar su inmunogenicidad. Los conectores apropiados para unir aminoácidos son bien conocidos en la técnica. Los conectores preferidos son conectores basados en aminoácidos, es decir, conectores peptídicos. De este modo, pueden unirse epítopos para células T universales mediante enlaces peptídicos. Un conector permite el procesamiento correcto de los epítopos para células T universales. Para que ocurra la presentación de antígenos por las moléculas MHC de la clase II, es necesario el ingreso de los antígenos en el compartimiento endosomal-lisosomal. Posteriormente, estos antígenos son procesados por enzimas proteolíticas, de las cuales las proteasas de cisteína lisosomales de la familia de la papaína pueden constituir un subconjunto importante. Los péptidos generados se unen a las moléculas del MHC de la clase II, que luego se presentan en la superficie de las células presentadoras de antígenos dedicadas (APC), incluyendo los macrófagos, las células dendríticas (DC) y las células B (Lutzner y Kalbacher, 2008). Por lo tanto, un conector preferiblemente comprende un sustrato para una proteasa de cisteína lisosomal de la familia de la papaína. El conector puede comprender un sustrato para una o más enzimas como la catepsina S, la catepsina B o la catepsina L. En algunas formas de realización, el conector

comprende, consiste esencialmente o consiste en al menos dos o al menos tres aminoácidos. En algunas formas de realización, el conector comprende, consiste esencialmente o consiste en los aminoácidos VVR, TVGLR, KVSVR, PMGAP o PMGLP.

Por consiguiente, los péptidos que comprenden dos epítopos para células T universales pueden ser péptidos lineales con el siguiente formato:

[epítipo para células T universal 1]-[conector]-[epítipo para células T universal 2].

Los péptidos que comprenden tres epítopos para células T universales pueden ser péptidos lineales con el siguiente formato:

[epítipo para células T universal 1]-[conector]-[epítipo para células T universal 2]-[conector]-[epítipo para células T universal 3].

Los péptidos que comprenden cuatro epítopos para células T universales pueden ser péptidos lineales con el siguiente formato:

[epítipo para células T universal 1]-[conector]-[epítipo para células T universal 2]-[conector]-[epítipo para células T universal 3]-[conector]-[epítipo para células T universal 4].

Vale destacar que no es necesario que los conectores entre cada par de epítopos para células T universales unidos sean idénticos. Por ejemplo, el conector entre el epítipo para células T universal 1 y el epítipo para células T universal 2 puede ser diferente del conector entre el epítipo para células T universal 2 y el epítipo para células T universal 3. En el caso de cuatro epítopos para células T universales cada uno de los tres conectores pueden ser diferentes o dos pueden ser iguales y el tercero diferente (en cualquier orden). En algunas

formas de realización donde hay múltiples conectores en un péptido, todos son idénticos.

Los inventores evaluaron diversas fuentes de epítomos para células T universales al diseñar péptidos apropiados para la encapsulación. En algunas formas de realización, los epítomos para células T universales derivan de la toxina de la difteria, la toxina del tétanos, el virus de Epstein Barr, la hemaglutinina de la influenza y/o la hemocianina de lapa californiana. Por lo tanto, las combinaciones específicas preferidas de epítomos para células T universales se seleccionan entre las siguientes:

- (a) una combinación de epítomos para células T universales de la toxina de la difteria y la toxina del tétanos;
- (b) una combinación de epítomos para células T universales del virus de Epstein Barr y la toxina del tétanos;
- (c) una combinación de epítomos para células T universales del virus de Epstein Barr, la toxina del tétanos y la hemocianina de lapa californiana; o
- (d) una combinación de epítomos para células T universales de la hemaglutinina de la influenza, la toxina de la difteria, la toxina del tétanos y el virus de Epstein Barr.

Estas combinaciones preferiblemente se proveen en los formatos conectados descritos. Para clarificar, mientras las combinaciones se incluyen preferiblemente en un orden específico pueden incluirse en un orden alternativo. Por ejemplo, si hay tres epítomos de células T universales, A, B y C, estos pueden incluirse en cualquiera de los ordenes ABC, ACB, BAC, BCA, CAB o CBA.

Los péptidos específicos que comprenden múltiples epítomos para células T universales diferentes constituyen otro aspecto de la invención. Estos péptidos

preferiblemente se incluyen en composiciones de vacunas de la invención. Por ende, los péptidos útiles en la invención comprenden, consisten esencialmente o consisten en secuencias de aminoácidos seleccionadas entre SEQ ID N° 1 (SAT42), SEQ ID N° 2 (SAT43), SEQ ID N° 3 (SAT44) o SEQ ID N° 4 (SAT47). La composición de estos péptidos se detalla en la tabla 2 más adelante.

Los péptidos específicos que comprenden epítopos para células T universales individuales también constituyen un aspecto de la invención. Estos péptidos preferiblemente se incluyen en composiciones de vacunas de la invención. Por consiguiente, los péptidos útiles en la invención comprenden, consisten esencialmente o consisten en secuencias de aminoácidos seleccionadas entre SEQ ID N° 5 (SAT6), SEQ ID N° 6 (SAT13), SEQ ID N° 7 (SAT15) o SEQ ID N° 8 (SAT17). La composición de estos péptidos se detalla en la tabla 1 más adelante. En las composiciones de vacunas de la invención también pueden incluirse combinaciones de estos péptidos, recortados en la medida apropiada hasta una longitud de 10-20 aminoácidos. Los péptidos combinados preferiblemente están unidos por uno o más conectores, según se los define en la presente.

El péptido antigénico derivado de A β se presenta en la superficie de los liposomas. Típicamente, esto se basa en su inserción en la superficie externa de los liposomas. La inserción en la superficie externa de los liposomas puede facilitarse uniendo los péptidos antigénicos derivados de A β a unidades que se insertan en la superficie externa de los liposomas. Los liposomas pueden ser cualquier liposoma apropiado para presentar antígenos peptídicos derivados de A β en su superficie y encapsular péptidos que comprenden epítopos para células T universales. Típicamente, la unidad comprende una porción hidrófoba para

asegurar la inserción en la bicapa lipídica de los liposomas. La unidad puede ser cualquier unidad apropiada, pero preferiblemente es un ácido graso. El ácido graso puede comprender un residuo de palmitoílo. Una construcción preferida, por ejemplo, ACI-24, comprende un antígeno peptídico derivado de A β (A β (1-15) en ACI-24) unido a dos residuos de palmitoílo en los extremos N y C del péptido. De este modo, el antígeno peptídico está tetrapalmitolizado. Esto puede facilitarse incorporando dos residuos de lisina en los extremos N y C del antígeno peptídico derivado de A β . Los residuos de lisina están palmitolados.

En algunas formas de realización, un liposoma tiene una carga superficial negativa, es decir, es aniónico. Preferiblemente, un liposoma comprende fosfolípidos, y aun más preferiblemente, los fosfolípidos comprenden dimirilsitoilfosfatidil-colina (DMPC) y dimirsitoilfosfatidil-glicerol (DMPG). Un liposoma también puede comprender colesterol. En algunas formas de realización, la proporción molar entre estos tres componentes puede ser de 9:1:7.

Por lo tanto, una construcción más preferida comprende un antígeno peptídico derivado de A β reconstituido en un liposoma. De este modo, las composiciones de la invención generalmente pueden ser conocidas como “composiciones de vacunas liposomales de la invención”.

El antígeno peptídico derivado de A β induce una respuesta mediada por células B en un sujeto. Se trata de un “antígeno para células B”. Según se ha indicado, las placas A β están formadas por péptidos A β con una longitud de entre 39 y 43 aminoácidos, que en su forma natural no patológica adoptan una conformación de espiral aleatoria. Durante la transición al estado patológico, se transforman principalmente en estructuras secundarias de láminas β , que se

agregan espontáneamente en depósitos insolubles. El antígeno peptídico derivado de A β está por lo tanto definido aquí como un antígeno peptídico que deriva de (un máximo de) 43 aminoácidos de A β pero no es A β de longitud completa. Más específicamente, el antígeno peptídico derivado de A β comprende el epítipo inmunodominante para células B de A β (1-42) pero carece del epítipo para células T hallado en A β (1-42). Por ende, en algunas formas de realización, el antígeno peptídico derivado de A β comprende, consiste esencialmente o consiste en entre 13 y 15 aminoácidos contiguos de los 17 aminoácidos del extremo N de A β . Vale destacar que el antígeno peptídico derivado de A β puede proveerse en el contexto de una molécula peptídica más grande, el resto de la cual no deriva de la secuencia de aminoácidos de A β . Por ejemplo, el péptido puede incluir residuos adicionales, por ejemplo, residuos de lisina para facilitar la palmitoilación. Esos residuos típicamente se encuentran en los extremos N y C del péptido. En este contexto, el término “consiste esencialmente” denota que el antígeno peptídico derivado de A β comprende entre 13 y 15 aminoácidos contiguos de los 17 aminoácidos del extremo N de A β pero puede incluir una cantidad limitada de residuos adicionales, por ejemplo, cuatro residuos de lisina para facilitar la palmitoilación. Un antígeno peptídico derivado de A β preferido comprende, consiste esencialmente o consiste en los aminoácidos 1-15 de A β , que puede denominarse “A β (1-15)” (WO2007/068411, ACI-24).

Un antígeno peptídico derivado de A β en una composición de la invención adopta una estructura secundaria que replica una forma patológica de A β . Preferiblemente, el antígeno peptídico derivado de A β adopta una estructura secundaria con una conformación de lámina β . Incluso más preferiblemente, el

antígeno peptídico derivado de A β adopta una conformación predominantemente de lámina β cuando se presenta en la superficie de un liposoma.

