(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 367 837**

(51) Int. Cl.:
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C12N 5/18 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **06725836 .8**
(96) Fecha de presentación : **09.03.2006**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1881008**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **23.01.2008**

(54) Título: **Método de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer mediante un anticuerpo monoclonal.**

(30) Prioridad: **09.03.2005 ES 200500550**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.11.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.11.2011

(73) Titular/es:
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 113
28006 Madrid, ES

(72) Inventor/es: **Méndez, Enrique**

(74) Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

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

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Método de diagnóstico in vitro de la enfermedad de Alzheimer mediante un anticuerpo monoclonal

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al diagnóstico de trastornos neurológicos, especialmente al diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer mediante un anticuerpo capaz de interaccionar con péptidos específicos asociados con dicha enfermedad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurológico que provoca la muerte de las células nerviosas del cerebro. Por lo general, progresa paulatinamente, comenzando después de los 50 años, y sus primeros síntomas pueden atribuirse a la vejez o al olvido común. A medida que avanza la enfermedad, se van deteriorando las capacidades cognitivas, entre ellas, la capacidad para tomar decisiones y llevar a cabo las tareas cotidianas, y pueden surgir modificaciones de la personalidad, así como conductas problemáticas. En sus etapas avanzadas, la EA conduce a la demencia y finalmente a la muerte. La enfermedad es actualmente incurable y constituye una causa importante de mortalidad.

En la actualidad, el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer se realiza normalmente a través del cuadro clínico, pues el diagnóstico definitivo sólo puede llevarse a cabo mediante un estudio histológico de muestras cerebrales (autopsia o biopsia), que revele la presencia en el tejido cerebral de sus rasgos característicos. Debido a la peligrosidad de la práctica de biopsias cerebrales en pacientes vivos, este procedimiento se utiliza muy raramente, por lo que se estima que la tasa de errores en el diagnóstico *in vivo* de esta enfermedad ronda el 20%-30%.

Los cerebros de los individuos que padecen enfermedad de Alzheimer muestran dos marcadores patológicos principales: degeneración neurofibrilar (que se identifica por la presencia de ovillos neurofibrilares, neuritas distróficas y hebras del neuropilo) y depósitos de sustancia amiloide (es decir, depósitos del denominado péptido β-amiloide, abreviado generalmente como Aβ), tanto en forma de placas (placas difusas y placas neuríticas, formas estas últimas características de la enfermedad, que se denominan así por aparecer entre y dentro de las neuronas), como en forma de depósitos vasculares (que aparecen en las paredes de los vasos sanguíneos cerebrales). Tanto la degeneración neurofibrilar como la deposición amiloide representan procesos degenerativos asociados también al envejecimiento normal del cerebro. En los sujetos de avanzada edad que no padecen demencia, el péptido Aβ se deposita principalmente en forma de placas difusas. Este tipo de depósito es especialmente intenso en algunos sujetos con capacidades cognitivas normales, y para algunos autores representa un proceso de "envejecimiento patológico", que se considera que está a medio camino entre el envejecimiento normal del cerebro y la EA [1]. Un desarrollo particularmente intenso y prematuro de placas difusas años antes de que aparezcan las placas neuríticas tiene lugar también en el síndrome de Down (SD), debido a una trisomía del cromosoma 21 que conduce a una sobreexpresión de la proteína precursora amiloide (β-APP). Aunque se puede observar un pequeño número de placas neuríticas en cerebros de sujetos con capacidades cognitivas normales, tanto los cerebros afectados por EA como los afectados por SD en edades avanzadas se caracterizan por el desarrollo de una gran cantidad de placas neuríticas maduras [2, 3]. En contraste con las placas difusas, que contienen una forma no fibrilar de Aβ (denomina “preamiloide”) [4], tanto los depósitos amiloides vasculares como las placas neuríticas contienen péptido Aβ en forma fibrilar y reaccionan con tinciones de sustancia amiloide tales como el Rojo Congo y la Tioflavina T.

El declive cognitivo en la EA se correlaciona de forma lineal con la progresión de los cambios neurofibrilares y la pérdida de sinapsis corticales [5]. No se ha observado pérdida local de sinapsis asociada a las placas difusas [6]. En contraste, las placas neuríticas están asociadas con pérdida de densidad sináptica, cambio neurofibrilar y activación de la microglía [7]. Tanto el cambio neurofibrilar puro como la deposición de Aβ siguen en la EA patrones secuenciales de progresión bien establecidos [8, 9]. Sin embargo, aunque el grado de declive cognitivo se correlaciona mejor con una sucesión de etapas basadas en el cambio neurofibrilar [5], el diagnóstico neuropatológico definitivo de la EA se basa todavía en la demostración histológica de una densidad significativamente mayor de placas neuríticas en las regiones neocorticales asociativas, con respecto a lo esperado según el grupo de edad del paciente, dentro de un cuadro clínico de demencia (criterios de consenso del CERAD: *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*) [10]. La formación de placas neuríticas representa el proceso patogénico central en la EA, y la composición molecular de estos depósitos β-amiloides y las diferencias con las placas difusas en lo que a dicha composición se refiere es, en consecuencia, uno de los principales campos de interés en la investigación actual sobre la EA.

El conocimiento que se posee sobre la composición molecular de los depósitos β-amiloides en el tejido cerebral de pacientes con enfermedad de Alzheimer ha cambiado radicalmente a lo largo de los últimos años. Varios estudios que empleaban métodos bioquímicos o inmunohistoquímicos con el fin de identificar diferentes formas del péptido Aβ han aportado una imagen bastante consistente que permite una interpretación molecular de los hallazgos morfológicos clásicos. Estos estudios son los que han proporcionado las bases de la teoría patogénica unitaria de la enfermedad denomina hipótesis amiloide [11], aunque la hipótesis original se ha reformulado recientemente con el fin de incluir el papel emergente de los oligómeros Aβ solubles como los principales agentes patógenos [12]. La

suposición de un papel patógeno central y primario de los péptidos Aβ en la EA está dando lugar en la actualidad a nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a la prevención o eliminación de estos depósitos.

La distribución topográfica y secuencia temporal de la deposición de péptidos Aβ conocidos en cerebros afectados por EA se ha dilucidado con la ayuda de anticuerpos dirigidos al extremo carboxilo, al extremo amino o a segmentos internos de la molécula Aβ, junto con el aislamiento y purificación de isoformas de Aβ por medio de métodos bioquímicos. La distribución tisular de péptidos caracterizados por los rasgos de sus extremos carboxilo muestra un patrón bastante regular y bien definido. Mientras que $A\beta_{X-40}$ es la forma predominante en los depósitos vasculares y es la forma principal que se encuentra en el LCR (líquido cefalorraquídeo), $A\beta_{X-42}$ es la forma principal detectada en los depósitos de tejido cerebral (placas difusas y neuríticas) [13]. En la EA, el síndrome de Down (SD) [13, 14] y el envejecimiento normal [1] $A\beta_{X-42}$ es el único componente de las placas difusas y el componente principal de las placas neuríticas. Estas últimas también pueden contener $A\beta_{X-40}$, predominantemente en la región de su núcleo central. También se ha establecido que $A\beta_{X-42}$ es la forma que se deposita en las fases iniciales.

Aunque inicialmente se creía que $A\beta_{X-40}$ y $A\beta_{X-42}$ comenzaban casi en su totalidad en el aminoácido Asp1, está bien establecido inmunohistoquímica y bioquímicamente que una amplia variedad de isoformas heterogéneas del péptido Aβ modificadas y truncadas en el extremo amino, participan en la composición de las placas tanto difusas como neuríticas [15]. Estas isoformas tienden a mostrar también un patrón regular de distribución entre las placas difusas y neuríticas, de forma que finalmente ha comenzado a surgir una imagen completa de la distribución topográfica de los diferentes péptidos Aβ. Sin embargo, existen todavía algunas discrepancias entre los estudios, particularmente con respecto a las características del extremo amino de los péptidos que componen las placas difusas, y la cantidad relativa de carga amiloide que representa cada uno de ellos.

Estas discrepancias implican particularmente al péptido p3 ($A\beta_{17-42}$). Mientras que algunos estudios sugieren que $A\beta_{17-42}$ puede ser el principal componente de las placas difusas [16], otros han encontrado una cantidad relativamente mayor de formas más largas (que comienzan en Asp1, o truncadas en el extremo amino u otras isoformas modificadas) a este nivel [15]. Puesto que $A\beta_{17-42}$ se genera mediante la escisión de β-APP por la α-secretasa (la denominada ruta no amiloidogénica) y muestra propiedades físico-químicas bastante diferentes de las isoformas más largas de Aβ (estas últimas generadas mediante la escisión de β-APP por la α-secretasa), su presencia selectiva en placas difusas puede tener un significado patogénico crucial en la evolución de las placas.

Gowing *et al.* [17] fueron los primeros en aislar el péptido $A\beta_{17-42}$ como la forma predominante recuperada de cerebros afectados por EA ricos en placas difusas. Este depósito no se encontró, ni en depósitos amiloides vasculares, ni en placas neuríticas. El anticuerpo monoclonal comercial 6E10, que reconoce $A\beta_{1-17}$, no produjo la inmunotinción de placas difusas, ni neocorticales, ni cerebelosas, en una serie de cerebros afectados por EA y SD [18]. Sin embargo, el cuerpo estriado, donde las placas difusas son particularmente abundantes en ausencia de placas neuríticas, mostró algunas placas positivas para el anticuerpo 6E10. Utilizando determinaciones por HPLC e inmunohistoquímica, Lalowski *et al.* [19] demostraron que $A\beta_{17-42}$ representa un 70% del contenido amiloide total en placas difusas del cerebelo, mientras que $A\beta_{1-42}$ representa un 12% y otras formas truncadas de $A\beta_{X-42}$ un 5% o menos. En cerebros de personas de edad avanzada y afectados por SD, Saido *et al.* [20] encontraron una tinción mayor de placas difusas con un anticuerpo específico anti-Aβ N3 (piroGlu) que con un anticuerpo anti-Aβ N(1). Iwatsubo *et al.* [15] estudiaron placas difusas en una serie de cerebros de personas de edad avanzada, afectados por EA y afectados por SD con un panel de anticuerpos dirigidos a reconocer formas de Aβ truncadas y modificadas en el extremo amino. Este estudio es único por el hecho de que el tejido cerebral empleado para el estudio inmunohistoquímico se fijó o en etanol al 70%, o en formaldehído al 4%, de forma que se podía ensayar el efecto sobre la aparición de artefactos de la fijación rutinaria con formaldehído. En todas las muestras de tejido fijadas en etanol al 70%, las placas difusas se tiñeron intensamente por la presencia de Aβ N1 (L-Asp), Aβ N1 (L-isoAsp), Aβ N1 (D-Asp), Aβ N3 (piroGlu), y Aβ X-42. Se obtuvo una inmunotinción débil con Aβ N11 (piroGlu) y Aβ N17. Sin embargo, en el material fijado en formaldehído algunas placas difusas se tiñeron con Aβ N1 (L-Asp), y no se obtuvo ninguna tinción con Aβ N1 (L-isoAsp) o Aβ N1 (D-Asp), mientras que el patrón de tinción para el extremo carboxilo permaneció sin cambios. Aunque los autores demostraron que la modificación del extremo amino puede alterar los resultados de la inmunotinción en tejidos fijados en formaldehído, obtuvieron una reactividad débil para el Aβ N17 incluso en material fijado en etanol. Utilizando un anticuerpo monoclonal específico para p3 ($A\beta_{17-42}$) [16], encontraron deposición de este péptido limitada en gran medida a las placas difusas, las neuritas distróficas y las coronas de placas neuríticas en las regiones de las amígdalas, el hipocampo y el parahipocampo. Los autores sugieren un papel específico de p3 en la deposición inicial de sustancia amiloide y en el origen de las placas neuríticas. Tekirian *et al.* [21], en una serie de cerebros afectados por EA y de control, demostraron la presencia en las placas difusas de Aβ N3 (pE) > Aβ N1 (D) > Aβ N17 (L) > Aβ N1 (rD).

En cuanto a la variabilidad en el extremo carboxilo, Parvathy *et al.* [22], en un estudio que empleaba anticuerpos dirigidos contra $A\beta_{X-40}$, $A\beta_{X-42}$ o $A\beta_{X-43}$, encontraron un subgrupo de placas neuríticas reactivas sólo frente al anticuerpo Aβ C40 y un subgrupo mayor de placas reactivas tanto frente a Aβ C40 como frente a Aβ C42.

Los estudios previos han establecido así que las placas difusas muestran un perfil de Aβ altamente específico en el extremo carboxilo y un perfil bastante específico en el extremo amino, este último sometido a alguna

heterogeneidad entre los pacientes y entre diferentes regiones del cerebro. La presencia de $A\beta_{17-42}$ parece estar limitada en gran medida a las placas difusas, aunque hay una gran variación entre los estudios con respecto a los contenidos relativos de este péptido más corto en las mismas. En los estudios realizados por Kida *et al.* [18], no se obtuvo ninguna tinción para péptidos Aβ que incluían la secuencia 12-16 en placas difusas de regiones corticales y subcorticales.

Tomándolos en conjunto, los resultados del Estado de la Técnica (ET) sugieren que, como propuso Larner [23], las formas del péptido Aβ específicas según el extremo amino pueden jugar un papel esencial en la evolución de las placas difusas para convertirse en placas neuríticas. Por ello, los anticuerpos capaces de detectar específicamente formas con el extremo amino truncado y, con ello, diferenciar claramente entre las placas difusas y las placas neuríticas son de gran utilidad como herramientas en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. De entre ellos, serían de especial utilidad aquellos capaces de diferenciar subgrupos de placas neuríticas según la proporción de las distintas formas de péptido amiloide que se diferencian en el aminoácido en el que acaba el extremo carboxilo, en especial si fueran capaces de permitir definir subconjuntos de placas que constituyeran un marcador específico de la enfermedad. El anticuerpo monoclonal de la invención, dirigido contra la secuencia constituida por los aminoácidos 12-16 del péptido β-amiloide y con una mayor afinidad por la forma Aβ42 que por Aβ40, cumple ambas características.

Otro aspecto en el que los anticuerpos capaces de detectar formas del péptido β-amiloide serían de especial utilidad sería en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer mediante el análisis de la concentración de distintas formas de este péptido en fluidos biológicos, un aspecto en el que se están trabajando tanto para facilitar el diagnóstico a partir de parámetros bioquímicos como, incluso, con vistas a identificar casos preclínicos o en especial riesgo de desarrollar la enfermedad y permitir el seguimiento de los pacientes incluidos en estudios clínicos. Con esta finalidad, muchos estudios se están centrando en el líquido cefalorraquídeo (LCR), con el fin de detectar si existen variaciones en las concentraciones de formas solubles del péptido β-amiloide presentes en este fluido que permitan diferenciar a los pacientes de los controles sanos. Sin embargo, es poco probable que el análisis del LCR, que lleva implícito el uso de una técnica invasiva, la punción lumbar, pueda aplicarse al diagnóstico y seguimiento de rutina de los pacientes con enfermedad de Alzheimer en la práctica clínica. Por ello, otras líneas de investigación se han centrado en el estudio de variaciones en la concentración en sangre y orina de marcadores biológicos (entre los cuales se encuentran formas solubles del péptido β-amiloide) que puedan correlacionarse con la aparición y la evolución de la enfermedad, aunque hay pocos estudios publicados hasta el momento. De acuerdo con ellos, los niveles de $A\beta_{X-42}$ y $A\beta_{X-40}$ en plasma parecen estar aumentados en el caso de existencia de síndrome de Down y también se incrementan en individuos normales con la edad. Los niveles plasmáticos de $A\beta_{X-42}$, pero no de $A\beta_{X-40}$, están aumentados en pacientes con enfermedad de Alzheimer, y descienden a lo largo de la evolución de la enfermedad [28,29], aunque la medida de la concentración de estas especies en plasma no permite su aplicación actual al diagnóstico. También se ha detectado la presencia de formas solubles del péptido β-amiloide en orina [30], aunque no se ha realizado hasta el momento un estudio comparativo entre pacientes y controles. Aunque el orden de magnitud de las concentraciones de péptido β-amiloide que se están detectando en plasma y orina están dificultando la definición de los perfiles correspondientes a los individuos sanos y a los pacientes que se encuentran en distintos estadios de la enfermedad y la posible asociación de las formas solubles del péptido β-amiloide con otras proteínas presentes en dichos fluidos biológicos es otra dificultad a superar, es este un campo en el que se está trabajando activamente, por lo que los anticuerpos monoclonales que puedan interaccionar con formas del péptido β-amiloide presentes en fluidos biológicos para posibilitar su detección pueden significar una herramienta de gran utilidad en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. El anticuerpo de la invención, que es capaz de interaccionar con formas solubles del péptido β-amiloide y de detectar su presencia en fluidos biológicos como la orina, es uno de los anticuerpos que puede ser de utilidad en la ejecución de estas técnicas diagnósticas. Además, el hecho de estar dirigido específicamente contra la zona cercana al extremo amino del péptido β-amiloide es una característica de interés en la diferenciación de las formas del péptido β-amiloide que conservan el extremo amino de aquellas formas en las que dicho extremo está truncado.

