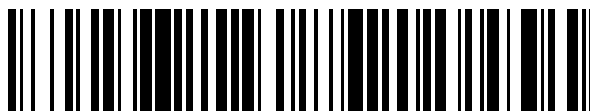


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 102**

51 Int. Cl.:
C07K 16/40 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
C12N 5/18 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06790622 .2**
96 Fecha de presentación: **31.08.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1937827**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.07.2008**

54 Título: **ANTICUERPOS Y SU USO EN EL TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y DIAGNÓSTICO DE UNA ENFERMEDAD ASOCIADA CON ANOMALÍAS EN LA SOD1.**

30 Prioridad:
31.08.2005 US 712400 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.02.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSITE LAVAL
VICE-RECTORAT A LA RECHERCHE, LOCAL
1462 PAVILLON DES SCIENCES DE
L'EDUCATION
QUEBEC, QUEBEC G1K 7P4, CA**

72 Inventor/es:
**JULIEN, Jean-Pierre y
URUSHITANI, Makoto**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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).

ES 2 374 102 T3

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos y su uso en el tratamiento, prevención y diagnóstico de una enfermedad asociada con anomalías en la SOD1

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención está relacionada con el campo de las enfermedades neurodegenerativas asociadas a anomalías en la SOD1 como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Más específicamente, la presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales y a su uso en composiciones y procedimientos para prevenir, tratar y/o diagnosticar dicha enfermedad neurodegenerativa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Una enfermedad neurodegenerativa es un trastorno provocado por el deterioro de ciertas células nerviosas. Cambios en estas células provocan que funcionen de manera anómala, lo que a la larga produce su muerte.

[0003] Las enfermedades neurodegenerativas incluyen la esclerosis lateral amiotrófica familiar y esporádica (ELAS y ELA, respectivamente), la enfermedad de Parkinson familiar y esporádica, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer familiar y esporádica, la atrofia olivopontocerebelosa, la atrofia sistémica múltiple, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad difusa por cuerpos de Lewy, degeneración corticobasal, epilepsia mioclónica familiar progresiva, degeneración estrionigral, distonía de torsión, temblores familiares, síndrome de Gilles de la Tourette, y enfermedad de Hallervorden-Spatz. La mayoría de las enfermedades se caracterizan por su aparición durante los años de la edad adulta y dan lugar a una degeneración rápida de subgrupos de neuronas específicas dentro del sistema neural, produciendo en último término una muerte prematura. No existe cura conocida ni terapia eficaz para frenar la progresión de ninguna de las enfermedades indicadas.

[0004] La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa letal caracterizada por un debilitamiento muscular progresivo durante la edad adulta. Las señales patológicas están representadas por una pérdida masiva de las neuronas motoras junto con astrocitosis y microglia de la corteza motora, el tronco encefálico y la médula espinal. En general, la aparición se produce entre la tercera y la sexta década, y normalmente en la sexta década. La ELA es fatal de manera uniforme, y normalmente en cinco años. La ELA sólo se puede diagnosticar cuando el paciente comienza a experimentar una debilidad y fatiga asimétricas de los miembros, fasciculación localizada en los miembros superiores y/o espasticidad en las piernas, que caracteriza la aparición.

[0005] En la ELA se encuentran afectadas las neuronas de la corteza cerebral y de las astas anteriores de la médula espinal, junto con sus homólogas en algunos de los núcleos motores del tronco encefálico. La clase de neuronas afectadas es altamente específica: las neuronas motoras de la motilidad ocular y las neuronas motoras para los esfínteres de la médula espinal permanecen inalteradas hasta estadios muy tardíos de la enfermedad. A pesar de que ocasionalmente se produce la muerte poco después de la aparición de la enfermedad sintomática, generalmente la enfermedad termina con un fallo respiratorio secundario a una debilidad profunda generalizada y del diafragma.

[0006] Aproximadamente el 10% de los casos de ELA presenta antecedentes familiares, y el resto de los casos de ELA diagnosticados son de tipo esporádico (90%). El descubrimiento hace una década por parte de Rosen y col. (1993, Nature, 362, 59-62) de mutaciones sin sentido en el gen que codifica para la superóxido dismutasa 1 (SOD1) de Cu/Zn en subgrupos de casos familiares dirigió la mayoría de las investigaciones sobre la ELA a elucidar el mecanismo de la enfermedad mediada por SOD1. Hasta la fecha, se han descubierto 114 mutaciones diferentes en el gen de la SOD1 que suponen cerca del 20% de los casos de ELA familiar.

[0007] La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Como tal, es una defensa antioxidante importante en casi todas las células expuestas al oxígeno. La SOD está ampliamente distribuida en los cuerpos vivos de animales, plantas o microorganismos. Más específicamente, la SOD1 es una proteína abundante expresada de manera ubicua. Debido a que su función normal es catalizar la conversión de aniones superóxido en peróxido de hidrógeno, en primer lugar se pensó que la toxicidad de diferentes mutantes de la SOD1 podría ser el resultado de una baja actividad de captación de radicales libres. Los ratones que expresan SOD1 G93A (glicina sustituida por alanina en la posición 93) o SOD1 G37R mutantes desarrollaron la enfermedad de las neuronas motoras a pesar del aumento en los niveles de actividad de la SOD1 (Cleveland y col., 2001, Nat Rev Neurosc, 2, 806-819). Además, ratones deficientes en SOD1 no desarrollaron la enfermedad de las neuronas motoras (Reaume y col., 1996, Nat Genet, 13, 43-47). La interrupción del gen para la chaperona de cobre de la SOD1 (CCS) que suministra cobre en el sitio catalítico de la SOD1 no tuvo

- ningún efecto sobre la progresión de la enfermedad en ratones mutantes transgénicos en SOD1 (Subramanian y col., 2002, Nat Neurosci, 5, 301-307). Por último, los ratones transgénicos que sobre-expresan una forma mutante de la SOD1 que carece de dos de los cuatro restos de histidina que coordinan la unión del Cu en el sitio catalítico aún eran capaces de desarrollar neurodegeneración motora a pesar de una notable reducción en la actividad de la SOD1 (Wang y col., 2002, Neurobiol Dis, 10, 128-138). En general, estos estudios con ratones genéticamente alterados indican que los mutantes en la SOD1 provocan la enfermedad de las neuronas motoras mediante la adquisición de nuevas propiedades tóxicas que son independientes de la actividad enzimática en la que está involucrado el sitio catalítico del cobre.
- 10 **[0008]** El punto de vista predominante es que la toxicidad de los mutantes en la SOD1 está relacionada con la propensión del mutante en la SOD1 para formar especies y agregados proteicos nocivos mal plegados. Además, a diferencia de la SOD1 de tipo silvestre (WT), las proteínas SOD1 mutantes extracelulares activan la microglía e inducen la muerte de las neuronas motoras en cultivo (Urushitani y col., 2006, Nat Neurosci, 9, 108-118), una vía patógena que estaría en consonancia con la idea de que la muerte de las neuronas motoras en ELA relacionada con SOD1 mutante no es estrictamente autónoma de las células (Boillee y col., 2006, Science, 312, 1389-1392). Curiosamente, la oxidación de la SOD1 WT es un fenómeno que puede promover su agregación (Furukawa, y col., 2006, PNAS USA, 103, 7148-7153). Considerando las evidencias del daño oxidativo en pacientes con ELA esporádica (Ihara y col., 2005, Neurol Res, 27, 105-108) y la abundancia de la proteína SOD1 en las células, parece plausible que las moléculas de SOD1 puedan constituir dianas del daño oxidativo en la ELA esporádica.
- 15 **[0009]** Desde el descubrimiento de mutaciones genéticas en la superóxido dismutasa 1 (SOD1) en el 20% de los pacientes con ELA familiar y el desarrollo de excelentes modelos de ratón basados en la sobre-expresión de mutantes en la SOD1 asociada a la ELA, se han elucidado muchas vías patógenas para la muerte de las neuronas motoras incluyendo el mal plegamiento y la agregación de proteínas, el deterioro del proteasoma, inflamación, especies reactivas de oxígeno, excitotoxicidad y disfunción de las mitocondrias. Basándose en estas hipótesis, se han sometido a ensayo múltiples enfoques para el tratamiento en ratones con ELA, incluyendo enfoques farmacológicos y la administración de moléculas mediada por virus.
- 25 **[0010]** El documento de EE.UU. 5.762.929 informa de un agente farmacéutico que puede aliviar los síntomas de enfermedades de las neuronas motoras como la esclerosis lateral amiotrófica por administración oral o parenteral. El documento de EE.UU. 5.780.489 informa de un procedimiento para el tratamiento y alivio de los síntomas de la esclerosis lateral amiotrófica con la administración a un paciente de una cantidad eficaz de un precursor del glutatión sin cisteína o un derivado del glutatión. El documento de EE.UU. 6.420.429 informa del uso de antioxidantes para el tratamiento de enfermedades como la esclerosis lateral amiotrófica. Los documentos de EE.UU. 5.843.641; EE.UU. 5.849.290 y EE.UU. 6.723.893 informan del uso de una cantidad eficaz de proteína SOD o ADN que codifica una proteína SOD para tratar enfermedades neurodegenerativas, específicamente esclerosis lateral amiotrófica (ELA). También informan de un procedimiento de diagnóstico de la estenosis lateral amiotrófica usando el ADN que codifica una proteína SOD o uno de sus fragmentos en una reacción de PCR.
- 35 **[0011]** En JONSSON P.A. y col.: "Minute Quantities of Misfolded Mutant Superoxide Dismutase-1 Cause Amyotrophic Lateral Sclerosis", BRAIN, vol. 127, no. 1, 2004, páginas 73-88 se describen anticuerpos policlonales dirigidos contra una proteína SOD1 anómala.
- 40 **[0012]** El documento EP-A2-0 279 705 se refiere al cribado de fluidos corporales para la superóxido dismutasa (SOD1) con el fin de determinar la trisomía fetal del cromosoma 21 del síndrome de Down, y anticuerpos, hibridomas y kits para ello.
- 45 **[0013]** El documento CA-A1-2 157 041 se refiere a compuestos y procedimientos para el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades de muerte celular.
- 50 **[0014]** En la Solicitud internacional WO 2005/019828 se describe un ensayo para la protección del epítipo para su uso en el diagnóstico, pronóstico e intervención terapéutica en enfermedades.
- 55 **[0015]** En FUJIWARA NORIKO y col., JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 280, no. 6, 11 de febrero de 2005, páginas 5061-5070 se describe la diferente inmunoreactividad frente a anticuerpos monoclonales entre la superóxido dismutasa de cobre/cinc asociada a la esclerosis lateral amiotrófica mutante y silvestre.
- 60 **[0016]** A pesar de que es bien sabido que la SOD1 es una proteína citosólica sin una secuencia de translocación específica, existen evidencias crecientes de que tanto la SOD1 normal como mutante se pueden segregar a través de las vías secretoras (Urushitani, y col., 2006, Nature Neurosci, 9, 108-118). Además, Urushitani, y col. (2006) descubrieron que la SOD1 mutante extracelular puede desencadenar microgliosis y la muerte de neuronas motoras

en cultivo, lo que sugiere un mecanismo patógeno basado en la toxicidad de proteínas SOD1 mutantes secretadas.

[0017] Así, existe la necesidad de nuevos agentes, tales como anticuerpos monoclonales que sean eficientes para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de enfermedades asociadas a anomalías de la SOD1.

5

RESUMEN DE LA INVENCION

[0018] Un objeto de la presente invención es proporcionar herramientas para el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades asociadas a la SOD1 para satisfacer las necesidades anteriormente mencionadas.

10

[0019] Ese objeto de la presente invención se consigue proporcionando anticuerpos que se unen específicamente a una superóxido dismutasa 1 (SOD1) anómala y que neutralizan el efecto patológico de la SOD1 anómala cuando se administra a un animal. Preferentemente los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales.

15 **[0020]** Más específicamente, los anticuerpos monoclonales de la invención se producen preferentemente mediante líneas celulares de hibridoma depositadas en la International Depositary Authority de Canadá el 29 de agosto de 2006 con los números de acceso ADI-290806-01, ADI-290806-02 y ADI-290806-03.

20 **[0021]** Otro aspecto de la invención se refiere a una composición para prevenir y/o tratar una enfermedad asociada a anomalías de la SOD1 en un animal, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y al menos un anticuerpo según la invención.

25 **[0022]** La presente invención también se refiere al uso de al menos un anticuerpo de la invención para prevenir y/o tratar una enfermedad asociada a anomalías de la SOD1 en un animal o el uso de un anticuerpo de la invención en la preparación de una composición para prevenir y/o tratar una enfermedad asociada a anomalías de la SOD1 en un animal.

30 **[0023]** Otro aspecto de la invención es el uso de al menos un anticuerpo monoclonal de la invención para el diagnóstico de una enfermedad asociada a anomalías de la SOD1 en un animal, o para la preparación de una composición para el diagnóstico de una enfermedad asociada a anomalías de la SOD1 en un animal.

[0024] Otro aspecto más de la invención se refiere a un kit para el diagnóstico de una enfermedad asociada a anomalías de la SOD1 en un animal. El kit comprende un contenedor, que contiene al menos un anticuerpo monoclonal según la presente invención.

35

[0025] Otro aspecto más de la invención es un kit para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada a anomalías de la SOD1 en un animal. El kit comprende un contenedor que contiene al menos un anticuerpo de la invención.

40 **[0026]** Los inventores describen un procedimiento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad asociada a anomalías de la SOD1 en un animal, dicho procedimiento que comprende la etapa de administración de una cantidad eficaz de una composición según la invención.

45 **[0027]** Otros objetos y ventajas de la presente invención serán evidentes tras la lectura de la siguiente descripción detallada no restrictiva, realizada con referencia a los dibujos acompañantes.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

[0028]

50

La Figura 1 muestra la aparición retardada y la extensión de la esperanza de vida en ratones SOD1 G37R vacunados

55 a. Calendario de inmunización. a: Inmunización temprana. Los ratones se inyectaron cuatro veces, comenzando a los 2 meses de edad. Se recogió sangre para el ensayo de titulación a los cuatro meses de edad y en la fase final.

60 b. Análisis de rotarod de los ratones vacunados con el protocolo de inmunización temprana. Se determinó el tiempo sobre el rotarod para ratones SOD1 G37R inyectados con G93A rec-adyuvante (N = 8) o con solución salina-adyuvante (N = 7). La vacunación mejoró significativamente el comportamiento motor (P < 0,0001 mediante la prueba post-hoc).

c. Efecto de la inmunización sobre el retraso de la aparición de la enfermedad (como se define por una pérdida del 30% del comportamiento motor) en ratones SOD1 G37R inmunizados con G93A rec-adyuvante o con solución salina-adyuvante. $P = 0,0011$ mediante la prueba log rank.

5 d. La inmunización incrementa la esperanza de vida de los ratones SOD1 G37R. Curva para la supervivencia de Kaplan-Meier. $N = 8$ para ratones tratados con G93A rec y $N = 7$ para ratones inyectados con solución salina $P < 0,0001$ mediante la prueba log-rank.

e. Mayor número de neuronas motoras restantes en ratones vacunados en la fase final de la enfermedad. Después de teñir las secciones con azul de toluidina, las neuronas motoras se contaron en 4 secciones procedentes de 4 ratones de cada grupo. $*P < 0,01$ mediante la prueba t de Student.

10 f. Inmunohistoquímica de la médula espinal de ratones transgénicos SOD1 G37R en fase terminal inmunizados con proteína SOD1 G93A recombinante (superior) o solución salina (inferior), usando anticuerpos contra NeuN.

15

Figura 2

a. Inmunohistoquímica de la médula espinal de ratones inmunizados con anticuerpos dirigidos contra Mac2. Nótese que se produce una tinción de Mac2 más prominente en la microglía reactiva del ratón vacunado con SOD1 G93A rec (dos paneles de la izquierda).

20

b. Mayor tinción de la IgG y microgliosis en la médula espinal de ratones con ELA vacunados. Las secciones de la médula espinal de ratones transgénicos SOD1 G37R del grupo vacunado o inyectado con solución salina/adyuvante se trataron con un anticuerpo monoclonal de rata dirigido contra Mac2 seguido de IgG dirigida contra rata conjugada a Alexa 488 (columna de izquierda), junto con IgG dirigida contra ratón conjugada a Alexa 594 para detectar IgG endógena (columna central). Para cada medio de contraste, la fotografía se tomó en condiciones fijas. Nótese las señales mejoradas de la Mac2 y la IgG en ratones SOD1 G37R vacunados. Barra de la escala = 50 μm .

25

La Figura 3 muestra que los títulos de anticuerpo están correlacionados con la duración de la vida de ratones vacunados

30

a. Titulación de anticuerpos de los sueros procedentes de ratones inmunizados con enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA). $N = 7$ para ratones SOD1 G37R tratados con G93A rec. $N = 6$ para ratones inyectados con solución salina. Se sometieron a ensayo los sueros de los ratones de 4 meses de edad y en el punto final. $N = 4$ para ratones no transgénicos de la misma camada tratados con G93A rec (sólo a los 4 meses de edad).

35

b. Correlación positiva entre el título de SOD1 dirigido contra humano y esperanza de vida en ratones inmunizados. El valor del ELISA para el título de SOD1 dirigido contra humano a los 4 meses de edad y la esperanza de vida (semanas) se representa en un diagrama de dispersión ($N = 7$ para el grupo tratado con SOD1 recombinante humano, $N = 6$ para el grupo inyectado con solución salina. $P = 0,0011$ analizados mediante la prueba rho de Spearman).

40

c. El análisis de transferencia de Western muestra que los antisueros de ratones vacunados con SOD1 G93A rec detectan la SOD1 G37R mutante humana. Los sueros de dos ratones diferentes procedentes de cada grupo, ratones 752 y 754 del grupo vacunado con SOD1 G93A rec y ratones 758 y 759 del grupo inyectado con solución salina-adyuvante, se hicieron reaccionar con lisados de la médula espinal de ratones SOD1 G37R y de ratones de la misma camada no transgénicos (antisueros WB). La flecha indica SOD1 G37R y el asterisco indica ratón SOD1 endógeno. Las membranas se volvieron a transferir con anticuerpo disponibles comercialmente contra SOD1 humano (WB α hSOD1) y actina (WB α actina).

50

d. Diferente reactividad de los antisueros procedentes de ratones inmunizados contra las proteínas SOD1 mutantes o WT. Los títulos de anticuerpos contra la proteína SOD1 WT recombinante humana metalada, la proteína metalada SOD1 G85R, o G93A, se determinaron por ELISA. $N = 3$ de cada grupo que consiste en ratones SOD1 G37R vacunados con SOD1 G93A rec o SOD1 WT rec, o ratones no transgénicos vacunados con SOD1 G93A rec. Los datos se presentan como porcentaje de la titulación en comparación con aquellos contra SOD1 WT rec en cada grupo de ratones (promedio $\pm$ SEM). $*P < 0,05$ por ANOVA de una vía con el método de Bonferroni.

55

e. Análisis de ELISA para la titulación de anticuerpos de los lisados de médula espinal procedentes de ratones vacunados. Lisados de la médula espinal procedentes de ratones inyectados con SOD1 G93A rec ($N = 3$) o con solución salina-adyuvante ($N = 3$) a los 7 meses de edad se fraccionaron subcelularmente en fracciones libres de detergente solubles en tampón (soluble) e insolubles (membrana) antes del ELISA. $*P < 0,05$ por ANOVA de una

60

vía.