Las composiciones de la invención típicamente comprenden al menos un coadyuvante. En algunas formas de realización de la invención, las composiciones de la invención comprenden dos coadyuvantes. El propósito de los uno o más coadyuvantes es incrementar o estimular la respuesta inmune en el sujeto. Preferiblemente, el al menos un coadyuvante es parte del portador (en lugar de estar encapsulado en él). Por lo tanto, el al menos un coadyuvante puede formar parte de un liposoma, y puede formar parte de la bicapa lipídica. El coadyuvante puede ser un coadyuvante a base de lípidos. El coadyuvante puede estar presentado al menos en parte en la superficie del liposoma: esto puede deberse a que el coadyuvante forma parte de la bicapa lipídica. En algunas formas de realización, uno o más coadyuvantes que forman parte de un liposoma pueden combinarse con un coadyuvante encapsulado. En otras realizaciones, uno o más adyuvantes que forman parte de un liposoma pueden mezclarse con un adyuvante adicional (tal como Alum o CpG) cuando se forman los liposomas. El portador (liposoma) puede operar como coadyuvante con la adición al liposoma de monofosforil lípido A (MPLA), un término que abarca derivados de MPLA como monofosforil hexa-acil lípido A, 3-deacilo (sintético) (3D-(6-acilo) PHAD®), PHAD® (hexaacil disacárido fosforilado) o MPL. Por lo tanto, según formas de realización particulares, las composiciones también comprenden MPLA. El MPLA típicamente se agrega durante la formación del liposoma (según se detalla más adelante en la presente). Por consiguiente, los liposomas preferidos comprenden dimirisitoilfosfatidil-colina (DMPC), dimirisitoilfosfatidil-glicerol (DMPG), colesterol y MPLA. En algunas formas de

realización, la proporción molar entre estos cuatro componentes puede ser de 9:1:7:0,05.

Otros coadyuvantes que pueden emplearse según la invención abarcan hidróxido de aluminio (alúmina) y CpG, entre otros.

Las composiciones de vacunas de la invención se administran en sujetos para tratar, prevenir, inducir respuestas inmunes protectoras o aliviar los síntomas de una enfermedad o una afección asociada a amiloide beta o una afección caracterizada o asociada a la pérdida de capacidad de memoria cognitiva. Las composiciones de vacunas pueden tener aplicaciones tanto profilácticas como terapéuticas. Los sujetos son mamíferos, típicamente seres humanos.

Una enfermedad o una afección asociada a amiloide beta puede abarcar trastornos neurológicos como la enfermedad de Alzheimer (EA). Otros ejemplos de enfermedades o afecciones asociadas a amiloide beta según la invención abarcan deterioro cognitivo leve (MCI), síndrome de Down, amiloidosis cardíaca, angiopatía amiloide cerebral (AAC), esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes en adultos, miositis con cuerpos de inclusión (MCI), amiloidosis ocular, glaucoma, degeneración macular, distrofia reticular y neuritis óptica. Varias de estas afecciones se caracterizan o están asociadas a la pérdida de capacidad de memoria cognitiva. Las afecciones caracterizadas o asociadas a la pérdida de capacidad de memoria cognitiva según la invención abarcan EA, deterioro cognitivo leve (MCI), síndrome de Down, amiloidosis cardíaca, angiopatía amiloide cerebral (AAC), esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson,

demencia con cuerpos de Lewy, ELA (esclerosis lateral amiotrófica) y miositis con cuerpos de inclusión (MCI).

En la invención se provee un método para tratar, prevenir, inducir una respuesta inmune protectora o aliviar los síntomas de una enfermedad o una afección asociada a amiloide beta o una afección caracterizada o asociada a la pérdida de capacidad de memoria cognitiva en un sujeto, que comprende administrarle una composición de vacuna de la invención al sujeto.

Los métodos también pueden expresarse como usos médicos de las composiciones de vacunas de la invención. De este modo, en la invención también se provee una composición de vacuna de la invención que puede usarse en el tratamiento, la prevención, la inducción de una respuesta inmune protectora o el alivio de los síntomas de una enfermedad o una afección asociada a amiloide beta o una afección caracterizada o asociada a la pérdida de capacidad de memoria cognitiva en un sujeto.

Asimismo, en la invención se provee el uso de composiciones de vacunas de la invención en la manufactura de un medicamento útil en el tratamiento, la prevención, la inducción de una respuesta inmune protectora o el alivio de los síntomas de una enfermedad o una afección asociada a amiloide beta o una afección caracterizada o asociada a la pérdida de capacidad de memoria cognitiva en un sujeto.

Todas las formas de realización de la presente se aplican a los métodos o los usos médicos descritos. La administración de una composición de vacuna de la invención en un sujeto da como resultado la producción de anticuerpos de IgG típicamente policlonales que se unen a las formas patológicas de A β . Según se ha indicado, estas formas patológicas de A β comprenden multímeros de

láminas β . Por ende, los anticuerpos producidos pueden denominarse anticuerpos “con especificidad por A β ”.

La capacidad de un anticuerpo de unirse al antígeno blanco está regulada principalmente por dos parámetros: afinidad y avidéz. La afinidad de un anticuerpo determina la fuerza de la interacción monovalente entre un anticuerpo y su antígeno. La avidéz de un anticuerpo abarca el fortalecimiento de la unión a través de más de un punto de interacción entre el antígeno y el anticuerpo. La capacidad de detección de los sueros policlonales, inducida por una vacunación, se basa en los dos parámetros mencionados con anterioridad (Siegrist, 2013). En general, se la conoce como la avidéz de la respuesta policlonal, ya que resulta difícil evaluar la afinidad y la avidéz de manera independiente. Según se explica con mayor detalle en el ejemplo 4 de la presente (sección 4.2), los inventores desarrollaron un abordaje de ELISA donde se evalúa la unión general entre sueros que contienen anticuerpos policlonales y antígenos en concentraciones más altas o más bajas en paralelo (Martineau, 2010). La proporción entre las señales bajas y altas (la señal representa la concentración del anticuerpo unido) se expresa como el índice de avidéz. Un índice con un valor más alto (más cercano a 1) representa una fuerza de unión general superior, en comparación con uno con un valor más bajo (más cercano a 0). Un incremento en el índice de avidéz en el tiempo provee una indicación de la maduración general de la avidéz de los anticuerpos inducidos por la vacuna. En la presente (ejemplo 4 y figura 4) se demuestra que una inmunización con composiciones de vacunas de la invención, que comprenden un péptido encapsulado que contiene un epítipo para células T universal, produce un efecto de maduración superior a una

inmunización con ACI-24 (sin péptidos encapsulados con epítomos para células T universales).

Las composiciones de vacunas de la invención pueden administrarse en los sujetos por cualquier vía apropiada. Aquellos versados en la técnica han de reconocer que las composiciones de vacunas pueden administrarse por vía tópica, oral, rectal, nasal o parenteral (por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea o intramuscular). Además, las composiciones de vacunas pueden incorporarse en matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, que se implantan en localizaciones cercanas o muy cercanas al sitio donde se desea realizar la administración. Sin embargo, en formas de realización preferidas, una composición de vacuna se administra por vía intramuscular o subcutánea.

Para generar respuestas inmunes protectoras, las composiciones de vacunas de la invención pueden administrarse una sola vez en los sujetos. Sin embargo, en algunas formas de realización, las composiciones de vacunas de la invención se administran varias veces en un mismo sujeto. Por ende, la invención abarca lo que se conoce como regímenes de cebado-refuerzo. Las vacunas suelen administrarse separadas por períodos de al menos 1 semana, frecuentemente aproximadamente 1-12 meses. Sin que se desee limitar la invención a una hipótesis específica, se cree que mediante la adición de un epítomo para células T universal a ACI-24 se mejora la respuesta mediada por anticuerpos anti-A β al proveerse una segunda señal específica desde las células T activadas con especificidad por epítomos conocidos. Las composiciones de vacunas de la invención representan una nueva opción terapéutica poderosa para la prevención y el tratamiento de enfermedades o afecciones asociadas a

amiloide beta, tales como la EA. En algunas formas de realización, en cada ocasión se administra una misma composición de vacuna, en un régimen de vacunación homólogo. La vacunación homóloga abarca un régimen de inmunización donde se emplea una misma vacuna tanto para el cebado (primera inmunización) como para el refuerzo (segunda inmunización o cualquier otra inmunización adicional).

Por otro lado, en una inmunización heteróloga de cebado-refuerzo se emplean vacunas diferentes para la inmunización primaria y al menos algunas de las inmunizaciones ulteriores. En algunas formas de realización, las composiciones de vacunas de la invención se administran varias veces en un mismo sujeto en una combinación heteróloga de cebado-refuerzo, junto con otras vacunas “anti-A β ” que comprenden antígenos peptídicos derivados de cualquier porción de la proteína A β , incluyendo antígenos peptídicos derivados de regiones fuera de A β (1-15). En algunas formas de realización, las composiciones de vacunas de la invención se administran varias veces en un mismo sujeto en una combinación heteróloga de cebado-refuerzo, junto con otras vacunas “anti A β ” que comprenden los mismos antígenos peptídicos, incluyendo antígenos peptídicos de A β (1-15). En algunas formas de realización, las composiciones de vacunas de la invención, que preferiblemente comprenden antígenos peptídicos de A β (1-15), se administran varias veces en un mismo sujeto, en una combinación heteróloga de cebado-refuerzo con otras vacunas “anti-A β ” que comprenden antígenos peptídicos derivados de A β correspondientes, preferiblemente antígenos peptídicos de A β (1-15). Los ejemplos de vacunas “anti-A β ” que pueden administrarse en una vacunación de cebado-refuerzo junto con composiciones de vacunas de la invención que

comprenden antígenos derivados de A β abarcan, sin limitaciones, la vacuna A β (1-15)-PADRE (Agadjanyan et al., 2005; Ghochikyan et al., 2006), la vacuna A β (1-15)-toxóide de la difteria (DT) o la vacuna CRM (WO2010016912), la repetición en tándem de A β (1-15) unido a lisina (Maier et al., 2006), la vacuna dendrímica de A β (1-15) (Seabrook et al., 2006), el conjugado de A β (1-15) DT (Liu et al., 2013), A β (1-6) unido a la proteína del recubrimiento del bacteriófago Q β (Windblad et al., 2012), A β (1-7)-CRM (Arai et al., 2015) y Nterm A β -KLH (Schneeberger et al., 2010).