Se han descrito otros anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra la zona cercana al extremo amino del péptido β-amiloide, así como su utilización en métodos diagnósticos relacionados con la EA. Así, por ejemplo, en la patente norteamericana US-4.666.829 se describe la obtención de un anticuerpo monoclonal generado frente a una porción del péptido amiloide más cercana al extremo amino. En concreto, se preparó un péptido sintético consistente en los diez primeros residuos de dicho péptido (Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr), representando por SEQ ID NO:1. El epítopo reconocido por este anticuerpo estará incluido en estos aminoácidos 1 a 10, mientras que el anticuerpo reivindicado en la presente invención reconoce al menos el epítopo que comprende los aminoácidos del 12 al 16. Además de diferir en la secuencia específica que reconoce este anticuerpo monoclonal con respecto al de la presente invención, también es diferente el diseño del método diagnóstico propuesto, pues lo que se determina es exclusivamente la unión de los anticuerpos utilizados a lo que en esa patente se considera el péptido característico de la enfermedad de Alzheimer, el constituido por los aminoácidos 1 a 28 del péptido amiloide, no considerándose la unión a otras formas del péptido de diferentes longitudes y/o con variaciones en los extremos amino y carboxilo. Además, no se aporta ninguna prueba experimental que demuestre su capacidad para detectar formas del péptido amiloide presentes en fluidos biológicos.

Por otra parte, en la solicitud de patente PCT WO 90/12871 se describe la preparación del anticuerpo monoclonal denominado SV17-6E10. La generación de este anticuerpo se produce por inmunización con la secuencia peptídica Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Gln-Val-His-His-Gln-Lys-Leu, representada por SEQ ID NO:2, que podría considerarse equivalente a la de los aminoácidos 1 a 17 del péptido amiloide. Otro anticuerpo monoclonal dirigido contra la zona en la que se incluyen los aminoácidos 1 a 17 es el ya mencionado anticuerpo monoclonal comercial 6E10 que, según figura en la descripción de la hoja técnica correspondiente al producto, http://www.alexis_corp.com/monoclonal:antibodies-SIG-9320/opfa.1.1.SIG-9320.386.4.1.html, específicamente, dentro de los aminoácidos 1 a 17 del péptido β-amiloide, reconoce el epítopo comprendido entre los aminoácidos 3 a 8. Este epítopo corresponde a una zona diferente y más cercana al extremo amino que la del anticuerpo monoclonal EM5 de la invención. Aunque es capaz de producir una tinción diferencial de las placas neuríticas y los depósitos vasculares, sin teñir las placas difusas, este anticuerpo no parece presentar diferencias de afinidad entre los péptidos Aβ42 y Aβ40.

La patente EP 0683234 describe anticuerpos monoclonales dirigidos contra la región que comprende los aminoácidos 1-16 del péptido β-amiloide, su uso en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer y su capacidad para unirse a las isoformas Aβ40 y Aβ42 del péptido β-amiloide. La solicitud de patente internacional WO 2004/029630 divulga anticuerpos monoclonales que se unen al epítopo EVHHQKI del péptido β-amiloide, detectando dicho péptido en muestras de cerebro y siendo usados para tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer.

Por tanto, el anticuerpo monoclonal de la invención, al que se ha denominado EM5, constituye una herramienta novedosa, porque reconoce al menos un epítopo no reconocido por ninguno de los anticuerpos descritos en el estado de la técnica conocido, en la secuencia del péptido β-amiloide. El anticuerpo de la invención, por consiguiente, es útil para su aplicación en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Detecta específicamente placas neuríticas sin detectar placas difusas, que no están asociadas a la enfermedad de forma específica. Dentro de las placas neuríticas, el anticuerpo monoclonal de la invención permite detectar un subgrupo de placas neuríticas que se diferencia en la composición molecular de las mismas con respecto a los depósitos de péptido β-amiloide. Además, el anticuerpo monoclonal de la invención es capaz de unirse a formas del péptido β-amiloide presentes en solución, permitiendo la posterior detección y cuantificación de dichos péptidos, incluso si la solución es un fluido biológico como la orina.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que reconoce en el péptido β-amiloide el epítopo correspondiente a la secuencia:

Val-His-His-Gln-Lys (SEQ ID NO:3) y es capaz de unirse a isoformas del péptido β-amiloide que contengan dicha secuencia, independientemente de que el péptido se encuentre en forma soluble, agregada o desnaturalizada por SDS, aunque mostrando una afinidad mayor por la isoforma Aβ 42 que por la isoforma Aβ 40.

La invención se refiere también a fragmentos del citado anticuerpo capaces también de unirse a isoformas del péptido β-amiloide que contengan dicha SEQ ID NO:3.

La invención se refiere también a una línea celular de hibridoma capaz de producir el anticuerpo monoclonal anteriormente descrito y a un método de producir dicho anticuerpo mediante la obtención de una línea celular de hibridoma y el cultivo de dicha línea celular en condiciones que permitan la producción del anticuerpo monoclonal.

Adicionalmente, la invención se refiere a una composición que comprenda el anticuerpo de la invención o al menos un fragmento del mismo capaz de unirse a SEQ ID NO:3. Una posible realización de una composición de la invención es aquella en la que el anticuerpo o el fragmento del mismo están acoplados a una sustancia capaz de permitir su detección, sustancia que puede ser un segundo anticuerpo capaz de unirse al anticuerpo de la invención o al fragmento del mismo y que lleva acoplada una sustancia capaz de permitir su detección, como puede ser una enzima capaz de catalizar la transformación de una determinada sustancia en otra que puede ser detectada, por ejemplo un cromógeno. Otra posible realización de una composición de la invención es aquella en la que el anticuerpo o un fragmento del mismo están acoplados a alguna sustancia o partícula que facilita la extracción de isoformas del péptido β-amiloide presentes en una solución, como puede ser una partícula magnética que permitirá la separación de la solución de los complejos antígeno-anticuerpo o antígeno-fragmento de anticuerpo formados si se aplica un campo magnético, siendo así posible concentrar las isoformas del péptido β-amiloide presentes en dicha solución y facilitar su posterior detección, identificación y/o cuantificación.

La invención se refiere también al uso del anticuerpo monoclonal de la invención o al menos un fragmento del mismo capaz de unirse a SEQ ID NO:3 para detectar isoformas del péptido β-amiloide que contengan SEQ ID NO:3. Las isoformas del péptido β-amiloide a detectar pueden encontrarse en una muestra de tejido cerebral tomada de un individuo, en una solución como puede ser una muestra de un fluido biológico o una solución derivada del mismo o, incluso, pueden encontrarse en algún otro tipo de muestra, no biológica, en la que se desea igualmente detectar la posible presencia de isoformas del péptido β-amiloide.

Por último, la invención se refiere a un método de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer basado en la detección de isoformas de péptido β-amiloide mediante el uso del anticuerpo de la invención, o de al menos un fragmento del mismo capaz de unirse a SEQ ID NO:3. En una realización preferida de la invención, la detección de isoformas del péptido β-amiloide se produce en una muestra de tejido cerebral tomada de un individuo. En ese caso, las composiciones de la invención en las que el anticuerpo o el fragmento del mismo están acoplados a una sustancia capaz de permitir su detección, sustancia que puede ser un segundo anticuerpo capaz de unirse al anticuerpo de la invención o a un fragmento del mismo y que lleva acoplada otra sustancia capaz de permitir su detección, pueden ser de especial utilidad.

En otra realización preferida del método diagnóstico de la invención, la detección de isoformas del péptido β-amiloide se produce en una solución, preferiblemente una muestra de un fluido biológico como puede ser el líquido cefalorraquídeo, la orina o la sangre o, incluso, una solución derivada de algún fluido biológico, como puede ser el plasma. En esta segunda realización de la invención, se prefiere el uso de composiciones de la invención en las que el anticuerpo o el fragmento del mismo están acoplados a alguna sustancia o partícula que facilite la extracción de isoformas del péptido β-amiloide presentes en solución, como puede ser una partícula magnética que permitirá la separación de la solución de los complejos antígeno-anticuerpo o antígeno-fragmento de anticuerpo formados, si se aplica un campo magnético, siendo así posible concentrar las isoformas del péptido β-amiloide presentes en la solución y facilitar su posterior detección, identificación y/o cuantificación. De esta forma, el método de diagnóstico de la invención comprende las etapas de:

a) añadir a la muestra de fluido biológico o la solución derivada del mismo una composición que comprende el anticuerpo de la invención o al menos un fragmento del mismo capaz de unirse a SEQ ID NO:3 acoplados a una partícula magnética;

b) dejar transcurrir tiempo suficiente para que se formen complejos antígeno-anticuerpo o antígeno fragmento de anticuerpo, entre al menos una isoforma del péptido β-amiloide y el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, comprendidos en la composición;

c) aplicar un campo magnético para extraer los complejos antígeno-anticuerpo o antígeno-fragmento de anticuerpo de la solución;

d) retirar la solución;

e) separar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de las moléculas de péptido β-amiloide,

f) identificar y cuantificar las isoformas del péptido β-amiloide extraídas de la muestra de fluido biológico o solución derivada del mismo.

Se prefiere que la solución de la que se extraen las isoformas del péptido β-amiloide sea una muestra de sangre u orina, por ser más sencilla su obtención que en el caso de las muestras de líquido cefalorraquídeo, o bien una muestra de plasma derivado de una muestra de sangre. Entre sangre o plasma y orina, se prefiere especialmente que la muestra de fluido biológico sea una muestra de orina, por no requerir de métodos invasivos para su obtención. Ello obliga, sin embargo, a utilizar algún método muy sensible para la identificación y cuantificación de las isoformas del péptido β-amiloide, que puede ser la espectrometría de masas MALDI-TOF.

Los anticuerpos policlonales EM2 y EM3, desarrollados también por el grupo de los inventores, pueden utilizarse también como herramienta complementaria en el método de diagnóstico de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1 muestra las curvas de unión de los anticuerpos EM5 (parte superior) y 6E10 (parte inferior) a péptidos Aβ inmovilizados. Se muestran los resultados correspondientes a distintas concentraciones (abscisas; en concentración nM) de los anticuerpos tanto frente al péptido Aβ 40 (símbolos rellenos) como frente al péptido Aβ 42 (símbolos vacíos), en ambos casos agregado (Δ) o sin agregar (□). Cada punto representa la media de experimentos realizados por triplicado. En ordenadas se representa la densidad óptica (D.O) a 450 nm.

La Fig. 2 muestra el resultado de los análisis por inmunotransferencia de los anticuerpos EM2, EM3 y EM5 frente a péptidos sintéticos Aβ 1-40 y Aβ 1-42.

La Fig. 3 muestra en su parte superior, un diagrama de barras referente a la reactividad de EM5 frente a series de péptidos Aβ sintéticos mediante ELISA, con los valores de absorbancia (D.O. a 450 nm) correspondientes a 20 µg/ml de anticuerpo. En la parte inferior se indica la localización del epítopo reconocido por EM5 según los resultados obtenidos en este ELISA. 1-28R = $A\beta_{1-28}$ de roedor. Entre paréntesis, diferentes mutaciones.

La Fig. 4 muestra la localización del epítopo del péptido Aβ reconocido por el anticuerpo monoclonal EM5 según se determinó mediante análisis de Espectrometría de Masas del péptido β-amiloide inmunoprecipitado digerido con

diferentes enzimas proteolíticas indicadas en la Tabla de la descripción (péptidos 1-5). La secuencia 6 corresponde al péptido β-amiloide sin digerir.

La Fig. 5 muestra fotografías de inmunotinciones de tejido cerebral afectado por la enfermedad de Alzheimer, utilizando EM2, EM3, EM5 y combinaciones de EM5 con cada uno de los anteriores. Las estructuras teñidas se señalan como V (vasos), DP (placas difusas) y NP (placas neuríticas). Las fotografías corresponden a:

- **(A)** y **(B):** Secciones seriadas consecutivas de la misma zona del córtex occipital inmunoteñidas con EM5 **(A)** y EM 3 **(B)** como anticuerpo primario, utilizando azul de nitro-tetrazolio (NBT) como cromógeno.

- **(C):** Micrografía con alto grado de magnificación de una técnica de inmunotinción doble utilizando EM3 (cromógeno: NBT) y EM5 (cromógeno: DAB) como anticuerpos primarios.

- **(D)** y **(E):** Secciones seriadas consecutivas de la misma área del córtex occipital inmunoteñidas o con EM5 **(D)** o con EM2 **(E).**

- **(F):** Microfotografía con alto grado de magnificación de una técnica de inmunotinción doble empleando EM2 (cromógeno: azul de nitro-tetrazolio, NBT) y EM5 (cromógeno: diaminobencidina, DAB).

La Fig. 6 muestra gráficos obtenidos en el análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF de formas del péptido β-amiloide de distinta longitud. En cada caso, en el eje de ordenadas se representa el porcentaje de intensidad (% Int.) correspondiente a cada uno de los picos de diferente masa (Mas.), deducida a partir de la relación masa/carga (m/z). El gráfico superior, indicado con la letra A y con el indicativo “Ctrl.” a la derecha, se obtuvo de una solución que contenía los péptidos que comprenden los aminoácidos 12 a 29 (Pep. Aβ. 12-29), 1 a 40 (Pep. Aβ. 1-40) y 1-42 (Pep. Aβ 1-42) del péptido β-amiloide. El gráfico inferior, indicado con la letra B y con el indicativo “EM5+PM” a la derecha, se obtuvo tras la concentración de los péptidos a partir de la solución que los contenía mediante el uso del anticuerpo EM5 unido covalentemente a partículas magnéticas y separación de los complejos formados mediante el uso de un campo magnético. El dibujo de la zona inferior derecha representa la zona de unión del anticuerpo a cada uno de los péptidos considerados.

La Fig. 7 muestra un gráfico obtenido mediante el análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF de una muestra de orina de un individuo sano a la que se le habían añadido cantidades adicionales de los péptidos que comprenden los aminoácidos 12 a 28 (pico marcado como Pep. 12-28), 1 a 40 (pico marcado como Pep. 1-40) y 1-42 (pico marcado Pep. 1-42) del péptido β-amiloide, tras lo cual la muestra se trató con el anticuerpo EM5 unido covalentemente a partículas magnéticas y se separaron los complejos formados mediante el uso de un campo magnético. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de intensidad (% Int.) correspondiente a cada uno de los picos de diferente masa (Ms.), deducida a partir de la relación masa/carga (m/z). Se indican los picos correspondientes a cada uno de las formas del péptido β-amiloide añadidas a la muestra de orina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Como se ha comentado anteriormente, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que reconoce en el péptido β-amiloide el epítopo correspondiente a la secuencia:

Val-His-His-Gln-Lys (SEQ ID NO:3)

Esta secuencia se corresponde con la de los residuos 12-16 del péptido β-amiloide humano. En consecuencia, sería esperable que el citado anticuerpo fuera capaz de unirse a isoformas del péptido β-amiloide que contuvieran dicha secuencia, no reconociendo aquellas que carecieran de ella como, por ejemplo, el denominado péptido p3 ($A\beta_{17-42}$) y otras formas con el extremo amino truncado ($A\beta_{17-X}$). En la caracterización del anticuerpo monoclonal, conocido como EM5, que se describe detalladamente en los ejemplos posteriores se demuestra que EM5 se une a cualquier péptido que contenga los residuos 12 a 16 de la secuencia del Aβ humano, aún presentando modificaciones fuera de esta región, y no reconoce péptidos que estén desprovistos de dicha región. Si la región se modifica, como es el caso del péptido $A\beta_{1-28}$(roedor), que presenta un cambio de aminoácido en la posición 13, además de en las posiciones 5 y 10, el péptido deja de ser reconocido por EM5.

