

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 674**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.1996 E 07012421 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2013 EP 1842859**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal específico para péptido BETA A4**

30 Prioridad:

14.02.1995 US 388463

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.04.2013

73 Titular/es:

**WYETH LLC (50.0%)
FIVE GIRALDA FARMS
MADISON, NJ 07940, US y
JANSSEN ALZHEIMER IMMUNOTHERAPY
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**KÖNIG, GERHARD y
GRAHAM, PAUL**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 400 674 T3

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).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo monoclonal específico para el péptido $\beta A4$

5 **Campo de la invención**

Esta solicitud se refiere a la enfermedad de Alzheimer, en particular, a un anticuerpo monoclonal específico para el péptido $\beta A4$ derivado de la proteína precursora de amiloide, células que producen dicho anticuerpo, métodos de generación dichos anticuerpos monoclonales, y a métodos para usar dichos anticuerpos en diagnóstico y terapia.

10

Antecedentes

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno cerebral neurodegenerativo progresivo irreversible. Con el transcurso de los años, la progresión de la AD provoca pérdida de memoria, demencia y finalmente la muerte. Actualmente es la cuarta causa principal de muerte en los Estados Unidos y supone aproximadamente 100.000 muertes anuales. Habitualmente, la AD afecta principalmente a los ancianos y por lo tanto, con el envejecimiento de la sociedad moderna, se espera que sea un problema sanitario creciente en el futuro próximo. Poco después del inicio de la enfermedad, los pacientes requieren asistencia todo el día, Esto representa un tremendo problema psicobiológico así como financiero para nuestra sociedad. Actualmente no existen medios de diagnóstico, prevención, tratamiento o cura de la AD.

20

Neuropatológicamente, la AD se caracteriza por una masiva pérdida neuronal en ciertas zonas del cerebro y por la deposición de material proteínico en el cerebro de los pacientes de AD. Estos depósitos son los neurofibrilares intracelulares y las placas de B-amiloide extracelulares. El principal componente proteínico de la placa de B-amiloide es el péptido $\beta A4$. El análisis de la secuencia del material de las placas de β -amiloide purificado y la espectrometría de masas mostró que la longitud máxima del péptido $\beta A4$ es de 43 aminoácidos. Habitualmente, sin embargo, pueden también terminar o bien en la posición 40 o en la posición 42 (Miller y cols., 1993, Arch. Biochem. Biophys. 301:41-52). De forma similar, en el extremo N pueden observarse ciertas irregularidades, que dan como resultado varias formas diferentes del péptido, que se inician principalmente en la posición 1, 4 u 11 (Miller y cols., 1993).

25

30

El clonado molecular reveló que el péptido $\beta A4$ se deriva de una proteína precursora mucho mayor denominada "proteína precursora de amiloide" (APP) (Kang y cols., 1987, Nature 325: 733-736) (Figura 1). La Figura 1 ilustra la proteína precursora de amiloide (APP) que es una proteína transmembrana (T_m = región de la membrana) en la que el extremo N está localizado en la zona extracelular y el extremo C está localizado en la zona intracelular (citoplasmática), $\beta A4$ está parcialmente incrustado en la membrana. Se han descrito diversas isoformas con ayustes alternativos, que sufren grandes modificaciones postranscripcionales (Selkoe, 1994, Ann. Rev. Neurosci. 17: 489-517). La secuencia de $\beta A4$ en β está localizada parcialmente en la zona extracelular y se extiende parcialmente a la región transmembrana (Figura 2). La Figura 2 (SEC ID NO: 3) ilustra la secuencia de $\beta A4$, que se muestra (zona demarcada con un círculo) con su extremo C en la región transmembrana (T_m , área recuadrada) y el extremo N localizado en la parte extracelular. Los asteriscos indican la localización de las mutaciones de las familias del gen APP: o bien flanquean la secuencia de $\beta A4$ o están centradas en la sección media de la secuencia de $\beta A4$. Se indican los tres sitios principales de escisión (α , β y γ). Por lo tanto se postuló que la liberación de $\beta A4$ se producía a través de la acción proteolítica de una o más proteasas en el extremo N (corte en β) y en el extremo C (corte en γ) del péptido (Figura 2) (Selkoe, 1994). El principal evento durante la secreción de APP está en el corte en α (posición 16/17 de $\beta A4$ "1-42"). Esta molécula de APP secretada (aAPPs) contiene los primeros 16 aminoácidos de la secuencia de $\beta A4$ en su extremo carboxilo. El resto de los fragmentos de APP asociados a la célula (los denominados fragmentos del extremo C (CTF)) contienen la porción del extremo C de la secuencia de $\beta A4$ y abarcan la región citoplasmática de APP. Por lo tanto, este corte proteolítico produce fragmentos que pueden no procesarse de tal forma que directa o indirectamente produzcan fragmentos amiloidógenos (procesamiento no amiloidógeno) (Selkoe, 1994).