En la invención también se proveen kits que contienen composiciones de vacunas según la invención. Por consiguiente, se provee un kit para tratar, prevenir, inducir una respuesta inmune protectora o aliviar los síntomas de una enfermedad o una afección asociada a amiloide beta o una afección caracterizada o asociada a la pérdida de capacidad de memoria cognitiva en un sujeto, que comprende una composición de vacuna (liposomal) de la invención, según se describe en la presente. Los kits pueden comprender instrucciones apropiadas para su uso. En las instrucciones de uso puede explicarse el cronograma de administración de las composiciones. Por ende, los kits pueden comprender múltiples dosis (separadas) de composiciones de vacunas de la invención. En las instrucciones de uso también pueden explicarse las condiciones para almacenar las composiciones, particularmente durante el período entre la administración de las dosis de las composiciones de vacunas. Estos kits pueden aplicarse a todos los métodos relevantes de la invención, según se describe en la presente.

En la invención también se proveen métodos para producir composiciones de vacunas liposomales de la invención. Estos métodos pueden comprender los siguientes pasos:

- (a) generar una película lipídica;
- (b) rehidratar la película lipídica en un amortiguador que comprende un péptido que comprende un epítipo para células T universal;
- (c) generar liposomas a partir de la película lipídica rehidratada para encapsular el péptido que comprende un epítipo para células T universal y formar una solución que contiene liposomas que comprenden epítopos para células T universales encapsulados;
- (d) agregarle un antígeno peptídico derivado de amiloide β ($A\beta$) a la solución y mantenerla bajo condiciones apropiadas para que éste se inserte en la bicapa lipídica de los liposomas.

Estos métodos se describen a modo de ejemplo en la presente, y sus detalles pueden aplicarse a cualquier aspecto de la invención. En términos generales, los métodos pueden comprender formar una película lipídica delgada, homogeneizarla y extruirla. Por lo tanto, en algunas formas de realización, la película lipídica se produce disolviendo un lípido en etanol y evaporando el etanol al vacío. Los componentes lipídicos preferidos para las composiciones de vacunas liposomales de la invención abarcan DMPC, DMPG, colesterol y MPLA (como coadyuvante). La proporción molar de estos componentes puede ser de 9:1:7:0,05. Esta proporción molar también puede aplicarse a las composiciones de vacunas liposomales de la invención. Los componentes lipídicos pueden solubilizarse a temperaturas elevadas. Una temperatura elevada puede ser de entre 40°C y 80°C, por ejemplo, aproximadamente 60°C.

En el paso (b), el amortiguador usado para la rehidratación puede depender del péptido que comprende el epítipo para células T universal empleado. En general, puede usarse cualquier amortiguador apropiado. En algunas formas de realización, el amortiguador comprende acetato de sodio o PBS. Si se debe encapsular SAT42, el amortiguador puede ser acetato de sodio. Si se debe encapsular uno o más de SAT43, SAT44 o SAT47, el amortiguador puede ser PBS. En todos los casos, puede agregarse DMSO al amortiguador, por ejemplo, DMSO al 5%. La rehidratación puede realizarse agitando la muestra.

En el paso (c), los liposomas pueden generarse mediante agitación en presencia de esferas. Puede usarse cualquier esfera apropiada. Por ejemplo, las esferas pueden ser esferas de vidrio. En este paso, pueden producirse vesículas multilamelares, que posteriormente se convierten en liposomas que comprenden bicapas lipídicas. Esta conversión puede depender de varios ciclos de congelación y descongelación, por ejemplo, 5-15, preferiblemente 10. Los ciclos de congelación-descongelación pueden ser seguidos por una homogeneización. Ésta puede ser seguida por una extrusión basada en el tamaño. En algunas formas de realización, los liposomas se extruyen a través de poros con un diámetro (o una dimensión máxima) de aproximadamente 0,08-0,1 μm . Esto puede ocurrir a través de una membrana, tal como una membrana de policarbonato. Los liposomas extruidos pueden concentrarse, por ejemplo, usando una forma de filtración como la ultrafiltración.

El paso (d) da como resultado la inserción del antígeno peptídico derivado de amiloide β ($A\beta$) en la bicapa lipídica de los liposomas. Las condiciones necesarias pueden abarcar una agitación durante 10-60 minutos, por ejemplo,

aproximadamente 30 minutos, a una temperatura de 25-35°C, tal como aproximadamente 30°C. El antígeno peptídico derivado de amiloide β ($A\beta$) es un péptido tetrapalmitoilado que comprende $A\beta$ 1-15. Para producir el péptido tetrapalmitoilado, este péptido comprende dos residuos de lisina en cada extremo. El péptido puede disolverse previamente en hidrógeno fosfato de disodio, para luego inyectarlo en la solución liposomal.

Como paso final, el método también puede comprender filtrar la composición de vacuna. Esto puede realizarse bajo condiciones estériles. La filtración puede ocurrir a través de una membrana con poros con un tamaño de 0,2 μ m. Las membranas apropiadas abarcan membranas de polietersulfona (PES), que pueden proveerse como filtros de jeringa. La composición de vacuna producida puede almacenarse bajo condiciones apropiadas hasta su uso, por ejemplo, con refrigeración (por ejemplo, a aproximadamente 5°C).

Otros métodos para producir composiciones de vacunas liposomales de la invención pueden basarse en una inyección de flujo transversal, según se describe a modo de ejemplo en la presente. Por consiguiente, en la invención también se proveen métodos para producir composiciones de vacunas liposomales de la invención mediante inyecciones de flujo transversal. Estos métodos pueden aplicarse particularmente a composiciones donde se ha encapsulado SAT44 o SAT47. Estos métodos pueden comprender los siguientes pasos:

- (a) disolver los lípidos que forman los liposomas (y el coadyuvante, de estar basado en lípidos) en una solución;
- (b) disolver el péptido que comprende un epítipo para células T universal en una solución;

- (c) mezclar las soluciones de los pasos (a) y (b) usando un módulo de inyección de flujo transversal, para formar liposomas intermedios donde se ha encapsulado el péptido que comprende un epítipo para células T universal;
- (d) extruir los liposomas intermedios a través de una membrana para disminuir su tamaño y su polidispersidad;
- (e) mezclar una solución que comprende un antígeno peptídico derivado de amiloide β ($A\beta$) con la solución del paso (d) usando un módulo de inyección de flujo transversal, lo que da como resultado la inserción del antígeno peptídico derivado de amiloide β ($A\beta$) en la bicapa lipídica de los liposomas.

Estos métodos se describen a modo de ejemplo en la presente, y sus detalles pueden aplicarse a cualquier aspecto de la invención. En términos generales, en los métodos se usa una inyección de flujo transversal para encapsular un péptido que comprende un epítipo para células T universal e insertar un antígeno peptídico de amiloide β ($A\beta$) en la bicapa lipídica de los liposomas.

En el paso (a), los lípidos (que pueden comprender un coadyuvante, tal como un coadyuvante de MPLA, según se describe en la presente) típicamente se disuelven en etanol. El etanol puede ser etanol al 90%-100%, por ejemplo, etanol al 96%. La disolución puede acelerarse, por ejemplo, mediante un calentamiento a una temperatura de entre 40°C y 80°C, por ejemplo, aproximadamente 60°C. Los componentes lipídicos preferidos son los detallados para las composiciones de vacunas liposomales de la invención, y abarcan DMPC, DMPG, colesterol y MPLA (como coadyuvante). La proporción molar de estos componentes puede ser de 9:1:7:0,05. Esta proporción molar también puede aplicarse a las composiciones de vacunas liposomales de la invención

En el paso (b), el péptido que comprende un epítipo para células T universal se disuelve. El péptido puede disolverse en un amortiguador, apropiado (por ejemplo, un amortiguador de His-sacarosa), en algunas formas de realización, bajo agitación, por ejemplo, sonicación.

En el paso (c), las soluciones de los pasos (a) y (b) se mezclan usando un módulo de inyección de flujo transversal, para formar liposomas intermedios donde se ha encapsulado un péptido que comprende un epítipo para células T universal. Antes de este paso, las soluciones de los pasos (a) y (b) pueden filtrarse. Un tamaño apropiado para los poros del filtro puede ser de aproximadamente 0,2 μm . Las soluciones pueden usarse en cualquier concentración apropiada. Una vez filtradas, las soluciones pueden calentarse a una temperatura de entre 30°C y 60°C, por ejemplo, aproximadamente 40°C. Los liposomas se forman inyectando las dos soluciones (de los pasos (a) y (b)) a través de un módulo de flujo transversal (donde se encuentran las 2 soluciones). Esto generalmente se realiza con una velocidad de flujo y una temperatura específicas, lo cual ha de resultar comprensible para aquellos versados en la técnica (las temperaturas apropiadas son las que se mencionaron con anterioridad). En algunas formas de realización, después de la formación de los liposomas, puede agregarse un amortiguador, típicamente para disminuir la concentración de etanol. Puede usarse cualquier amortiguador apropiado, por ejemplo, un amortiguador de His-sacarosa.