La Figura 4 muestra el aclaramiento de especies mutantes de la SOD1 en la médula espinal mediante la vacunación con un anticuerpo monoclonal preferido de la invención

- 5 a. Análisis de transferencia de Western que muestra que uno de los anticuerpos monoclonales preferidos de la invención, es decir, el anticuerpo monoclonal C4F6 reconoce las formas mutantes de la SOD1 (G37R y G93A), pero mal la SOD1 WT procedente de extractos de médula espinal de ratones transgénicos.
- 10 b. Análisis de ELISA que muestran que el anticuerpo monoclonal C4F6 detecta la proteína metalada SOD1 G85R, pero no la proteína recombinante SOD1 WT metalada.
- c. Análisis de transferencia de Western de extractos de médula espinal que muestra una menor cantidad de especies mutantes de la SOD1 detectadas por el anticuerpo C4F6 en ratones vacunados, en comparación con
15 ratones control con adyuvante-solución salina. Se cargaron cinco y diez microgramos de proteína de cada ratón en cada pocillo para el análisis de transferencia de Western. Se analizaron tres ratones procedentes de ambos grupos de ratones vacunados e inyectados con solución salina.
- d. Análisis densitométrico de los datos de la transferencia de Western en c. El valor promedio del grupo control se ha
20 normalizado en uno solo. Los datos muestran la media $\pm$ SEM (N = 3 de cada grupo).

La Figura 5 muestra los efectos de la inmunización activa o pasiva en ratones SOD1 G93A con niveles extremos de proteína SOD1 mutante

- 25 a, b. Efecto limitado de la inmunización activa sobre la probabilidad de aparición de la enfermedad (a) y supervivencia (b) de ratones SOD1 G93AGur como muestra la curva de Kaplan-Meier. Los ratones fueron vacunados con el mismo protocolo utilizado para los ratones SOD1 G37R. N = 12 para los ratones tratados con G93A rec y N = 8 para los ratones inyectados con solución salina. Los datos se analizaron mediante la prueba de log-rank.
- 30 c-e. Efecto significativo de inmunización pasiva en ratones SOD1 G93A. Los ratones se sometieron a infusión intraventricular de anticuerpos dirigidos contra SOD1 (Ab, N = 5) o solución salina control (N = 5) a partir de los 85 días de edad. c. Transferencia de Western que demuestra los anticuerpos dirigidos contra SOD1 G93A purificados por afinidad a partir de antisueros de ratones inmunizados. d-f. La inmunización pasiva con anticuerpos SOD1 G93A
35 dirigidos contra seres humanos alivia los síntomas de la enfermedad controlados mediante el peso corporal (d) y puntuación de los reflejos de los miembros posteriores (e). Los resultados son estadísticamente significativos ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías). f. La inmunización pasiva prolongó significativamente la esperanza de vida de ratones SOD1 G93A en comparación con los ratones inyectados con solución salina. (P = 0,025 mediante la prueba de supervivencia de Kaplan-Meier, prueba de log-rank y prueba t de Student).
- 40

La Figura 6 muestra que los anticuerpos SOD1 dirigidos contra seres humanos inyectados a través de una mini-bomba osmótica pueden penetrar en la médula espinal lumbar y aún son activos 16 días después de la infusión con la bomba.

- 45 Anticuerpos policlonales de conejo SOD1 dirigidos contra seres humanos o IgG control se conjugaron con FITC y se usaron para la infusión intraventricular a través de una mini-bomba osmótica para ratones SOD1 G93A (100 días de edad).
- a. Análisis de inmunofluorescencia de la médula espinal lumbar de los ratones SOD1 G93A tratados con la infusión intraventricular de anticuerpos SOD1 dirigidos contra seres humanos (columna de la izquierda) o IgG control (columna de la derecha) y conjugados a FITC. En verde, anticuerpos conjugados a FITC o IgG control; en rojo, anticuerpos dirigidos contra NeuN; en azul, anticuerpos dirigidos contra Mac2. Se detectaron anticuerpos SOD1 conjugados a FITC en las proximidades de las neuronas de la médula espinal (puntas de flecha), y la microglía (flechas).
- 50
- 55 b. Transferencia de Western de extractos de la médula espinal con anticuerpos SOD1 dirigidos contra seres humanos o IgG control y conjugados a FITC procedentes de muestras 16 días después de la infusión con la bomba. Como control se usaron anticuerpos frescos contra la SOD1 humana. Esto confirma la reactividad del anticuerpo residual en la bomba 16 días después de la infusión.
- 60

La Figura 7 muestra los resultados del ELISA de la afinidad de los anticuerpos monoclonales preferidos de

la invención por la SOD1 mutante y la SOD1 WT.

La Figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos de la superóxido dismutasa 1, a saber, la SEQ ID NO 7.

5 La Figura 9 muestra la secuencia de ácidos nucleicos de la superóxido dismutasa 1, a saber, la SEQ ID NO 8.

La Figura 10 muestra que la oxidación induce la agregación de la SOD1 WT *in vitro*

A. Formación de especies agregadas de la SOD1 por tratamiento con peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Proteínas
10 SOD1 recombinantes purificadas de bacterias (1 mg/ml, WT, G85R y G93A) se incubaron en una disolución que contiene H₂O₂ 1 mM durante 30 min a 37°C. Después de la adición de 50U/ml de catalasa para detener la reacción, las muestras de proteínas se analizaron por transferencia de Western utilizando anticuerpos SOD1 dirigidos contra seres humanos. Nótese que, tras el tratamiento con H₂O₂, la SOD1 WT produjo agregados de elevado peso molecular como los de las muestras de las proteínas SOD1 mutantes. Las flechas indican fragmentos de SOD1
15 cuyas secuencias se confirmaron mediante espectroscopía de masas (datos no mostrados). El símbolo del asterisco marca la catalasa añadida para recoger el H₂O₂.

B. La agregación derivada de la oxidación y fragmentos de SOD1 muestran una solubilidad alterada en PBS. Después del tratamiento de la proteína SOD1 recombinante con H₂O₂, las proteínas se dializaron contra PBS y
20 posteriormente se sometieron a ultracentrifugación (105.000 g x 1 hora). Los sobrenadantes o los sedimentos se analizaron por transferencia de Western utilizando anticuerpos SOD1 dirigidos contra seres humanos. Nótese que aparecen diversos patrones de fragmentación y posibles complejos que incluyen fragmentos de SOD1, como indican las flechas.

25 La Figura 11 muestra la inducción del mal plegamiento de la SOD1 WT por el estrés oxidativo *in vivo*

A. Interacciones de la Hsp/Hsc70 con la SOD1 WT oxidada o con la SOD1 mutante *in vivo*. Se transfectaron transitoriamente células Neuro2a con hSOD1 marcada con FLAG (WT y G93A; 2 µg/pocillo) en placas de cultivo. A las 24 horas de la transfección, las células se incubaron durante 45 min con un tampón que contiene H₂O₂ 1,5 mM.
30 Los lisados se inmunoprecipitaron con gel de afinidad anti-FLAG y las transferencias se sometieron a ensayo con anticuerpos dirigidos contra SOD1 o dirigidos contra Hsp/Hsc70. La punta de flecha vacía indica la cadena pesada de la IgG. La punta de flecha negra señala la proteína Hsp/Hsc70 que se co-inmunoprecipitó con SOD1 WT oxidada o con SOD1 mutante.

B. Conjugación de multi-ubiquitina con proteínas SOD1 WT oxidadas. HA-ubiquitina (HA-Ub, 1 µg/pocillo) se co-transfectó con FLAG-hSOD1 seguido por el experimento descrito en A. Los inmunoprecipitados con el gel de afinidad anti-FLAG se resolvieron en un gel de SDS-poliacrilamida al 12,5%. Los inmunoprecipitados (izquierda) y los lisados de entrada al 10% (derecha) se analizaron por transferencia de Western usando anticuerpo dirigido contra SOD1 o dirigido contra HA. La punta de flecha vacía indica la cadena ligera de la IgG. La conjugación de
40 multi-ubiquitina se produjo con SOD1 mutante, así como con especies de SOD1 WT oxidadas.

La Figura 12 muestra la interacción de las SOD1 WT oxidadas o SOD1 mutantes con cromogranina B

A. Análisis de transferencia de Western de la distribución subcelular de SOD1 humanas en células Neuro2a transfectadas. A las 24 horas de la transfección con hSOD1-FLAG (WT y G93A mutante), las células se trataron con H₂O₂ 1,5 mM durante 45 minutos antes de la recogida. Las células se procesaron posteriormente para el fraccionamiento subcelular que da como resultado fracciones citosólicas (bandas 1-4), fracciones de la membrana pesada (5-8) y fracciones de la membrana ligera (9-12). Se analizó la distribución de la SOD1 humana y la CgB. La Akt-quinasa, la COX-IV, la TGN-38 y la syntaxina 1 fueron los marcadores del citosol, la mitocondria, el microsoma y
50 los componentes de la membrana, respectivamente.

B. Se transfectaron transitoriamente células Neuro2a con hSOD1-FLAG (WT y G93A a 1 µg/pocillo) y HA-CgB de ratón (1 µg/pocillo). A las 24 horas de la transfección, las células se expusieron a H₂O₂ 1,5 mM durante 45 minutos. A continuación, los lisados celulares se inmunoprecipitaron con gel de afinidad anti-FLAG. Los inmunoprecipitados y
55 los lisados de entrada al 10% se analizaron por transferencia de Western utilizando anticuerpos dirigidos contra SOD1 o dirigidos contra HA (gel de SDS-poliacrilamida al 12,5%).

La Figura 13 muestra la inducción de la activación microglial por SOD1 WT oxidadas

60 Células microgliales BV2 se expusieron a SOD1 WT intactas o tratadas con H₂O₂ (SOD1 WT o SOD1 Ox-WT a 10 µg/ml), SOD1 G93A no oxidadas (10 µg/ml), LPS (10 µg/ml) o PBS para el control durante 24 horas a 37°C. El ARN

total se analizó por PCR con transcriptasa inversa semi-cuantitativa (RT-PCR) usando pares de cebadores para el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y gliceraldehído -3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). A. Datos representativos de la RT-PCR. B. Valores densitométricos normalizados con la GAPDH y la relación de expresión obtenida mediante la comparación con el control de PBS (parte inferior, media $\pm$ SEM).

La Figura 14 muestra que la SOD1 WT oxidada y SOD1 mutante son igualmente tóxicas para las neuronas motoras cultivadas

- 10 Cultivos disociados a los 12 días *in vitro* procedentes de médulas espinales de ratón embrionario E13 se expusieron a SOD WT recombinante tratada con H₂O₂, no tratada (SOD1 WT-Ox., SOD1 WT) o a SOD1 G93A (0,5 y 1,0 μ g/ml) durante 24 horas a 37°C. Los cultivos se fijaron y se marcaron con anticuerpos dirigidos contra neurofilamentos H no fosforilados (SMI32). A. Micrografías de cultivos primarios de médula espinal tratados con el control PBS (arriba a la izquierda), SOD1 WT (arriba a la derecha), SOD1 WT reaccionada con H₂O₂ (abajo a la derecha) y SOD1 G93A (abajo a la izquierda). B. Supervivencia de las motoras neuronas después del tratamiento. Número de grandes neuronas SMI32 positivo determinado y expresado como % del control. La viabilidad de las neuronas motoras expuestas a SOD1 WT oxidadas o SOD1 G93A era significativamente inferior que la de los cultivos control o de los cultivos tratados con SOD1 WT. Los datos representan la media $\pm$ SEM (error estándar de la media). N = 3 ó 4. Los datos se estimaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA, P < 0,05).

20

La Figura 15 muestra los resultados de la inmunohistoquímica utilizando secciones de la médula espinal de ratones transgénicos de SOD1 humana

- 25 Tinción con el clon C4F6, preferentemente que reconoce SOD1 mutantes. Los cortes de la médula espinal (25 μ m de espesor) obtenidos a partir de ratones transgénicos SOD1 mutantes presintomáticos (G37R y G93A) o ratones transgénicos de WT humana se tiñeron con un anticuerpo monoclonal preferido de la invención, es decir, C4F6, seguido de un 2º anticuerpo biotinilado y el sistema complejo de avidina-biotina (Vectastain). Se usó diaminobencidina (DAB) como cromógeno. El anticuerpo se obtuvo del sobrenadante del medio de cultivo de hibridomas (1:500). e y f son controles negativos sin el anticuerpo primario.

30

La Figura 16 muestra el análisis de transferencia de Western utilizando anticuerpos monoclonales preferidos de la invención

- 35 a. Análisis de transferencia de Western que muestra que un anticuerpo monoclonal preferido de la invención, es decir C4F6, reconoce mejor SOD1 G37R que SOD1 WT procedentes de ratones transgénicos de SOD1 humana. Como control se usó anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra SOD1 humana (S100, StressGen).

- 40 b. Análisis de ELISA que muestra que el anticuerpo C4F6 reacciona contra la proteína SOD1 G85R metalada mejor que la proteína recombinante metalada WT. c. Otro anticuerpo monoclonal preferido de la invención, es decir, D3H5, reconoce la proteína SOD1 WT y varias proteínas mutantes de la SOD1. Análisis de transferencia de Western de células neuro2a de la línea celular de neuroblastoma de ratón, sobre-expresión de SOD1 humana (WT, A4V, G85R y G93A) o control de vectores. Se analizaron los lisados celulares por transferencia de Western con el anticuerpo monoclonal preferido D3H5 que reconoce tanto la SOD1 WT como mutante. El S100 se utilizó como control.

- 45 **La Figura 17 muestra la detección de ratones Tg de SOD1 humana con un anticuerpo monoclonal preferido de la invención, a saber, el C4F6.**

- 50 La sangre (50 ~ 100 microlitros/ratón) extraída de los ratones se transfirió a tubos de muestras tratados con EDTA. Después de la centrifugación durante 15 minutos a 1000 x g a 4°C, el sedimento se incubó en Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) durante 1 hora en hielo. Las muestras se centrifugaron durante 20 min a 20.000 x g a 4°C, y a continuación el sobrenadante se recogió y se llevó a ebullición en tampón de muestras de SDS durante 5 min.

- 55 La Figura muestra los datos de la transferencia de Western utilizando un anticuerpo monoclonal preferido de la invención, es decir, el anticuerpo monoclonal de ratón C4F6 (panel superior) y anticuerpo policlonal de conejo SOD1 dirigido contra seres humanos disponible comercialmente (StressGen, Victoria, BC).

Cada banda contiene 10 μ g de proteínas.

- 60 **La Figura 18 muestra los resultados de la inmunohistoquímica utilizando secciones de la médula espinal de ratones transgénicos de SOD1 humana**

Tinción con un anticuerpo monoclonal de la invención, es decir, D3H5, que reconoce tanto la SOD1 WT como mutante. Los cortes de la médula espinal (25 μ m de espesor) obtenidos a partir de ratones transgénicos SOD1 mutantes presintomáticos (G37R y G93A) o ratones transgénicos de WT humana se tiñeron con un anticuerpo monoclonal de ratón SOD1 dirigido contra seres humanos (clon D3H5), seguido de un 2º anticuerpo biotinilado y el sistema complejo de avidina-biotina (Vectastain). Se usó diaminobencidina (DAB) como cromógeno. El anticuerpo se obtuvo del sobrenadante del medio de cultivo de hibridomas (1:500). e y f son controles negativos sin el anticuerpo primario.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10

[0029] En la descripción de la presente invención, se utiliza la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones que figuran a continuación:

[0030] Como se usa en el presente documento, la enfermedad asociada con anomalías de la SOD1 preferentemente se refiere a una enfermedad neurodegenerativa. Las enfermedades neurodegenerativas son un conjunto variado de trastornos del sistema nervioso caracterizados por la pérdida gradual y progresiva del tejido neural. Una lista no exhaustiva de enfermedades neurodegenerativas incluye, pero no está limitado a la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Hallervorden-Spatz, la atrofia olivopontocerebelosa, la atrofia sistémica múltiple, la parálisis supranuclear progresiva, la enfermedad difusa por cuerpos de Lewy, la degeneración corticobasal, la epilepsia mioclónica familiar progresiva, la degeneración estrionigral, la distonía de torsión, el temblor familiar, el síndrome de Gilles de la Tourette, y la enfermedad de Hallervorden-Spatz, y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), que es de naturaleza familiar, esporádica típica o atípica.

[0031] Las formas "humanizadas" de anticuerpos no-humanos (por ejemplo, de ratón) son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulinas o sus fragmentos (como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, o subsecuencias de anticuerpos de unión al antígeno de otro tipo) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulinas no humanas. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por los restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata o conejo con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos marco de la Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR importadas o secuencias marco. Estas modificaciones se realizan para perfeccionar y optimizar el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y por lo general dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de una inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una parte de la región constante de una inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones y col., Nature 321:522 (1986); Reichmann y col., Nature 332:323 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593 (1992).

[0032] De tipo silvestre es la versión de origen natural, normal, no mutada de un gen o proteína.

[0033] Anomalías, anómala: cuando se refiere a una proteína SOD1 anómala, quiere decir que la proteína SOD1 anómala tiene la misma o sustancialmente una secuencia de aminoácidos similar que la proteína SOD1 de tipo silvestre, pero tiene una conformación de la proteína diferente de la proteína SOD1 de tipo silvestre y presenta una actividad patógena. La actividad patógena, en este caso está involucrada en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como se ha definido anteriormente. Por el término anómala/anomalías se entiende proteínas SOD1 mutantes, oxidadas o agregadas.

[0034] El término "inmunizar" o "inmunización" como se usa en el presente documento, se refiere a la producción de una respuesta inmunitaria (respuesta humoral y/o celular) en un paciente que lo protege (parcial o totalmente) de las manifestaciones de la enfermedad. Las inmunizaciones pueden ser de naturaleza profiláctica o terapéutica. La inmunización también puede ser pasiva. La terapia de inmunización pasiva es una forma transitoria de inmunidad adquirida en la que se adquieren los anticuerpos contra una enfermedad de forma natural (por ejemplo a través de la placenta al feto) o artificial (por ejemplo con la inyección de antisuero). Se trata de un proceso en el que los individuos con enfermedad avanzada son inyectados con plasma rico en anticuerpos o también antes de la aparición de los síntomas de la enfermedad. Los anticuerpos son los anticuerpos policlonales o monoclonales de la presente invención. El tratamiento de inmunización pasiva supone de esta forma la administración de agentes con una reacción inmunitaria a la SOD1 anómala establecida (por ejemplo, células efectoras o anticuerpos, más

específicamente anticuerpos monoclonales) que pueden mediar directa o indirectamente con los efectos de la anti-SOD1 anómala y no dependen necesariamente de un sistema inmunitario intacto del hospedador.

[0035] Como se usa en el presente documento, el término "animal" se refiere a cualquier animal, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales zoológicos, deportivos, o de compañía, como perros, caballos y gatos. Preferiblemente, el animal del presente documento es un ser humano.

[0036] Diagnóstico como se usa en el presente documento es el proceso de identificación de una enfermedad por sus signos, síntomas y resultados de diversos procedimientos de diagnóstico. El diagnóstico se puede llevar a cabo sobre muestras biológicas tomadas de un sujeto, preferentemente un animal y más preferentemente un ser humano. Dichas muestras se pueden seleccionar entre, pero no limitado a, lo siguiente: plasma o suero sanguíneo, sangre, orina, esputo, líquidos efluentes del colon, fluido cefalorraquídeo, fluido linfático, médula ósea, muestras de tejido como las procedentes de una biopsia quirúrgica o células bucales, o cualquier otra muestra sospechosa de contener SOD1 anómala. Preferiblemente, la muestra utilizada para el diagnóstico es plasma o suero sanguíneo.

[0037] El término anticuerpo monoclonal como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que pueden estar presentes en pequeñas cantidades que se producen de forma natural. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, se dirigen contra un sitio antigénico único. Además, en contraste con preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de que se pueden sintetizar mediante el cultivo de hibridomas, no contaminados por otras inmunoglobulinas.

1. Los anticuerpos y composiciones de la invención

[0038] Los inventores han encontrado que la inmunización de animales con un polipéptido de la superóxido dismutasa mutante, que es el agente putativo que provoca una enfermedad neurodegenerativa como esclerosis lateral amiotrófica (ELA), permite tratar y/o prevenir dicha enfermedad.