35

40

45

50

Recientemente, se demostró que las líneas celulares que expresan grandes cantidades de APP a través de una construcción de ADNc de APP transfectada de forma estable producen cantidades de picomolares altas a nanomolares bajas de $\beta A4$ y lo liberan rápidamente al medio (Shoji y cols., 1992, Science 258: 126-129). También se ha encontrado que casi todos los cultivos celulares primarios y las estirpes celulares liberan $\beta A4$ de forma constitutiva (Busciglio y cols., 1993, PNAS USA 90: 2092-2096). Además, se ha demostrado que controles sanos así como pacientes de Alzheimer presentan cantidades nanomolares bajas de $\beta A4$ en suero y LCR (Seubert y cols., 1992, Nature 359: 325327). La mayoría de las especies de $\beta A4$ solubles detectadas en estos fluidos corporales y medios acondicionados era $\beta A4$ "1-40", lo que no refleja verdaderamente la composición global que se encuentra en las deposiciones de las placas de β -amiloide. Por lo tanto ya no podría mantenerse la noción de que la producción y la posterior liberación de $\beta A4$ son suficiente y por lo tanto responsable de la acumulación de placas de β -amiloide en el cerebro de los pacientes de AD; otros factores deben contribuir a la deposición de las placas β -amiloide. Una hipótesis muy sencilla es que la producción excesiva aguda o crónica de $\beta A4$ provoca la mayor carga de amiloide que se observa en la AD.

55

60

65

El hallazgo de que mutaciones puntuales específicas en y alrededor de la región $\beta A4$ del gen APP están relacionadas con ciertos casos de enfermedad de Alzheimer familiar (FAD) demostraron inequívocamente que el gen APP es un "gen de enfermedad" (Goate y cols., 1991, Nature 349: 704-706; Murrell y cols., 1991, Science 254: 97-99; Levy y cols., 1990, Science 248: 1124-1126; Carter y cols., 1992, Nature Genetics 2: 255-256). En las familias en las que la AD se hereda de forma dominante con una edad específica de inicio, las mutaciones puntuales del gen APP son necesarias y suficientes para provocar AD. Aunque la gran mayoría de los casos de enfermedad de Alzheimer son esporádicos y probablemente multifactoriales, estas mutaciones familiares de APP pueden enseñarnos mucho sobre la amiloidogénesis, es decir, la generación del pequeño péptido $\beta A4$ a partir del precursor mayor y su posterior deposición en placas de β -amiloide.

La doble mutación en un codón de APP 670/671 (la "variante sueca", en el extremo N de $\beta A4$ en APP) provoca una liberación de 5 a 8 veces mayor de $\beta A4$ en cultivos celulares transfectados de forma estable con ese ADNc de APP mutado (Figura 2) (Citron y cols., 1992; Cai y cols., 1993). Puede concebirse que esta doble mutación puntual provoque un mayor procesamiento de APP debido a una mayor proteólisis en el corte en β , que a su vez produce un mayor nivel de $\beta A4$ liberado. Una mayor cantidad de monómeros $\beta A4$, tal como demuestran los estudios de transfección con la "mutación sueca", puede explicar la cinética más rápida de la agregación de $\beta A4$ a las placas de β -amiloide en estas familias.