En el paso (d), los liposomas intermedios se extruyen a través de una membrana para disminuir su tamaño y su polidispersidad. En los liposomas formados en la solución, hay un péptido encapsulado que comprende un epítipo para células T universal. Puede usarse cualquier membrana apropiada. Un

tamaño apropiado para los poros puede ser de aproximadamente 100 nm. Un tipo de membrana apropiado es una membrana de policarbonato. Este paso puede realizarse a cualquier temperatura apropiada, preferiblemente a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 25°C). Después de este paso, puede implementarse un paso de filtración, por ejemplo, ultra/diafiltración, para eliminar el etanol. En este paso puede usarse cualquier membrana apropiada, por ejemplo, una membrana de fibras huecas con un umbral de peso molecular de aproximadamente 500 kD. Puede implementarse un paso de intercambio del amortiguador en un amortiguador de dispersión. Un amortiguador de dispersión preferido es la PBS. La PBS puede tener un pH apropiado, por ejemplo, entre 6 y 8, particularmente aproximadamente 6,9. Para esto, pueden ser necesarios entre 5 y 15 intercambios de volumen, por ejemplo, aproximadamente 10. Antes del paso (e), los liposomas pueden diluirse en el amortiguador de dispersión hasta la concentración deseada. La concentración deseada puede estar en el rango de 0,1-10 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 1 mg/ml. Antes del paso (e), la solución que contiene los liposomas puede calentarse a una temperatura apropiada, por ejemplo, entre 30°C y 60°C, preferiblemente aproximadamente 35°C.

El paso (e) comprende mezclar una solución que comprende un antígeno peptídico derivado de amiloide β ($A\beta$) con la solución del paso (d) usando un módulo de inyección de flujo transversal. Según se indica en la presente, el antígeno peptídico derivado de amiloide β ($A\beta$) preferiblemente está lipidado (por ejemplo, tetrapalmitoilado), y la descripción provista se aplica mutatis mutandis. Antes de mezclar, el antígeno peptídico derivado de amiloide β ($A\beta$) típicamente se disuelve en una solución amortiguadora apropiada, por ejemplo, una solución

de Beta-OG al 10% p/v en un amortiguador de Na₂HPO₄ 10 mM, pH 11,4. La solución generalmente se calienta a una temperatura apropiada, por ejemplo, entre 30°C y 80°C, por ejemplo, aproximadamente 60°C. La solución puede diluirse adicionalmente, según sea necesario, para asegurar una concentración apropiada del antígeno peptídico derivado de amiloide β (A β). Una concentración apropiada puede estar en el rango de 0,1-10 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 1 mg/ml. El pH típicamente se mantiene en el rango de 11-12, por ejemplo, aproximadamente 11, preferiblemente 11,4. La mezcla de la solución que comprende un antígeno peptídico derivado de amiloide β (A β) con la solución del paso (d) usando un módulo de inyección de flujo transversal da como resultado la inserción del antígeno peptídico derivado de amiloide β (A β) en la bicapa lipídica externa de los liposomas. La mezcla puede incubarse durante un período de tiempo fijo, a una temperatura apropiada, para facilitar la inserción del antígeno peptídico derivado de amiloide β (A β) en la bicapa lipídica de los liposomas. Un período de tiempo apropiado puede ser de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 120 minutos, por ejemplo, aproximadamente 30 minutos. Una temperatura apropiada puede ser de entre 30°C y 60°C, preferiblemente aproximadamente 35°C. La incubación puede realizarse bajo agitación, por ejemplo, centrifugación.

Después del paso (e), el producto puede recuperarse para su inclusión en las composiciones de la invención. De este modo, el producto puede formularse en una composición de vacuna liposomal de la invención. Esto puede abarcar un paso de ultra/diafiltración para eliminar Beta-OG de la solución amortiguadora. Puede emplearse cualquier membrana apropiada para este paso, por ejemplo, una membrana de fibras huecas con un umbral de peso molecular de

aproximadamente 500 kD. La ultra/diafiltración puede abarcar un paso de intercambio del amortiguador en un amortiguador final. Un amortiguador final preferido es un amortiguador de His-sacarosa, que puede ser histidina 10 mM más sacarosa 250 mM. Para esto, pueden ser necesarios entre 5 y 15 intercambios de volumen, por ejemplo, aproximadamente 10. Puede implementarse un paso de concentración para obtener el volumen final preferido. También puede implementarse un paso de filtración final (estéril). En éste, puede emplearse un cartucho de filtración. El paso de filtración puede realizarse a través de un tamiz con poros con cualquier tamaño apropiado, por ejemplo, aproximadamente 0,2 μm . La filtración puede realizarse bajo condiciones estériles. La composición de vacuna producida puede almacenarse posteriormente bajo condiciones apropiadas hasta su uso, por ejemplo, bajo refrigeración (por ejemplo, a aproximadamente 5°C).

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. (A) Análisis de anticuerpos IgG con especificidad por A β 1-42 mediante un ELISA en plasma de ratones C57BL/6 21 (ACI-24.046) o 7 días (ACI-24, ACI-24.043, ACI-24.044) antes (antes de la exsanguinación) o 7, 21 ó 35 días después de la primera inmunización con las vacunas indicadas (las flechas representan los puntos de tiempo donde se realizó la inmunización). Los resultados se expresan como media geométrica $\pm$ intervalo de confianza (IC) de 95%, en ng/ml, con n=5 ratones por grupo. El eje X representa los días donde se realizaron los tratamientos/las exsanguinaciones, mientras que el eje Y representa la titulación de los anticuerpos, expresada en ng/ml. (B) Análisis de anticuerpos IgG con especificidad por A β 1-42 mediante un ELISA en plasma de ratones C57BL/6 21 (ACI-24.046) o 7 (ACI-24, ACI-24.043, ACI-24.044) días

antes (antes de la exsanguinación) o 21 días después de la primera inmunización con las vacunas indicadas. Los resultados se expresan como media geométrica $\pm$ IC de 95%, en ng/ml, con 5 ratones por grupo. Análisis estadístico entre los diversos grupos realizado el día 21: prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. El eje X representa el plasma individual de los grupos inmunizados con las vacunas indicadas, mientras que el eje Y representa la titulación de los anticuerpos, expresada en ng/ml.

Figura 2. (A) Análisis de la inhibición de la auto-asociación de A β 1-42 mediante un ELISA con anticuerpos IgG en plasma de ratones C57BL/6 21 ó 7 días antes (líneas de puntos) o 21 días después de la primera inmunización (líneas en negrita) con las vacunas indicadas. Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar del porcentaje de inhibición de la auto-asociación de A β 1-42, con 5 ratones por grupo. El eje X representa las diluciones en serie del plasma, mientras que el eje Y representa el porcentaje de inhibición de la auto-asociación de A β 1-42. (B) La inhibición de la auto-asociación de A β 1-42 se expresa como el porcentaje (%) de inhibición el día 21 menos el % de inhibición el día -21 ó -7 (fondo, previo a la exsanguinación), con una dilución del plasma de 1/25. El eje X representa los grupos tratados con las vacunas indicadas, mientras que el eje Y representa el porcentaje de inhibición de la auto-asociación de A β 1-42 después de la sustracción del fondo.

Figura 3. Análisis de los anticuerpos IgG con especificidad por oligómeros A β 1-42 mediante un ELISA en plasma de ratones C57BL/6 21 (ACI-24.046) o 7 (ACI-24, ACI-24.043, ACI-24.044) días antes o 21 días después de la primera inmunización con las vacunas indicadas. Los resultados se expresan como

media geométrica $\pm$ IC de 95%, en ng/ml, con 5 ratones por grupo. Análisis estadístico entre los diversos grupos realizado el día 21: prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. El eje X representa los grupos inmunizados con las vacunas indicadas, mientras que el eje Y representa la titulación de los anticuerpos, expresada en ng/ml.

Figura 4. Análisis de la avidéz por A β 1-42 de anticuerpos IgG mediante un ELISA en plasma de ratones C57BL/6 7 ó 21 días después de la primera inmunización con las vacunas indicadas. Los resultados se expresan como media geométrica $\pm$ IC de 95% del índice de avidéz, con 5 ratones por grupo. Análisis estadístico: prueba de Mann-Whitney entre el día 7 y el día 21 para cada grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. El eje X representa los grupos inmunizados con las vacunas indicadas, mientras que el eje Y representa el índice de avidéz.

Figura 5. Análisis de anticuerpos IgG con especificidad por oligómeros A β mediante un abordaje MSD en suero de monos Cynomolgus inmunizados con ACI-24.046 (SAT44, n=8), ACI-24.045 (SAT43, n=4) o ACI-24.043 (SAT47, n=4) antes de la primera inmunización (día 1) y 1 semana después de la tercera inmunización (día 64). Los resultados se expresan como media geométrica $\pm$ IC de 95%, en AU/ml. El eje X representa el plasma individual de los grupos inmunizados con las vacunas indicadas, mientras que el eje Y representa la titulación de los anticuerpos, expresada en AU/ml.