[0039] Los inventores también han demostrado por primera vez que la inmunización pasiva con un anticuerpo contra el polipéptido de la superóxido dismutasa mutante permite tratar y/o prevenir dicha enfermedad.

[0040] Por tanto, los inventores describen anticuerpos que se unen específicamente a una superóxido dismutasa 1 (SOD1) anómala. Por superóxido dismutasa 1 anómala se quiere decir una superóxido dismutasa 1 que puede haber mutado, haberse oxidado, agregado, o presentar una conformación alterada y retener una actividad patógena.

[0041] Los anticuerpos se unen específicamente a la SOD1 anómala y neutralizan su efecto patológico cuando se administran a un animal, como un ser humano. Los anticuerpos de la invención se producen como se describe en el ejemplo 2 a continuación.

[0042] Con respecto a los anticuerpos descritos, el término "se unen específicamente a" se refiere a anticuerpos que se unen con una afinidad relativamente alta a uno o más epítomos del polipéptido de la SOD1, pero que sustancialmente no reconocen y se unen a moléculas distintas de los polipéptidos de la SOD1 contemplados por la presente invención. Como se usa en el presente documento, el término "afinidad relativamente elevada" significa una afinidad de unión entre el anticuerpo y el epítipo de interés de al menos 10^6 M^{-1} , y preferentemente de al menos 10^7 M^{-1} aproximadamente e incluso más preferentemente de 10^8 M^{-1} a 10^{10} M^{-1} . La determinación de dicha afinidad se lleva a cabo preferentemente en condiciones de inmunoensayo normales para una unión competitiva, que son conocidas por alguien experto en la materia.

[0043] En una forma de realización preferida, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales de la invención se preparan como se describe en el ejemplo 1 a continuación.

[0044] La presente invención también se refiere a las líneas celulares de hibridoma depositadas en la International Depositary Authority de Canadá el 29 de agosto de 2006 con los números de acceso ADI-290806-01, ADI-290806-02 y ADI-290806-03. En una forma de realización más preferida, los anticuerpos monoclonales de la invención son los anticuerpos monoclonales producidos mediante las líneas celulares de hibridoma con los números de acceso ADI-290806-01, ADI-290806-02 y ADI-290806-03, y denominadas respectivamente, B1G9, C4F6 y D3H5. Como se puede observar en la Figura 7 y en la Tabla 3, los ensayos de ELISA muestran que los anticuerpos monoclonales B1G9 tienen afinidad específica con la SOD1 mutante y no tienen afinidad con la SOD1 normal o de tipo silvestre;

C4F6 tiene una afinidad muy fuerte con la SOD1 mutante y D3H5 tiene afinidad por ambos tipos de proteínas SOD1. En ensayos inmunohistoquímicos específicos, se ha demostrado que C4F6 detecta intensamente especies de la SOD1 en tejidos (médula espinal y muestras de sangre como se puede observar en los ejemplos A y B) extraídos de ratones transgénicos que expresan la SOD1 G93A mutante. Así, como se puede apreciar, los anticuerpos monoclonales de la invención y más específicamente C4F6, D3H5 y B1G9 se unen fuertemente a la SOD1 anómala y más específicamente a la SOD1 mutante y por tanto pueden ser eficaces en la inmunización pasiva.

[0045] Como también se puede apreciar, los anticuerpos de la invención se pueden usar para preparar una composición con el fin de prevenir y/o tratar una enfermedad asociada con anomalías de la SOD1 en un animal. Por tanto, la presente invención también se refiere a una composición para prevenir y/o tratar una enfermedad asociada con anomalías de la SOD1 en un animal. La composición comprende un anticuerpo dirigido contra la SOD1 anómala y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" quiere decir un vehículo para contener la composición de la invención que se puede inyectar en un hospedador sin efectos adversos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados conocidos en la materia incluyen, pero no están limitados a, agua estéril, solución salina, glucosa, dextrosa, o disoluciones tamponadas. Los vehículos pueden incluir agentes auxiliares incluyendo, pero no limitado a, diluyentes, estabilizantes (es decir, azúcares y aminoácidos), conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes tamponantes del pH, aditivos que aumentan la viscosidad, colorantes y similares.

[0046] Los anticuerpos usados en la composición de la invención preferentemente se unen a una proteína SOD1 anómala y más preferentemente a la proteína SOD1 mutante. La composición según la invención, cuando se administra a un animal, tal como un ser humano, conferirá un efecto terapéutico y/o de protección al animal contra una proteína SOD1 anómala y más preferentemente contra una proteína SOD1 mutante. En una forma de realización preferida, el anticuerpo usado en la composición de la invención es un anticuerpo policlonal preparado como en el ejemplo 2 o un anticuerpo monoclonal preparado según el ejemplo 1 a continuación. En una forma de realización incluso más preferida, los anticuerpos monoclonales son C4F6, D3H5 y B1G9.

2. Uso de los anticuerpos y composiciones de la invención

[0047] Según otra forma de realización, los inventores describen el uso de al menos un anticuerpo dirigido contra la SOD1 anómala para prevenir y/o tratar una enfermedad asociada con anomalías de la SOD1 en un animal. Según otra forma de realización más, los inventores describen el uso de al menos un anticuerpo dirigido contra la SOD1 anómala en la preparación de una composición para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad asociada a anomalías de la SOD1 en un animal.

[0048] En una forma de realización preferida, el al menos un anticuerpo dirigido contra la SOD1 anómala es un anticuerpo policlonal o monoclonal y más preferentemente un anticuerpo monoclonal. En una forma de realización incluso más preferida de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal y más preferentemente C4F6, D3H5 y/o B1 G9.

[0049] La cantidad de anticuerpos dirigidos contra la SOD presente en la composición de la invención preferentemente es una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpos dirigidos contra la SOD en la composición de la invención es la cantidad necesaria para permitir que dicha composición desempeñe su papel biológico sin provocar efectos excesivamente negativos en el hospedador al cual se administra la composición. La cantidad exacta de anticuerpos dirigidos contra la SOD1 presente en la composición de la invención a usar y la composición a administrar variará según factores tales como el tipo de dolencia a tratar, la edad y el tamaño del animal a tratar, el modo de administración, así como los otros principios de la composición. La composición de la invención puede estar en forma de disoluciones o suspensiones líquidas; para la administración por vía oral, las formulaciones pueden estar en forma de comprimidos o cápsulas; y para las formulaciones intranasales, en forma de polvos, gotas nasales, o aerosoles.

[0050] Los anticuerpos y/o la composición de la invención se usan para tratar o prevenir una enfermedad asociada a anomalías de la SOD1 en un animal, tal como un ser humano.

[0051] Como se usan en el presente documento, los términos "prevenir" y "que previene" se refieren a un proceso mediante el cual se impide o se retrasa una enfermedad asociada con anomalías de la SOD1.

[0052] Los términos "tratamiento" y "tratar" y similares se usan en el presente documento para referirse de manera general a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o sus síntomas y/o puede ser terapéutico en términos de cura parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. Abarca cualquier

tratamiento de una enfermedad en un animal, y así incluye:

(a) la prevención de que se produzca la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero aún no se ha diagnosticado que la padezca;

5

(b) la inhibición de la enfermedad, es decir, la detención de su desarrollo; o

(c) el alivio de la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad.

10 **[0053]** Mediante el término "tratamiento" también se quiere decir, para los propósitos de esta invención, que los síntomas de la enfermedad asociada con anomalías de la SOD1 se reducen o se eliminan completamente.

[0054] Aquellos que necesitan tratamiento incluyen a los sujetos que ya padecen la enfermedad así como los sujetos propensos a padecer la enfermedad o aquellos en los que se debe prevenir la enfermedad.

15

[0055] Según otra forma de realización más, los inventores describen el uso de al menos un anticuerpo dirigido contra la SOD1 anómala para el diagnóstico de una enfermedad asociada con anomalías de la SOD1 en un animal o para la preparación de una composición para el diagnóstico de una enfermedad asociada con anomalías de la SOD1 en un animal. En una forma de realización preferida, el anticuerpo usado para el diagnóstico es un anticuerpo monoclonal y más preferentemente el anticuerpo monoclonal es C4F6, D3H5 y/o B1G9.

20

3. Kits de la invención

[0056] Según otra forma de realización adicional, la presente invención proporciona un kit para el diagnóstico de una enfermedad asociada con anomalías de la SOD1 en un animal.

25

[0057] Los kits según la invención pueden comprender recipientes, cada uno que contiene uno o más de los diversos componentes que son necesarios para llevar a cabo las pruebas diagnósticas. Los componentes pueden ser compuestos, reactivos, contenedores y/o equipo. Normalmente los reactivos están en forma concentrada. Por ejemplo, un contenedor dentro de un kit puede contener un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a una SOD1 anómala. Se contempla que los kits según la invención sean útiles para la detección y/o cuantificación de proteína SOD1 anómala en muestras biológicas (o de otros tipos). Uno o más contenedores adicionales pueden incluir elementos, como reactivos o tampones, a usar en el ensayo. Dichos kits pueden contener también, o alternativamente, un reactivo de detección como se ha descrito anteriormente que contiene un grupo informador adecuado para la detección directa o indirecta de la unión del anticuerpo.

35

[0058] Como se puede apreciar, el anticuerpo dirigido contra la SOD1 anómala es preferentemente un anticuerpo monoclonal y más preferentemente B1G9 y C4F6 o D3H5. El anticuerpo monoclonal de la invención D3H5 además se puede usar como control en el kit de la invención.

40

[0059] En otra forma de realización adicional, los inventores describen un kit para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada a anomalías de la SOD1 en un animal.

[0060] El anticuerpo dirigido contra la SOD1 anómala contemplado es un anticuerpo que se une específicamente a una superóxido dismutasa 1 (SOD1) anómala y que neutraliza el efecto patológico de la SOD1 anómala cuando se administra a un animal como un ser humano. En una forma de realización preferida de la invención, los anticuerpos del kit de tratamiento o prevención son anticuerpos monoclonales. Incluso más preferentemente, los anticuerpos son B1G9, S4F6 y D3H5.

45

50 4. Procedimiento de tratamiento

[0061] En una forma de realización adicional, los inventores describen un procedimiento para prevenir y/o tratar una enfermedad asociada a anomalías de la SOD1 en un animal tal como un ser humano. El procedimiento comprende la etapa de administración de una cantidad eficaz de una composición.

55

[0062] La composición de la invención se puede administrar a un animal mediante diversas vías de administración. Por ejemplo, la composición se puede administrar en forma de preparaciones inyectables estériles, tales como suspensiones inyectables estériles acuosas u oleaginosas. Estas suspensiones se pueden formular según técnicas conocidas en la materia usando agentes dispersantes o humectantes y agente suspensores adecuados. Las preparaciones inyectables estériles también pueden ser disoluciones o suspensiones inyectables estériles en diluyentes o disolventes no tóxicos parenteralmente aceptables. Se pueden administrar, por ejemplo, por vía

60

parenteral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracapsular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, mediante aerosol o por infusión o por vía oral. Las dosificaciones adecuadas variarán, dependiendo de factores tales como la cantidad de cada uno de los componentes de la composición, el efecto deseado (de corta o de larga duración), la vía de administración, la edad y el peso del animal a tratar. Se puede usar cualquier otro procedimiento muy conocido en la materia para administrar la composición de la invención.

[0063] La presente invención se entenderá más fácilmente en referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son ilustrativos de un amplio espectro de aplicabilidad de la presente invención y no se pretende que limiten su alcance. A pesar de que en la práctica se puede usar cualquier procedimiento y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento para poner a prueba la invención, de aquí en adelante se describirán procedimientos y materiales preferidos.

Ejemplo 1

Generación de anticuerpos monoclonales según las formas de realización preferidas de la invención contra SOD1 mutante

[0064] Se generaron anticuerpos monoclonales de ratón contra SOD1 G93A. Para producir anticuerpos monoclonales contra la SOD1 mutante humana, se inmunizaron ratones BALB/c con la proteína G93A rec. A continuación se derivaron esplenocitos para generar el hibridoma. De seis clones generados, dos clones presentaban inmunorreactividad específica contra SOD1 G93A mediante análisis de ELISA. Un clon denominado C4F6 presentaba reactividad selectiva para especies mutantes de la SOD1 que incluyen G93A, G37R y G85R con una mala reactividad a la SOD1 WT.

Ejemplo 2

Inmunización pasiva mediante infusión intraventricular de anticuerpo dirigido contra hSOD1

[0065] Se inmunizaron ocho ratones hembra C57Bl/6 de 3 meses de edad con proteína SOD1 G93A recombinante humana y el antisuero se purificó por afinidad y se dializó contra una solución salina. El anticuerpo se infundió en los ventrículos a través de una cánula de infusión cerebral conectada a una mini-bomba osmótica (modelo 2004, Alzet). La velocidad de infusión de la bomba fue de 0,25 μ l/h para permitir el tratamiento continuo de los ratones durante 28 días (1,8 μ g/día). El efecto de la inmunización pasiva se evaluó para el peso corporal, la puntuación refleja de los reflejos de los miembros posteriores y la esperanza de vida. Para obtener el antisuero de ratón contra SOD1 mutante, se inmunizaron ocho ratones hembra C57Bl/6 de 3 meses de edad con proteína SOD1 G93A recombinante humana y el antisuero se purificó por afinidad y se dializó contra una solución salina. Dos semanas después de la tercera inmunización, se extrajo toda la sangre y se obtuvo el suero por centrifugación durante 10 minutos a 12.000 g a temperatura ambiente. El suero se purificó por afinidad utilizando una columna de afinidad acoplada previamente a la proteína SOD1 G93A recombinante (kit amino-link, Pierce, Rockford, IL). El anticuerpo se dializó contra solución salina con una concentración de 0,3 mg/ml y se almacenó a -80°C hasta su uso. La titulación y la especificidad de los antisueros se estimó por transferencia de Western. Para el control, los inventores infundieron solución salina o IgG de ratón recogida de ratones C57Bl/6 no tratados. La mini-bomba osmótica (modelo 2004, Alzet) se llenó con 200 μ l de anticuerpo purificado o solución salina control, y se conectó a la cánula de infusión cerebral (calibre 30, 3,0 mm de altura, Alzet, Palo Alto, CA) con un tubo catéter de cloruro de polivinilo de 2,5 cm de longitud. Se anestesiaron ratones transgénicos SOD1 G93A de 85 días de edad con xilazina-ketamina (10 mg/ml). La cánula para la infusión cerebral estéril se implantó estereotáxicamente en el ventrículo derecho. Después de su inserción, la cánula de infusión se fijó con cemento dental. La mini-bomba osmótica se implantó bajo la piel. La velocidad de infusión de la bomba fue de 0,25 μ l/h para permitir el tratamiento continuo de los ratones durante 28 días (1,8 μ g/día). Para verificar que los anticuerpos infundidos intraventricularmente habían penetrado en la médula espinal lumbar, anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra la SOD1 humana (StressGen) o IgG control conejo (Dako) se conjugaron con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Pierce) antes de la infusión con la mini-bomba osmótica. Dieciséis días después de la instalación de la bomba, los ratones se sacrificaron para el análisis de inmunofluorescencia y la transferencia de transferencia de Western para probar la actividad de los anticuerpos residuales de la bomba.

[0066] La medición del peso corporal y el reflejo de los miembros posteriores se utiliza para calificar los efectos clínicos debido a que la prueba rotarod presenta un riesgo de caída como resultado de daños en la bomba. Se valoraron la extensibilidad y el reflejo postural de los miembros posteriores, cuando los ratones se sacaron cogiéndolos de sus colas. Una puntuación de 3 indica extensión completa con un reflejo postural normal. Una puntuación de 2 indica una extensión moderada con un reflejo postural normal. Una puntuación de 1 indica una mala

extensión y reflejo postural, mientras que una puntuación de cero indica que no hay movimiento de los miembros posteriores. La puntuación se llevó a cabo de manera ciega por expertos en animales que no tenían información sobre el tratamiento.

5 Ejemplo 3

Efectos terapéuticos de la inmunización con superóxido dismutasa mutante en modelos murinos de ELA

[0067] Empieza a ser evidente la existencia de vías de secreción convencionales para mutantes de la superóxido dismutasa (SOD1) relacionadas con la ELA y para la neurotoxicidad de la SOD1 mutante extracelular. Esto ha llevado a los inventores a probar protocolos de inmunización con el objetivo de reducir la carga de SOD1 mutante extracelular en tejido nervioso de modelos murinos de ELA, utilizando como inmunógeno proteína mutante SOD1 recombinante purificada de bacterias. La vacunación de ratones hSOD1^{G37R} mediante inyecciones repetidas de adyuvante-SOD1 mutante con una última inyección de refuerzo antes de los síntomas a los seis meses de edad fue eficaz en retrasar la aparición de la enfermedad y extender la esperanza de vida en más de cuatro semanas. El examen al microscopio de las muestras de médula espinal reveló una mayor supervivencia de las células motoras en la fase terminal de la enfermedad y una activación microglial más robusta en ratones hSOD1^{G37R} inmunizados, en comparación con aquellos inyectados con solución salina-adyuvante. Por otra parte, la inmunización pasiva mediante la infusión intraventricular de anticuerpos purificados dirigidos contra hSOD1 con la mini-bomba osmótica alivió los síntomas de la enfermedad y prolongó la esperanza de vida de los ratones hSOD1^{G93A}. La inmunización es un enfoque terapéutico potencial para los casos de ELA familiar causada por mutaciones de la SOD1.

Procedimientos

25 Ratones transgénicos

[0068] Ratones transgénicos portadores de la SOD1 G37R mutante (línea 29), que sobre-expresan 5 veces la proteína SOD1 humana en comparación con la SOD1 endógena de ratón, fueron un generoso regalo del Dr. D. Cleveland (Universidad de California, San Diego). Se adquirieron ratones transgénicos portadores de la SOD1 G93A mutante (B6SJL-TgN[SOD1-G93A]d11Gur) en los laboratorios Jackson. Los ratones se mantuvieron heterocigóticos en los ratones con componente C57Bl/6.

Protocolo de inmunización y análisis del ratón

[0069] Se generó proteína recombinante SOD1 G93A humana y se purificó a partir de bacterias como se ha descrito previamente (Urushotani, y col., 2004 J. Neurochem, 90, 231-244). El estudio se llevó a cabo con ratones de la misma camada de G37R (N = 8 y 7 para ratones vacunados y control, respectivamente), o SOD1 G93A (N = 12 y 8 para ratones vacunados y control, respectivamente). Para el tratamiento de los ratones SOD1 G37R, ocho ratones transgénicos SOD1 G37R (hembras = 5, machos = 3) se vacunaron con SOD1 G93A recombinante, mientras que siete ratones SOD1 G37R (hembras = 4, machos = 3) fueron inyectados con solución salina-adyuvante. Cuatro ratones no transgénicos de la misma camada también fueron tratados con proteína SOD1 G93A recombinante para estimar la reacción adversa y la titulación del suero. La inmunización comenzó a los 2 meses de edad, seguida de dos inyecciones a intervalos de tres semanas con una última dosis de refuerzo a los 6 meses de edad. Doce ratones SOD1 G93A fueron vacunados con G93A rec, mientras que ocho ratones SOD1 G93A fueron inyectados con solución salina-adyuvante. La inmunización se llevó a cabo con adyuvante Ribi (Sigma). Se reconstituyó un vial con 2 ml de solución salina estéril con o sin 500 µg de proteína recombinante SOD1 G93A. Después de la emulsificación con el uso intensivo del vórtex, se inyectaron por vía subcutánea 200 µl de adyuvante-disolución de antígeno (50 µg de proteína para dos sitios). El punto final se define como el tiempo en el que los ratones se vuelven incapaces de darse la vuelta en 30 segundos después de ponerlos de lado. Los datos de supervivencia se analizaron mediante curvas de Kaplan-Meier, la prueba de la esperanza de vida y la prueba de log-rank. La significación estadística de la aparición o la supervivencia medias se analizó mediante la prueba t de Student.