Otra mutación de una FAD reside en el extremo C de $\beta A4$ en la posición 717 ("variante londinense") y no afecta al nivel de $\beta A4$ liberado en el cultivo tisular (Figura 2). Recientemente se ha demostrado que esta mutación en 717 cambia la proporción entre $\beta A4$ "1-40/1-42" (Suzuki Ycols., 1994, Science 264: 1336-1340). Aunque no está claro por ahora como se produce la generación del extremo C de $\beta A4$, dado que esta parte está incrustada en la región transmembrana, es tentadora la hipótesis de que la "mutación londinense" afecta a la escisión proteolítica de APP para producir $\beta A4$. Posiblemente, esta mutación puntual interfiere con la fidelidad de la escisión de la proteasa específica en el sitio γ . La $\beta A4$ 1-40 muestra, entre otras cosas, una tremenda diferencia de solubilidad en soluciones acuosas comparado con la $\beta A4$ 1-42 (Burdick y cols., 1992, JBC 267: 546-554). Este es casi insoluble en agua, mientras que 1-40 es soluble en agua hasta varios mg/ml *in vitro*. Pequeñas cantidades de la forma más larga 1-42 pueden potenciar la precipitación de 1-40 *in vitro* de forma notable. Una proporción ligeramente mayor de la especie de $\beta A4$ 1-42 explicaría el temprano inicio de la deposición de $\beta A4$ en las placas de β -amiloide en pacientes con esta "mutación londinense". La proporción entre la especie 1-42 y la especie 1-40 más corta y más soluble también puede ser uno de los factores críticos en los casos esporádicos de AD (es decir los casos en los que no se ha identificado predisposición genética), Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a la especie 1-42, son por lo tanto de utilidad para investigar la producción y presencia de la especie $\beta A4$ que termina en la posición del aminoácido 42, y pueden usarse como indicador diagnóstico de la presencia de especies anormales en la AD.

Los análisis bioquímicos recientes con un anticuerpo que reconoce el $\beta A4$ que termina en la posición 40, y un anticuerpo que reconoce la especie de $\beta A4$ que se extiende hasta la posición 42 o más, demostró que la contribución de la especie de $\beta A4$ mas larga puede ser crítica para el inicio de la enfermedad (Suzuki y cols., 1994). Sin embargo, el anticuerpo monoclonal de Suzuki no distingue entre $\beta A4$ 1-42, 1-43, y especies más largas de $\beta A4$. Este es también el caso para otro anticuerpo monoclonal publicado, el 2G9 (Yang y cols., 1994, Neuro Report 5: 2117-2120). Por lo tanto, para evitar esta reactividad cruzada, sería muy útil disponer de anticuerpos que sean específicos para la especie de $\beta A4$ que termina en la posición 42 y que excluya las otras formas para evitar la reactividad cruzada con los fragmentos de APP del extremo C asociados a la membrana, que son productos celulares habituales no necesariamente asociados a las placas de β -amiloide.

Se ha descrito un anticuerpo monoclonal que reconoce $\beta A4$ 1-42 (Murphy Ycols., 1994, Am. J. Path. 144: 1082-1088). Sin embargo, no se usó la especie del péptido $\beta A4$ 1-43 en estos estudios, por lo tanto no se sabe la especificidad exacta de este anticuerpo monoclonal en respuesta al péptido 1-43. Únicamente se realizaron estudios competitivos con péptidos $\beta A4$ que terminaban en la posición 40 ("1-40"), y en la posición 44 ("1-44") y más con este anticuerpo. De forma importante, se refleja que el anticuerpo teñía amiloide difuso, amiloide fibrilar, ovillos neurofibrilares intraneuronales y extraneuronales, pero no amiloide vascular.

Una prueba diagnóstica bioquímica *in vitro* para la enfermedad de Alzheimer está en las primeras etapas y tampoco existen medios de detectar los individuos con riesgo de contraer AD. El actual diagnóstico de AD requiere una evaluación clínica detallada que no puede dar respuestas claras hasta que se manifiestan síntomas significativos de demencia y pérdida de memoria. A la vista de las investigaciones a las que se ha hecho referencia anteriormente, $\beta A4$ 1-42 representa un marcador preclínico para la AD. Así, la identificación del nivel o de la acumulación de $\beta A4$ 1-42, o de otras especies que terminan en el residuo 42 y de cómo esta puede progresar durante el transcurso de la enfermedad, y de cómo se distribuye en el cerebro, proporcionara valiosas perspectivas para controlar el curso además de para el diagnóstico específico y el posible tratamiento de AD.