Figura 6. Análisis de anticuerpos IgG con especificidad por A β 1-42 mediante un ELISA en plasma de ratones C57BL/6 7 días después de la 3ª inmunización (día 36) con las vacunas ACI-24 y ACI-24,046 (SAT44) (A) o las vacunas ACI-24 y ACI-24.043 (SAT47) (B). Los resultados se expresan como la media geométrica $\pm$ IC de 95%, en ng/ml, con n = 10 ratones por grupo. El eje X representa las

vacunas usadas para la inmunización de cada grupo en particular, mientras que el eje Y representa la titulación de anticuerpos, expresada en ng/ml. Prueba estadística Prueba de Mann-Whitney entre ACI-24 y la vacuna indicada. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabla de abreviaturas

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
A β	Amiloide beta (abeta)
Ac2O	Anhídrido acético
EA	Enfermedad de Alzheimer
AP	Fosfatasa alcalina
APC	Células presentadoras de antígenos
BSA	Suero de ternero bovino
AU/ml	Unidades arbitrarias por ml
IC	Intervalo de confianza
DMF	Dimetilformamida
DMPC	1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-fosfocolina
DMPG	1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-fosforilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Estudio inmunoabsorbente ligado a enzimas
HLA	Antígeno leucocitario humano
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
HRP	Peroxidasa de rábano picante
Ig	Inmunoglobulina
KLH	Hemocianina de lapa californiana
MPLA	Monofosforil lípido A

SRA	Espectrometría de masa
MSD	Meso Scale Discovery
Pal1-15	A β 1-15 tetrapalmitoilado
PBS	Solución salina amortiguada con fosfato
PES	Polietersulfona
pNPP	Fosfato de p-nitrofenilo
SC	Subcutáneo
TMB	Tetrametilbencidina
AFT	Ácido trifluoroacético
TIS	Triisopropilsilano
TLR4	Receptor tipo Toll 4
Beta-OG	n-octil- β -D-glucopiranosido

La invención ha de comprenderse mejor en referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1. Diseño de nuevos epítomos para células T

La capacidad de un epítomo para células T de activarlas (calificación de inmunogenicidad) es el resultado de dos propiedades complementarias: (i) la afinidad por el HLA y (ii) la capacidad de unirse a diversos haplotipos del HLA de manera promiscua. Se realizó una evaluación in silico (Epivax) de diversos epítomos para células T con orígenes diferentes para seleccionar los péptidos con las calificaciones de inmunogenicidad más altas. En una fase preliminar, se evaluaron 10 péptidos con orígenes diferentes (hemocianina de lapa californiana (KLH), toxina de la difteria, virus de influenza, virus de Epstein Barr y virus de herpes). Los péptidos con la mejor calificación de inmunogenicidad (superior a 10) se seleccionaron debido a la posibilidad de que fueran altamente

inmunogénicos en seres humanos, en función de la predicción de su afinidad por el HLA y su capacidad de reaccionar con diversos haplotipos del HLA (las secuencias de los péptidos seleccionados se proveen en la tabla 1).

Tabla 1

Nomb re	Secuencia	Origen del péptido
SAT6	STLEYFLYDPIFFLHHSNTDRLWAIWQALQKY RGKPYNTANCAIVRHDTY (SEQ ID N° 5)	KLH
SAT1 3	VHHNTEEIVAQSIALLSLMV (SEQ ID N° 6)	Toxina de la difteria
SAT1 5	IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSL (SEQ ID N° 7)	Hemaglutinina de influenza
SAT1 7	VYGGSKTSLYNLRRGTALAI (SEQ ID N° 8)	Virus de Epstein Barr

Una vez seleccionados los péptidos individuales, se diseñaron péptidos promiscuos combinados compuestos por 2 ó 3 epítomos inmunogénicos para células T de diversos orígenes (denominados SAT42, SAT43 y SAT44) y péptidos promiscuos compuestos por péptidos recortados (por ejemplo, SAT47 o SAT43) (tabla 2). Los péptidos recortados se diseñaron seleccionando, en la secuencia de cada epítomo para células T, la secuencia peptídica de 15 unidades más inmunogénica, en función de las zonas activas de los epítomos para células T predichas in silico. El objetivo fue incrementar la calificación de inmunogenicidad sin incrementar el tamaño del péptido promiscuo final, debido a las limitaciones en los procesos de síntesis de péptidos y encapsulación de vacunas. En resumen, la tasa de rendimiento y el éxito de la síntesis de péptidos

se reducen al incrementarse la longitud de los péptidos, especialmente cuando se supera una longitud de 30 aminoácidos y cuando además hay principalmente residuos hidrofóbicos, como es el caso de los péptidos de epítomos para células T descriptos en la presente. Más aun, la tasa de encapsulación de los péptidos se reduce al incrementarse la longitud, ya que la probabilidad de alojarlos en el lumen de los liposomas se reduce al incrementarse la longitud de los péptidos. La calificación de la inmunogenicidad in silico de estos 4 epítomos para células T promiscuos fue muy alta, particularmente más alta que la de cada uno de los péptidos constituyentes, con lo cual se confirmó que al combinarse péptidos de diversos orígenes puede mejorarse la afinidad por el HLA y la cobertura de haplotipos del HLA (las secuencias de los epítomos para células T promiscuos se proveen en la tabla 2).

Tabla 2

No mb re	Secuencia	Diseño del péptido	Origen del péptido
SA T4 2	VHHNTEEIVAQSIALSSLMVPM GAPQYIKANSKFIGITEL (SEQ ID Nº 1)	SAT13+PMGAP+toxina del tétanos	Toxina de la difteria+toxina del tétanos
SA T4 3	VYGGSKTSLYNLRRGTALAIVV RQYIKANSKFIGITELVVRPIFFL HHSNTDRLWAI (SEQ ID Nº 2)	SAT17+VVR+toxina del tétanos+VVR+SAT6	Epstein Barr+tétanos+KLH
SA T4 4	VYGGSKTSLYNLRRGTALAIVV RQYIKANSKFIGITEL (SEQ ID Nº 3)	SAT17+VVR+toxina del tétanos	Epstein Barr+tétanos

SA	SMGVYQILAIYSTVVRIVAQSIAL	SAT15+VVR+SAT1	Hemagglutinin
T4	SSVRYIKANSKFIGVVRLYNLR	3+VVR+tétanos+VV	a de
7	RGTAL (SEQ ID N° 4)	R+SAT17	influenza+dift
			eria+tétanos+
			Epstein Barr

Ejemplo 2. Síntesis y formulación de vacunas

Método general para sintetizar y purificar péptidos que son epítomos para células T universales

Los péptidos para células T se manufacturaron mediante una síntesis lineal en una fase sólida (SPPS), en una resina de 2-clorotritilo, mediante una reacción convencional con Fmoc. El procedimiento de unión convencional se realizó con 3,0 equivalentes de aminoácidos y un reactivo de unión, en presencia de 3,0 equivalentes de la base en DMF, durante 1 hora a temperatura ambiente. Para las secuencias de unión difíciles, se implementó una unión doble con un período de reacción extendido. Después de completar la unión de los aminoácidos, se implementó un paso de limitación de la acetilación, usando 5,0 equivalentes de Ac₂O en piridina, de manera tal de abortar el alargamiento de las cadenas peptídicas no deseadas. La resina se lavó con DMF y el grupo Fmoc se eliminó usando piperidina al 20% en DMF durante 5 minutos. Después de terminar la SPPS, se realizó la desprotección y la escisión de los péptidos en general de la resina usando un cóctel de escisión convencional (TFA/TIS/agua) durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se separó por filtración y se lavó con TFA. Posteriormente, el producto en bruto se hizo precipitar con un exceso de 10 veces de volumen de éter isopropílico/hexano frío, y el sólido se filtró usando un tamiz de vidrio y se secó al vacío. El péptido en bruto fue

purificado en una columna de fase inversa C18, usando un gradiente del solvente A (agua, 0,1% de TFA) y el solvente B (acetonitrilo, 0,1% de TFA) en un sistema de HPLC preparativa. Las fracciones de HPLC que contenían el péptido deseado con una pureza superior a 90% se combinaron, se diluyeron en agua y se sometieron a un intercambio iónico. Las fracciones deseadas del intercambio iónico se liofilizaron. Se determinó y se confirmó la identidad y la pureza del péptido final mediante un análisis de HPLC-MS.

Preparación de las vacunas ACI-24.043/ACI-24.044/ACI-24.045/ACI-24.046 (película lipídica delgada)

Las vacunas que contenían péptidos de epítomos para células T encapsulados se produjeron usando tecnología de películas lipídicas delgadas, a lo que siguió una homogeneización y una extrusión. Primero, se solubilizó DMPC, DMPG (Lipoid, Alemania), colesterol y monofosforil hexa-acilo lípido A, 3-deacilo sintético o 3D-(6-acil) PHAD™ (Avanti Polar Lipids, EEUU), en una proporción molar de 9:1:7:0,05 en etanol a 60°C. El etanol se evaporó mediante una centrifugación al vacío para obtener una película lipídica delgada.

La película lipídica se rehidrató con uno de estos amortiguadores (en función del epítomo para células T que se deseaba encapsular):

- acetato de sodio 20 mM, pH 4 (Fluka), DMSO al 5% (Sigma Aldrich) en agua MilliQ con 0,8 mg/ml del epítomo para células T SAT42; o
- PBS 0,1x, pH 7,4, DMSO al 5% (todos de Sigma-Aldrich) en agua MilliQ con 0,3-0,4 mg/ml del epítomo para células T SAT43, SAT44 o SAT47.

La solución se agitó suavemente durante 15 minutos. La muestra se agitó vigorosamente en presencia de esferas de vidrio. Las vesículas multilamelares resultantes se sometieron a 10 ciclos de congelación y descongelación (N2

líquido y baño de agua a 37°C) y una homogeneización, seguida por una extrusión consecutiva a través de membranas de policarbonato (Whatman, Reino Unido) con poros con un tamaño de 0,1/0,08 µm. Los pasos de homogeneización y extrusión se realizaron usando EmulsiFlex-C5 (Avestin, Canadá). Los liposomas extruidos se concentraron por ultrafiltración, y el amortiguador se intercambió por PBS, pH 7,4, mediante una diafiltración (10 intercambios). Los liposomas resultantes se diluyeron en PBS, pH 7,4, y se calentaron a 30°C antes de agregar Pal1-15.