Ensayo de ELISA

[0070] Se midió el título de anticuerpos contra la SOD1 humana de antisuero o de tejidos de médula espinal por ELISA. Se recubrieron placas de 96 pocillos con 1 µg/ml de proteína SOD1 recombinante (WT, G85R, o G93A). Después de bloquear en BSA al 5% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente, se añadió a cada pocillo suero de ratón diluido en serie en TBS que contiene BSA al 1% y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. La detección se realiza con IgG conjugada con peroxidasa dirigida contra ratón y sal de diamonio del ácido 2'-azino bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) como sustrato. La absorción se leyó a una longitud de onda de 405 nm con el lector de ELISA (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se determinó el título de anticuerpos

por la dilución a la mitad del nivel máximo de densidad óptica.

Transferencia de Western

- 5 **[0071]** Se prepararon lisados de toda la médula espinal para la transferencia de Western con el fin de titular los antisueros de los ratones vacunados, o de investigar la cantidad de SOD1 G37R después de la vacunación. Se prepararon lisados de todo el tejido procedente de ratones transgénicos SOD1 G37R y de ratones no-transgénicos de la misma camada por homogeneización en x5 volúmenes de tampón TNG-T compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, glicerol al 10%, Triton X100 al 1% y cóctel de inhibidores de proteasas (Roche). Después de 20 golpes en el homogeneizador Teflon, la suspensión de tejido se centrifuga durante 10 minutos a 1000 x g a 4°C, el sobrenadante se desnatura en tampón de muestras que contiene 2-mercaptoetanol y SDS con ebullición.

- [0072]** Para la titulación de antisueros de ratones vacunados, se utilizaron 25 mg de lisados para la transferencia de Western, usando antisueros a una dilución de 1000 veces procedentes de ratones vacunados o ratones control 15 inyectados con solución salina. Para los controles, las membranas se volvieron a transferir con anticuerpos dirigidos contra SOD1 humana (SOD-100, StressGen) y anticuerpos dirigidos contra actina (Chemicon) disponibles comercialmente. Para analizar la cantidad de proteína SOD1 G37R en la médula espinal de ratones vacunados, se analizaron por transferencia de Western dos cantidades diferentes de proteínas (5 y 10 µg/banda) procedentes de cada ratón, utilizando anticuerpos SOD100, anticuerpos dirigidos contra actina o anticuerpos monoclonales de ratón 20 dirigidos contra SOD1 generados por los inventores (véase Ejemplo 1). La transferencia se detectó usando IgG conjugada con peroxidasa y ensayo quimioluminiscente. Las bandas del Western se escanearon y se analizaron por densitometría usando el *software* Scion Image (Scion Corp. Frederick, MD).

Análisis histoquímico

- 25 **[0073]** Los ratones se perfundieron con paraformaldehído al 4% (PFA), después se fijaron y se incubaron en agente anticongelante. La inmunohistoquímica se realizó siguiendo los protocolos estándar. Las secciones de médula espinal de 25 µm se incubaron con el anticuerpo primario (1:800 para el anticuerpo dirigido contra Mac2) a 4°C durante toda la noche. En el experimento de inmunofluorescencia, las secciones se incubaron con anticuerpo 30 secundario conjugado con un colorante fluorescente (Alexa 488, Molecular Probe) durante 1 hora a temperatura ambiente. Para detectar la inmunoglobulina G endógena en los tejidos de la médula espinal, se añadió IgG dirigida contra ratón conjugada con Alexa 594 junto con otro anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488. Las secciones se sometieron a observación con un microscopio de láser confocal (Olympus, Tokio) en las mismas condiciones de la configuración del *software* (Fluoview, Olympus), incluyendo PMT, ganancia, *offset*, C.A. y HeNe-G. Los 35 anticuerpos primarios se visualizaron con el complejo de avidina-biotina-inmunoperoxidasa (ABC) usando el kit Vectastain ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.) y tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobencidina (DAB, Sigma). El número de neuronas motoras en las secciones de la médula espinal se contó y se promedió a partir de los cinco cortes de cada ratón (n = 4 para cada grupo) teñidos con azul de toluidina (tinción de Nissl).

40 Resultados

La inmunización retrasa la aparición de la enfermedad y la mortalidad en ratones SOD1 G37R

- [0074]** Los inventores probaron un enfoque de vacunación en un modelo de ratón del que se ha informado que 45 sobre-expresa la SOD1 G37R mutante (línea 42) a niveles moderados (~4 veces los niveles de la SOD1 endógena) (24). Como antígeno para la inmunización, los inventores utilizaron SOD1 mutante recombinante humana libre de metales (apo-G93A) purificada de *E. coli* debido a su mal plegamiento y también a su disponibilidad en el laboratorio del solicitante. La inmunización de ratones SOD1 G37R, con 50 µg de proteína SOD1 mutante recombinante o solución salina en adyuvante se inició a los dos meses de edad, seguida de dos inyecciones subcutáneas en 50 intervalos de tres semanas. La última inyección de antígeno- o solución salina-adyuvante se llevó a cabo a los 6 meses de edad (Fig. 1a).

- [0075]** El rendimiento motriz de los ratones SOD1 G37R se evaluó mediante la prueba de rotarod. Como se muestra en la Figura 1B, se produjo una rápida disminución del rendimiento motriz a las 50 semanas para los 55 ratones con ELA inyectados con solución salina-adyuvante, mientras que la disfunción motora se pospuso -3 semanas en ratones ELA vacunados con SOD1 mutante (Fig. 1b). La aparición de la enfermedad, tal como se define por la pérdida de un 30% del rendimiento motriz, se produjo a una media de edad de $53,1 \pm 0,2$ semanas en los ratones con ELA vacunados en comparación con las $50,2 \pm 0,4$ semanas en ratones con ELA inyectados con solución salina-adyuvante (Fig. 1c, $p = 0,0011$). El efecto de la inmunización frente a hSOD1 en la esperanza de vida 60 de ratones con ELA también fue notable, con una media de $60,4 \pm 0,4$ semanas en comparación con las $56,1 \pm 0,74$ semanas para los ratones control inyectados con solución salina-adyuvante (Fig. 1d, $p < 0,0001$). Por lo tanto, el

enfoque de inmunización amplió la longevidad de los ratones con ELA en 4,3 semanas.

Atenuación de la pérdida de neuronas motoras y microgliosis mejorada en los ratones con ELA inmunizados

- 5 **[0076]** Para investigar si la inmunización con SOD1 mutante producía neuroprotección, los inventores determinaron el número de neuronas motoras con tinción de Nissl en secciones de la médula espinal de ratones SOD1 G37R en la fase final de la enfermedad (Fig. 1e). El número de neuronas motoras espinales restantes en ratones con ELA tratados con solución salina-adyuvante corresponde al $24,1 \pm 2,0$ por ciento del número de neuronas motoras en ratones no transgénicos de la misma camada. En comparación, los ratones con ELA en la fase
- 10 final vacunados con SOD1 mutante presentaban más neuronas motoras supervivientes, con un número de neuronas motoras restantes que corresponden al $41,9 \pm 3,1$ por ciento. La inmunohistoquímica con anticuerpos dirigidos contra NeuN también reveló más neuronas motoras supervivientes en la fase final en la médula espinal de ratones con ELA vacunados en comparación con los ratones control tratados con adyuvante-solución salina (Fig. 1f).
- 15 **[0077]** Para investigar si la vacuna iba acompañada de una respuesta neuroinflamatoria mejorada, se inmunotifieron secciones de la médula espinal de ratas con anticuerpos monoclonales de rata dirigidos contra Mac2, un marcador de microglía activada. Los estudios de microscopía mostraron una activación microglial mayor en los ratones con ELA inmunizados con SOD1 mutante en comparación con ratones con ELA inyectados con solución salina-adyuvante (Figura 2a). La señal de inmunofluorescencia para anticuerpos dirigidos contra Mac2, seguida de
- 20 anticuerpos IgG dirigidos contra rata conjugados con Alexa 488 fue mayor en muestras de la médula espinal procedentes de ratones vacunados con ELA que en ratones inyectados con solución salina-adyuvante (Fig. 2b-e). Los inventores también examinaron las señales de inmunofluorescencia para la inmunoglobulina G endógena (IgG) en muestras de médula espinal utilizando IgG dirigida contra ratón conjugada con fluorescente rojo (Alexa 594). La señal de inmunodetección para IgG endógena fue mayor en las muestras procedentes de ratones vacunados. Cabe
- 25 señalar que gran parte de la señal de la IgG estaba colocalizada con células de la microglía (Figura 2b-e, centro).

Correlación entre el título de anticuerpos y la longevidad de los ratones SOD1 G37R

- [0078]** Se determinaron los títulos de anticuerpos en el suero de ratones con ELA a los 4 meses de edad y en la
- 30 fase final de la enfermedad por ELISA utilizando SOD1 G93A recombinante como antígeno (Tabla 1). A pesar de que los animales recibieron la última inyección del antígeno a los 6 meses de edad en el grupo de inmunización temprana, el título de anticuerpos dirigidos contra la SOD1 G93A recombinante se mantuvo alto en los ratones vacunados hasta la fase final de la enfermedad (Fig. 3a, Tabla 1). Se observaron unos títulos de anticuerpos más bajos contra la SOD1 G93A mutante en ratones no transgénicos de la misma camada inyectados con G93A rec (Fig. 3a, Tabla 1). Por otra parte, el diagrama de dispersión de la Figura. 3b revela una correlación directa entre el título de anticuerpos en el suero a los 4 meses de edad y la esperanza de vida de los ratones con ELA (analizados significativamente por la rho de Spearman, $P = 0,0011$). Esto sería consistente con un efecto terapéutico de los anticuerpos contra la SOD1 mutante.
- 40 **[0079]** Se llevó a cabo el análisis por inmunotransferencia para demostrar que los antiseros procedentes de ratones inmunizados con la proteína SOD1 G93A recombinante mutante eran capaces de reconocer la proteína SOD1 G37R mutante. A diferencia de los ratones inyectados con solución salina-adyuvante, los ratones sometidos a inmunización produjeron antiseros que daban fuertes señales en las inmunotransferencias de la proteína SOD1 G37R procedente de muestras de la médula espinal de ratones con ELA (Fig. 3c). Por otra parte, los inventores
- 45 observaron que los antiseros procedentes de ratones con ELA vacunados con G93A rec producían una mayor reactividad a SOD1 G85R que a SOD1 WT (Fig. 3d, Tabla 2). Por el contrario, los antiseros procedentes de ratones SOD1 G37R vacunados con la proteína SOD1 WT recombinante (WT rec) presentaban títulos bajos contra las formas mutantes de la SOD1 (Fig. 3d, Tabla 2). Estos datos muestran que anticuerpos generados con formas mutantes de la SOD1 reconocen preferentemente las formas mal plegadas de SOD1.
- 50

Análisis de los lisados de médula espinal de ratones vacunados para detectar la presencia de anticuerpos dirigidos contra SOD1

- [0080]** Ratones SOD1 G37R inmunizados con G93A rec-adyuvante, o con suero salino-adyuvante se sacrificaron
- 55 a los 7 meses de edad, cuando los títulos de anticuerpos eran los más altos, y a continuación se fraccionaron lisados de médula espinal en las fracciones citosólicas, de la membrana ligera y pesada. El análisis de ELISA demostró títulos elevados de anticuerpos contra la SOD1 G93A rec en tanto en fracciones de membrana de médula espinal solubles en tampón sin detergente y solubles en TritonX100 al 1% procedentes de ratones vacunados con G93A rec-adyuvante (Fig. 3e).
- 60

Evidencia del aclaramiento de especies de SOD1 en la médula espinal de ratones vacunados

[0081] Para examinar el efecto de la inmunización en el aclaramiento de especies de SOD1 G37R, se analizaron lisados totales de médula espinal por transferencia de Western utilizando un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra SOD1 humana (SOD100) o un anticuerpo monoclonal preferido de la invención (C4F6) con especificidad para las especies mutantes de la SOD1 generadas por nosotros mismos. El anticuerpo monoclonal C4F6 se produjo utilizando procedimientos estándar descritos anteriormente después de la inmunización de ratones con la proteína G93A rec (véase Ejemplo 1). Curiosamente, este anticuerpo monoclonal reconoce la SOD1 G93A y en menor medida otras formas mutantes de la SOD1, incluyendo G37R y G85R (Fig. 4a, b). Sin embargo, el C4F6 presenta una reactividad muy pobre a la SOD1 WT (Fig. 4a). El análisis de transferencia de Western de los lisados de médula espinal utilizando el anticuerpo monoclonal C4F6 reveló menor cantidad de especies mutantes de la SOD1 en ratones vacunados, en comparación con ratones control con adyuvante-solución salina (Fig. 4c, d). Por el contrario, con el uso del anticuerpo policlonal dirigido contra SOD1 humana (SOD100), no hubo diferencias en los niveles de SOD1 entre animales vacunados y el grupo control (Fig. 1c). Estos resultados sugieren que la inmunización mejoró la enfermedad de los ratones G37R reduciendo la carga del subgrupo de SOD1 mutante, presumiblemente especies mal plegadas detectables con el anticuerpo monoclonal C4F6.

Efectos limitados de la vacunación en ratones con ELA que expresan niveles extremos de SOD1 mutante

[0082] Los resultados anteriores demuestran los efectos beneficiosos de la inmunización activa mediante un modelo de aparición tardía de la ELA, la línea de ratón SOD1 G37R que sobre-expresa moderadamente la SOD1 mutante en unas 5 veces aproximadamente. Posteriormente se probó el efecto de la vacunación con los ratones SOD1 G93A ampliamente utilizados (B6SJL-TgN[SOD1-G93A]1Gur) que sobre-expresan el ARNm de SOD1 mutante en 40 veces y las proteínas en 17 veces. Como resultado, estos ratones desarrollan rápidamente síntomas de ELA a los 90 días de edad que evolucionan hasta la muerte a los 130 días.

[0083] La inmunización activa se realizó con el mismo protocolo descrito anteriormente utilizando SOD1 G93A recombinante como antígeno. Sin embargo, este enfoque de vacunación no llegó a alterar de manera significativa la aparición clínica de la enfermedad y la esperanza de vida de ratones SOD1 G93A (Fig. 5a, b). Una explicación razonable para el fracaso del enfoque de la vacunación con este modelo de ratón con ELA es que la cantidad de anticuerpos dirigidos contra SOD1 que pasó la barrera hematoencefálica no fue suficiente para neutralizar esos niveles extremos de proteínas SOD1 mutantes en el tejido nervioso.

[0084] Como enfoque alternativo, se probó una estrategia de inmunización pasiva en ratones SOD1 G93A basándose en la infusión intraventricular directa de anticuerpos con una mini-bomba osmótica (bomba Alzet, Durect). Los antisueros para el enfoque de la inmunización pasiva se obtuvieron de ratones C57Bl/6 vacunados con SOD1 mutante humana recombinante como se ha descrito anteriormente. Después de la purificación por afinidad y diálisis contra solución salina (Fig. 5c), se infundió la solución de anticuerpos o una solución salina control en el espacio intraventricular de ratones SOD1 G93A presintomáticos (85 días de edad, N = 5 para anticuerpos dirigidos contra SOD1, N = 5 para el control) usando una mini-bomba osmótica con una duración de 28 días (bomba Alzet, Durect, Cupertino, CA). La progresión de la enfermedad se controló por el perfil temporal del peso corporal y la puntuación de reflejos de las extremidades posteriores (véase Procedimientos). Para verificar el enfoque y la penetración de los anticuerpos en la médula espinal lumbar, los inventores llevaron a cabo en primer lugar la infusión intraventricular de anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra SOD1 humana conjugado con FITC. Dieciséis días después de la instalación de la bomba, los ratones se sacrificaron para el examen de la médula espinal por inmunohistoquímica. El estudio de inmunofluorescencia reveló que el anticuerpo dirigido contra SOD1 humana marcado con FITC se detecta con frecuencia en las neuronas espinales con una distribución vesicular (Fig. 6a, puntas de flecha) y ocasionalmente en la microglía activa (flechas Fig. 6a). Esto fue menos evidente en el control de la infusión de IgG-FITC (Fig. 6a, derecha). El anticuerpo residual en la mini-bomba se recogió y se analizó por transferencia de Western. Los resultados muestran que el anticuerpo se mantuvo activo incluso después de 16 días de implantación subcutánea de la mini-bomba (Fig. 6b). El enfoque de la inmunización pasiva retrasó significativamente tanto la pérdida de peso corporal como el deterioro de los reflejos de las extremidades posteriores (Fig. 5d, e. $P < 0,05$, ANOVA de dos vías). Por otra parte, la supervivencia media de los ratones inmunizados fue de 143 días, mientras que la de los ratones control es de 135 ($P = 0,0256$, prueba de esperanza de vida de Kaplan-Meyer y prueba de log-rank). La esperanza de vida media de los ratones vacunados fue de $141 \pm 1,4$ mientras que la de los ratones control fue de $135 \pm 1,5$ (media $\pm$ error estándar de la media, $P < 0,05$ en la prueba t de Student), dando lugar a una prolongación significativa de la esperanza de vida en 1 semana.

Ejemplo 4

60 Reactividad de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra SOD1 de acuerdo con formas de realización preferidas de la invención.

ELISA para 6 anticuerpos monoclonales dirigidos contra SOD1

[0085] Se recubrieron placas de pocillos con 1 µg/ml de proteína SOD1 recombinante (WT o G93A). Tras el bloqueo en BSA al 5% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente, se añadió suero de ratón diluido en serie en TBS que contiene BSA al 1% (1/2, 1/10, 1/20 y 1/40) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. La detección se realiza con IgG dirigida contra ratón y conjugada con peroxidasa y sal de diamonio del ácido 2'-azino bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) como sustrato. La absorción se leyó a 450 nm.

[0086] Como se desprende de la Figura 6 y la Tabla 3, los clones B1 G9 y C4F6 de los anticuerpos monoclonales presentan reactividad específica para la SOD1 mutante, mientras que otros clones mostraron reactividad para las formas normal o mutante de la SOD1. El clon D3H5 tiene una gran afinidad por las especies normal y mutante de la SOD1.

Ejemplo 5**Detección inmunohistoquímica específica de las especies mutantes de la SOD1 en muestras de médula espinal de ratón por un anticuerpo monoclonal preferido de la invención (C4F6).**

[0087] Ratones normales o ratones transgénicos que expresan la SOD1 WT humana (J2429) o la SOD1 mutante humana (G93A o G37R) se perfundieron con paraformaldehído al 4% (PFA), a continuación se fijaron y se incubaron en agente anticongelante. Las secciones de la médula espinal de 25 µm obtenidas de ratones transgénicos SOD1 mutante presintomáticos (G37R y G93A) o ratones transgénicos SOD1 WT humana se tiñeron con anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra SOD1 humana (clon C4F6). Para ello, las secciones de médula espinal se incubaron con el anticuerpo primario (1:500 para el anticuerpo C4F6) a 4°C durante toda la noche seguida de anticuerpo biotinilado dirigido contra IgG. Los anticuerpos primarios se visualizaron con el método del complejo avidina-biotina-inmunoperoxidasa (ABC) usando el kit Vectastain ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.) y tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobencidina (DAB, Sigma).

[0088] La inmunotinción se detectó en muestras de ratones transgénicos que expresan especies mutantes de la SOD1 (G93A y G37R), pero no en ratones que expresan SOD1 WT humana (J2429) (Figura 15).

Ejemplo 6**Especificidad de un anticuerpo monoclonal preferido de la invención (C4F6) para las formas mutantes de la SOD1.**

[0089] Con referencia a la Figura 16, los inventores han demostrado que la vacunación con SOD1 mutante puede conferir protección al reducir la cantidad de especies de la SOD1 mutante en el SNC reactivas a anticuerpos C4F6.