Sería de utilidad para preparar pruebas diagnósticas, agentes terapéuticos y ensayos de control de AD contar con un anticuerpo monoclonal que, al contrario de lo que sucede con la especificidad de los anticuerpos disponibles actualmente (que presentan reacción cruzada con 1-43; que se reseña que no teñe amiloide vascular), sí teñe el amiloide vascular y es específico para el péptido $\beta A4$ que termina en el residuo 42, y por lo tanto extiende la

capacidad diagnóstica de la técnica, es decir uno que reconozca el extremo C libre de $\beta A4$ y tiña amiloide difuso y fibrilar, ovillos neurofibrilares, y amiloide vascular.

Resumen de la invención

5 La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal, como se define en la reivindicación 1, que es específico para el péptido $\beta A4$, de forma específica el extremo C de $\beta A4$ "1-42" y tiñe amiloide difuso y fibrilar, ovillos neurofibrilares, y amiloide vascular. En particular, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que es específico para péptidos $\beta A4$ en los que el extremo C es el residuo 42 de la secuencia de aminoácidos de $\beta A4$. La presente invención además abarca fragmentos de anticuerpo que tienen la misma especificidad de enlace como se define en la reivindicación 5. La presente invención abarca en particular el anticuerpo monoclonal conocido como "Mab 369.2B" y se produce por la línea celular "369.2B", que ha sido depositada bajo el Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection (ATCC) el 26 de Enero de 1995, y se le ha asignado el número de acceso HB 11829. La presente invención abarca el uso del anticuerpo monoclonal de la presente invención en usos diagnósticos, de purificación, y terapéuticos.

Así una realización de la presente invención abarca un anticuerpo monoclonal específico para el final del péptido $\beta A4$ en la posición 42, en donde dicho anticuerpo enlaza con el amiloide difuso, amiloide fibrilar, amiloide vascular, y los ovillos neurofibrilares. En una realización particular, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que es específico para los aminoácidos C-terminales del péptido $\beta A4$ 1-42. En la realización más preferida la presente invención abarca un anticuerpo monoclonal que está identificado como 369.2B, y es producido por la línea celular depositada con la American Type Culture Collection (ATCC) como número de acceso HB 11829. Una realización preferida de la presente invención también abarca una célula que está identificada por el número de Acceso de la ATCC HB 11829. En una realización adicional de la presente invención, se abarca un fragmento inmunológicamente reactivo del anticuerpo monoclonal de la presente invención que es capaz del mismo enlace que el anticuerpo monoclonal de la presente invención.

Se divulgan métodos de generar anticuerpos específicos para la OA4 que reconocen el residuo C-terminal libre 42; métodos para detectar la presencia de los péptidos $\beta A4$ que terminan en la posición 42, en tejido que comprende poner en contacto una muestra de tejido con un anticuerpo monoclonal de la presente invención, detectando la presencia del anticuerpo monoclonal de una forma selectiva; métodos para la purificación selectiva de péptidos $\beta A4$ que terminan en la posición 42, comprendiendo poner en contacto una muestra a ser purificada con el anticuerpo monoclonal de la presente invención, separar el péptido $\beta A4$ de la muestra a ser purificada, y aislar el péptido $\beta A4$, y métodos para la detección del péptido $\beta A4$ asociado con la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo poner en contacto una muestra a ser probada con el anticuerpo monoclonal de la presente invención, y detectar la presencia de péptidos $\beta A4$.

También se divulgan métodos para la prevención de la agregación del péptido $\beta A4$ administrando el anticuerpo monoclonal de la presente invención. El anticuerpo monoclonal puede ser idéntico al 369.2b, o un fragmento inmunológicamente activo con especificidad de enlace equivalente del mismo. La presente invención proporciona de este modo un medio para detectar la presencia del péptido $\beta A4$ que comprende el fragmento inmunológicamente reactivo del anticuerpo monoclonal de la presente invención. Así como un medio para prevenir la agregación del péptido $\beta A4$ que comprende un fragmento inmunológicamente reactivo del anticuerpo monoclonal de la presente invención. La presente invención proporciona un medio para detectar y monitorizar el nivel de péptido $\beta A4$ en muestras de tejido o fluido (por ejemplo sangre, otros fluidos corporales, secciones de tejido, tejidos de biopsia, etc.). En una realización preferida, el péptido $\beta A4$ que está siendo detectado, monitorizado, inhibido o purificado es un péptido $\beta A4$ con un residuo de aminoácido terminal carboxi libre siendo el número de residuo 42 de la secuencia de aminoácidos del péptido $\beta A4$.