Además, los estudios muestran que el anticuerpo es capaz de unirse a isoformas del péptido Aβ que contienen los residuos 12 a 16 independientemente de si las mismas se encuentran en forma soluble, agregada o desnaturalizada (en SDS). En particular, las pruebas descritas en los Ejemplos que se describen posteriormente demuestran que el anticuerpo de la invención es capaz de unirse tanto a isoformas del péptido β-amiloide que se encuentran agregadas, formando parte del placas presentes en muestras de tejido cerebral, como a isoformas del péptido β-amiloide que se encuentren en solución, incluso si la solución es una muestra de fluido biológico como puede ser la orina. Por ello, otro de los aspectos de la invención se refiere a una composición que contenga el anticuerpo de la invención, o al menos un fragmento del mismo capaz de unirse a SEQ ID NO:3, acoplados a alguna sustancia que permita su detección y/o su concentración, y a su uso en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

Cuando el anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo estén acoplados a alguna sustancia que permita su detección, la detección de la presencia de las isoformas del péptido β-amiloide que se hayan unido al anticuerpo o un fragmento del mismo y/o la cuantificación de las mismas podrá hacerse mediante la detección y/o cuantificación del anticuerpo o de su fragmento unidos a isoformas del péptido β-amiloide que contengan la secuencia específica reconocida por el anticuerpo de la invención. En una realización preferida de la invención, la sustancia a la que se acopla el anticuerpo, o un fragmento del mismo capaz de unirse a SEQ ID NO:3, es un segundo anticuerpo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal de la invención, estando el segundo anticuerpo unido a una enzima capaz de catalizar la transformación de una determinada sustancia en otra que posea unas características que hagan fácil la detección de su presencia. En la realización que más se prefiere de la invención, el segundo anticuerpo unido a una enzima es parte del sistema Envision, de Laboratorios Dako, siendo la sustancia cuya transformación es catalizada por la enzima un cromógeno y siendo la enzima que cataliza la reacción o bien fosfatasa alcalina (utilizándose entonces como cromógeno azul de nitro-tetrazolio) o peroxidasa de rábano (utilizándose entonces como cromógeno diaminobencidina).

Otra posibilidad es que el anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo estén unidos a alguna sustancia o partícula que facilite la concentración de las isoformas del péptido β-amiloide que se hayan unido a dicho anticuerpo o a su fragmento. Esta realización se prefiere cuando la composición de la invención vaya a utilizarse para la detección y/o cuantificación de isoformas del péptido β-amiloide que se encuentren en solución, especialmente en una solución en la que su concentración sea baja, como puede ser la sangre o el plasma, la orina o el líquido cefalorraquídeo. La sustancia o partícula será tal que permita la separación fácil del complejo antígeno-anticuerpo de dicha disolución, por ejemplo, por inmunoprecipitación. Un ejemplo preferido de dichas partículas son las partículas magnéticas que, al estar acopladas al anticuerpo de la invención o a un fragmento del mismo capaz de unirse a isoformas del péptido β-amiloide que contengan la secuencia específica reconocida por el anticuerpo de la invención, permitirán la extracción de la solución de las isoformas del péptido β-amiloide unidas al anticuerpo o a un fragmento del mismo si se aplica un campo magnético adecuado. Posteriormente, las isoformas del péptido β-amiloide pueden separarse del anticuerpo o del fragmento del mismo para proceder a su detección, identificación y/o cuantificación. Un método adecuado para ello puede ser la espectrometría de masas, en especial la conocida como MALDI-TOF (iniciales de la expresión inglesa *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*, es decir, la espectrometría de masas de desorción/ionización por láser, asistida por una matriz, realizada en tiempo de vuelo)**.**

Como se ha mencionado, el anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo capaz de unirse a isoformas del péptido β-amiloide que contengan la secuencia específica reconocida por el anticuerpo de la invención, así como las composiciones que contengan al menos uno de ellos, pueden utilizarse para el diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer. Los métodos de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer que hagan uso del anticuerpo de la invención o de un fragmento del mismo capaz de unirse a isoformas del péptido β-amiloide que contengan la secuencia específica reconocida por el anticuerpo de la invención, así como los que hagan uso de composiciones que incluyan dicho anticuerpo o dicho fragmento, están incluidos dentro del alcance de la invención. Dicho diagnóstico puede realizarse sobre tejido cerebral, en el que se pone de manifiesto selectivamente la presencia de depósitos en los que predominen isoformas del péptido amiloide que contengan la secuencia reconocida por el anticuerpo monoclonal de la invención (placas neuríticas y depósitos vasculares, depósitos característicos del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer) revelando la existencia de unión a dichos depósitos del anticuerpo monoclonal de la invención, o de un fragmento del mismo capaz de unirse a la secuencia específica reconocida por dicho anticuerpo, a diferencia de lo que sucedería con los depósitos en los que las isoformas predominantes fueran aquellas que carecen de la secuencia reconocida por el anticuerpo monoclonal de la invención (placas difusas), las isoformas $A\beta_{17-42}$, que no presentarían unión del anticuerpo monoclonal o de fragmentos del mismo. La unión del anticuerpo a placas neuríticas y depósitos vasculares se pone de manifiesto mediante una composición como puede ser una de las que comprenden, además del anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo, un segundo anticuerpo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal de la invención, estando el segundo anticuerpo unido a una enzima capaz de catalizar la transformación de una determinada sustancia en otra que posea unas características que hagan fácil la detección de su presencia, como puede ser un cromógeno. En la realización más preferida del método diagnóstico sobre tejido cerebral, que aquí se describe, se complementa mediante la utilización adicional de los anticuerpos policlonales EM2 y EM3, que reconocen o $A\beta_{X-42}$ (EM3) o $A\beta_{X-40}$ (EM2), ambos anticuerpos también desarrollados previamente por el grupo de los autores de la invención [24].

Otra realización del método diagnóstico de la invención se lleva a cabo en un fluido biológico que se sepa que contiene isoformas del péptido β-amiloide, como puede ser el líquido cefalorraquídeo, la orina o la sangre o, en este último caso, el plasma derivado de la misma. Dado que la obtención de líquido cefalorraquídeo implica la realización de una punción, se prefiere la utilización de plasma o de orina, especialmente de esta última, que no lleva implícita la utilización de técnicas invasivas para su obtención. Se prefiere entonces que el método diagnóstico de la invención haga uso de composiciones que comprendan el anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo unidos a alguna sustancia o partícula que facilite la concentración de las isoformas del péptido β-amiloide que se unan a dicho anticuerpo o a un fragmento del mismo. Tal como se ha comentado, se prefiere que las partículas que faciliten la concentración de las isoformas del péptido β-amiloide sean partículas magnéticas acopladas al anticuerpo o a un fragmento del mismo, de manera que, al someter la solución que contenga los complejos

formados con las isoformas del péptido β-amiloide a la acción de un campo magnético, puedan extraerse éstos de la solución, que se puede desechar con facilidad mediante algún método como la aspiración. En el caso de utilizarse un anticuerpo completo, se prefiere especialmente que el acoplamiento del anticuerpo a la partícula magnética se produzca mediante un enlace covalente, para aumentar su estabilidad, pero que el establecimiento de dicho enlace covalente se produzca de manera que se evite en lo posible la zona de unión al antígeno, para no disminuir la capacidad de unión del anticuerpo, por lo que se prefieren los métodos en los que unión se produzca preferentemente en la zona rica en histidinas del fragmento Fc del anticuerpo o en las cadenas glicosídicas de dicha zona. En esta línea, se prefiere particularmente el método de unión de los anticuerpos a partículas magnéticas descrito por Fuentes *et al.* [26].

Una vez separados los complejos de unión de las isoformas del péptido β-amiloide de la solución, se prefiere la separación de dichas isoformas de los anticuerpos o de los fragmentos de los mismos previamente a la detección y/o cuantificación de las isoformas de péptido β-amiloide extraídas, para lo cual pueden utilizarse acetonitrilo y ácido trifluoroacético. Dado que la concentración de isoformas de péptido β-amiloide en orina no suele ser elevada, se prefiere que la detección y/o cuantificación se produzca mediante algún método muy sensible como puede ser la espectrometría de masas MALDI-TOF.

Otro de los aspectos de la invención es una línea celular de hibridoma capaz de producir el anticuerpo monoclonal de la invención. En una realización preferida de la invención, dicha línea celular se obtiene mediante la fusión con la línea de mieloma de ratón P3/X63-Ag.653 de células de bazo de ratones BALB/c inmunizados con péptido $A\beta_{1-40}$ acoplado a KLH (hemocianina de lapa californiana).

Por último, un aspecto más de la invención es un método de producción y purificación del anticuerpo monoclonal de la invención a partir de células de hibridoma. En la realización preferida de la invención, el método consiste en la producción de una línea celular de hibridoma como la anteriormente descrita y su crecimiento como fluido ascítico en ratones BALB/c previamente tratados con Pristane. El anticuerpo monoclonal se purifica de ese fluido ascítico mediante cromatografía de afinidad en una columna de proteína A-Sefarosa (Pharmacia). En una realización particularmente preferida de la invención, las células de hibridoma utilizadas para ello son las de la línea denominada “EM5 clone A”, cuyo depósito se ha solicitado el día 1 de Marzo de 2006 en la European Collection of Cell Cultures (Colección Europea de Cultivos Celulares, ECACC), CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido, habiendo recibido el número de acceso 06030101.

La invención y sus realizaciones preferidas se describen ahora con más detalle mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos.-

Ejemplo 1.- Producción de anticuerpos

La producción de los anticuerpos policlonales EM2 y EM5 empleados en este estudio se llevó a cabo tal como se ha publicado previamente [24].

Para la producción del anticuerpo monoclonal EM5 se llevaron a cabo los siguientes pasos:

Obtención de hibridomas

Se inyectaron de forma subcutánea a ratones BALB/c 40 µg de péptido $A\beta_{1-40}$ acoplado a KLH (hemocianina de lapa californiana) y disuelto en tampón fosfato salino (PBS) y emulsionado con un volumen igual de coadyuvante de Freund completo. Los ratones recibieron tres inyecciones repetitivas cada dos semanas en coadyuvante de Freund incompleto. Tres días antes de la fusión, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de 25 µg de $A\beta_{1-40}$ - KLH en PBS. El día de la fusión, se fusionó células de bazo de los animales inmunizados con la línea de mieloma de ratón P3/X63-Ag.653 utilizando polietilenglicol 1400 (Sigma), siguiendo procedimientos establecidos [25]. Las células fusionadas se distribuyeron en placas estériles de 96 pocillos a una densidad de 105 células por pocillo y se seleccionaron en medios que contenían hipoxantina, timidina y aminopterina. Los hibridomas productores de anticuerpos se identificaron mediante el ELISA descrito más adelante.

Cribado de hibridomas.

Se recubrieron durante toda la noche a 4ºC placas de microtitulación de poliestireno (Maxisorb, Nunc) con $A\beta_{1-40}$, a 5 µg/ml en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6 (tampón de recubrimiento). Las placas se lavaron con Tween 20 al 0,05% en PBS (PBS-T) y se bloquearon los sitios de unión no específicos con albúmina de suero bovino (BSA) al 2% en PBS-T (solución de bloqueo) durante 1 hora a 37 ºC. Después de lavar, se incubó las placas durante 1 hora con sobrenadante de cultivo de tejidos diluido dos veces en solución de bloqueo. Las placas se lavaron de nuevo y se incubaron con IgG de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano (Sigma) una hora a 37 ºC. Después de lavar, se añadió la solución con el sustrato (o-fenilendiamina al 0,05% y peróxido de hidrógeno al 0,015% en tampón citrato 100 mM, pH 5,0). La reacción se paró 10 minutos más tarde con ácido sulfúrico 2,5 M y se determinó la absorbancia a 492 nm en un lector de microplacas. Se seleccionaron los hibridomas cuyos sobrenadantes produjeron un valor de absorbancia al menos dos veces superior al obtenido con el sobrenadante de hibridomas no relacionados (anticuerpos anti-gliadinas). Los hibridomas que producían anticuerpos específicos se clonaron

repetidamente mediante dilución limitante, y los isotipos de los anticuerpos monoclonales se determinaron en sobrenadante de cultivo de células concentrado mediante inmunoprecipitación en gel utilizando un antisuero específico (Sigma). Los hibridomas seleccionados se hicieron crecer como fluido ascítico en ratones BALB/c previamente tratados con Pristane.

Purificación de anticuerpos monoclonales.

El anticuerpo monoclonal EM5 se purificó del fluido ascítico mediante cromatografía de afinidad en una columna de proteína A-Sefarosa (Pharmacia). Los anticuerpos purificados se dializaron profusamente en PBS y se almacenaron a - 85 ºC hasta el momento de su uso.

Ejemplo 2.- Cálculo de la constante aparente de disociación: afinidad por los péptidos $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$

Se estudió mediante ELISA la afinidad de los anticuerpos monoclonales EM5 y 6E10 utilizando los péptidos inmovilizados recién disueltos $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$, péptidos que habían sido sintetizados en la instalación WM Keck de la Universidad de Yale utilizando la metodología del N-t-butiloxicarbonilo.

Se revistieron placas de microtitulación de poliestireno (Immulon 2, Dynex Technology Inc., Chantilly, VA) durante 16 horas a 4 ºC con 0,5 µg de péptido $A\beta_{1-40}$ o $A\beta_{1-42}$ recién disuelto o agregado en tampón carbonato/bicarbonato pH 9,6. Después de bloquear con Superblock (Pierce Chemical Co.) se añadieron a los pocillos recubiertos con Aβ concentraciones crecientes de EM5 purificado (0-0,5 nM en TBS-T, 100 microlitros por pocillo) y se incubaron durante 3 horas a 37 ºC. El EM5 unido se detectó con el fragmento F(ab´)2 de IgG de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano (1:3000, Amersham). La reacción se desarrolló durante 15 minutos con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (BioRad, Hercules, CA.), se paró con ácido sulfúrico 2 M y se cuantificó en un lector de microplacas (Cambridge Technology, Watertown, MA) a 450 nm. La afinidad del anticuerpo comercialmente disponibles 6E10 (Senetek, PLC) se estudió siguiendo un protocolo similar utilizando preparaciones de anticuerpos IgG purificados. El análisis de regresión no lineal, la estimación de las constantes aparentes de disociación y la comparación de los datos de unión de proteínas para averiguar la significación estadística mediante el cálculo de las ratios F se evaluaron empleando el software Prism de GraphPad (GraphPad, San Diego, CA).

La Figura 1 muestra las curvas de saturación correspondientes a la unión en el ELISA de los anticuerpos monoclonales EM5 y 6E10 a péptidos Aβ recién disueltos y agregados. En todos los casos, se observó una elevada afinidad con constantes aparentes de disociación en el rango picomolar. Ninguno de estos anticuerpos mostró una afinidad diferencial por las formas de Aβ recién preparadas o agregadas. De forma interesante, mientras que 6E10 mostró una afinidad equivalente por $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$, EM5 mostró una afinidad mayor por Aβ 42 que por Aβ 40 ($p<0,01$) (13,7 pM y 15,5 pM por Aβ 42 recién preparado y agregado, respectivamente; y 37,5 pM y 37,0 pM por Aβ 40 recién preparado y agregado, respectivamente).

Ejemplo 3.- Análisis por inmunotransferencia

Se estudió y comparó el reconocimiento específico de $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ por parte de EM5 con los anticuerpos policlonales EM2 y EM3 mediante análisis por inmunotransferencia. Para ello, se sometieron péptidos Aβ (0,5 µg/calle) a electroforesis PAGE en acrilamida al 16%, tris-tricina-SDS. Los péptidos se transfirieron electroforéticamente durante 1 hora a 400 mA y 4°C a membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (Immobilon-P, Millipore) utilizando ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfónico, pH 11, que contenía metanol al 10%. Las membranas se bloquearon durante 16 h a 4 ºC con TBS-T que contenía leche descremada en polvo al 5% y se incubaron luego durante 1 hora a temperatura ambiente con 2 µg/ml de las IgG EM2, EM3 o EM5. Como segundo anticuerpo se empleó una IgG de cabra anti-conejo (EM2 y EM3) o anti-ratón (EM5) acoplada a peroxidasa de rábano (Amersham) y diluida 1:2.000. Las inmunotransferencias se visualizaron mediante quimioluminiscencia (Amersham) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Los resultados se muestran en la Figura 2. En ella puede apreciarse que, en los experimentos de inmunotransferencia, EM5 mostró inmunorreactividad frente a los péptidos tanto $A\beta_{1-40}$ como $A\beta_{1-42}$ (corroborando los resultados obtenidos por ELISA), mientras que los anticuerpos EM2 y EM3 fueron capaces de reconocer sólo los péptidos $A\beta_{1-40}$ o $A\beta_{1-42}$, respectivamente, como se ha descrito anteriormente [24]. Estos resultados apoyan la idea de que el anticuerpo monoclonal EM5 se une a un epítopo lineal específico común a ambos péptidos, que se conserva en las muestras tratadas con SDS. En conjunto, nuestros resultados indican que EM5 es capaz de reconocer péptidos Aβ en las formas soluble, agregada y desnaturalizada (en SDS), con una unión ligeramente preferencial con Aβ 42, probablemente como resultado del incremento de la hidrofobicidad del péptido.