[0090] La Figura 16a muestra el análisis de transferencia de Western, que muestra que el anticuerpo monoclonal de ratón C4F6 reconoce las formas mutantes de la SOD1 (G37R y G93A), pero no la SOD1 WT procedente de extractos de médula espinal de ratones transgénicos. La Figura 16b muestra el análisis de ELISA que muestra que el anticuerpo monoclonal C4F6 detecta la proteína SOD1 G85R metalada, pero no la proteína SOD1 WT metalada recombinante. Y por último, la Figura 16c muestra el análisis de transferencia de Western de extractos de médula espinal que presentan una menor cantidad de especies mutantes de la SOD1 detectadas por el anticuerpo C4F6 en ratones vacunados, en comparación con ratones control con adyuvante-solución salina. Se cargaron cinco y diez microgramos de proteína de cada ratón en cada pocillo para el análisis de transferencia de Western. Se analizaron tres ratones procedentes del grupo de ratones vacunados y del grupo inyectado con solución salina.

Ejemplo 7**Selección de mutantes de la SOD1 por transferencia de Western de muestras de sangre utilizando un anticuerpo monoclonal preferido de la invención (C4F6).**

[0091] Las muestras de sangre (100 µl) de ratones transgénicos que expresan SOD1 G93A mutante, que expresan SOD1 WT humana o tomadas de ratones normales se centrifugaron durante 15 minutos a 1000 x g a 4°C. El sedimento se incubó en Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) durante 1 h en hielo. Las muestras se centrifugaron durante 20 min a 20.000 x g a 4°C y el sobrenadante se recogió y se llevó a ebullición en SDS-tampón de muestras durante 5 min. Las muestras se fraccionaron en SDS-PAGE y se transfirieron de acuerdo con los procedimientos estándar.

Para la detección de las bandas, las transferencias se trataron con IgG conjugada con peroxidasa y ensayo quimioluminiscente.

[0092] Con referencia a la Figura 17, el panel superior muestra las inmunotransferencias de muestras de sangre usando el anticuerpo monoclonal C4F6 procedente de ratones normales (1-5), procedente de ratones que expresan SOD1 G93A mutante (bandas 6-10) y procedente de ratones que expresan SOD1 WT humana (bandas 11-14). El panel inferior presenta las inmunotransferencias de muestras de sangre usando anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra SOD1 humana (StressGen, Victoria, BC) procedente de ratones normales (1-5), procedente de ratones que expresan SOD1 G93A mutante (bandas 6-10) y procedente de ratones que expresan SOD1 WT humana (bandas 11-14).

[0093] La Figura 17 muestra que el anticuerpo monoclonal C4F6 detecta las especies mutantes de la SOD1 (G93A), pero no las SOD1 WT normales en muestras de sangre de ratones transgénicos que expresan genes de la SOD1 humana. Los resultados demuestran que este anticuerpo se puede utilizar para la selección diagnóstica de especies mutantes de la SOD1 mediante un simple análisis de sangre.

Ejemplo 8

Detección por inmunohistoquímica de especies de la SOD1 WT o mutantes en muestras de médula espinal de ratón por un anticuerpo monoclonal preferido de la invención (D3H5).

[0094] Ratones normales o ratones transgénicos que expresan la SOD1 WT humana (J2429) o la SOD1 mutante humana (G93A o G37R) se perfundieron con paraformaldehído al 4% (PFA), a continuación se fijaron y se incubaron en agente anticongelante. Las secciones de la médula espinal de 25 µm obtenidas de ratones transgénicos SOD1 mutante presintomáticos (G37R y G93A) o ratones transgénicos SOD1 WT humana se tiñeron usando un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra SOD1 humana preferido de la invención (D3H5). Para ello, las secciones de médula espinal se incubaron con el anticuerpo primario (1:500 para el anticuerpo D3H5) a 4°C durante toda la noche seguida de anticuerpo biotinilado dirigido contra IgG. Los anticuerpos primarios se visualizaron con el método del complejo avidina-biotina-inmunoperoxidasa (ABC) usando el kit Vectastain ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.) y tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobencidina (DAB, Sigma) (Figura 18).

Ejemplo 9

La SOD1 de tipo silvestre adquiere las propiedades tóxicas y de unión de las formas mutantes relacionadas con ELA mediante la oxidación.

Materiales y procedimientos

Plásmidos y anticuerpos

[0095] Se generaron plásmidos de expresión de mamíferos que portan la SOD1 humana marcada con FLAG (pcDNA3-FLAG-SOD1) o cromogranina B de ratón marcada con HA (pcDNA3-CgB-HA) como se ha descrito previamente por Urushitani y col., 2006, Nature Neurosc, 9, 108-118. Los anticuerpos monoclonales de conejo dirigidos contra la SOD1 humana (SOD-100) y los anticuerpos monoclonales Hsp/Hsc70 de ratón se adquirieron en StressGen (Victoria, BC). Los anticuerpos monoclonales de rata dirigidos contra HA (3F10), los anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra los neurofilamentos H no fosforilados (SMI32), y los anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra actina (C4) se adquirieron en Roche (Basilea, Suiza), Steinberger Monoclonal Inc. (Baltimore, MA) y Chemicon (Temecula, CA). Los anticuerpos dirigidos contra la cromogranina B (26102) y la COX-IV (A-6431) se adquirieron en QED Bioscience (San Diego, CA) y Molecular Probes (Eugene, OR). Los anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra la syntaxina 1 (HPC1) y la Akt1 (B-1) procedían de Santa Cruz (Santa Cruz, CA). Los anticuerpos policlonales de conejo contra TGN-38 de ratón/rata se generaron como se ha descrito previamente por Urushitani y col., 2006, Nature Neurosc, 9, 108-118.

Cultivos, transfección y tratamiento farmacológico

[0096] Las células Neuro2a de la línea celular de neuroblastoma murino se mantuvieron en medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM) que contiene suero fetal bovino al 10% (FBS). Las transfecciones se realizaron usando Lipofectamin PLUS (Invitrogen, Carlsbad, CA) según el protocolo del fabricante. A las 3 horas de la transfección, el medio se reemplazó con medio nutritivo que contiene dibutilil AMP-cíclico 2 mM (db-AMPC). A las 24 horas de la transfección, las células se expusieron a peróxido de hidrógeno 1,5 mM (H₂O₂) o agua estéril (control) durante 45 minutos para su posterior análisis. Las células BV2 de la línea celular microglial murina se mantuvieron

en medio DMEM/F12 de Ham (DF), que contiene FBS al 10%. A excepción del cultivo en placa inicial, no se incluyeron antibióticos en el medio de cultivo.

Inmunotransferencia e inmunoprecipitación

5
[0097] Las células cultivadas se lavaron dos veces con PBS y se recogieron en tampón TNG-T que consiste en Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, glicerol al 10%, Triton X-100 al 1% y un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche, Mannheim, Alemania). Después de 1 hora de incubación en hielo, la suspensión celular se centrifugó (15.000 rpm durante 20 minutos), y se recogió el sobrenadante. Para investigar el efecto del tratamiento con H₂O₂ sobre la célula, los lisados se incubaron con gel de afinidad anti-FLAG (M2, Sigma, St. Louis, MO) durante 1 hora a 4°C. Los inmunoprecipitados se eluyeron en SDS-tampón de muestras al 4%, y se separaron por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE desnaturalizante) y se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (PerkinElmer, Boston, MA) para el análisis de Western. Se obtuvo la imagen de la transferencia de Western usando un reactivo de iluminación por quimioluminiscencia para Western (PerkinElmer).

Ubiquitinación *in vivo*

[0098] Se investigó la modificación de la SOD1 humana mediante la cadena de la poli-ubiquitina con un experimento de ubiquitinación *in vivo* (ver Urushitani y col., 2002, J. Neurochem 83, 1030-1042). Células Neur2a se cotransfectaron con la hSOD1 marcada con FLAG (WT o mutante G93A) y ubiquitina marcada con HA. Después de la exposición al H₂O₂, las células se recogieron en tampón TNG-T que contiene un cóctel de inhibidores de proteasas en el mismo protocolo mencionado anteriormente. Los lisados se inmunoprecipitaron utilizando gel de afinidad anti-FLAG (M2, Sigma), y los eluidos procedentes de las inmunoperlas se analizaron por transferencia de Western utilizando anticuerpos dirigidos contra HA (Roche) y anticuerpos dirigidos contra SOD1 humana (StressGen).

Purificación de proteínas recombinantes

[0099] Se generó glutatión S-transferasa recombinante fusionada a hSOD1 (GST-hSOD1) según el procedimiento de Urushitani y col., 2002, J. Neurochem 83, 1030-104. La metalación de la hSOD1 se llevó a cabo mediante la incubación durante toda la noche con ZnCl₂ 20 mM y tres horas de incubación con CuCl₂ 20 mM, seguida de diálisis durante toda la noche contra PBS. Por otra parte, la oxidación de la holo-hSOD1 recombinante se llevó a cabo con una hora de incubación a temperatura ambiente con H₂O₂ 0,1 mM, seguida de diálisis contra PBS durante toda la noche. Las proteínas recombinantes se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Fraccionamiento subcelular

[0100] Células Neuro2a se transfectaron transitoriamente con la SOD1 marcada con FLAG (WT y G93A) en placas de cultivo de seis pocillos. 24 horas después de la transfección, las células se trataron con peróxido de hidrógeno 1,5 mM en DMEM durante 30 minutos, y posteriormente se incubaron en medio nutritivo eliminando el H₂O₂ durante 30 minutos más. Las células recogidas se homogeneizaron en tampón de homogeneización (sacarosa 250 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), MgCl₂ 1 mM y cóctel de inhibidores de proteasas), y se centrifugaron durante 15 min a 1000 g para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se centrifugó adicionalmente a 8.000 g durante 15 minutos para separar los sedimentos (fracción de la membrana pesada) y el sobrenadante. El sobrenadante se sometió a ultracentrifugación a 105.000 g durante 60 minutos para obtener la fracción citosólica (sobrenadante) y la fracción de la membrana ligera (sedimento). Cada fracción de sedimentos se resuspendió en el tampón de homogeneización que contiene Triton-X100 al 1% con sonicación breve. Después de determinar la concentración de proteínas con el ensayo de Bradford (BioRad, Hercules, CA) se analizaron cantidades iguales de proteína por transferencia de Western.

RT-PCR semi-cuantitativa

[0101] Células BV2 de la línea celular microglial murina al 90% de confluencia en placas de cultivo de seis pocillos se trataron con PBS, LPS (10 µg/ml), SOD1 WT (10 µg/ml), SOD1 WT oxidada (10 µg/ml) o con SOD1 G93A (10 µg/ml) durante 24 horas. Todas las proteínas SOD1 recombinantes se habían metalado previamente. El ARN total se extrajo de los lisados de células totales utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Se sintetizó la primera cadena de ADNc a partir de ARN total usando la transcriptasa inversa y el cebador oligo-dT (Invitrogen). Se estimó por PCR el nivel de expresión del factor de necrosis tumoral (TNF-α), la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y el GAPDH. Los pares de cebadores utilizados en este experimento son 5' TCAGTGAGACCACTGCAATG 3' (SEQ ID NO1) y 5' GTGGAGTGAGACTTTGGATG 3' (SEQ ID NO 2) para el TNF-α; 5' CCTTGTGTCAGCCCTCAGA 3' (SEQ ID NO 3) y 5' CACTCTCTTGCGGACCATCTC 3' (SEQ ID NO 4) para la

iNOS y por último 5' GGCATTGTGGAAGGGCTCA 3' (SEQ ID NO 5) y 5' TCCACCACCCTGTTGCTGT 3' (SEQ ID NO 6) para el GAPDH.

Cultivo primario de médula espinal de ratón embrionario

5
[0102] Se prepararon cultivos primarios disociados de médula espinal de ratón embrionario como se describe por Urushitani y col., 2002, J. Neurochem 83, 1030-104. Doce días después de la puesta en placa, los cultivos se trataron con proteínas recombinantes (SOD1 WT humanas, SOD1 WT humanas oxidadas y SOD1 G93A humanas durante 24 horas, seguido de fijación en paraformaldehído al 4% (PFA)). La viabilidad de la neurona motora se estimó mediante inmunocitoquímica, utilizando anticuerpos dirigidos contra neurofilamentos H no fosforilados (SMI32, 1:500). Las neuronas motoras se identificaron como neuronas de gran tamaño inmunorreactivas a SMI32 (> 20 µm) con un solo axón largo que se extiende. Se utilizó IgG dirigida contra ratón conjugada con Alexa 488 como anticuerpo secundario. Los cultivos se observaron bajo microscopio de fluorescencia y se obtuvieron cuatro imágenes de campo seleccionadas al azar procedentes de 3 cultivos hermanos. Se obtuvo el número de neuronas motoras de cada campo y se calculó la densidad celular (células/cm²).
10
15

Resultados

Mal plegamiento de la SOD1 WT por el estrés oxidativo

20
[0103] Para probar la hipótesis de que la SOD1 puede ser una proteína diana del estrés oxidativo en la neurodegeneración, los inventores trataron proteínas SOD1 recombinantes purificadas de bacterias (WT, G85R y G93A) con peróxido de hidrógeno 1 mM (H₂O₂) durante 30 min a 37°C y se analizó su patrón de migración y solubilidad. El análisis de Western de las fracciones totales de SOD1 recombinante tratadas con H₂O₂ mostró un cambio notable en el patrón de la migración, la fragmentación y la formación de un agregado de elevado peso molecular (Fig. 10A, bandas 2, 4 y 6). Por otra parte, la ultracentrifugación de la proteína recombinante después del tratamiento con H₂O₂ reveló que dichas especies relacionadas con la oxidación se detectaban exclusivamente en la fracción de los sedimentos, pero no en el sobrenadante (Fig. 10B). Sólo se han detectado especies monoméricas y dimericas de la SOD1 en el sobrenadante. Aunque la SOD1 WT es menos susceptible al estrés oxidativo que la SOD1 mutante, el cambio molecular obtenido en el análisis de Western es, sin duda, similar a los mutantes. Estos resultados *in vitro* indican que la oxidación afecta al mal plegamiento y la agregación de la SOD1 WT, así como a la SOD1 mutante. Los resultados de acuerdo con la presente invención son consistentes con el informe anterior que muestra que la oxidación de la SOD1 WT promueve su agregación *in vitro* analizada mediante ensayos de dispersión de luz. Para investigar más a fondo la oxidación de la SOD1 WT *in vivo*, se transfectaron células Neuro2a con SOD1 WT y G93A marcadas con péptidos FLAG en el N'-término y se expusieron a H₂O₂ 1,5 mM durante 45 minutos 24 horas después de la transfección. A continuación, el ensayo de inmunoprecipitación de los lisados de las células transfectadas utilizando gel de afinidad anti-FLAG reveló que la Hsp/Hsc70 había co-inmunoprecipitado con G93A mutante, SOD1 WT oxidada, pero no con la SOD1 WT no oxidada (Fig. 11A). Se concluye que la oxidación de H₂O₂ provoca el mal plegamiento de la SOD1 WT con la consiguiente interacción con la Hsp/Hsc70.
30
35
40

La SOD1 WT oxidada se puede conjugar con poli-ubiquitina

[0104] La mayoría de los tipos proteínas SOD1 mutantes relacionadas con la ELA se degradan por la vía de la ubiquitina-proteasoma. En base a esta idea, los inventores realizaron el experimento de ubiquitinación *in vivo* para investigar si la oxidación transforma la proteína SOD1 WT en especies mal plegadas adecuadas para la poli-ubiquitinación. Se transfectaron células Neuro2a con SOD1 WT o G93A marcadas con FLAG junto con ubiquitina marcada con HA y a continuación se expusieron a H₂O₂ 1,5 mM durante 45 minutos antes de la recogida. El análisis de transferencia de Western de los lisados de células totales y los inmunoprecipitados anti-FLAG muestran que la SOD1 WT en células tratadas con H₂O₂ se conjugaban con la cadena de multi-ubiquitina a diferencia de la SOD1 WT procedente de células no tratadas. Se observó el mismo fenómeno con la SOD1 G93A mutante (Fig. 11 B).
45
50

La SOD1 WT oxidada interacciona con la cromogranina B

[0105] Los inventores han identificado previamente a la cromogranina B (CgB) como par de unión de la SOD1 mutante. Se ha encontrado que las cromograninas interaccionan y promueven la secreción de especies mutantes de la SOD1. Para probar si las especies de SOD1 WT oxidadas pueden interaccionar con las cromograninas, se transfectaron células Neuro2a con SOD1 WT o G93A marcadas con FLAG junto con CgB marcada con HA de ratón. A las 24 horas de la transfección, las células se expusieron a H₂O₂ 1,5 mM durante 45 minutos antes de la recogida. El análisis de transferencia de Western de los lisados de células Neuro2a fraccionadas mostró que tanto la SOD1 WT como mutante se distribuían en la fracción microsomal en donde CgB se expresa abundantemente (Fig. 12A). El tratamiento con peróxido de hidrógeno no afectó a los niveles de proteína de la SOD1 WT y mutante en fracciones
55
60

subcelulares. Los lisados celulares totales se inmunoprecipitaron con gel de afinidad anti-FLAG y se analizaron por transferencia de Western. Como se muestra en la Fig. 12B, la CgB co-inmunoprecipitó con SOD1 G93A o con SOD1 WT oxidada, pero no con la SOD1 WT intacta. Este resultado indica que la oxidación de la SOD1 WT, que se distribuye en los compartimentos del retículo endoplasmático-Golgi, induce su unión a cromograninas.

5

La SOD1 WT oxidada puede inducir la activación microglial y la muerte de las neuronas motoras

[0106] Existen evidencias de que son secretadas ambas especies de SOD1 WT y mutante. Sin embargo, a diferencia de la SOD1 WT, la SOD1 secretada mutante induce moléculas proinflamatorias como el TNF- α , la iNOS y la COX2. Para examinar si la SOD1 WT oxidada puede mimetizar la SOD1 mutante en la activación de la microglía, se expusieron células BV2 microgliales murinas a holo-SOD1 recombinantes purificadas de bacterias que se trataron con H₂O₂ o se dejaron sin tratar. El experimento de RT-PCR semi-cuantitativa reveló que la exposición de células BV2 a SOD1 G93A o SOD1 WT oxidada induce la expresión de TNF- α e iNOS (Fig. 13).

[0107] A diferencia de la SOD1 WT, la SOD1 mutante extracelular puede inducir la muerte de neuronas motoras cultivadas, incluso en ausencia de microglía. Aquí, cultivos de médula espinal embrionaria se expusieron a SOD1 WT recombinante, SOD1 WT oxidada o SOD1 G93A (0,5 y 1,0 μ g/ml) durante 24 horas. Como era de esperar, la SOD1 WT no era tóxica para las neuronas motoras en este intervalo de concentraciones. Sin embargo, las SOD1 WT oxidadas presentaban toxicidad a neuronas motoras cultivadas en una forma dependiente de la dosis como la SOD1 mutante G93A (Fig. 14). Los inventores también observaron la activación microglial en el cultivo mixto caracterizado por una morfología de células grandes ameboides (datos no mostrados). Estos resultados indican que la SOD1 WT oxidada adquiere la propiedad neurotóxica de especies mutantes de la SOD1.

Discusión

25

[0108] De los resultados presentados en el presente documento, los inventores han llegado a la conclusión de que la SOD1 WT adquiere, a través de la oxidación, muchas de las propiedades tóxicas y de unión de la SOD1 mutante asociada a la ELA. Esta conclusión se apoya en los siguientes resultados: 1) la SOD1 WT recombinante tratada con H₂O₂ produjo agregados similares a los de las especies mutantes de la SOD1, 2) la oxidación induce el mal plegamiento de la SOD1 WT según lo revelado por la interacción con la Hsp/Hsc70 y por la multi-ubiquitinación, 3) la SOD1 WT oxidada se distribuye en fracciones de membrana e interacciona con la proteína CgB neurosecretora en las células neuronales transfectadas y, 4) la SOD1 WT oxidada extracelular provocó la activación de la microglía y la muerte de las neuronas motoras cultivadas.