Se disolvió un péptido humano tetrapalmitoilado Pal1-15 (Bachem AG, Suiza) en Na₂HPO₄ 10 mM, pH 11,4, en agua MilliQ con β-OG al 1% (Sigma-Aldrich, EEUU), se inyectó el producto en la solución liposomal a 30°C, se agitó durante 30 minutos y se realizó una concentración basada en una ultrafiltración y una dilución en PBS, pH 7,4, por diafiltración. Los liposomas resultantes se esterilizaron filtrándolos a través de tamices de jeringa con membranas de polietersulfona (PES) de 0,2 µm y se almacenaron a 5°C.

Preparación de la vacuna ACI-24.043 (inyección de flujo transversal)

Los lípidos (DMPG, DMPC, colesterol y 3D-(6-acil) PHAD™ (Avanti Polar Lipids, EEUU)) se disolvieron en EtOH al 96% en un gabinete de calentamiento a 60°C. Después de la disolución completa de los lípidos, la solución se filtró a través de un tamiz con poros con un tamaño de 0,2 µm en un sistema de inyección calentado a 60°C. En detalle, se dispersó la cantidad apropiada de ACI-24.043 (SAT47) en EtOH a temperatura ambiente con la ayuda de una sonicación (la concentración de EtOH típicamente fue 2% v/v de la solución final de SAT47). Después de la dispersión completa del péptido, se agregó un amortiguador de His-sacarosa (histidina 10 mM, sacarosa 250 mM) hasta

obtener una proporción en masa entre el fármaco y los lípidos de 1/50. La solución SAT47 se filtró a través de un tamiz con poros con un tamaño de 0,2 μm (tamiz Sartoscale) en la botella con el amortiguador de inyección, que luego se calentó hasta 40°C. Los liposomas se formaron en el sitio de inyección cuando se mezcló la solución de lípidos/EtOH y el amortiguador de inyección. Inmediatamente después de la formación de los liposomas, se implementó un paso de dilución en línea con histidina 10 mM y sacarosa 250 mM para disminuir la concentración de EtOH. Los liposomas intermedios se extruyeron a través de membranas de policarbonato con poros con un tamaño de 100 nm (1 paso) a temperatura ambiente. Para eliminar el EtOH, se realizó una ultra/diafiltración (UDF) con una membrana de fibras huecas (umbral de peso molecular: 500 kD) y se intercambió el amortiguador por PBS, pH 6,9 (10 intercambios de volumen). Luego se diluyeron los liposomas con SAT47 usando el amortiguador de dispersión (PBS, pH 6,9) hasta obtener una concentración total de lípidos de 1 mg/ml, y se calentó hasta 35°C. Se disolvió Pal1-15 en una solución al 10% p/v de beta-OG en un amortiguador de Na_2HPO_4 10 mM, pH 11,4, a 60°C, y se realizó una dilución adicional el mismo amortiguador hasta alcanzar una concentración final de 1 mg/ml. Se ajustó el pH en 11,4. Después de mezclar estas dos soluciones usando un módulo de inyección de flujo transversal, la suspensión liposomal se incubó adicionalmente a 35°C durante 30 minutos bajo agitación, para permitir la inserción completa de Pal1-15. Se implementó un segundo paso de UDF usando una membrana de fibras huecas (umbral de peso molecular: 500 kD) para eliminar beta-OG y se intercambió el amortiguador por histidina 10 mM y sacarosa 250 mM (10 intercambios de volumen). El producto

se concentró hasta el volumen final y se filtró a través de tamices de jeringa Acrodisc mPES de 0,2 μ m.

Preparación de la vacuna ACI-24.046 (inyección de flujo transversal)

Los lípidos (DMPG, DMPC, colesterol y 3D-(6-acil) PHAD™ (Avanti Polar Lipids, EEUU)) se disolvieron en EtOH al 96% en un gabinete de calentamiento a 60°C. Después de la disolución completa de los lípidos, la solución se filtró a través de un tamiz con poros con un tamaño de 0,2 μ m en un sistema de inyección calentado a 60°C. En paralelo, se disolvió ACI-24.046 (SAT44) en el amortiguador de inyección (histidina 10 mM, sacarosa 250 mM) a 40°C. Después de la disolución completa de SAT44, la solución se filtró a través de un tamiz con poros con un tamaño de 0,2 μ m (Sartoscale) en la botella con el amortiguador de inyección, que luego se calentó hasta 40°C. Los liposomas se formaron en el sitio de inyección cuando se mezcló la solución de lípidos/EtOH y el amortiguador de inyección. Inmediatamente después de la formación de los liposomas, se implementó un paso de dilución en línea con histidina 10 mM y sacarosa 250 mM para disminuir la concentración de EtOH. Los liposomas intermedios se extruyeron a través de membranas de policarbonato con poros con un tamaño de 100 nm (1 paso) a temperatura ambiente. Para eliminar el EtOH, se realizó una ultra/diafiltración (UDF) con una membrana de fibras huecas (umbral de peso molecular: 500 kD) y se intercambió el amortiguador por PBS, pH 6,9 (10 intercambios de volumen). Luego se diluyeron los liposomas con SAT44 usando el amortiguador de dispersión (PBS, pH 6,9) hasta obtener una concentración total de lípidos de 1 mg/ml, y se calentó hasta 35°C. Se disolvió Pal1-15 en una solución al 10% p/v de beta-OG en un amortiguador de Na₂HPO₄ 10 mM, pH 11,4, a 60°C, y se realizó una dilución adicional el mismo amortiguador hasta

alcanzar una concentración final de 1 mg/ml. Se comprobó el pH y se lo ajustó cuidadosamente una vez más en 11,4. Después de mezclar estas dos soluciones usando un módulo de inyección de flujo transversal, la suspensión liposomal se incubó adicionalmente a 35°C durante 30 minutos bajo agitación, para permitir la inserción completa de Pal1-15. Se implementó un segundo paso de UDF usando una membrana de fibras huecas (umbral de peso molecular: 500 kD) para eliminar beta-OG y se intercambió el amortiguador por histidina 10 mM y sacarosa 250 mM (10 intercambios de volumen). El producto se concentró hasta el volumen final y se filtró a través de tamices de jeringa Acrodisc mPES de 0,2 μ m.

Ejemplo 3. Estudios de inmunogenicidad in vivo con vacunas con epítomos para células T encapsulados como pruebas de concepto (PoC)

Una vez realizada la encapsulación exitosa de diversos epítomos para células T, se evaluó la inmunogenicidad de las vacunas que contenían los epítomos para células T encapsulados con calificaciones de inmunogenicidad altas, SAT42, SAT44 y SAT47 (vacunas ACI-24.044, ACI-24.046 y ACI-24.043, respectivamente), en comparación con la vacuna ACI-24, in vivo. Se sometieron ratones C57BL/6 salvajes a un total de tres inmunizaciones subcutáneas (SC) los días 0, 14 y 28, usando ACI-24, ACI-24.044 (SAT42 encapsulado), ACI-24.046 (SAT44 encapsulado) y ACI-24.043 (SAT47 encapsulado). Se recolectaron muestras de sangre los días -21 (ACI-24.046), -7 (ACI-24, ACI-24.043, ACI-24.044) (antes de la exsanguinación), 7, 21 ó 35 para determinar la titulación de IgG con especificidad por A β 1-42 mediante un ELISA.

Se recubrieron placas con 10 μ g/ml de una película con el péptido A β 1-42 humano (Bachem, Suiza) durante la noche a 4°C. Después de lavar con Tween

20 al 0,05%/PBS y bloquear con BSA al 1%/Tween al 0,05%/PBS, se agregaron diluciones en serie de plasma a las placas y se incubó a 37°C durante 2 horas. Después del lavado, las placas se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (Jackson ImmunoResearch, PA, EEUU) durante 2 horas a 37°C. Después del lavado final, las placas se incubaron durante 2,5 horas con el sustrato AP (pNPP) y se leyeron a 405 nm usando un lector de placas de ELISA. Los resultados se expresaron en referencia a diluciones en serie realizadas con un anticuerpo disponible comercialmente (6E10, Biolegend, Reino Unido, Cat. 803002). En la figura 1A se representa la titulación de IgG con especificidad por A β 1-42 inducida por la vacuna ACI-24, con epítomos para células T encapsulados o sin ellos, a lo largo del tiempo. A pesar de que la vacuna ACI-24 dio como resultado la mayor titulación de IgG con especificidad por A β 1-42 el día 7, después de la primera inmunización, se observó un incremento en la titulación de anticuerpos después de las inmunizaciones segunda y tercera, cuando se encapsuló un epítomo para células T en la vacuna ACI-24.

A partir de los resultados en la figura 1B, puede observarse que la inmunización con vacunas ACI-24 que comprendían epítomos para células T encapsulados indujo un incremento en la titulación de anticuerpos con especificidad por A β , en comparación con ACI-24, que alcanzó significación estadística para el grupo inmunizado con la vacuna ACI-24.043 (SAT47 encapsulado).

Las vacunas con SAT42, SAT43, SAT44 o SAT47 encapsulado fueron evaluadas en un estudio en monos *Cynomolgus*. Cuatro monos por grupo recibieron tres inmunizaciones subcutáneas mensuales (los días 1, 29 y 57) con

la vacuna ACI-24.044 (SAT42 encapsulado – dos grupos con un total de 8 monos), la vacuna ACI-24.046 (SAT44 encapsulado – 2 grupos con un total de 8 monos), la vacuna ACI-24.045 (SAT43 encapsulado – 4 monos) o la vacuna ACI-24.043 (SAT47 encapsulado – 4 monos). Se extrajo sangre antes de la primera inmunización (día 1) y 1 y 3 semanas después de cada inmunización (días 8, 22, 36, 50, 64 y 78) para determinar la titulación de IgG con especificidad por A β 1-42 mediante un ELISA.