Ejemplo 4.- Localización del epítopo

Con el fin de localizar con precisión el epítopo exacto reconocido por el anticuerpo EM5, se analizó la unión del anticuerpo a una serie de péptidos Aβ sintéticos. De ellos, los péptidos $A\beta_{1-16}$, $A\beta_{1-28}$ y $A\beta_{25-35}$ se adquirieron a Sigma (San Luis, MO); los péptidos $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{1-42}$(E22Q), $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-40}$(E22G), $A\beta_{1-40}$(E22Q), $A\beta_{1-28}$(roedor), $A\beta_{1-28}$(E22Q), $A\beta_{17-40}$, $A\beta_{16-42}$ y $A\beta_{25-35}$ se sintetizaron en la instalación WM Keck de la Universidad de Yale utilizando la metodología del N-t-butiloxicarbonilo; $A\beta_{21-28}$, $A\beta_{21-28}$(E22Q), $A\beta_{37-41}$ y $A\beta_{37-40}$ se sintetizaron en la Unidad de Síntesis

de Péptidos (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid) utilizando la metodología normal del Fmoc. El diseño de los péptidos $A\beta_{37-42}$ y $A\beta_{37-49}$ incluía una cola en el extremo amino con un residuo de cisteína para el acoplamiento que tenía la secuencia CSGGSGGG (SEQ ID NO:4). Todos los péptidos se purificaron mediante cromatografía líquida de alta eficacia en el modo de fase inversa y su pureza se evaluó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

a) ELISA de captura de anticuerpos

Para realizar el ensayo, se recubrieron placas de microtitulación de poliestireno de fondo plano (Immulon 2, Dynex Technology Inc., Chantilly, VA) durante 16 horas a 4 ºC con 1 µg/pocillo del correspondiente péptido Aβ en tampón carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,6. Después de bloquear con NaCl 150 mM, Tris 20 mM, Tween-20 al 0,05%, pH 7,4 (TBST) que contenía BSA al 2%, se incubaron diluciones seriadas del anticuerpo EM5 (de 20 a 0,02 mg/ml de la fracción de las IgG) durante 1 hora a 37ºC. Se aplicó entonces una IgG anti-ratón acoplada a peroxidasa (Sigma, San Luis, MO) y diluida 1:2000 durante 30 minutos a 37ºC. La reacción se desarrolló con TMB (BioRad, CA), se paró con ácido sulfúrico 2M y se cuantificó a 450 nm. La unión inespecífica se determinó omitiendo los primeros anticuerpos.

Los resultados se muestran en la Figura 3, en cuya parte superior aparece un diagrama de barras correspondiente a los valores de absorbancia obtenidos correspondientes a la incubación de 20 µg/ml del anticuerpo con cada uno de los péptidos. EM5 demostró unirse a cualquier péptido que contuviera los residuos 12 a 16 de la secuencia del Aβ humano y no logró reconocer péptidos desprovistos de esta región. Es más, variantes mutantes con modificaciones fuera de esta región ($A\beta_{1-42}$(E22Q), $A\beta_{1-40}$(A21G), $A\beta_{1-40}$(E22G), $A\beta_{1-40}$(E22Q)) mostraron una unión similar al compararlas con el péptido de tipo silvestre, mientras que el péptido $A\beta_{1-28}$(roedor), que muestra tres cambios de aminoácidos en las posiciones 5, 10 y 13, no fue reconocido por EM5.

b) Análisis por espectrometría de masas del péptido β-amiloide digerido e inmunoprecipitado

Para confirmar los resultados, se realizó un estudio complementario en el que un juego de péptidos derivados de $A\beta_{1-42}$, generados por digestión con tripsina o α-quimotripsina, se pusieron en contacto con partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo EM5. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

Para digerir el péptido, a una alícuota de 10 µl de péptido β-amiloide en bicarbonato amónico 50 mM que contenía 1 µg de péptido se le añadieron 0,5 µl de tripsina o α-quimotripsina que contenían 0,025 µg de la enzima. La incubación se llevó a cabo durante 2 horas a 37 ºC. En la Tabla I se muestran esquemáticamente las digestiones llevadas a cabo.

Para realizar la inmovilización del anticuerpo monoclonal EM5 sobre partículas magnéticas, se incubó una alícuota de 5 µl (1,1 mg/ml) de EM5 con 50 µl de Dynabeads M450 recubiertas con IgG de cabra anti-ratón a temperatura ambiente durante 2 horas. El complejo se lavó 4 veces con PBS con mezcla bidireccional (en un rotor).

Para efectuar la inmunoprecipitación, se incubó una alícuota de 10 µl del péptido β-amiloide digerido con tripsina (o α-quimotripsina) con 50 µl de EM5 inmovilizado sobre partículas magnéticas en un rotor durante 1 hora a 37 ºC. El complejo magnético-inmunoprecipitado se lavó 4 veces con PBS en el mismo rotor y se aspiraron y descartaron los sobrenadantes.

Para llevar a cabo el análisis de espectrometría de masas del péptido β-amiloide inmunoprecipitado digerido los péptidos inmunoprecipitados contenidos en los complejos magnéticos se liberaron con 20 µl de acetonitrilo al 50 %/ ácido trifluoroacético al 0,3 %. Se mezclaron 5 µl de esta solución con 5 µl de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico saturado en ácido trifluoroacético al 0,1 % / acetonitrilo (2:1). Un volumen de 0,5 µl de esta solución se depositó después en una sonda de acero inoxidable en forma de punta y se dejó que se secara a temperatura ambiente. Las muestras se midieron en un espectrómetro de masas para MALDI-TOF Reflex II de Bruker equipado con una fuente de iones con óptica de visualización y un láser de N_2 (337 nm). Los espectros de masas se recogieron en el modo positivo lineal a un voltaje de aceleración de 28,5 kV y 1,5 kV en el detector lineal, acumulando 200 espectros de disparos únicos de láser por debajo del umbral de irradiancia. Sólo se consideraron las señales de masas bien resueltas, de elevada intensidad, surgidas de 3-5 puntos de incidencia seleccionados. Todos los espectros MALDI se calibraron externamente utilizando una mezcla de péptidos normalizada [angiotensina II (1047,2), fragmento 18-39 de la hormona adrenocorticotrópica (2466,7) e insulina (5734,6); Sigma].

Las características de los péptidos analizados, así como los datos obtenidos, se resumen en la Tabla I siguiente:

Tabla I.- Datos de espectrometría de masas MALDI-TOF obtenidos para fragmentos obtenidos por digestión del péptido β-amiloide

Fragmento Nº	Aminoácidos comprendidos	Enzima utilizada	Masa Experimental (m/z)	Valor Esperado (m/z)
1	1-16	Tripsina	1956,57	1955,0
2	1-17	α-Quimotripsina	2067,37	2068,2
3	5-17	α-Quimotripsina	1606,62	1605,7
4	6-16	Tripsina	1337,12	1336,4
5	11-17	α-Quimotripsina	888,66	890,0

Las secuencias de cada uno de estos péptidos (1-5) y del péptido sin digerir (6) se muestran en la Figura 4, en la que se ha sombreado la zona que parece corresponder al epítopo reconocido por el anticuerpo EM5 según los resultados de espectroscopia de masas MALDI-TOF del material inmunoprecipitado.

Como puede apreciarse en dicha Figura 4, el análisis por espectroscopía de masas MALDI-TOF del material inmunoprecipitado demuestra que EM5 fue capaz de extraer de la mezcla de digestión cada fragmento de péptido que contenía los residuos 11-16 (regiones sombreadas). No se recuperaron de la solución fragmentos de péptido fuera de esta región. Estos resultados confirman los datos obtenidos mediante ELISA y análisis por inmunotransferencia.

En conclusión, la reactividad diferencial del anticuerpo frente a una serie de péptidos Aβ indica que EM5 reconoce los residuos 11-16 de los péptidos Aβ. De entre ellos, la participación de los residuos 12-16 es fundamental, como lo demuestra el hecho de que la mutación del residuo 12 en el péptido $A\beta_{1-28}$ de roedor (1-28 R) impida su reconocimiento por parte del anticuerpo; por su parte, la implicación del residuo 11 (E) en la conformación del epítopo no puede descartarse aunque los datos obtenidos no la confirman por completo.

Ejemplo 5.- Inmunohistoquímica: reactividad tisular de los anticuerpos

Para demostrar la validez del anticuerpo EM5 para poner de manifiesto depósitos característicos de la enfermedad de Alzheimer (placas neuríticas y depósitos vasculares) frente a las placas difusas, se realizaron inmunotinciones de secciones de tejido cerebral afectado por la enfermedad de Alzheimer utilizando los anticuerpos EM2 (un anticuerpo policlonal dirigido al extremo carboxilo del péptido Aβ 40), EM3 (un anticuerpo policlonal dirigido al extremo carboxilo del péptido Aβ 42) y EM5 (un anticuerpo monoclonal con especificidad demostrada por los residuos 12-16 del péptido Aβ). Tanto EM2 como EM3 se han utilizado ya en un estudio anterior [24].

Procesamiento de tejido cerebral y áreas seleccionadas para inmunohistoquímica.

El tejido cerebral fue proporcionado por el Banco de Tejidos para Investigaciones Neurológicas, Madrid. Se incluyeron en el estudio seis sujetos, 3 varones y 3 hembras, con EA definida. Las edades oscilaban entre 68 y 75 años. En todos los casos se hizo un diagnóstico de EA según las directrices clínico-patológicas del CERAD (*Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*: Consorcio para el Establecimiento de un Registro de la Enfermedad de Alzheimer) [10]. Ninguno de los pacientes presentó otros hallazgos neuropatológicos relevantes, por ejemplo enfermedad de Parkinson o cambios vasculares significativos. Todos los cerebros se procesaron para su estudio histológico siguiendo los protocolos de corte, fijación e inclusión del Brain Bank. Los períodos post-mortem oscilaron entre 10 y 18 horas. Inmediatamente después de la autopsia se fijó una mitad del cerebro (obtenida por medio de una sección medio-sagital de los hemisferios cerebrales, cerebelo y tronco encefálico) en formaldehído tamponado con fosfato al 4%. Después de 3-4 semanas de fijación, se obtuvieron bloques de tejido de todas las áreas corticales y subcorticales implicadas de modo significativo en la EA, y se incluyeron en parafina después de una deshidratación progresiva en etanol y aclarado del tejido con xilol. En todos los casos se obtuvieron de los bloques de parafina originales para su estudio inmunohistoquímico secciones de tejido de 5 µm que correspondían al córtex parieto-occipital lateral, córtex temporal lateral (estas dos últimas áreas según lo recomendado por las directrices del CERAD [10]), hipocampo, caudado - putamen (a nivel de la cabeza del núcleo caudado), y córtex del hemisferio cerebeloso. Como control de tinción amiloide inespecífica, se llevó a cabo una tinción con metenamina - plata modificada en secciones consecutivas a las procesadas para la inmunohistoquímica amiloide.

Anticuerpos y protocolos de inmunotinción

Los anticuerpos primarios empleados fueron EM2, EM3, y EM5. Tanto EM2 como EM3 se han utilizado en un estudio anterior [24]. Las secciones se incubaron con anticuerpos primarios a temperatura ambiente durante 30

minutos. Los anticuerpos policlonales se revelaron con el sistema Envision (Laboratorios Dako) con fosfatasa alcalina (FA) utilizando azul de nitro-tetrazolio (NBT) como cromógeno, y el EM5 se reveló o con el sistema anterior o con el sistema Envision (Dako Laboratories) con peroxidasa de rábano (HRP) utilizando diaminobencidina (DAB) como cromógeno. En el caso de las técnicas de colocalización los anticuerpos policlonales se revelaron siempre con el sistema Envision con FA (utilizando NBT como cromógeno), mientras que el EM5 se reveló con el sistema Envision con HRP (utilizando DAB como cromógeno).

Inmunotinción doble y simple.

Se utilizaron técnicas de inmunotinción doble utilizando EM5 como primer anticuerpo primario y EM2 o EM3 como segundo anticuerpo primario, como trabajo preliminar con el fin de establecer el grado de colocalización de cada par de anticuerpos, junto con la dilución óptima de trabajo de cada uno de ellos. Durante esta fase del estudio, que se restringió a secciones de tejido del córtex parieto-occipital de dos de los casos, se estableció que el uso de EM5 como primer anticuerpo primario descartaba un efecto enmascarador de los otros dos anticuerpos, cuando se empleaban como primer anticuerpo durante la técnica de inmunotinción doble. En secciones seriadas de ambos bloques de parafina seleccionados se colocalizaron diluciones crecientes (1:50, 1:100, 1:500, 1: 1000 y 1:2000) de EM5 con diluciones decrecientes (1:2000, 1:1000, 1:500, 1:100 y 1:50) de EM2 o de EM3. Como se encontró así que el anticuerpo EM2 se colocalizaba en alto grado con EM5, el resto del estudio se dirigió a mostrar el patrón diferencial de reactividad mostrado por EM5 y EM3. Con este propósito, la posterior inmunotinción doble en secciones de todas las áreas seleccionadas en todos los casos se limitó al uso de EM5 (a una dilución 1:1000) como primer anticuerpo primario y EM3 (a una dilución 1:1000) como segundo anticuerpo primario. De forma adicional, con el fin de visualizar con más precisión el patrón de reactividad mostrado por cada anticuerpo en el mismo tejido, se llevó a cabo una inmunotinción simple en secciones seriadas de cada bloque utilizando EM5, EM2 o EM3 como anticuerpo primario. Como el objetivo principal de esta parte del estudio es comparar cualitativamente diferentes patrones de inmunorreactividad, más que diferencias cuantitativas entre anticuerpos, los resultados de las tinciones no se cuantificaron.

Resultados

Los resultados de uno de los casos pueden apreciarse en la Figura 5, presentados con la distribución que se mencionó anteriormente, es decir:

- **(A)** y **(B):** Secciones seriadas consecutivas de la misma zona del córtex occipital inmunoteñidas con EM5 **(A)** y EM 3 **(B)** como anticuerpo primario, utilizando NBT como cromógeno. Se han marcado los vasos (V) para facilitar la localización de las placas. Mientras que EM3 **(B)** pone de manifiesto tanto placas difusas (DP) como neuríticas (NP), así como depósitos en los vasos sanguíneos (V), EM5 **(A)** tiñe con más intensidad tanto vasos sanguíneos como algunas placas neuríticas, aunque no placas difusas.

- **(C)** Micrografía con alto grado de magnificación de una técnica de inmunotinción doble utilizando EM3 (utilizando NBT -color azul- como cromógeno) y EM5 (utilizando DAB -color marrón- como cromógeno) como anticuerpos primarios. Se observa una doble inmunotinción de las placas neuríticas y la pared de los vasos.

- **(D)** y **(E):** Secciones seriadas consecutivas de la misma área del córtex occipital inmunoteñidas o con EM5 **(D)** o con EM2 **(E)**. De nuevo, se han marcado los vasos (V) para ayudar en la identificación de las placas. Se observa que tanto los vasos como las placas neuríticas reaccionan con ambos anticuerpos. Se tiñen menos placas neuríticas con EM2 que con EM5, y ninguna placa difusa reacciona con ninguno de ellos.

- **(F)** Microfotografía con alto grado de magnificación de una técnica de inmunotinción doble empleando EM2 (utilizando NBT -color azul- como cromógeno) y EM5 (utilizando DAB –color marrón- como cromógeno) como anticuerpos primarios en la misma sección de tejido del córtex occipital. Se observa una precisa colocalización de la reactividad de ambos anticuerpos en la pared del vaso y las placas neuríticas.