[0109] Existen múltiples evidencias de la implicación del estrés oxidativo en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, el Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica. Teniendo en cuenta la abundancia de la SOD1 que comprende el 1% de la proteína total, y su papel como antioxidante, es posible que la SOD1 pueda ser una diana del estrés oxidativo en enfermedades neurodegenerativas. En realidad, la oxidación de la SOD1 WT es un fenómeno bien establecido. El H₂O₂ puede interaccionar con el sitio activo de la SOD1 WT y puede inactivar la enzima mediante la producción de radicales hidroxilo. Rakhit y col., (2004, J. Biol. Chem., 279, 15499-15504) han encontrado que la SOD1 WT posee cuatro aminoácidos propensos a la oxidación (His48, 80, 120 y Phe20) y que su oxidación provoca la agregación de la SOD1. Además, la oxidación de los restos de cisteína en la SOD1 WT también puede provocar su mal plegamiento y la agregación a través de los disulfuros intermoleculares.

[0110] Los resultados según la presente invención demuestran que la SOD1 WT oxidada interacciona con la proteína neurosecretora CgB al igual que las formas mutantes de las SOD1. Una vez secretada al medio, la SOD1 WT oxidada extracelular activa las células microgliales y provoca la muerte de las neuronas motoras (Fig. 14). Dicho modelo de toxicidad basado en la SOD1 WT oxidada o mutante secretada es compatible con la opinión de que la enfermedad no es estrictamente autónoma de las neuronas motoras y que hay múltiples tipos de células que contribuyen a la enfermedad, incluyendo neuronas motoras, interneuronas, microglía y astrocitos. Esto también explica cómo se puede propagar el daño de una célula a otra, como se observa en el análisis de ratones quiméricos que expresan SOD1 mutante.

[0111] En vista de los resultados presentados aquí no puede excluirse el papel de la SOD1 en la patogénesis de otras enfermedades neurodegenerativas. Un informe reciente de Choi y col., 2005, J. Biol. Chem., 280, 11648-11655 mostró que la SOD1 se oxida en los lisados cerebrales de pacientes con la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson y que también están presentes proteínas SOD1 oxidadas en las placas seniles y los cuerpos de Lewy.

60

Tabla 1. Titulación del suero por ELISA para detectar anticuerpos contra SOD1 G93A en ratones inmunizados

Composición	Edad	Ratones	Títulos de Ab	N
G93A rec	4 meses	G37R	2967,3 ± 1413,50	7
	Fase final	G37R	1183,5 ± 721,2	6
	4 meses	No Tg	648,1 ± 278,25	4
Solución salina	4 meses	G37R	31,9 ± 1,23	6
	Fase final	G37R	63,6 ± 2,22	4

Titulación de anticuerpos de sueros procedentes de ratones vacunados por enzimoimmunoanálisis de adsorción 5 (ELISA).

Tabla 2. Datos del ELISA que muestran la diferente reactividad de los antisueros procedentes de ratones inmunizados con especies de la SOD1 WT o mutante.

Ratones Tg	inmunizados por	N	Antígenos diana en el ELISA		
			WT	G85R	G93A
G37R	G93A rec	3	411,4 ± 181,75	720,24 ± 228,85	1446,23 ± 324,64
G37R	WT rec	3	424,3 ± 4,48	227,74 ± 76,33	229,7 ± 52,07
No Tg	G93A rec	3	571,7 ± 319,60	672,17 ± 242,03	1123,9 ± 233,23

Tabla 3. Los títulos de anticuerpos para la proteína SOD1 metalada humana recombinante WT, G85R, o G93A se determinaron por ELISA

	Dilución (1/x)	Dilución 1/2	Dilución 1/10	Dilución 1/20	Dilución 1/40
B1G9	Mutante	1,147	1,320	0,939	0,889
	No mutante	0,014	0,009	0,011	0,010
D3H5	Mutante	1,807	2,198	2,023	2,055
	No mutante	1,765	2,004	2,034	1,787
D4G6	Mutante	2,050	1,980	1,653	1,210
	No mutante	1,773	1,768	1,364	1,163
C10F10	Mutante	1,336	1,684	1,65	1,627
	No mutante	1,178	1,307	1,357	1,497
C4F6	Mutante	2,180	1,893	1,622	1,441
	No mutante	0,885	0,222	0,110	0,075
B9G12	Mutante	1,179	1,134	1,030	0,941
	No mutante	0,759	0,654	0,601	0,520

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 < 110> UNIVERSITE LAVAL
JULIEN, Jean-Pierre
< 120> ANTIBODIES AND THEIR USE IN THE TREATMENT, PREVENTION AND DIAGNOSIS OF A DISEASE ASSOCIATED WITH SOD1 ABNORMALITIES
- 10 < 130> 00819-0089
< 140>
PCT/cA2006/001444
< 141> 2006-08-31
- 15 < 150>
US 60/712.400
< 151> 2005-08-31
- < 160> 8
- 20 < 170> PatentIn versión 3.1
< 210> 1
< 211> 20
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial
- 25 < 220>
< 223> Cebador de la PCR para el TNF-alfa
< 400> 1
tcagtgcagac cactgcaatg 20
< 210> 2
- 30 < 211> 20
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial
< 220>
< 223> Cebador de la PCR para el TNF-alfa
- 35 < 400> 2
gtggagtgag actttggatg 20
< 210> 3
< 211> 19
< 212> ADN
- 40 < 213> Secuencia artificial
< 220>
< 223> Cebador de la PCR para la iNOS
< 400> 3
ccttgtgtca gccctcaga 19
- 45 < 210> 4
< 211> 21
< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial
 < 220>
 < 223> Cebador de la PCR para la iNOS
 < 400> 4
 5 cactctcttg cggaccatct c 21
 < 210> 5
 < 211> 19
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial
 10 < 220>
 < 223> Cebador de la PCR para el GAPDH
 < 400> 5
 ggcattgtgg aagggtca 19
 < 210> 6
 15 < 211> 19
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial
 < 220>
 < 223> Cebador de la PCR para el GAPDH
 20 < 400> 6
 tccaccacc tggtgctgt 19
 < 210> 7
 < 211> 154
 < 212> PRT
 25 < 213> Homo sapiens
 < 400> 7

Met	Ala	Thr	Lys	Ala	Val	Cys	Val	Leu	Lys	Gly	Asp	Gly	Pro	Val
				5					10					15
Gln	Gly	Ile	Ile	Asn	Phe	Glu	Gln	Lys	Glu	Ser	Asn	Gly	Pro	Val
				20					25					30
Lys	Val	Trp	Gly	Ser	Ile	Lys	Gly	Leu	Thr	Glu	Gly	Leu	His	Gly
				35					40					45
Phe	His	Val	His	Glu	Phe	Gly	Asp	Asn	Thr	Ala	Gly	Cys	Thr	Ser
				50					55					60
Ala	Gly	Pro	His	Phe	Asn	Pro	Leu	Ser	Arg	Lys	His	Gly	Gly	Pro
				65					70					75
Lys	Asp	Glu	Glu	Arg	His	Val	Gly	Asp	Leu	Gly	Asn	Val	Thr	Ala
				80					85					90
Asp	Lys	Asp	Gly	Val	Ala	Asp	Val	Ser	Ile	Glu	Asp	Ser	Val	Ile
				95					100					105
Ser	Leu	Ser	Gly	Asp	His	Cys	Ile	Ile	Gly	Arg	Thr	Leu	Val	Val
				110					115					120
His	Glu	Lys	Ala	Asp	Asp	Leu	Gly	Lys	Gly	Gly	Asn	Glu	Glu	Ser
				125					130					135
Thr	Lys	Thr	Gly	Asn	Ala	Gly	Ser	Arg	Leu	Ala	Cys	Gly	Val	Ile
				140					145					150
Gly	Ile	Ala	Gln											

< 210> 8
 < 211> 981
 30 < 212> ADN
 < 213> Homo sapiens
 < 400> 8

ES 2 374 102 T3

gtttggggcc	agagtgggcg	agggcgggag	gtctggccta	taaagtagtc	gcggagacgg	60
ggtgctggtt	tgcgtcgtag	tctcctgcag	cgtctggggg	ttccgttgca	gtcctcggaa	120
ccaggacctc	ggcgtggcct	agcgagttat	ggcgacgaag	gccgtgtgcg	tgctgaaggg	180
cgacggccca	gtgcagggca	tcatcaattt	cgagcagaag	gaaagtaatg	gaccagtga	240
ggtgtgggga	agcattaaaag	gactgactga	aggcctgcat	ggattccatg	ttcatgagtt	300
tggagataat	acagcaggct	gtaccagtgc	aggctctcac	tttaatcctc	tatccagaaa	360
acacggtggg	caaaggatg	aagagaggca	tgttgagagac	ttgggcaatg	tgactgctga	420
caaagatggt	gtggccgatg	tgtctatiga	agattctgtg	atctcactct	caggagacca	480
ttgcatcatt	ggccgcacac	tgggtggtcca	tgaaaaagca	gatgacttgg	gcaaagggtg	540
aaatgaagaa	agtacaaaga	caggaaacgc	tggaagtcgt	ttggcttgtg	gtgtaattgg	600
gatcgcccaa	taaacattcc	cttggatgta	gtctgaggcc	ccttaactca	tctgttatcc	660
tgctagctgt	agaaatgtat	cctgataaac	attaaacact	gtaatcttaa	aagtgttaatt	720
gtgtgacttt	ttcagagtgg	ctttaaagta	cctgtagtga	gaaactgatt	tatgatcact	780
tggaagattt	gtatagtttt	ataaaaactca	gttaaaaatgt	ctgtttcaat	gacctgtatt	840
ttgccagact	taaatcacag	atgggtatta	aacttgtcag	aatttccttg	tcattcaagc	900
ctgtgaataa	aaaccctgta	tggcacttat	tatgaggcta	ttaaaaagaat	ccaaattcaa	960
actaaaaaaaa	aaaaaaaaaaa	a				981

REIVINDICACIONES

1. Una línea celular de hibridoma depositada en la International Depositary Authority de Canadá el 29 de agosto de 2006, bajo el número de acceso AD1-290806-01.
2. Una línea celular de hibridoma depositada en la International Depositary Authority de Canadá el 29 de agosto de 2006, bajo el número de acceso AD1-290806-02.
3. Una línea celular de hibridoma depositada en la International Depositary Authority de Canadá el 29 de agosto de 2006, bajo el número de acceso AD1-290806-03.
4. Un anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma de acuerdo con la reivindicación 1.
5. Un anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma de acuerdo con la reivindicación 2.
6. Un anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma de acuerdo con la reivindicación 3.
7. Una composición para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo constituido por: la esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer y Parkinson en un animal, dicha composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo monoclonal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
8. La composición de la reivindicación 7, **caracterizada porque** la enfermedad es la esclerosis lateral amiotrófica.
9. El uso de un anticuerpo monoclonal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 para el diagnóstico *in vitro* de una enfermedad seleccionada del grupo constituido por: la esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer y Parkinson en un animal.
10. El uso de un anticuerpo monoclonal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 para la preparación de una composición para el diagnóstico de una enfermedad seleccionada del grupo constituido por: la esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer y Parkinson en un animal.
11. El uso de las reivindicaciones 9 ó 10, **caracterizado porque** la enfermedad es la esclerosis lateral amiotrófica.
12. Un kit para el diagnóstico de una enfermedad seleccionada del grupo constituido por: la esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer y Parkinson en un animal, dicho kit que comprende al menos un recipiente, dicho recipiente que contiene un anticuerpo monoclonal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
13. El kit de la reivindicación 12, **caracterizado porque** la enfermedad es la esclerosis lateral amiotrófica.
14. Un kit para el tratamiento o la prevención de una enfermedad seleccionada del grupo constituido por: la esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer y Parkinson en un animal, dicho kit que comprende al menos un recipiente, dicho recipiente que contiene un anticuerpo monoclonal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4-6.
15. El kit de la reivindicación 14, **caracterizado porque** la enfermedad es la esclerosis lateral amiotrófica.