Las placas se recubrieron con 10 μ g/ml de una película con el péptido A β 1-42 humano (Bachem, Suiza) durante la noche a 4°C. Después de lavar con Tween 20/PBS al 0,05% y bloquear con BSA al 1%/Tween 20/PBS al 0,05%, se aplicaron 8 diluciones al medio en serie de suero sobre las placas y se incubó a 37°C durante 2 horas. Después del lavado, las placas se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de mono conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (KPL, Cat. N° 074 11 021) durante 2 horas a 37°C. Después del lavado, las placas se incubaron con 50 μ l de ABTS/H₂O₂ (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (sustrato para HRP) y se leyeron a 405 nm después de una hora usando un lector de placas de ELISA. Los resultados se expresaron con relación a diluciones en serie de un grupo de monos positivos usado como referencia.

La inmunogenicidad de las vacunas con diversos epítomos para células T se comparó con la de la vacuna ACI-24. En la tabla 3 se observa el incremento en la titulación de anticuerpos con especificidad por A β en comparación con la vacuna ACI-24 1 semana después de la tercera inmunización. Todas las vacunas evaluadas, ACI-24.046 (SAT44), ACI-24.043 (SAT47), ACI-24.045 (SAT43) o ACI-24.044 (SAT42), indujeron un incremento en la titulación de anticuerpos de

al menos 7 veces (ACI-24.044 con SAT42 encapsulado), en comparación con la titulación inducida por la vacuna ACI-24. Las vacunas ACI-24.043 (SAT47 encapsulado) y ACI-24.046 (SAT44 encapsulado) indujeron titulaciones de anticuerpos con especificidad por A β significativamente mayores que ACI-24 1 semana después de la tercera inmunización (tabla 3). Las vacunas ACI-24.043 (SAT47 encapsulado) y ACI-24.046 (SAT44 encapsulado) presentaron calificaciones Epivax elevadas (142,89 y 57,2, respectivamente).

Tabla 3. Incremento en la titulación de anticuerpos con especificidad por A β en comparación con ACI-24 (1 semana después de la tercera inmunización, día 64)

Vacuna	ACI-24.046 (SAT44 encapsulado)	ACI-24.043 (SAT47 encapsulado)	ACI-24.045 (SAT43 encapsulado)	ACI-24.044 (SAT42 encapsulado)
Incremento, expresado en veces, en la titulación de IgG con especificidad por A β , con relación a ACI-24	40, p=0,0027 (**)	144, p=0,0003 (***)	17, p=0,1408 (ns)	7, p=0,6003 (ns)

Análisis estadístico: prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ns: no significativo

A partir de los resultados obtenidos in vivo (figuras 1) con las vacunas ACI-24.046 (SAT44 encapsulado) y ACI-24.043 (SAT47 encapsulado) manufacturadas con tecnología de películas con lípidos delgados, se evaluó la inmunogenicidad in vivo de las mismas vacunas manufacturadas con un método

de inyección de flujo transversal. Se sometieron ratones C57BL/6 salvajes a un total de tres inmunizaciones subcutáneas (s.c.) los días 0, 14 y 28 con las vacunas ACI-24, ACI-24.046 (SAT44 encapsulado) o ACI-24.043 (SAT47 encapsulado). Se tomaron muestras de sangre los días 7, 7, 21 y 35 para determinar la titulación de IgG con especificidad por A β 1-42 mediante un ELISA.

A partir de los resultados en la figura 6, puede concluirse que la inmunización con vacunas ACI-24 que comprendían epítopos para células T encapsulados indujo un incremento significativo en la titulación de anticuerpos con especificidad por A β , en comparación con ACI-24.

Ejemplo 4. Calidad de los anticuerpos con especificidad por A β inducidos

4.1. Inhibición de la auto-asociación de A β 1-42 humano in vitro

La calidad de los anticuerpos con especificidad por A β inducidos se evaluó in vitro midiendo la inhibición de la auto-asociación/agregación de A β 1-42. Este estudio se basa en la capacidad del plasma de ratones antes y después de la inmunización de alterar la predisposición natural de A β 1-42 humano a auto-asociarse.

Se recubrieron placas de ELISA convencionales con 1 μ g/ml de A β 1-42 durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron 4 veces con 300 μ l de Tween 20 al 0,05%/PBS. Se alcanzó la saturación agregando BSA al 0,5%/PBS e incubando durante 1 hora a 37°C. Después del lavado, se agregaron cuatro diluciones de plasma al medio en serie a las placas durante 20 minutos, a temperatura ambiente con agitación. Se aplicó A β 1-42 biotinilado en cada cavidad, hasta una concentración final de 0,1 μ g/ml, y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación. Se usó A β 1-42 biotinilado sin plasma como control positivo para la auto-asociación de A β 1-42 (considerado como

100% de auto-asociación, 0% de inhibición). Después de un paso de lavado, las placas se incubaron con peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con estreptavidina (R&D Systems, Canadá, Ref. 890803), en una dilución de 1/200 en BSA al 0,5%/Tween 20 al 0,05%/PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Después del lavado, las placas se incubaron con el sustrato Sure Blue Reserve TMB (Seracare, Cat. 5120-0081) durante 10 minutos. Se interrumpió la reacción con una solución de terminación Bethyl (Bethyl Laboratories, Inc, Cat. E115) y se leyeron las placas a 450 nm usando un lector de placas de ELISA. El porcentaje de inhibición de la auto-asociación se calculó con relación a A β 1-42 biotinilado sin plasma como control positivo (0% de inhibición).

En función de los resultados, se concluyó que los anticuerpos con especificidad por A β generados después de 2 inmunizaciones con todas las vacunas que contenían epítopos para células T afectaron la auto-asociación de A β 1-42 de manera más eficiente que los anticuerpos inducidos por ACI-24 (figura 2A). Debido a que el plasma previo a la exsanguinación induce un fondo inhibición de la auto-asociación, el porcentaje el día 21 se normalizó restando el fondo previo a la exsanguinación. Los anticuerpos específicos anti-A β 1-42 generados por la inmunización con todas las vacunas ACI-24 que contenían epítopos para células T indujeron una mayor inhibición de la auto-asociación de A β 1-42 que ACI-24: esta inhibición alcanzó significación estadística en el grupo inmunizado con ACI-24.046 (SAT44 encapsulado) (figura 2B).

4.2. Generación de anticuerpos que reconocen oligómeros A β

Para evaluar la especificidad de los anticuerpos inducidos en la unión a oligómeros A β patológicos en ratones C57BL/6, se determinaron las respuestas

de IgG con especificidad por oligómeros A β 1-42 mediante un ELISA. Las placas se recubrieron con 10 μ g/ml de oligómeros preparados como se describió con anterioridad (Adolfsson, 2012), durante la noche a 4°C. Después de lavar con Tween 20 al 0,05%/PBS y bloquear con BSA al 1%/Tween 20 al 0,05%/PBS, se agregaron diluciones de plasma en serie a las placas y se incubó a 37°C durante 2 horas. Después del lavado, las placas se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch, Cat. 115-055-164, PA, EEUU) durante 2 horas a 37°C. Después del lavado final, las placas se incubaron durante 2,5 horas con el sustrato AP (pNPP) y se leyeron a 405 nm usando un lector de placas de ELISA. Los resultados se expresaron con relación a diluciones en serie de un anticuerpo disponible comercialmente (6E10, Biolegend, Reino Unido, Cat. 803002).

Cada muestra se analizó en ocho o cuatro diluciones al medio en serie, comenzando con una dilución de 1/100, 1/400, 1/800 ó 1/1600, en función de la titulación de anticuerpos A β 1-42. Sobre la base de los resultados en la figura 3, se concluyó que la inmunización con todas las vacunas ACI-24 que contenían epítopos para células T indujo un incremento en la titulación de anticuerpos con especificidad por los oligómeros A β 1-42, en comparación con ACI-24, que alcanzó significación estadística para el grupo inmunizado con la vacuna ACI-24.043 (SAT47 encapsulado).

Se determinó el índice de avidéz de los anticuerpos inducidos en ratones C57BL/6 7 y 21 días después de la inmunización mediante un ELISA. Se recubrió la mitad de una placa de ELISA convencional con 10 μ g/ml de una película con el péptido A β 1-42, mientras que la otra mitad se recubrió con 1 μ g/ml de una película con el péptido A β 1-42, durante la noche a 4°C. Después de un lavado

con Tween 20 al 0,05%/PBS y un bloqueo con BSA al 1%/Tween 20 al 0,05%/PBS, se aplicaron ocho diluciones al medio en serie de plasma bajo las dos condiciones de recubrimiento y se incubó a 37°C durante dos horas. Después de un paso de lavado, las placas se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (Jackson ImmunoResearch, Cat. 115-055-164, PA, EEUU) durante 2 horas a 37°C. Después del lavado final, las placas se incubaron durante 2,5 horas con el sustrato AP (pNPP) y se leyeron a 405 nm usando un lector de placas de ELISA. Los resultados se expresaron con relación a diluciones en serie de un anticuerpo disponible comercialmente (6E10, Biolegend, Reino Unido, Cat. 803002).

Para determinar el índice de avidez, se calcularon las AU/ml para cada muestra con los dos recubrimientos usando una curva de referencia obtenida con 10 µg/ml del péptido Aβ1-42. Se usaron valores de OD de entre 0,6 y 2,8 para el cálculo posterior de la concentración. El índice de avidez se calculó como la proporción entre la concentración de anticuerpos en la concentración de recubrimiento más baja (1 µg/ml del péptido Aβ1-42) y el recubrimiento saturado (10 µg/ml del péptido Aβ1-42).

En función de los resultados en la figura 4, se concluyó que la inmunización con todas las vacunas ACI-24 que contenían epítopos para células T indujo la maduración de la avidez de los anticuerpos con especificidad por Aβ1-42 entre la primera y la segunda inmunización (día 7 y día 21 respectivamente), lo cual alcanzó significación estadística en los grupos inmunizados con ACI-24.044 (SAT42 encapsulado) y ACI-24.043 (SAT47 encapsulado).