Todos los casos salvo uno mostraron depósitos amiloides vasculares prominentes leptomeníngeos e intracorticales que reaccionaban con todos los anticuerpos ensayados. En todos los casos positivos la inmunorreactividad de los depósitos amiloides vasculares fue más marcada (más extensa e intensa) tanto con EM2 (Fig. (5E)) como con EM5 (Fig. (5A) y (5D)) que con EM3 (Fig. (5B)). EM2 y EM5 se colocalizan exquisitamente a este nivel (Fig. (5F)). Como se esperaba, las áreas neocorticales y el hipocampo mostraron una alta densidad de placas difusas y neuríticas, mientras que el córtex del cerebelo y el cuerpo estriado mostraron sólo depósitos amiloides difusos. Las secciones incubadas con el anticuerpo EM3 mostraron reactividad con placas tanto difusas como neuríticas (Fig. (5B)). Cuando se compararon con secciones sucesivas teñidas con el método de metenamina - plata modificado, se demostró que EM3 teñía todas las placas presentes en cada sección. Adicionalmente, el anticuerpo EM3 teñía algunos cuerpos neuronales. Tanto EM2 como EM5 tiñeron placas neuríticas inmaduras (sin núcleo) y maduras (con núcleo), de nuevo con un alto grado de colocalización (Fig. (5F)). EM2 no reaccionó con ninguna placa difusa ni en la región cortical ni en la subcortical (Fig. (3E)). La inmunotinción doble con EM5 y EM3 revela la colocalización de ambos anticuerpos en algunas placas neuríticas, pero no en placas difusas (Fig. (5C)), aunque se encontró algo de colocalización a este nivel cuando se incubó EM5 a una dilución muy baja (1:50). Sólo en un caso que mostraba abundantes placas difusas positivas para EM3 en secciones del cuerpo estriado sí que tiñó EM5

algunas de ellas muy ligeramente a la dilución de trabajo (1:500). Este mismo caso no mostró ninguna reactividad de las placas difusas como EM5 en el córtex del cerebelo. En todos los demás casos las secciones del cuerpo estriado y del cerebelo mostraron una cantidad variable de placas difusas, ninguna de ellas reactiva frente al anticuerpo EM5. Ni EM2 ni EM5 parecieron teñir todas las placas neuríticas presentes (véanse las Fig. (5A, D)). Sin embargo, como se había observado en el caso de la inmunorreactividad de los depósitos amiloides vasculares, las placas neuríticas reactivas frente a EM2 o EM5 se tiñeron más intensamente que con EM3. Salvo por la negatividad de los vasos frente a todos los anticuerpos en un único caso y la ligera positividad de algunas placas difusas del cuerpo estriado en ese mismo cerebro, se puede considerar que todos los casos muestran patrones de tinción similares para cada anticuerpo ensayado.

Por tanto, en contraste con el patrón de tinción más bien uniforme observado en las placas difusas, el panel de anticuerpos detectó heterogeneidad dentro de las placas neuríticas, lo que resulta relevante para indicar etapas concretas en el proceso de evolución de las placas difusas para convertirse en placas neuríticas. El anticuerpo EM5 tiñó intensamente todas las estructuras (placas neuríticas y paredes de los vasos) teñidas por EM2 y teñidas de forma variable por EM3. Un subconjunto de placas neuríticas demostró tener un patrón de tinción idéntico al amiloide vascular, con una elevada colocalización de reactividad frente a EM2 y EM5. La invención muestra que EM5 debería reaccionar con todas las estructuras que contienen o $A\beta_{<11-40}$ o $A\beta_{<11-42}$. De hecho, los resultados de los ELISA aquí presentados muestran que el anticuerpo EM5 reconoce formas tanto de reciente disolución como agregadas del péptido Aβ. Sin embargo, en secciones de tejidos encontramos una variabilidad mayor en la tinción entre las placas neuríticas con EM5 que con los anticuerpos policlonales, junto con una elevada colocalización de intensa reactividad frente a EM5 con EM2 (Aβ C40). Una tinción relativamente más intensa en estas placas positivas puede revela un subgrupo de placas neuríticas o bien con un contenido particularmente elevado de péptidos Aβ largos, o selectivamente alto de Aβ C40, o incluso una accesibilidad particular del epítopo reconocido por EM5 en estructuras (vasos o placas) que muestran codeposición de $A\beta_{<11-40}$ y $A\beta_{<11-42}$. El anticuerpo de la invención parece detectar el mismo subconjunto de placas neuríticas Aβ C40 (+) detectado anteriormente por Parvathy *et al.* [22]. Este subconjunto de placas neuríticas con contenidos particularmente altos de péptidos Aβ largos pueden ser hitos relevantes en la progresión de las lesiones amiloides en la EA que el anticuerpo monoclonal de la invención permite poner de manifiesto. Por ello, el uso de EM5 puede permitir definir subconjuntos de placas que constituyan un marcador específico del estadio de progresión de la enfermedad.

Ejemplo 6.- Capacidad de los anticuerpos para reaccionar con formas del péptido β-amiloide en orina

Para demostrar la validez del anticuerpo EM5 para poner de manifiesto la presencia de formas del péptido β-amiloide en fluidos biológicos, se realizó una prueba de detección de los mismos en muestras de orina de pacientes sanos, a las que se había añadido con posterioridad a su obtención una mezcla de péptidos sintéticos que correspondían a formas de distinta longitud del péptido β-amiloide. Para ello, se añadió a las muestras de orina el anticuerpo monoclonal, unido a partículas magnéticas y se procedió a la detección de los péptidos unidos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Los detalles del procedimiento seguido se indican a continuación.

Unión del anticuerpo a partículas magnéticas

Las partículas magnéticas acopladas al anticuerpo EM5 se prepararon siguiendo el método descrito por Fuentes *et al.* [26], basado en la oxidación suave de los restos glicosídicos de las inmunoglobulinas para generar grupos aldehído, que se hacen reaccionar con partículas magnéticas en cuya superficie se han generado grupos amino mediante modificación con etilendiamina. Brevemente, se indujo la oxidación del anticuerpo EM5 mediante la incubación con peryodato sódico 10 mM durante 2 horas, tras las cuales se dializó el anticuerpo oxidado en agua destilada a 4ºC. La modificación de las partículas magnéticas EM/100-30 (Merck Co, Francia), que poseen grupos carboxílicos en su superficie, se produjo mediante su incubación, a una concentración de 10 mg/ml, con etilendiamina 1 M pH 4,75, durante 90 minutos, tras los cuales se añadió EDCI (1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida hidrocloruro)sólido hasta una concentración final de 10 mM y se dejó que tuviera lugar la reacción durante 90 minutos, antes de lavar profusamente con agua destilada.

La inmovilización del anticuerpo sobre las partículas magnéticas se llevó a cabo tras añadir 10 mg del anticuerpo EM5 oxidado, disuelto en tampón fosfato sódico 150 mM de pH 7,5, a 2 ml de partículas magnéticas (10 mg/ml) con grupos amino en su superficie a 4ºC e incubando toda la noche. Las bases de Schiff formadas y los grupos aldehído sin reaccionar se redujeron mediante la adición de borohidruro sódico hasta alcanzar una concentración de 1 mg/ml, a pH 8,5 y 4ºC. La preparación se lavó profusamente con agua destilada. La cantidad de anticuerpo inmovilizado se determinó cuantificando la diferencia en concentración de proteínas en el sobrenadante antes y después de la inmovilización, utilizando el método de Bradford [27].

Detección de péptido β-amiloide en solución

Antes de comprobar su validez para unirse a isoformas de péptido β-amiloide presentes en muestras de fluidos biológicos como puede ser la orina, se comprobó la capacidad del anticuerpo de la invención para unirse a formas del péptido β-amiloide en solución y si los anticuerpos acoplados a partículas magnéticas permitían la extracción de formas del péptido β-amiloide de soluciones en las que se encontraran para proceder a su posterior identificación y/o

cuantificación. Para ello, péptidos sintéticos que correspondían a las formas del péptido β-amiloide $A\beta_{12-29}$, $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$, disueltos en agua destilada, se mezclaron en agua destilada para dar lugar a una mezcla con unas concentraciones finales de 0,44 µg/µl de $A\beta_{12-29}$ y $A\beta_{1-42}$ y 0,11 µg/µl de $A\beta_{1-40}$. 4 µl de esta mezcla de péptidos se añadieron a 981 µl de agua.

A continuación, se provocó la separación de las formas del péptido β-amiloide presentes en solución en agua mediante el uso del anticuerpo de la invención, utilizándolo acoplado a partículas magnéticas. El análisis por espectrometría de masas de las mezclas de péptidos separadas de la solución se muestra en la Fig. 6, en la que la parte A corresponde al análisis de la solución sin tratamiento previo con anticuerpos (Ctrl.) y la parte B corresponde al uso del anticuerpo unido a partículas magnéticas (EM5+PM). Como se ve, el anticuerpo es capaz de unirse a formas del péptido β-amiloide en solución y de formar complejos con ellas de forma que pueden separarse de dicha solución.

Preparación de la muestra de orina

En distintos días, se recogieron muestras de 10 ml de orina de un individuo sano y se centrifugaron a 3500 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. La orina se neutralizó a pH 7,0 con NaOH 1M en tampón PBS.

Péptidos sintéticos que correspondían a las formas del péptido β-amiloide $A\beta_{12-28}$, $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$, se mezclaron en agua destilada para dar lugar a una mezcla con unas concentraciones finales de 0,44 µg/µl de $A\beta_{12-28}$ y $A\beta_{1-42}$ y 0,11 µg/µl de $A\beta_{1-40}$. 4 µl de esta mezcla de péptidos se añadieron a 981 µl de orina.

La concentración final de formas del péptido β-amiloide en orina era 1,76 µg/ml en el caso de $A\beta_{12-18}$ y de $A\beta_{1-42}$ y 0,44 µg/ml en el caso de $A\beta_{1-40}$.

Inmunoprecipitación

15 µl de partículas magnéticas recubiertas con el anticuerpo monoclonal EM5 (diluido 1:4 en tampón PBS) se incubaron durante 1 hora a 37ºC con 981 µl de la muestra de orina antes descrita, que contenía los tres péptidos β-amiloides ($A\beta_{12-18}$, $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$).

Después de la incubación, se colocó el tubo en un separador imantado de partículas magnéticas y se extrajo cuidadosamente la orina utilizando una pipeta.

Las partículas magnéticas con los péptidos unidos a ellas, retenidas por la acción del campo magnético del separador, se lavaron 3 veces con H_2O.

Los péptidos unidos a ellas se separaron de las partículas magnéticas con 12 µl de una solución de una matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico en 30% (v/v) de acetonitrilo acuoso que contenía un 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) y se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

Detección de los péptidos inmunoprecipitados por espectrometría de masas

1,5 µl de la mezcla de la muestra resultante de la inmunoprecipitación en la matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico se colocó en una sonda de acero inoxidable con capacidad para 100 muestras y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Las muestras se midieron en una estación de trabajo para espectrometría de masas MALDI-TOF Voyager DE-PRO de PE Biosystems utilizando la configuración por defecto del aparato. Los espectros de masa de recogieron en el modo reflector positivo a un voltaje de aceleración de 20 kV y un voltaje del colector del 75%, 0,002% de filamento guía y 150 nanosegundos de tiempo de retraso, acumulando 200 espectros de disparos individuales de láser por debajo de la irradiación umbral. Sólo se consideraron las señales de masas bien resultas, de elevada intensidad, de 3-5 puntos de incidencia seleccionados. El equipo se calibró externamente empleando la mezcla de calibración 2, proporcionada por Applied Biosystems (Tres Cantos, Madrid, España), compuesta por angiotensina (1297 Da), ACTH 1-17 (2094 Da), ACTH 18-39 (2466 Da), ACTH 7-38 (3660 Da) e insulina bovina (2867 Da).

La Fig. 7 muestra la gráfica obtenida con una de las muestras, representativa de las demás. Se observan picos correspondientes a los péptidos añadidos a la muestra de orina, lo que demuestra la capacidad del anticuerpo de la invención para unirse a ellos en muestras de orina. Al haberse realizado el análisis con una muestra de un fluido biológico, se observan también otros picos, correspondientes a otras moléculas presentes de forma natural en la muestra y que se han unido también al anticuerpo acoplado a partículas magnéticas.

Depósito del hibridoma

El hibridoma que produce el anticuerpo EM5 se depositó en la European Collection of Cell Cultures (Colección Europea de Cultivos Celulares, ECACC), CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido. La fecha de depósito y el número de acceso se muestran a continuación:

Denominación del hibridoma	Fecha de depósito	Nº de acceso
EM5 clone A	01.03.2006	06030101

Tal como se comentó anteriormente, estas células de hibridoma de obtuvieron mediante la fusión de dos tipos de células: a) linfocitos de bazo de ratones BALB/c, obtenidos tras la inmunización de los ratones utilizando como inmunógeno la forma del péptido β-amiloide denominada $A\beta_{1-40}$, que comprende los aminoácidos 1 a 40 de dicho péptido, acoplada a KLH, la hemocianina de lapa californiana; b) células de la línea de mieloma de ratón P3/X63-Ag653, que actuaban como parte inmortal de la fusión. Se obtuvieron varios clones, de los cuales se seleccionó el clon denominado "EM5 clone A", que produce el anticuerpo monoclonal denominado "EM5", un anticuerpo tipo IgG1 capaz de reconocer específicamente el antígeno utilizado para la inmunización, el péptido $A\beta_{1-40}$, según se comprobó mediante ensayos tipo ELISA de captura de anticuerpos. Este clon se creció en medio de cultivo RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino, 10% de DMSO, glutamina 2 mM y piruvato sódico 1 mM, a 37ºC y en una atmósfera con 5% de CO_2, condiciones en las que el 95% de las células crecían en suspensión y el 5% restante adherido al recipiente de cultivo. Las células se clonaron dos veces mediante diluciones limitantes, tras lo cual se tomaron alícuotas de 4×10^6 células, que se introdujeron en viales. Una vez realizados controles de ausencia de bacterias, ausencia de micoplasmas y ausencia de hongos, se enviaron varios de estos viales a la European Collection of Cell Cultures (ECACC), solicitando la admisión de su depósito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, Yen S. y Aronson MK. Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. Neurobiol Aging 13: 1-11 (1992).

2. Iwatsubo T, Mann DAM, Odaka A, Suzuki N e Ihara Y. Amyloid β protein (Aβ) deposition: Aβ42(43) precedes Aβ40 in Down's syndrome. Ann Neurol 37: 294-299 (1995).

3. Fukumoto H, Asami-Okada A, Suzuki N, Shimada H, Ihara Y e Iwatsubo T. Amyloid β protein deposition in normal aging has the same characteristics as that in Alzheimer's disease. Am J Pathol 148: 259-265 (1996).

4. Giaccone G, Tagliavini F, Linoli G, Bouras C, Frigerior L, Frangione B y Bugiani O. Down syndrome patients: extracellular preamyloid deposits precede neuritic degeneration and senile plaques. Neurosci Lett 97: 232-238 (1989).

5. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. Ann Neurol 30: 572-580 (1991).

6. Masliah E, Terry RD, Mallory M, Alford M y Hansen LA. Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer Disease. Am J Path 137: 1293-97 (1990).

7. Dickson DW. The pathogenesis of senile plaques. J Neuropathol Exp Neurol 56: 321-339 (1997).

8. Braak H y Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathologica (Berl) 82: 239-259 (1991).

9. Thal DR, Rüb U, Schultz Ch, Sassin I, Ghebremedhin S, Del Tredici K, Braak E y Braak H. Sequence of Aβ-protein deposition in the human medial temporal lobe. J Neuropathol Exp Neurol 59 (8): 733-748 (2000).

10. Mirra, SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughes JP, van Belle G y Berg L. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. Neurology 41: 479-486 (1991).

11. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genotypes, phenotype and treatments. Science 275(5300):630-1 (1997).

12. Hardy J, y Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science 297: 353-356 (2002).

13. Vigo-Pelfrey C, Lee D, Keim P, Lieberberg I y Schenk DB. Characterization of β-amyloid peptide from human cerebrospinal fluid. J. Neurochem 61: 1965-1968 (1993).

14. Iwatsubo T, Mann DAM, Odaka A, Suzuki N e Ihara Y. Amyloid β protein (Aβ) deposition: Aβ42(43) precedes Aβ40 in Down's syndrome. Ann. Neurol 37: 294-299 (1995).