FIGURA 1

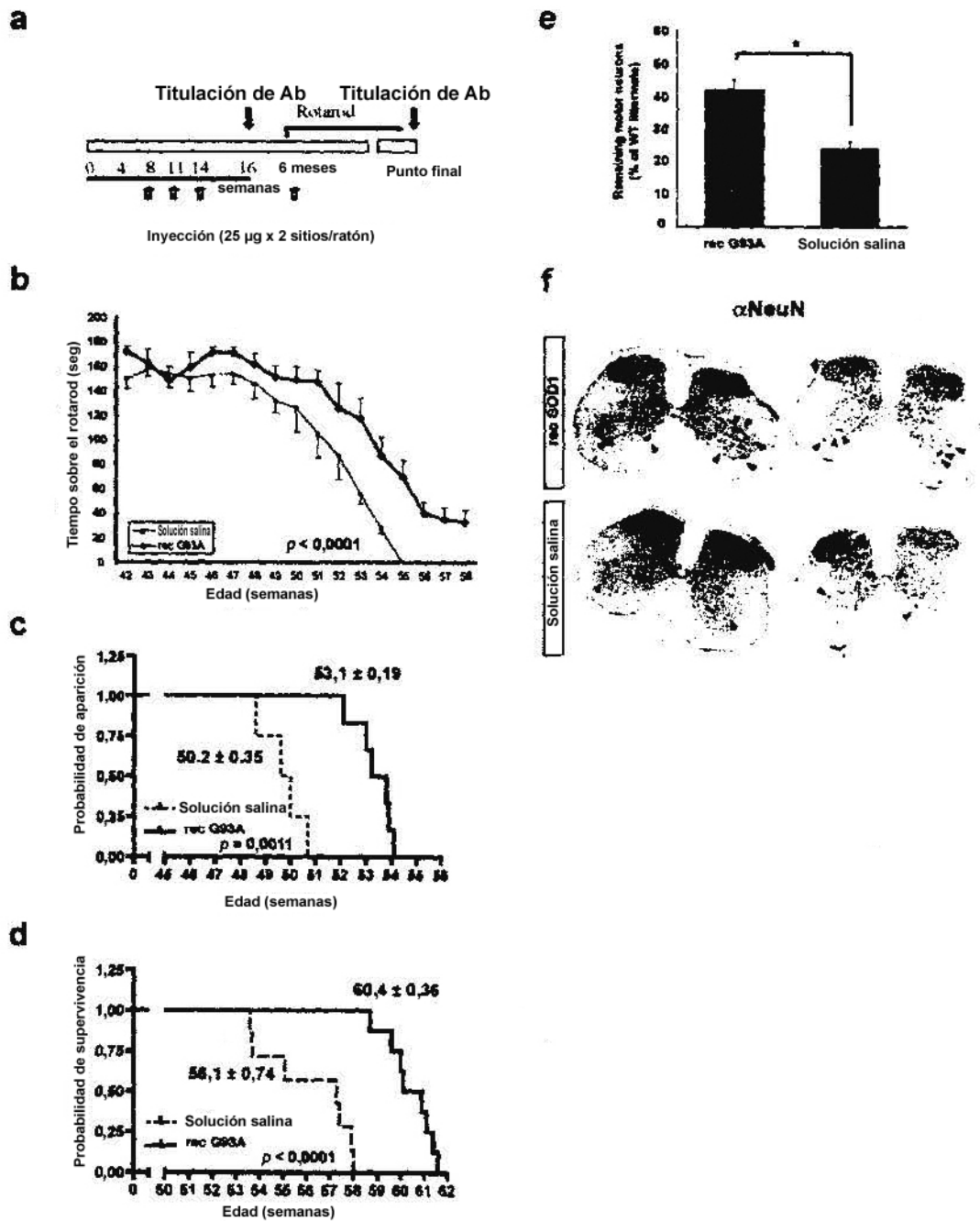


FIGURA 2

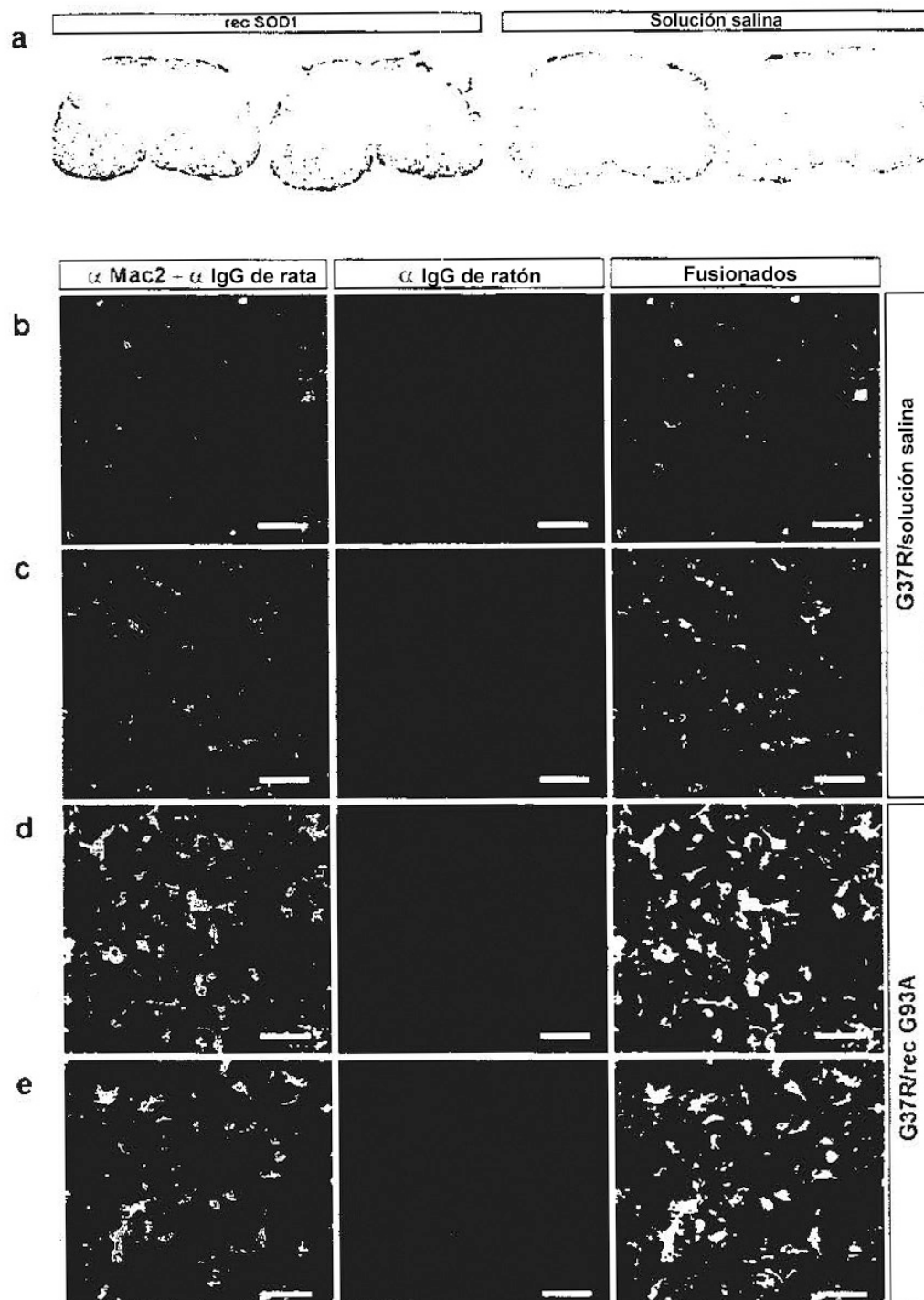


FIGURA 3

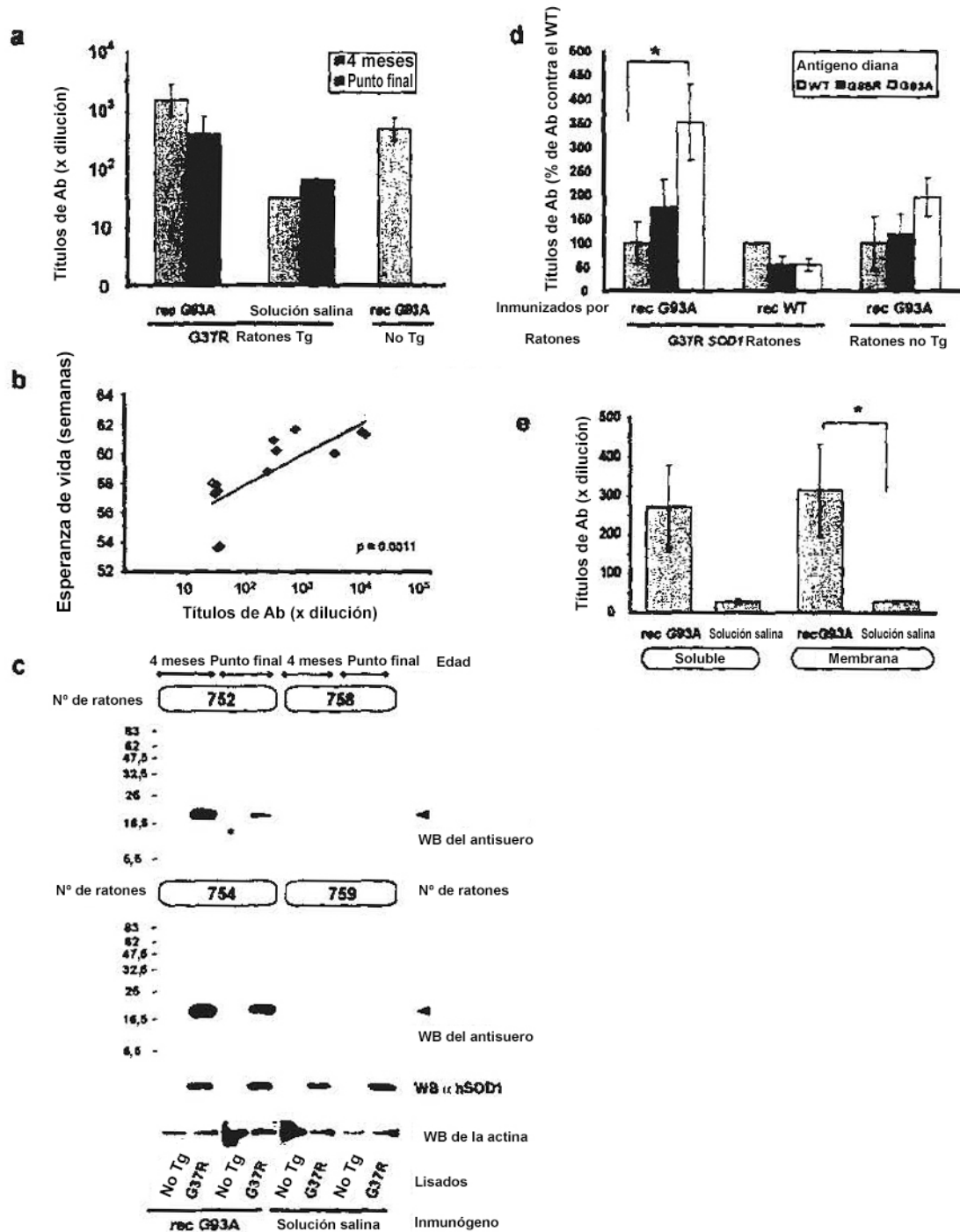


FIGURA 4

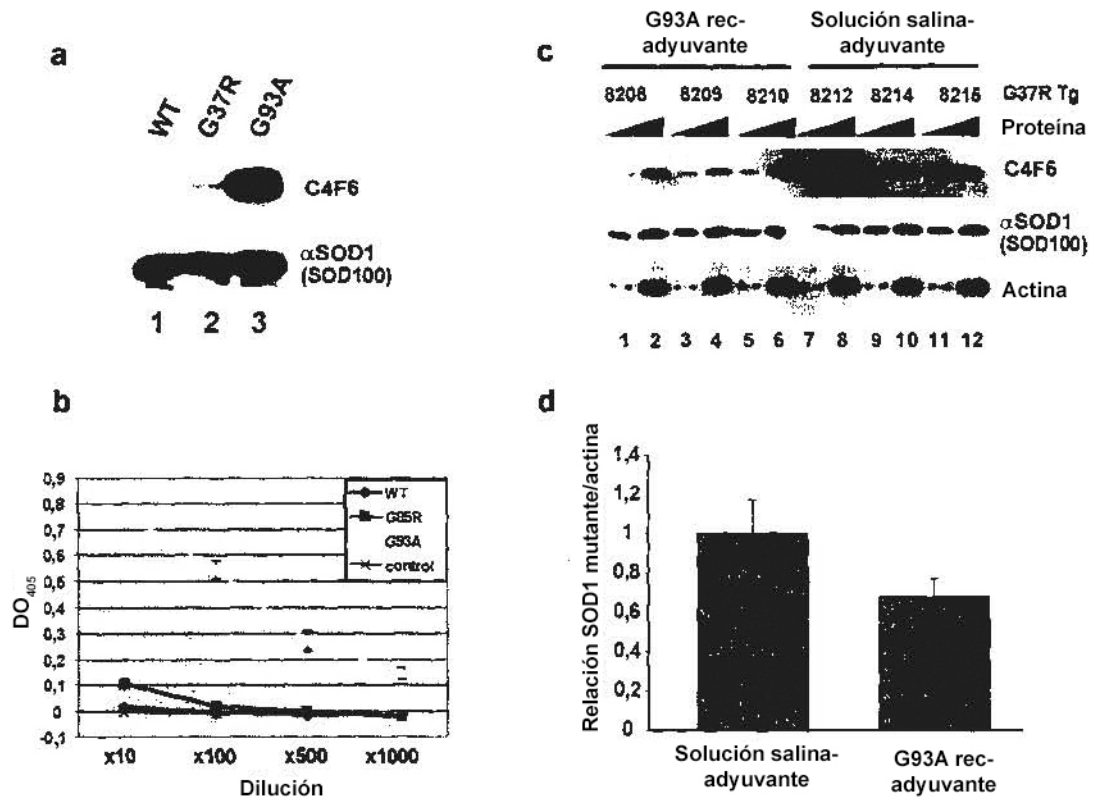


FIGURA 5

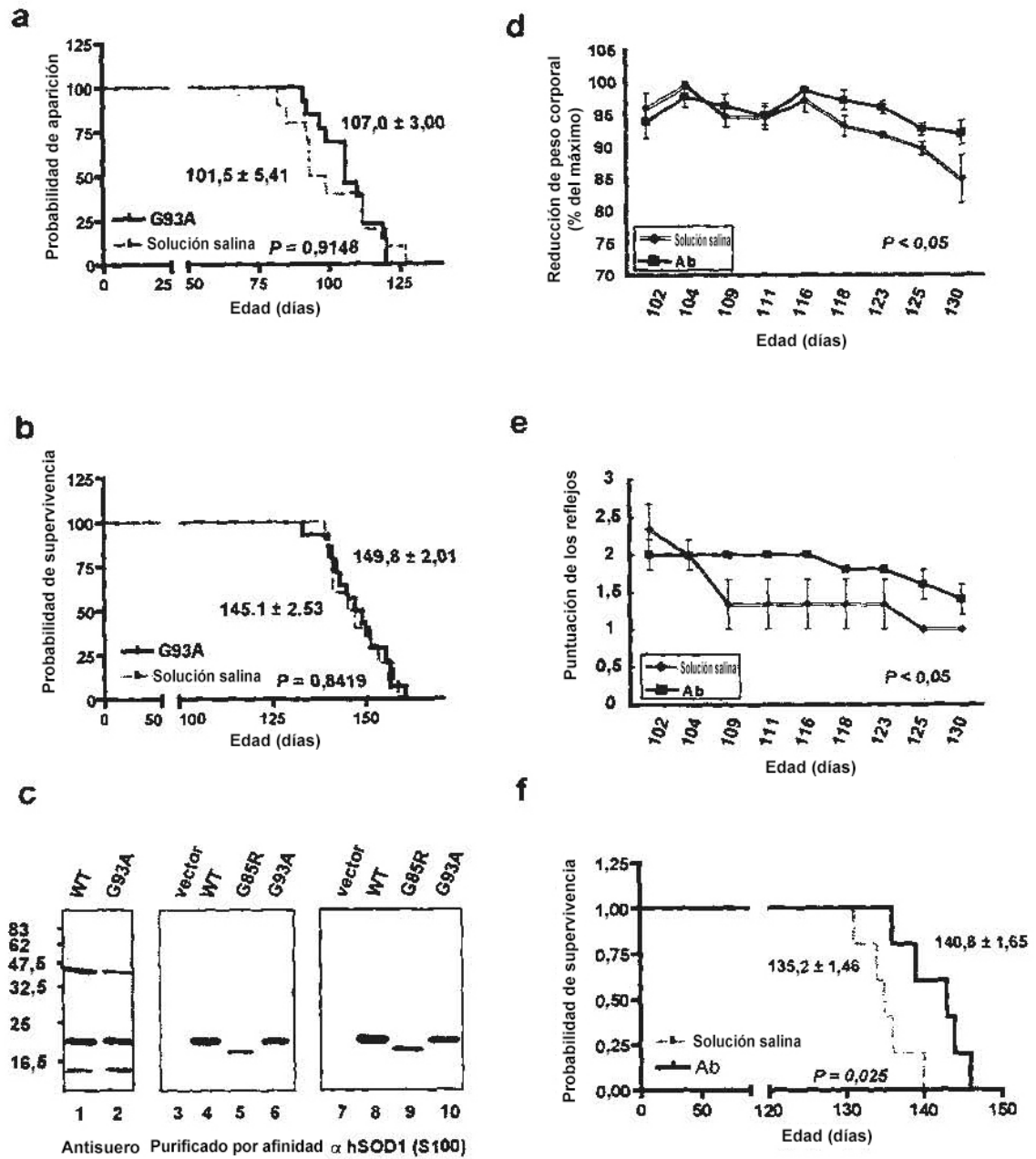
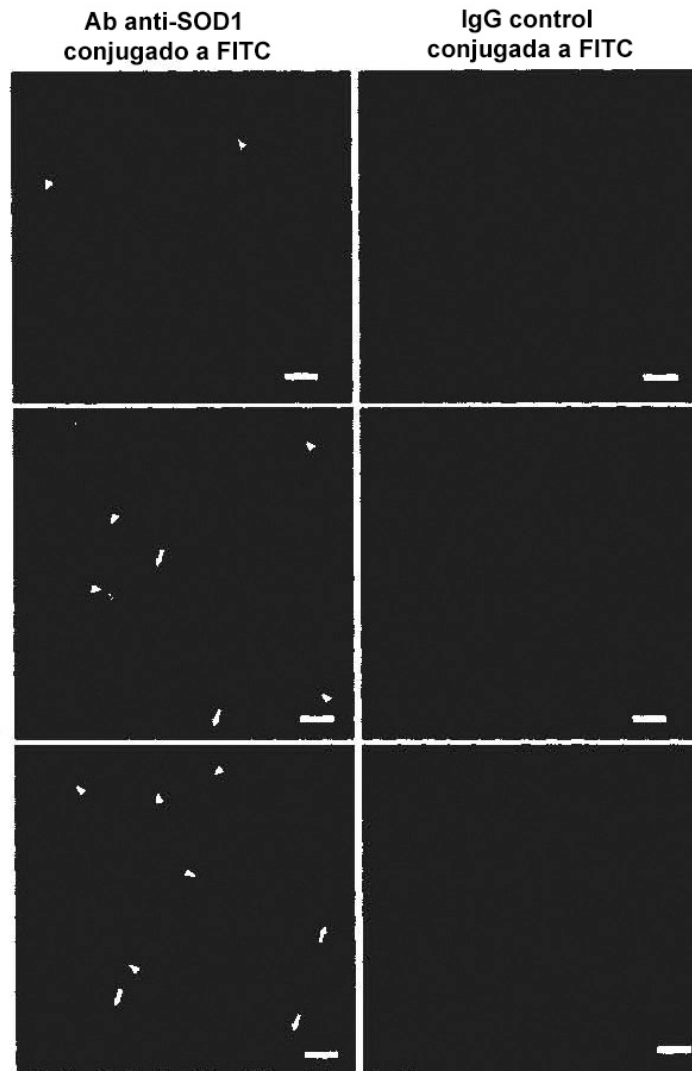


FIGURA 6

a



b

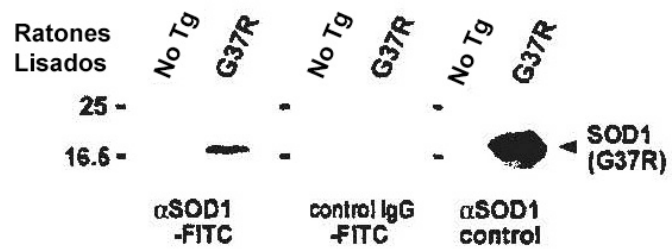


FIGURA 7

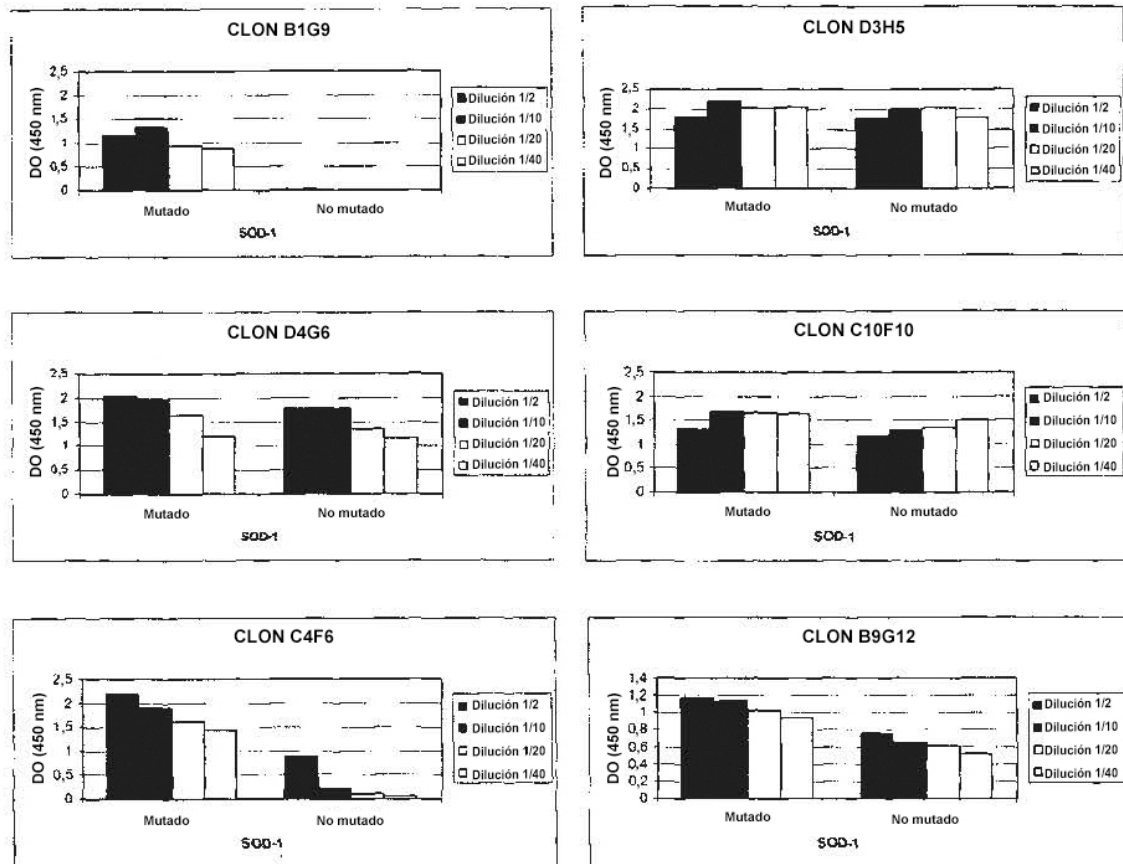


FIGURA 8

MATKAVCVLKGDGPVQGIINFEQKESNGPVKVWGSIKGLTEGLHGFHVHEFGDNTAGCTSAAGPHFNPLSRKHGGPKDEER
HVGD LGNV TADK DGVADVSIEDSVISL SGDHCIIGRTL VVHEKADDLGKGNEESTKTGNAGSRLACGVIGIAQ

FIGURA 9

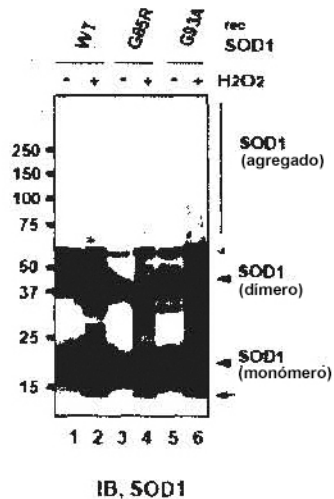
```

gtttggggcc agagtgggag aggcggggag gtctgggcta taaagtagtc ggggagacgg
ggtgctgggt tgcgtcgtag tctctgcag cgtctggggc ttccgttgca gtctcgga
ccaggacctc ggcgtggcct agcgagttat ggcgacgaag gccgtgtgag tgcgaagg
cgacggccca gtgcaggcca tcatcaattt cgagcagaag gaaagtaatg gaccagtga
ggtgtgggga agcattaaag gactgactga aggcctgcac ggattccatg ttcattgag
tgagagataa acagcaggct gtaccagtgc aggtcctcac tttaatoctc tatccagaa
acacgggtgg ccaaaggatg aagagaggca tgttgagagc ttgggcaatg tgactgctga
caaagatggg gtggccgatg tgtctattga agattctgtg atctcactct caggagacca
ttgcatcatt ggcgcacac tgggtggcca tgaaaaagca gatgacttgg gcaaagggtg
aaatgaagaa agtataaaag caggaaacgc tgggaagtgt ttggcttgtg gtgtaattgg
gatcgcccaa taaacattcc ctggatgta gtctgaggcc ccttaactca tctgttatcc
tgctagctgt agaaatgtat cctgataaac attaaacact gtaatcttaa aagtgttaatt
gtgtgacttt ttcagagtgg ctttaaagta cctgtagtga gaaactgatt tatgatcact
tggaagattt gtatagtttt ataaaactca gttaaaatgt ctgtttcaat gacctgtatt
ttgccagact taaatcacag atgggtatta aacttgtcag aatttctttg tcattcaagc
ctgtgaataa aaacctgtga tggcacttat tatgaggcta ttaaaagaat ccaaattcaa
actaaaaaaa aaaaaaaaaa a