Para evaluar la especificidad de unión de los anticuerpos inducidos en monos *Cynomolgus*, se determinaron las titulaciones de IgG con especificidad

por oligómeros patológicos A β 1-42 usando tecnología de Meso Scale Discovery (MSD) el día 64 (1 semana después de la tercera inmunización) en suero inmunizado con la vacuna ACI-24.046 (SAT44 encapsulado – 2 grupos con un total de 8 monos), la vacuna ACI-24.045 (SAT43 encapsulado – 4 monos) o la vacuna ACI-24.043 (SAT47 encapsulado – 4 monos). Se saturaron placas de MSD con estreptavidina durante la noche con 5% del bloqueador A (MSD, Ref. R93BA-4) a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron 4 veces con Tween 20 al 0,05%/PBS y se recubrieron con 25 μ l del anticuerpo de captura biotinilado 6E10 (Biolegend, Ref. 803008) en PBS, a razón de 0,5 μ g/ml, durante 1 hora en un agitador a 37°C. Después del lavado, las placas se incubaron con 25 μ l de oligómeros A β 1-42 (Adolfsson, 2012), a razón de 10 μ g/ml en PBS, durante 1 hora a 37°C en un agitador. Las placas se lavaron y se incubaron con ocho diluciones al medio de suero de mono (dilución inicial: 1/50 en leche descremada al 1%/Tween al 0,05%/PBS). Las muestras se incubaron durante 2 horas a 37°C en un agitador. Se lavaron las placas 4 veces, se agregó un anticuerpo de detección anti-IgG humana marcado con SULFO-TAG (Jackson, Ref. 109-005-098) y se diluyó en leche descremada al 1%/Tween 20/PBS al 0,05% durante 1 hora a 37°C en un agitador. Después de 4 lavados, se agregó el amortiguador de lectura MSD T 2X (MSD, Ref. R92TC-2) y se leyeron las placas durante 5 minutos. Los resultados se expresaron con relación a diluciones en serie del conjunto de monos usados como referencia.

En función de los resultados, se concluyó que todas las vacunas evaluadas, ACI-24.046 (SAT44 encapsulado), ACI-24.043 (SAT47 encapsulado) y ACI-24.045 (SAT43 encapsulado), indujeron un incremento en la cantidad de anticuerpos capaces de reconocer oligómeros A β en el día 64 (1 semana

después de la tercera inmunización comparado con el día 1 (antes de la primera inmunización); ver figura 5.

REFERENCIAS

Adolfsson, O., Pihlgren, M., Toni, N., Varisco, Y., Buccarello, A. L., Antonello, K., Lohmann, S., Piorkowska, K., Gafner, V., Atwal, J. K., Maloney, J., Chen, M., Gogineni, A., Weimer, R. M., Mortensen, D. L., Friesenhahn, M., Ho, C., Paul, R., Pfeifer, A., Muhs, A., Watts, R. J., An effector-reduced anti- β -amyloid ($A\beta$) antibody with unique $a\beta$ binding properties promotes neuroprotection and glial engulfment of $A\beta$, *J. Neurosci*, 11 de Julio, 32(28):9677-89 (2012).

Agadjanyan, M. G., Ghochikyan, A., Petrushina, I., Vasilevko, V., Movsesyan, N., Mkrtichyan, M., Saing, T, y Cribbs, D. H., Prototype Alzheimer's Disease Vaccine Using the Immunodominant B Cell Epitope from β -Amyloid and Promiscuous T Cell Epitope Pan HLA DR-Binding Peptide, *J. Immunol.*, 174 (3), 1580-1586 (2005).

Arai, H., Suzuki, H., Yoshiyama, T., Vanutide cridificar and the QS-21 adjuvant in Japanese subjects with mild to moderate Alzheimer's disease: results from two phase 2 studies, *Curr. Alzheimer Res.*, 12(3):242-54 (2015).

Ghochikyan, A., Mkrtichyan, M., Petrushina, I., Movsesyan, N., Karapetyan, A., Cribbs, D. H., Agadjanyan, M. G., Prototype Alzheimer's disease epitope vaccine induced strong Th2-type anti- $A\beta$ antibody response with Alum to Quil A adjuvant switch, *Vaccine*, 20, 24(13):2275-82 (2006).

Gilman, S., Koller, M., Black, R. S., Jenkins, L., Griffith, S. G., Fox, N. C., Eisner, L., Kirby, L., Boada Rovira, M., Forette, F., Orgogozo, J. M., Clinical effect of $A\beta$ immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial, *Neurology*, 64, 1553-1562 (2005).

Liu, B., Frost, J. L., Sun, J., Fu, H., Grimes, S., Blackburn, P., Lemere, C. A., MER5101, a novel A β 1-15:DT conjugate vaccine, generates a robust anti-A β antibody response and attenuates A β pathology and cognitive deficits in APP^{swe}/PS1 Δ E9 transgenic mice, *J. Neurosci.*, 33(16):7027-37 (2013).

Lutzner, N., Kalbacher, H., Quantifying Cathepsin S Activity in Antigen Presenting Cells Using a Novel Specific Substrate, *J. Biol. Chem.*, vol. 283, N° 52, p. 36185 (2008).

Maier, M., Seabrook, T. J., Lazo, N. D., Jiang, L., Das, P., Janus, C., Lemere, C. A., Short amyloid-beta (A β) immunogens reduce cerebral A β load and learning deficits in an Alzheimer's disease mouse model in the absence of an A β -specific cellular immune response, *J. Neurosci.*, 3, 26(18):4717-28 (2006).

Martineau, P., capítulo 41: Affinity Measurements by Competition ELISA, Pages 657-665, de *Antibody engineering*, vol. 1, R. Kontermann y S. Dübel (2010)

Monsonogo, A., Weiner, H. L., Immunotherapeutic approaches to Alzheimer's disease, *Science*, 31, 302(5646):834-8 (2003).

Muhs, A., Hickman, D. T., Pihlgren, M., Chuard, N., Giriens, V., Meerschman, C., van der Auwera, I., van Leuven, F., Sugawara, M., Weingertner, M.-C., Bechinger, B., Greferath, R., Kolonko, N., Nagel-Steger, L., Riesner, D., Brady, R. O., Pfeifer, A., Nicolau, C., Liposomal vaccines with conformation-specific amyloid peptide antigens define immune response and efficacy in APP transgenic mice, *PNAS*, 104, 23:9810-9815 (2007).

Orgogozo, J. M., Gilman, S., Dartigues, J. F., Laurent, B., Puel, M., Kirby, L. C., Jouanny, P., Dubois, B., Eisner, L., Flitman, S., Michel, B. F., Boada, M., Frank, A., Hock, C., Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abet42 immunization, *Neurology*, 61:46-54 (2003).

Pihlgren, M., Silva, A. B., Madani, R., Giriens, V., Waeckerle-Men, Y., Fettelschoss, A., Hickman, D. T., López-Deber, M. P., Ndao, D. M., Vukicevic, M., Buccarello, A. L., Gafner, V., Chuard, N., Reis, P., Piorkowska, K., Pfeifer, A., Kündig, T. M., Muhs, A., Johansen, P., TLR4- and TRIF-dependent stimulation of B lymphocytes by peptide liposomes enables T cell-independent isotype switch in mice, *Blood*, 3 de Enero, 121(1):85-94 (2013).

Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Araki, K., Ahmed, R., From vaccines to memory and back, *Immunity*, 29 de Octubre, 33(4):451-63 (2010).

Schneeberger, A., Mandler, M., Mattner, F., Schmidt, W., AFFITOME® technology in neurodegenerative diseases: the doubling advantage, *Hum. Vaccin.*, 11:948-52 (2010)

Seabrook, T. J., Thomas, K., Jiang, L., Bloom, J., Spooner, E., Maier, M., Bitan, G., Lemere, C. A., Dendrimeric Abeta1-15 is an effective immunogen in wildtype and APP-tg mice, *Neurobiol. Aging*, 28(6):813-23 (2006).

Siegrist, C. A., capítulo 2: Vaccine Immunology, páginas 14-32, de *Vaccine* (6ª edición 2013), Walter A. Orenstein y Paul.

Soto, C., Plaque busters: strategies to inhibit amyloid formation in Alzheimer's disease, *Molecular Medicine Today* (vol. 5), Agosto de 1999.

Winblad, B., Graf, A., Riviere, M. E., Andreasen, N., Ryan, J. M., Active immunotherapy options for Alzheimer's disease, *Alzheimers Res. Ther.*, 30 de Enero de 2014, 6(1):7.

Winblad, B., Andreasen, N., Minthon, L., Floesser, A., Imbert, G., Dumortier, T., Maguire, R. P., Blennow, K., Lundmark, J., Staufenbiel, M., Orgogozo, J. M., Graf, A., Safety, tolerability, and antibody response of active Aβ immunotherapy

with CAD106 in patients with Alzheimer's disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study, *Lancet. Neurol.*, 11(7):597-604 (2012).

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen los mismos significados que suelen darles aquellos versados en la técnica a los que concierne esta invención. Todas las publicaciones y las patentes mencionadas específicamente en la presente se incorporan como referencia en su totalidad, para todos los propósitos relacionados con la invención.

El alcance de la presente invención no está limitado por las formas de realización específicas descritas. De hecho, aquellos versados en la técnica han de poder concebir diversas modificaciones a partir de la descripción precedente y las figuras adjuntas. Estas modificaciones han de quedar incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Además, se considera que todos los aspectos y las formas de realización de la invención descritos en la presente pueden aplicarse y combinarse ampliamente con cualquier otra forma de realización consistente, incluyendo las tomadas de otros aspectos de la invención (aun de manera aislada), según sea apropiado.