15. Iwatsubo T, Saido TC, Mann DMA, Lee V M-Y y Trojanowski JQ. Full-lenght amyloid-β (1-42(43)) and amino-terminally modified and truncated amyloid-β42(43) deposit in diffuse plaques. Am J Pathol 149: 1823-1830 (1996).

16. Higgins L, Murphy Jr GM, Forno LS, Catalano R y Cordell B. p3 β-amyloid peptide has a unique and potentially pathogenic immunohistochemical profile in Alzheimer's disease brain. Am J Path 149: 585-596 (1996).

17. Gowing E, Roher AE, Woods AS, Cotter RJ, Chaney M, Little SP y Ball MJ. Chemical characterization of Aβ 17-42 peptide, a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer disease. J Biol Chem 269: 10987-10990 (1994).

18. Kida E, Wisniewski KE y Wisniewski HM. Early amyloid-β deposits show different immunoreactivity to the amino- and carboxy-terminal regions of β-peptide in Alzheimer's disease and Down's syndrome brain. Neurosci Lett 193: 105-108 (1995).

19. Lalowski M, Golabek A, Lemere A, Selkoe DJ, Wisniewski HM, Beavis RC, Frangione B y Wisniewski T. The "nonamyloidogenic" p3 fragment (amyloid β17-42) is a major constituent of Down's syndrome cerebellar preamyloid. J Biol Chem 271: 33623-33631 (1994).

20. Saido TC, Iwatsubo T, Mann DMA, Shimada H, Ihara Y y Kawashima S. Dominant and differential deposition of distinct β-amyloid peptide species, AβN3(pE) in senile plaques. Neuron, 14: 457-466 (1995).

21. Tekirian TL, Saido TC, Markesberry WR, Russell MJ, Wekstein DR, Patel E y Geddes JW. N-terminal heterogeneity of parenchimal and cerebrovascular Aβ deposits. J Neuropathol Exp Neurol 57: 76-94 (1998).

22. Parvathy S, Davis P, Haroutunian V, Purohit DP, Davis KL, Mohs RC, Park H, Moran TM, Chan JY y Buxbaum JD. Correlation between Aβx-40-, Aβx-42-, and Aβx-43-containing amyloid plaques and cognitive decline. Arch Neurol 58: 2025-2032 (2001).

23. Larner AJ. Hypothesis: amyloid β-peptides truncated at the N-terminus contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 20: 65-69 (1999).

24. Jimenez-Huete A, Alfonso P, Soto C, Alvar JP, Rábano A, Ghiso J, Frangione B y Mendez E. Antibodies directed to the carboxyl terminus of amyloid β-peptide recognize sequence epitopes and distinct immunoreactive deposits in Alzheimer's disease brain. Alzheimer's Reports 1: 41-48 (1998).

25 Campbell A. Monoclonal antibody technology En: '*Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology'* (Eds: Burdon RH, Knippenberg PH) Elsevier, Amsterdam, p. 120-134 (1984).

26. Fuentes M, Mateo C, Guisán JM, Fernández-Lafuente R. Preparation of inert magnetic nano-particles for the directed immobilization of antibodies. Biosensors and Bioelectronics 20: 1380-1387. (2005)

27. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 278-254. (1976)

28. Mayeux R, Ong LS, Tang M-X, Manly J, Stern Y, Schupf N, Mehta PD. Plasma Aβ40 y Aβ42 and Alzheimer disease. Relation to age, mortaliy and risk. Neurology 61: 1185-1190. (2003).

29. Vandersthichele H, van Kerschaver E, Hesse C, Davidsson P, Buyse M, Andreasen N, Minthon L, Tallin A, Blennow K, Vanmechelen E. Stardardization of measurement of beta-amyloid (1-42) in cerebrospinal fluid an plasma. Amyloid 7: 245-258. (2000).

30. Ghiso J, Calero M, Matsubara E, Governale S, Chuba J, Beavis R, Wisniewski T, Frangione B. Alzheimer's soluble amyloid beta is a normal component of human urine. FEBS Lett 408: 105-108 (1997).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

<120> MÉTODO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER MEDIANTE UN ANTICUERPO MONOCLONAL

<130> PCT-258

<160> 4

<210> 1

<211> 10

<212> péptido

<213> artificial

<310> US4666829

<311> 15.05.85

<312> 19.05.87

<400>

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr

<210> 2

<211> 17

< 212> péptido

<213> artificial

<220>

<222> 1-17

<223> Péptido β-amiloide

<223> 6E10, SV17-6E10

<310> WO 90/12871

<311> 13.04.90

<312> 01.11.90

<400>

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Gln Val His His Gln Lys Leu

<210> 3

<211> 5

<212> péptido

<213> humano

<220>

<222> 12-16

<223> Secuencia reconocida por EM5 en el péptido β-amiloide

<400>

Val His His Gln Lys

<210> 4

<211> 8

<212> péptido

<213> artificial

<220>

<223> Cola de acoplamiento para el diseño del extremo amino terminal de $A\beta_{37-42}$ y $A\beta_{37-49}$

<400>

Cys Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly

REIVINDICACIONES

1.- Un anticuerpo monoclonal que reconoce en el péptido β-amiloide al menos el epítopo correspondiente a la secuencia: Val-His-His-Gln-Lys (SEQ ID NO:3), cuya afinidad de unión a $A\beta_{1-42}$ es mayor que la afinidad de unión a $A\beta_{1-40}$, ambas medidas por ELISA y es capaz de unirse selectivamente a placas neuríticas y a depósitos amiloides vasculares de isoformas del péptido β-amiloide humano que contengan dicha secuencia en tejido cerebral y a formas solubles del péptido β-amiloide humano en muestras de fluidos biológicos o soluciones derivadas de los mismos.

2.- Un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, capaz de unirse selectivamente a formas solubles del péptido β-amiloide humano en muestras de fluidos biológicos o soluciones derivadas de los mismos seleccionadas del grupo: sangre, plasma u orina.

3.-El anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 1 ó 2 producido por la línea celular de hibridoma ECACC 06030101.

4.- Una línea celular de hibridoma capaz de producir el anticuerpo monoclonal de las reivindicaciones 1 ó 2.

5.- Línea celular de hibridoma según la reivindicación 4, obtenida mediante la fusión con la línea de mieloma de ratón P3/X63-Ag.653 de células de bazo de ratones BALB/c inmunizados con al menos un péptido que contenga la secuencia Val-His-His-Gln-Lys (SEQ ID NO:3).

6.- Línea celular de hibridoma según la reivindicación 4, obtenida mediante la fusión con la línea de mieloma de ratón P3/X63-Ag.653 de células de bazo de ratones BALB/c inmunizados con el péptido $A\beta_{1-40}$.

7.- Línea celular de hibridoma según la reivindicación 6, obtenida mediante la fusión con la línea de mieloma de ratón P3/X63-Ag.653 de células de bazo de ratones BALB/c inmunizados con el péptido $A\beta_{1-40}$ acoplado a KLH.

8.- Línea celular de hibridoma según la reivindicación 7 que comprende en una muestra sustancialmente pura de ECACC 06030101.

9.- Uso del anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer a partir de una muestra de tejido cerebral tomada de un individuo aquejado de dicha enfermedad.

10.- El uso según la reivindicación 9 donde el estado de progresión de la enfermedad se correlaciona con la presencia en la muestra de un subconjunto de placas neuríticas que se ponen de manifiesto mediante su unión al anticuerpo monoclonal.

11.- Una composición que comprende el anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 acoplado a una sustancia que permite la detección de dicho anticuerpo.

12.- Composición según la reivindicación 11, en la que la sustancia a la que se acopla el anticuerpo monoclonal es un segundo anticuerpo capaz de unirse a dicho primer anticuerpo, estando unido este segundo anticuerpo a una enzima capaz de catalizar la transformación de una determinada sustancia en otra que pueda ser detectada.

13.- Composición según la reivindicación 12, en la que la sustancia cuya transformación cataliza la enzima es un cromógeno.

14.- Composición según las reivindicaciones 12 y 13, en la que el segundo anticuerpo está unido a fosfatasa alcalina y el cromógeno utilizado es azul de nitro-tetrazolio.

15.- Composición según las reivindicaciones 12 y 13, en la que el segundo anticuerpo está unido a peroxidasa de rábano y el cromógeno utilizado es diaminobencidina.

16.- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, que comprende al menos otro anticuerpo específico para al menos una zona de secuencia diferente del péptido β-amiloide.

17.- Composición según la reivindicación 16, que comprende el anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 acoplado a una sustancia que puede ser detectada y otro u otros anticuerpos específicos para una o más zonas de secuencia diferentes del péptido β-amiloide, acoplados a sustancias diferentes que también pueden ser detectadas.

18.- Composición según la reivindicación 17, en la que el anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 está acoplado a un segundo anticuerpo unido a peroxidasa de rábano, utilizándose como sustancia a transformar que puede ser detectada el cromógeno diaminobencidina (DAB).

19.- Composición según la reivindicación 17, en la que el anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 está acoplado a un segundo anticuerpo unido a peroxidasa de rábano utilizándose como sustancia a transformar que puede ser detectada el cromógeno azul de nitro-tetrazolio.

20.- Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19 en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer a partir de una muestra de tejido cerebral tomada de un individuo aquejado de ella.

21.- Un método de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer a partir de una muestra de tejido cerebral tomada de un individuo aquejado de ella, que comprende la detección en la misma de la presencia de placas neuríticas y depósitos amiloides vasculares mediante el anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 3.

22.- Método según la reivindicación 21, donde el anticuerpo monoclonal está comprendido en una composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19.

23.- Método según la reivindicación 21, donde la presencia de placas neuríticas detectadas mediante el anticuerpo monoclonal de las reivindicaciones 1 a 3 se correlaciona con el estado de progresión de la enfermedad.

24.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, donde la presencia de la isoforma $A\beta_{1-40}$ del péptido β-amiloide en las placas neuríticas detectadas mediante el anticuerpo monoclonal se conforma a través de la unión de un anticuerpo específico de la región carboxiterminal de la isoforma $A\beta_{1-40}$ del péptido β-amiloide.

25.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, donde la presencia de placas neuríticas adicionales y/o placas difusas es detectado mediante la unión de un anticuerpo específico de la región carboxiterminal de la isoforma $A\beta_{1-42}$ del péptido β-amiloide.

26.- Una composición que comprende un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo está acoplado a una sustancia o partícula que facilita la extracción de complejos antígeno-fragmento de anticuerpo de la solución en la que se encuentran.

27.- Una composición según la reivindicación 26, en la que la sustancia o partícula que facilita la extracción de complejos antígeno-fragmento de anticuerpo de la solución en la que se encuentran es una partícula magnética.

28.- Una composición según la reivindicación 27, en la que la unión entre el anticuerpo y la partícula magnética es una unión covalente.

29.- Uso del anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 1 ó 2 en el diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer a partir de una muestra de un fluido biológico o de una solución derivada del mismo.

30.- Uso según la reivindicación 29, en el que el anticuerpo monoclonal está comprendido en una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28.

31.- Uso según la reivindicación 30, en el que la composición según las reivindicaciones 26 a 28 se añade a la muestra de fluido biológico o a la solución derivada del mismo para que se formen complejos antígeno-anticuerpo con las formas del péptido β-amiloide presentes en la muestra de fluido biológico o la solución derivada del mismo.

32.- Uso según la reivindicación 31, en el que se provoca la extracción de complejos antígeno-fragmento de anticuerpo formados del fluido biológico o la solución en la que se encuentran mediante el uso de un campo magnético.

33.- Uso según la reivindicación 32, en el que las formas del péptido β-amiloide extraídas de un fluido biológico o una solución derivada del mismo en forma de complejos antígeno-anticuerpo se separan del anticuerpo posteriormente a su extracción del fluido biológico o la solución en la que se encontraban y antes de proceder a su identificación y/o cuantificación.

34.- Uso según la reivindicación 33, en el que las formas del péptido β-amiloide se identifican y/o cuantifican mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

35.- Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 34, en el que la muestra de fluido biológico es una muestra de orina.

36.- Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 35, en el que el estado de progresión de la enfermedad de Alzheimer se correlaciona con la concentración de la isoforma $A\beta_{1-42}$ en la muestra.

37.- Un método de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer a partir de una muestra de un fluido biológico o de una solución derivada del mismo que comprende las etapas de:

a) añadir a la muestra de fluido biológico o la solución derivada del mismo una composición según las reivindicaciones 26 a 28;

b) dejar transcurrir tiempo suficiente para que se formen complejos antígeno-fragmento de anticuerpo entre al menos una isoforma del péptido β-amiloide y el anticuerpo comprendido en la composición;

c) aplicar un campo magnético para extraer los complejos antígeno-fragmento de anticuerpo de la solución;

d) retirar la solución;

e) separar el anticuerpo de las moléculas de péptido β-amiloide;

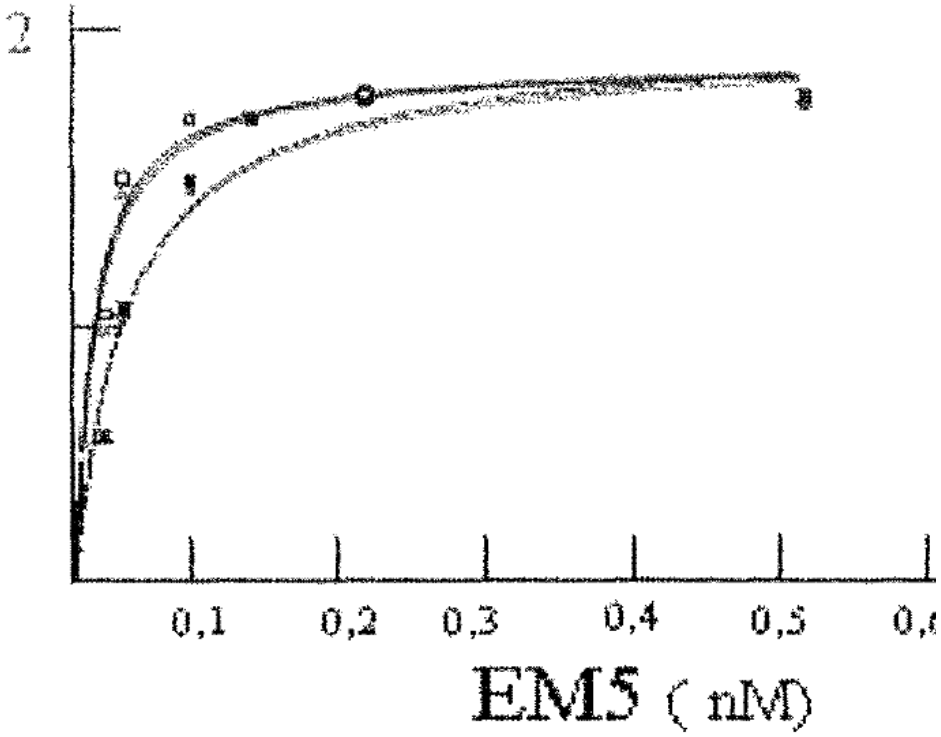
f) identificar y cuantificar las isoformas de péptido β-amiloide extraídas de las muestra de fluido biológico o solución derivada del mismo.

38.- Método de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer según la reivindicación 37, en el que la muestra de fluido biológico es una muestra de orina.

39.- Método de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer según la reivindicación 37, en el que la composición que se añade en la etapa a) comprende un anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 1 ó 2, unido covalentemente a las correspondientes partículas magnéticas mediante la modificación de uno o más restos presentes en la zona Fc de dicho anticuerpo.

40.- Método de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer según la reivindicación 39, en el que la identificación y cuantificación de las isoformas del péptido β-amiloide extraídas de la muestra de orina se realiza mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

41.- Método de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer según la reivindicación 40, en el que la etapa e) de separación del anticuerpo o fragmento del anticuerpo de las moléculas de péptido β-amiloide se realiza en ácido α-ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo acuoso que contiene ácido trifluoroacético.