```

FIGURA 10

A



B

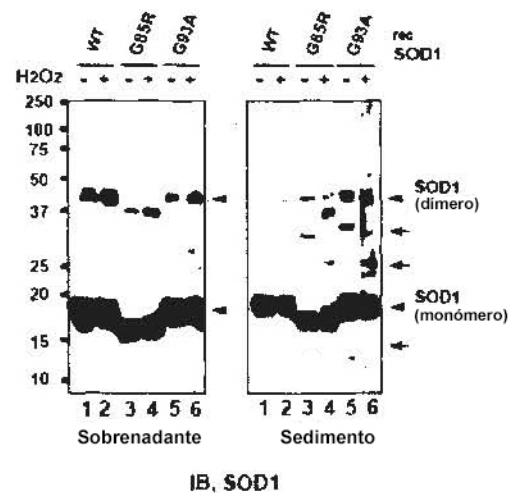


FIGURA 11

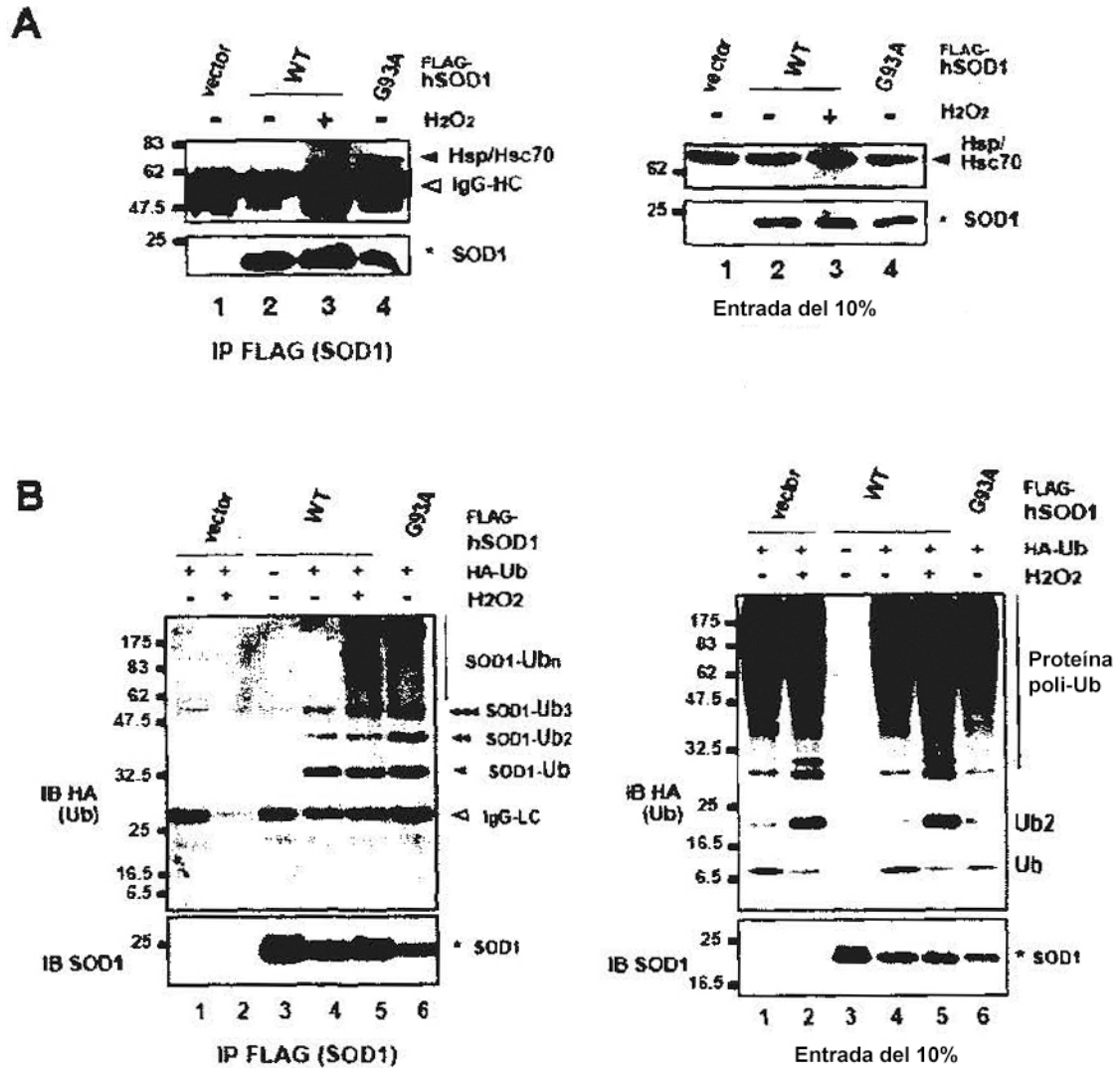
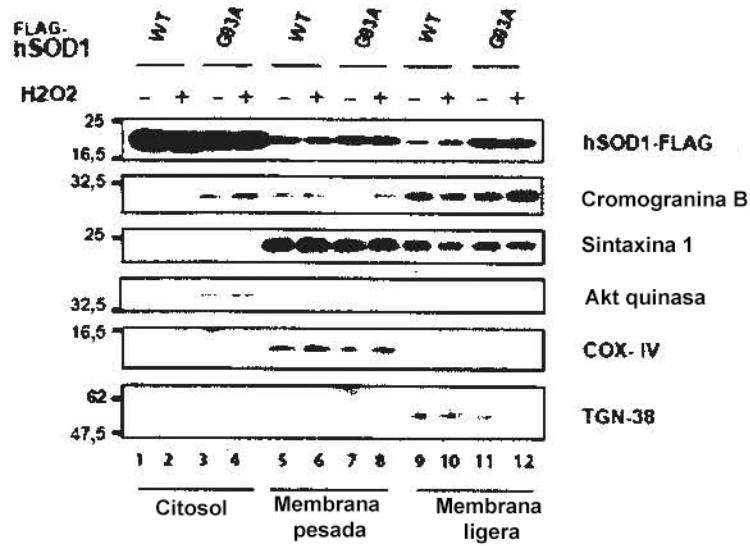


FIGURA 12

A



B

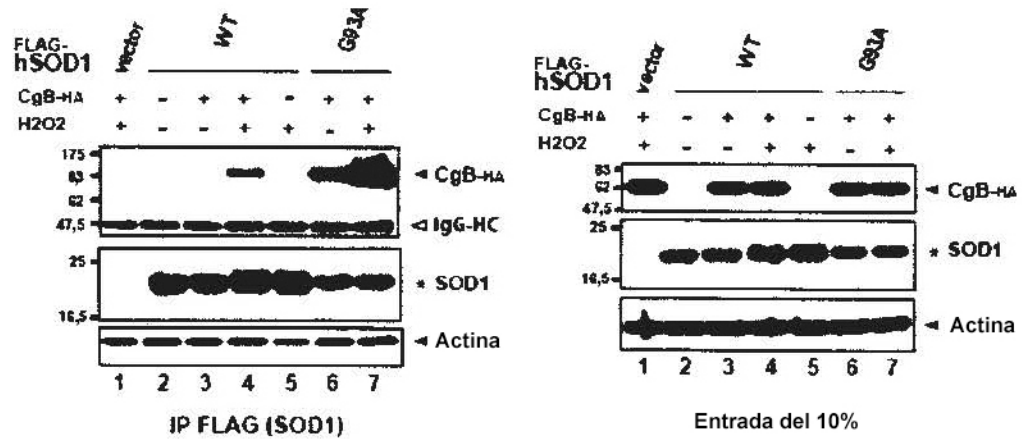
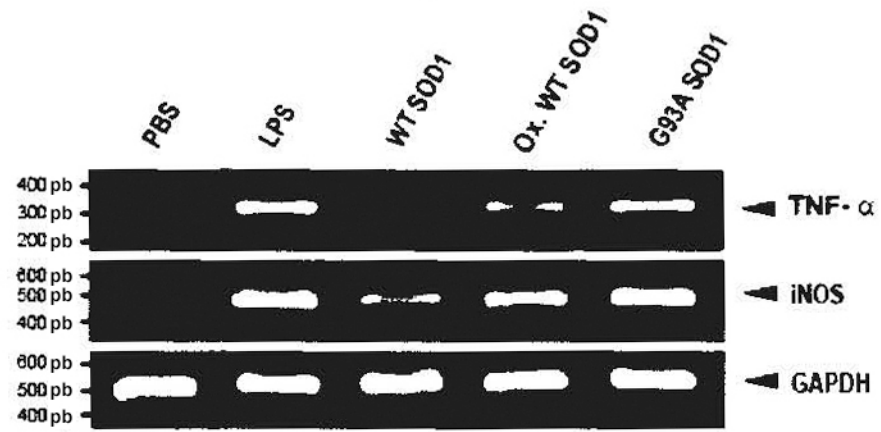


FIGURA 13

A



B

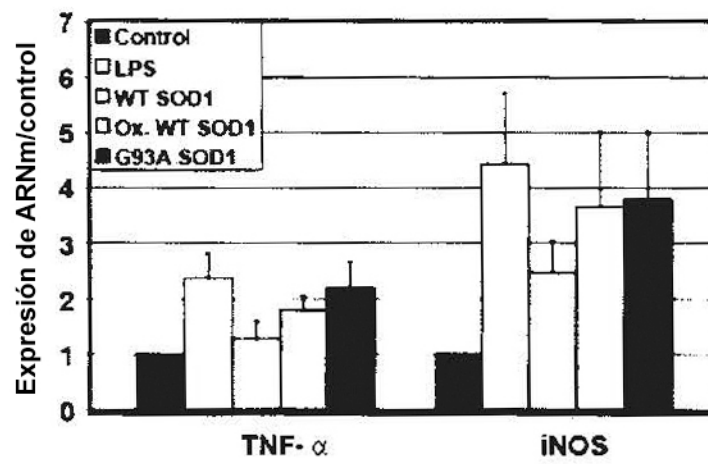


FIGURA 14

A



B

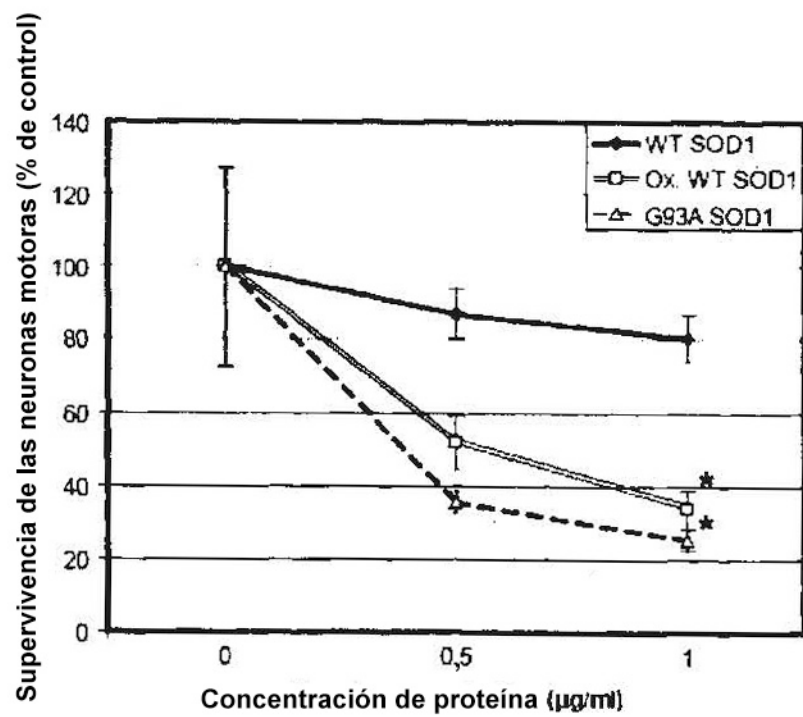
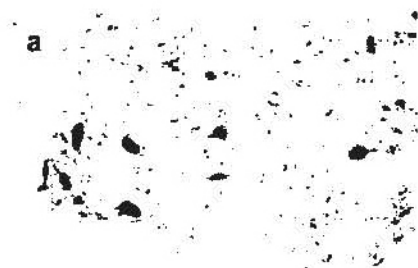


FIGURA 15

C4F6 para mutantes específicos



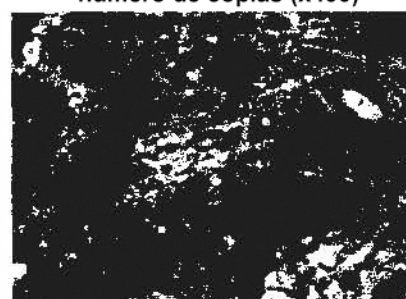
J2429 (SOD1 WT humana x200)



J2429 (SOD1 WT humana x200)



G93A vacuolas con un alto número de copias (x400)



G37R (x 400)

Control (no Ab)



J2429 (SOD1 WT humana x200)



G37R (x 200)

FIGURA 16

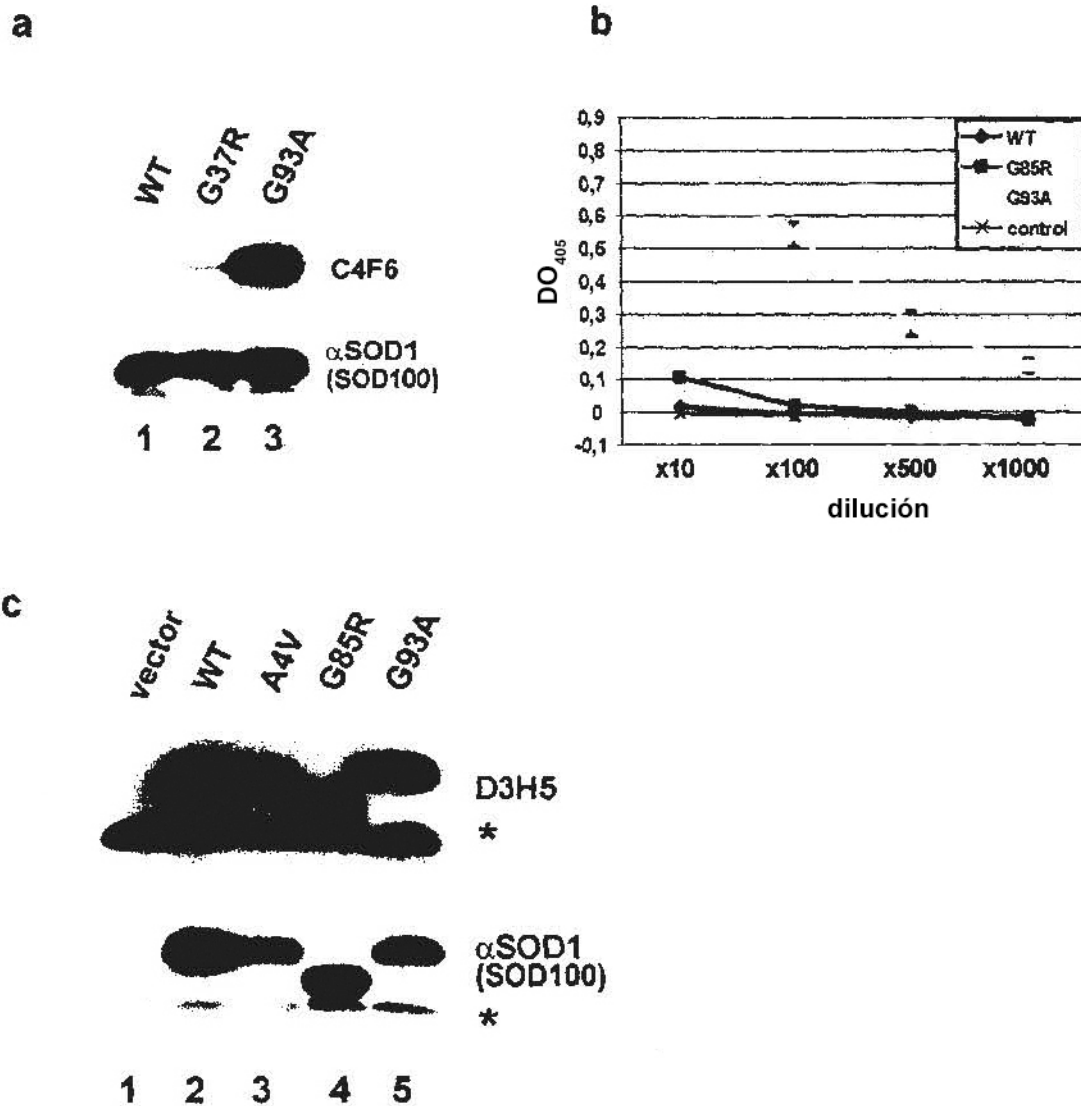


FIGURA 17

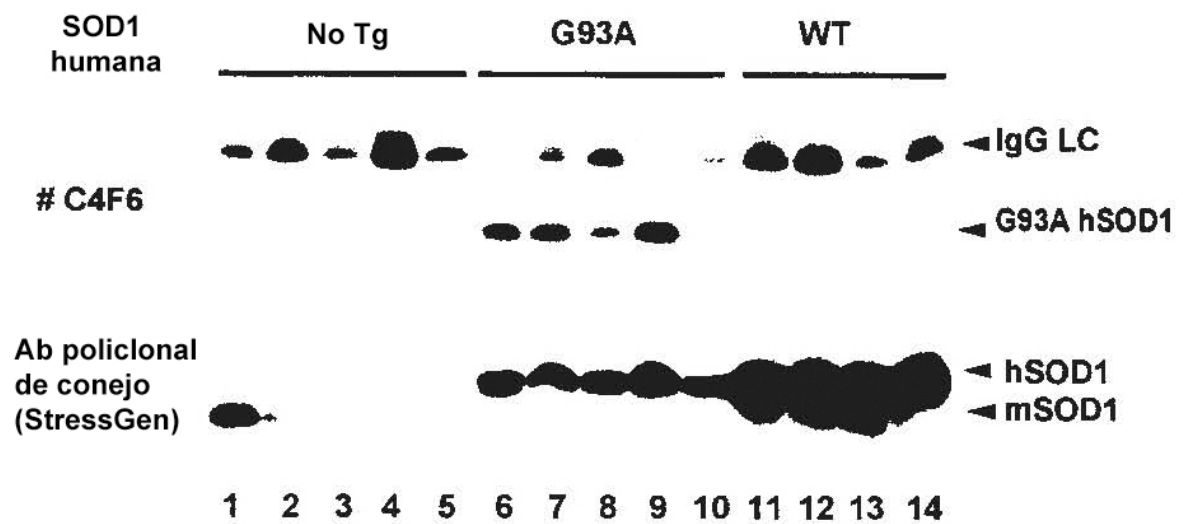
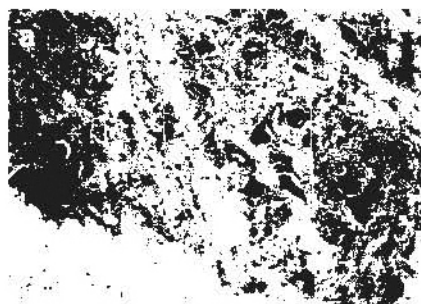


FIGURA 18

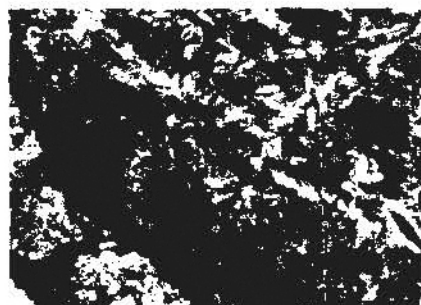
D3H5 tanto para WT como para mutantes



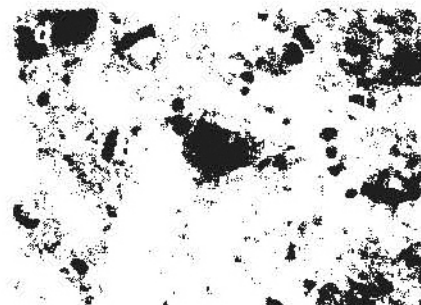
J2429 (SOD1 WT humana x200)



G93A vacuolas con un alto
número de copias



G37R (x 400)

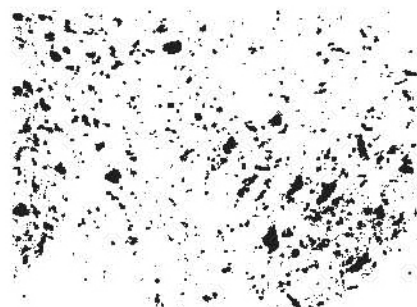


Inclusión de G37R

#Control (no Ab)



J2429 (SOD1 WT humana x200)



G37R (x 200)