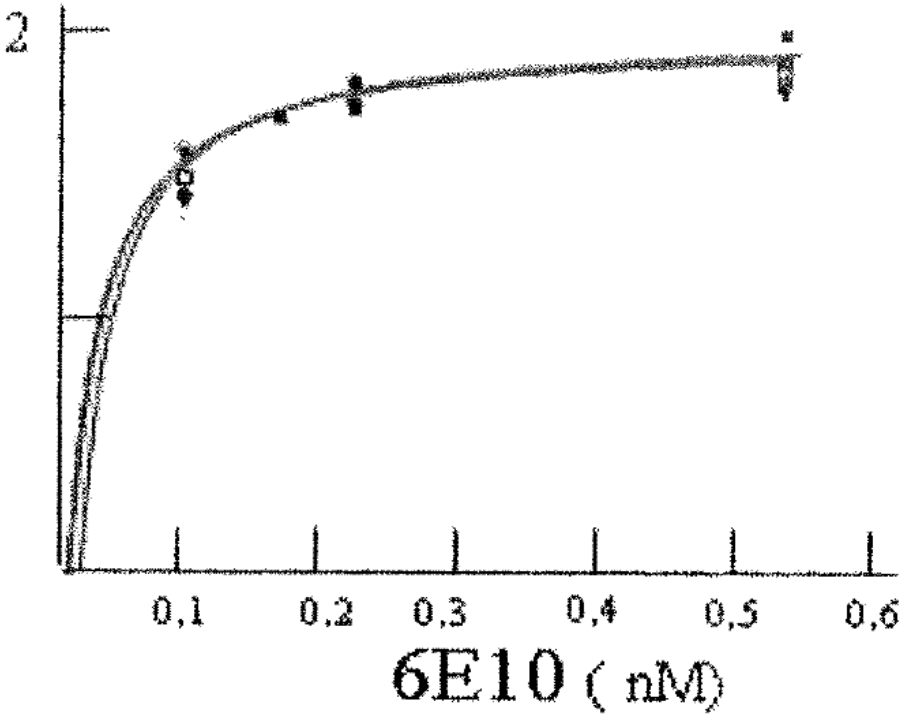


Figura 1

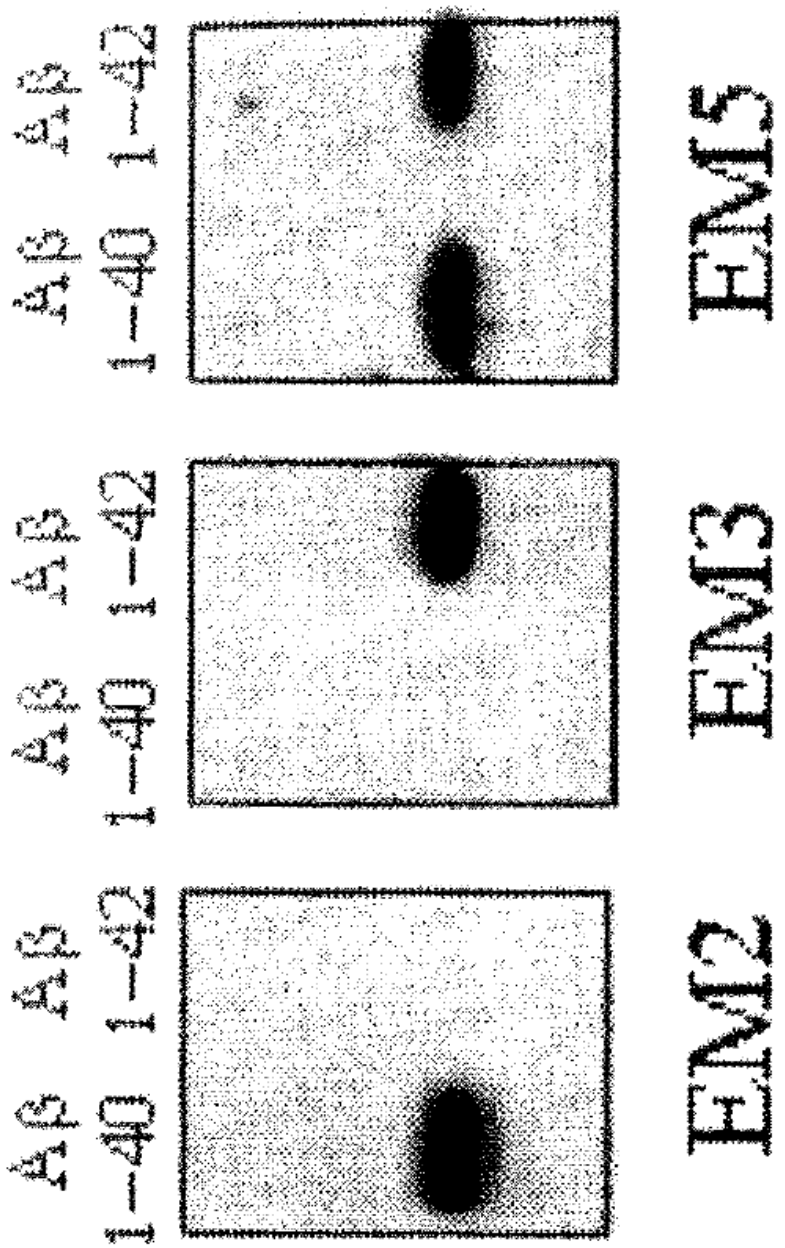
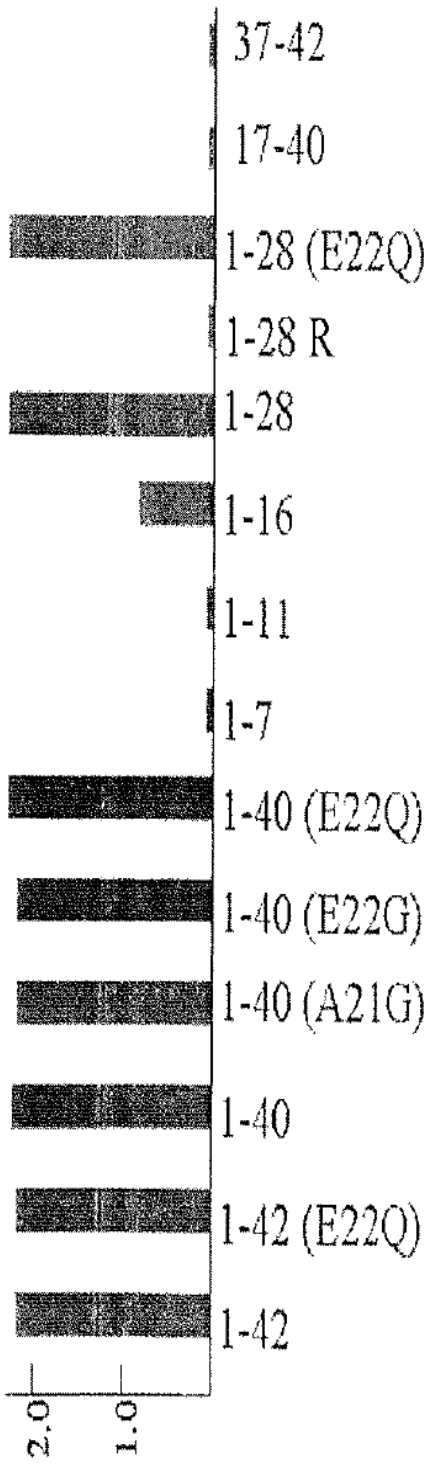


Figura 2


37-42
17-40
1-28 (E22Q)
1-28 R
1-28
1-16
1-11
1-7
1-40 (E22Q)
1-40 (E22G)
1-40 (A21G)
1-40
1-42 (E22Q)
1-42
2.0
1.0

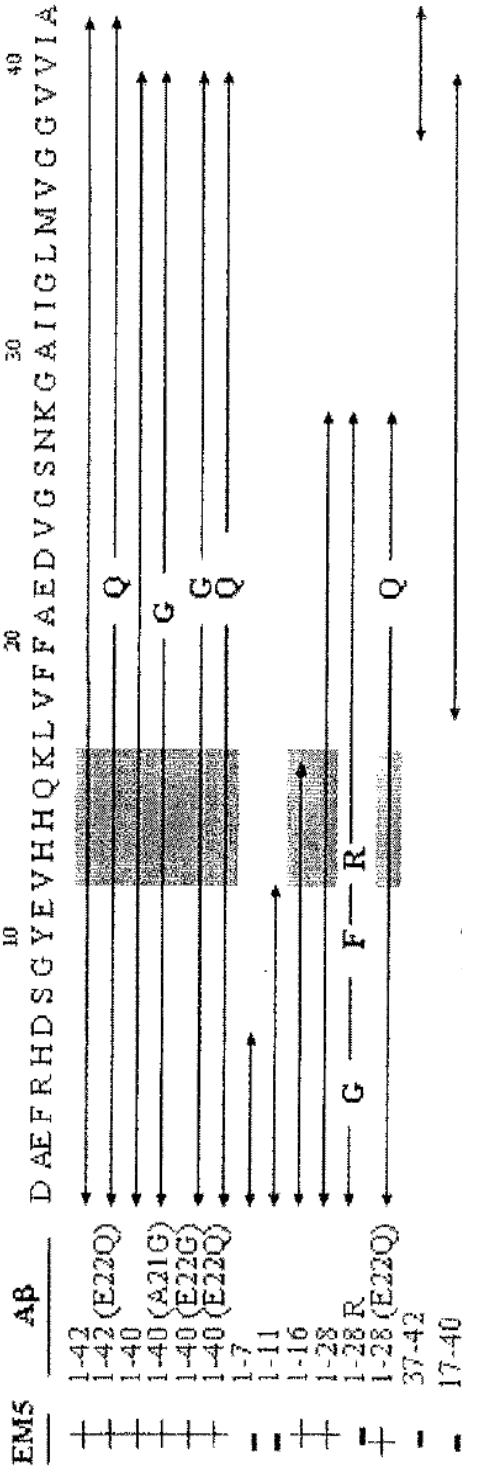

EMS
Aβ
D A E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A E D V G S N K G A I I G L M V G G V V I A
10
20
30
40
1-42
1-42 (E22Q)
1-40
1-40 (A21G)
1-40 (E22G)
1-40 (E22Q)
1-7
1-11
1-16
1-28
1-28 R
1-28 (E22Q)
37-42
17-40
Q
G
G
Q
G
F
R
Q

Figura 3

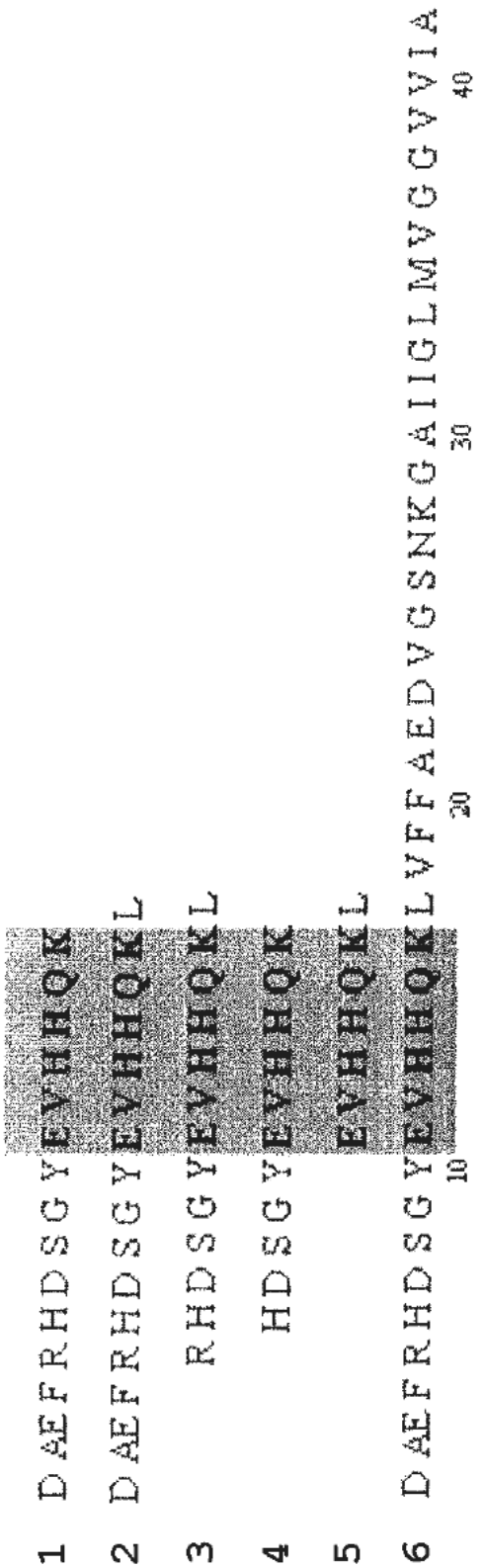

1 DAEFRHDSGYEVHHQK
2 DAEFRHDSGYEVHHQKL
3 RHDSGYEVHHQKL
4 HDSGYEVHHQK
5 EVHHQKL
6 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
10
20
30
40

Figura 4

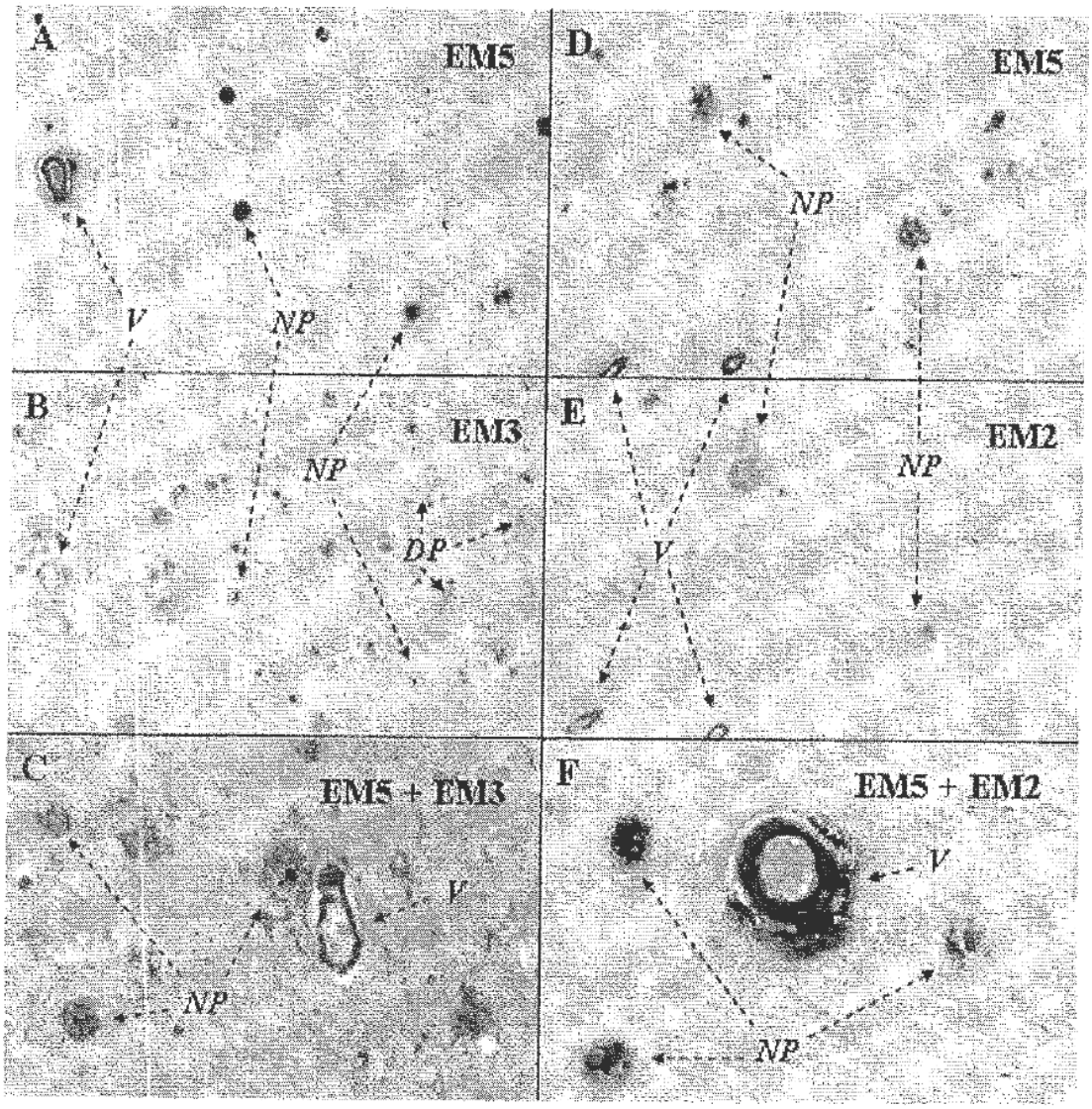


Figura 5

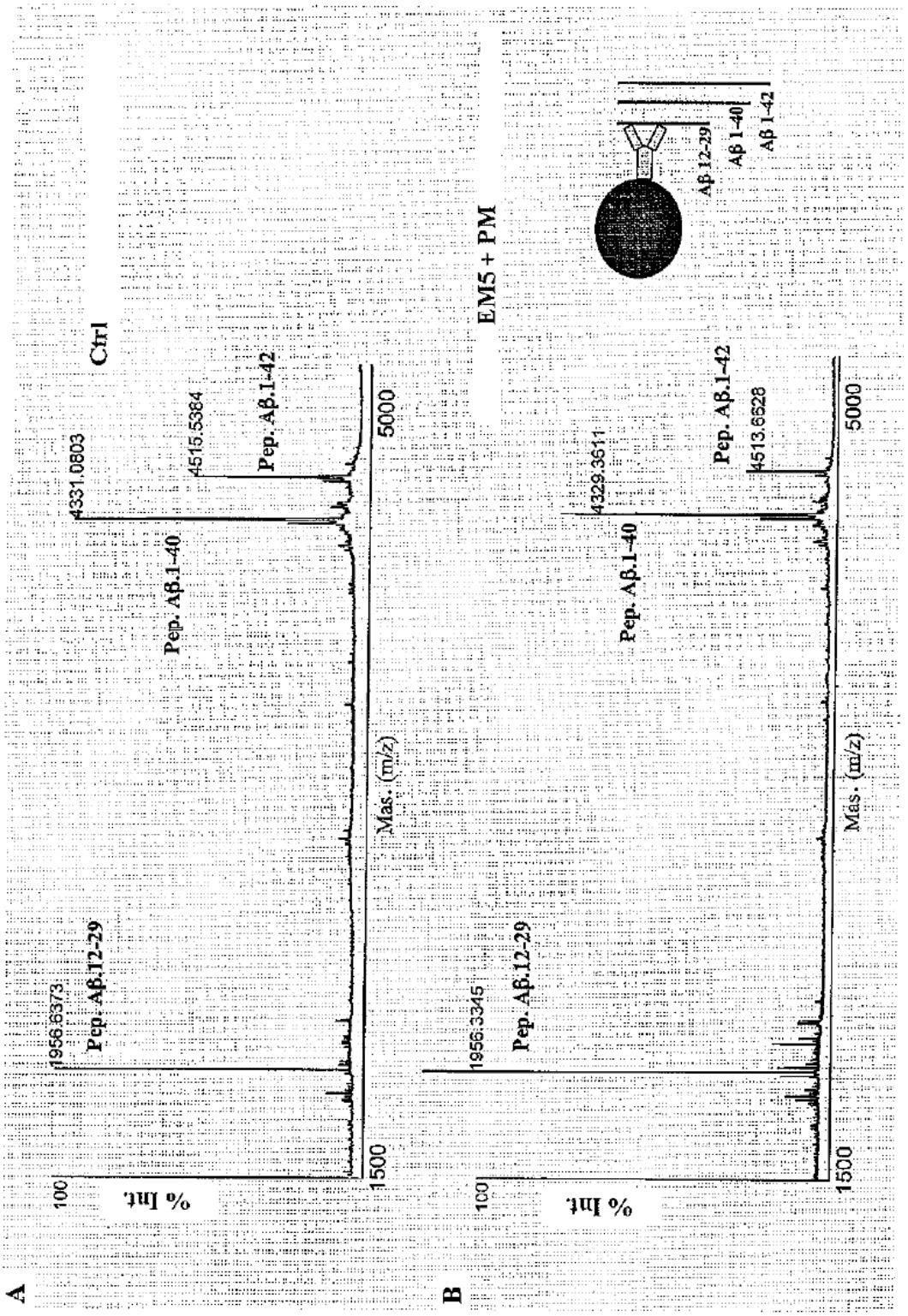

A
Ctrl
% Int.
100
1956.6373
Pep. Aβ.12-29
Pep. Aβ.1-40
4331.0803
4515.5384
Pep. Aβ.1-42
1500
5000
Mas. (m/z)
B
EM5 + PM
% Int.
100
1956.3345
Pep. Aβ.12-29
Pep. Aβ.1-40
4329.3611
Pep. Aβ.1-42
4513.6528
Aβ.12-29
Aβ 1-40
Aβ 1-42
1500
5000
Mas. (m/z)

Figura 6

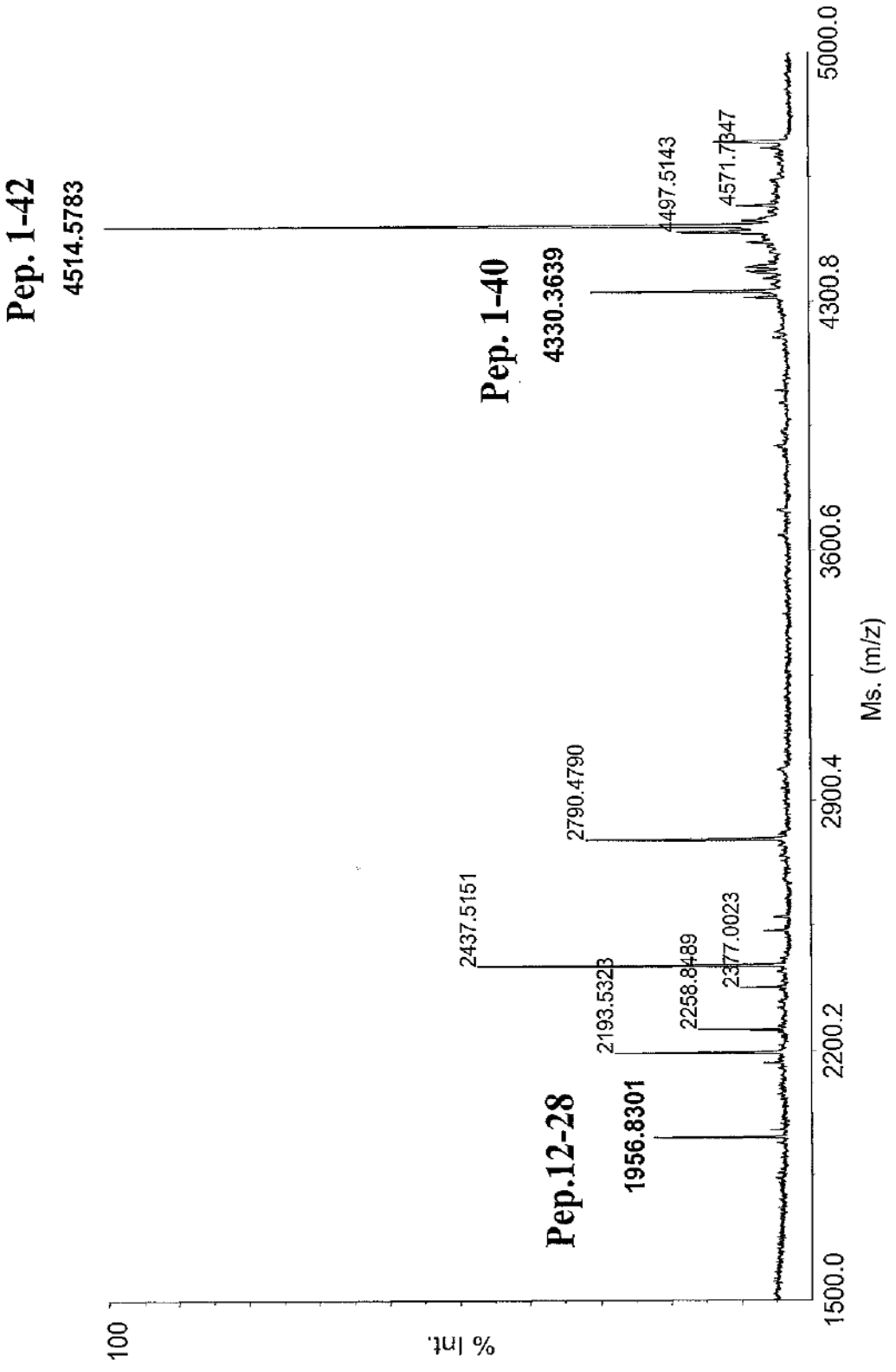

Pep. 1-42
4514.5783
Pep. 1-40
4330.3639
Pep.12-28
1956.8301
2437.5151
2193.5323
2258.8489
2377.0023
2790.4790
4497.5143
4571.7347
100
% Int.
1500.0
2200.2
2900.4
3600.6
4300.8
5000.0
Ms. (m/z)

Figura 7

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 4666829 A **[0015] [0087]**
- WO 9012871 A **[0016] [0087]**
- EP 0683234 A **[0017]**
- WO 2004029630 A **[0017]**

Literatura no patente citada en la descripción

- **Dickson DW ; Crystal HA ; Mattiace LA ; Masur DM ; Blau AD ; Davies P ; Yen S. ; Aronson MK.** Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging,* 1992, vol. 13, 1-11 **[0086]**
- **Iwatsubo T ; Mann DAM ; Odaka A ; Suzuki N ; Ihara Y.** Amyloid β protein (Aβ) deposition: Aβ42(43) precedes Aβ40 in Down's syndrome. *Ann Neurol,* 1995, vol. 37, 294-299 **[0086]**
- **Fukumoto H ; Asami-Okada A ; Suzuki N ; Shimada H ; Ihara Y ; Iwatsubo T.** Amyloid β protein deposition in normal aging has the same characteristics as that in Alzheimer's disease. *Am J Pathol,* 1996, vol. 148, 259-265 **[0086]**
- **Giaccone G ; Tagliavini F ; Linoli G ; Bouras C ; Frigerior L ; Frangione B ; Bugiani O.** Down syndrome patients: extracellular preamyloid deposits precede neuritic degeneration and senile plaques. *Neurosci Lett,* 1989, vol. 97, 232-238 **[0086]**
- **Terry RD ; Masliah E ; Salmon DP ; Butters N ; DeTeresa R ; Hill R ; Hansen LA ; Katzman R.** Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol,* 1991, vol. 30, 572-580 **[0086]**
- **Masliah E ; Terry RD ; Mallory M ; Alford M ; Hansen LA.** Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer Disease. *Am J Path,* 1990, vol. 137, 1293-97 **[0086]**
- **Dickson DW.** The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol,* 1997, vol. 56, 321-339 **[0086]**
- **Braak H ; Braak E.** Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica (Berl),* 1991, vol. 82, 239-259 **[0086]**
- **Thal DR ; Rüb U ; Schultz Ch ; Sassin I ; Ghebremedhin S ; Del Tredici K ; Braak E ; Braak H.** Sequence of Aβ-protein deposition in the human medial temporal lobe. *J Neuropathol Exp Neurol,* 2000, vol. 59 (8), 733-748 **[0086]**
- **Mirra, SS ; Heyman A ; McKeel D ; Sumi SM ; Crain BJ ; Brownlee LM ; Vogel FS ; Hughes JP ; van Belle G ; Berg L.** The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology,* 1991, vol. 41, 479-486 **[0086]**
- **Selkoe DJ.** Alzheimer's disease: genotypes, phenotype and treatments. *Science,* 1997, vol. 275 (5300), 630-1 **[0086]**
- **Hardy J ; Selkoe DJ.** The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science,* 2002, vol. 297, 353-356 **[0086]**
- **Vigo-Pelfrey C ; Lee D ; Keim P ; Lieberberg I ; Schenk DB.** Characterization of β-amyloid peptide from human cerebrospinal fluid. *J. Neurochem,* 1993, vol. 61, 1965-1968 **[0086]**
- **Iwatsubo T ; Mann DAM ; Odaka A ; Suzuki N ; Ihara Y.** Amyloid β protein (Aβ) deposition: Aβ42(43) precedes Aβ40 in Down's syndrome. *Ann. Neurol,* 1995, vol. 37, 294-299 **[0086]**
- **Iwatsubo T ; Saido TC ; Mann DMA ; Lee V M-Y ; Trojanowski JQ.** Full-length amyloid-β (1-42(43)) and amino-terminally modified and truncated amyloid-β42(43) deposit in diffuse plaques. *Am J Pathol,* 1996, vol. 149, 1823-1830 **[0086]**
- **Higgins L ; Murphy Jr GM ; Forno LS ; Catalano R ; Cordell B.** P3 β-amyloid peptide has a unique and potentially pathogenic immunohistochemical profile in Alzheimer's disease brain. *Am J Path,* 1996, vol. 149, 585-596 **[0086]**
- **Gowing E ; Roher AE ; Woods AS ; Cotter RJ ; Chaney M ; Little SP ; Ball MJ.** Chemical characterization of Aβ 17-42 peptide, a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Biol Chem,* 1994, vol. 269, 10987-10990 **[0086]**
- **Kida E ; Wisniewski KE ; Wisniewski HM.** Early amyloid-β deposits show different immunoreactivity to the amino- and carboxy-terminal regions of β-peptide in Alzheimer's disease and Down's syndrome brain. *Neurosci Lett,* 1995, vol. 193, 105-108 **[0086]**

- **Lalowski M ; Golabek A ; Lemere A ; Selkoe DJ ; Wisniewski HM ; Beavis RC ; Frangione B ; Wisniewski T.** The "nonamyloidogenic" p3 fragment (amyloid β17-42) is a major constituent of Down's syndrome cerebellar preamyloid. *J Biol Chem,* 1994, vol. 271, 33623-33631 **[0086]**
- **Saido TC ; Iwatsubo T ; Mann DMA ; Shimada H ; Ihara Y ; Kawashima S.** Dominant and differential deposition of distinct β-amyloid peptide species, AβN3(peptide) in senile plaques. *Neuron,* 1995, vol. 14, 457-466 **[0086]**
- **Tekirian TL ; Saido TC ; Markesberry WR ; Russell MJ ; Wekstein DR ; Patel E ; Geddes JW.** N-terminal heterogeneity of parenchymal and cerebrovascular Aβ deposits. *J Neuropathol Exp Neurol,* 1998, vol. 57, 76-94 **[0086]**
- **Parvathy S ; Davis P ; Haroutunian V ; Purohit DP ; Davis KL ; Mohs RC ; Park H ; Moran TM ; Chan JY ; Buxbaum JD.** Correlation between Aβx-40-, Aβx-42-, and Aβx-43-containing amyloid plaques and cognitive decline. *Arch Neurol,* 2001, vol. 58, 2025-2032 **[0086]**
- **Lamer AJ.** Hypothesis: amyloid β-peptides truncated at the N-terminus contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging,* 1999, vol. 20, 65-69 **[0086]**
- **Jimenez-Huete A ; Alfonso P ; Soto C ; Alvar JP ; Rabano A ; Ghiso J ; Frangione B ; Mendez E.** Antibodies directed to the carboxyl terminus of amyloid β-peptide recognize sequence epitopes and distinct immunoreactive deposits in Alzheimer's disease brain. *Alzheimer's Reports,* 1998, vol. 1, 41-48 **[0086]**
- Monoclonal antibody technology. **Campbell A.** Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier, 1984, 120-134 **[0086]**
- **Fuentes M ; Mateo C ; Guisan JM ; Fernandez-Lafuente R.** Preparation of inert magnetic nano-particles for the directed immobilization of antibodies. *Biosensors and Bioelectronics,* 2005, vol. 20, 1380-1387 **[0086]**
- **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.,* 1976, vol. 72, 278-254 **[0086]**
- **Mayeux R ; Ong LS ; Tang M-X ; Manly J ; Stem Y ; Schupf N ; Mehta PD.** Plasma Aβ40 and Aβ42 and Alzheimer disease. Relation to age, mortality and risk. *Neurology,* 2003, vol. 61, 1185-1190 **[0086]**
- **Vandersthichele H ; van Kerschaver E ; Hesse C ; Davidsson P ; Buyse M ; Andreasen N ; Minthon L ; Tallin A ; Blennow K ; Vanmechelen E.** Standardization of measurement of beta-amyloid (1-42) in cerebrospinal fluid and plasma. *Amyloid,* 2000, vol. 7, 245-258 **[0086]**
- **Ghiso J ; Calero M ; Matsubara E ; Governale S ; Chuba J ; Beavis R ; Wisniewski T ; Frangione B.** Alzheimer's soluble amyloid beta is a normal component of human urine. *FEBS Lett,* 1997, vol. 408, 105-108 **[0086]**