Realizaciones específicas preferidas de la presente invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción mas detallada de ciertas realizaciones preferidas y las reivindicaciones.

Breve Descripción de los Dibujos

55 La invención se comprenderá más completamente al considerar la siguiente descripción detallada, tomada junto con los dibujos en los que:

La Fig. 1 es una representación esquemática de la porción $\beta A4$ de la proteína precursora de amiloide (APP), su localización relativa a la membrana celular y los sitios de escisión α , β y γ ;

60 La Fig. 2 muestra la porción $\beta A4$ de APP, su posición relativa a la región transmembrana de una célula y tres sitios principales de escisión (α , β y γ) en APP;

La Fig. 3 es un diagrama del clon pGK003 que se uso para generar el péptido $\beta A4$ 1-42;

La Fig. 4A muestra la SDS-PAGE en un gel de Tris/Tricina al16%, de $\beta A4$ marcado radioactivamente traducido *in vitro* en un sistema de germen de trigo;

65 La Fig. 4B muestra la SDS-PAGE en un gel de Tris/Tricina al16%, de $\beta A4$ marcado radioactivamente traducido *in vitro* en un sistema de germen de trigo, inmunoprecipitado con MAbs 286.8A;

La Fig. 5 es una grafica que muestra la inmunoprecipitación de $\beta A4$ (IVT $\beta A4$) traducido *in vitro* con 286.8A;
La Fig. 6 es un diagrama de los péptidos que se usan para generar la respuesta inmunitaria (inmunógeno) y para cribar el suero de ratones;

La Fig. 7 es una grafica que muestra la inmunoprecipitación de $\beta A4$ traducido *in vitro* en función de la concentración de anticuerpo; -o- 286.8A, - Δ - 369.2B, - \square - 369,6;

La Fig. 8 es una grafica que muestra el % de diversas secuencias de $\beta A4$ inmunoprecipitadas mediante el MAb 369.2;

La Fig. 9 es una grafica que muestra el mapeo de los epítomos de MAb 369.2 mediante ensayo competitivo, donde 35 - \blacksquare - es 35-42 (OVA) (péptido $\beta A4$ 35-42 acoplado a ovalbimina), - \square - es el péptido $\beta A4$ 1-42 y - \blacklozenge - es el péptido $\beta A4$ 1-40;

La Fig. 10 es una fotografía que muestra la unión de MAb 369.2B a amiloide vascular y otras placas con diversas morfologías.

Descripción Detallada de la Invención

Las deposiciones de β -amiloide en el cerebro con enfermedad de Alzheimer están formadas principalmente por péptidos $\beta A4$ que muestran heterogeneidad tanto en el extremo N como en el C. La principal especie del extremo C, que se identifica mediante secuenciación peptídica de β -amiloide, purificado a partir de material cerebral postmortem, termina en la posición 40 o 42 del péptido $\beta A4$ que tiene como máximo 43 residuos de longitud. Los experimentos *in vitro* con péptidos $\beta A4$ sintéticos que terminan o bien en la posición 40 o en la 42 indican profundas diferencias fisicoquímicas. Anteriormente, no podía determinarse la distribución de estas dos especies de $\beta A4$ en tejido postmortem así como su generación *in vitro* debido a la falta de anticuerpos específicos contra el extremo carboxi que fueran capaces de distinguir entre las subespecies de péptido $\beta A4$.

Indicios recientes sugieren que la liberación de $\beta A4$ es un evento normal en casi en todos los cultivos celulares. Habitualmente pueden medirse concentraciones de picomolares altas a nanomolar bajas de $\beta A4$ en el suero y en el líquido cefalorraquídeo (Seubert y cols., 1993). Este hallazgo fue sorprendente porque se había asumido que la producción de $\beta A4$ es un evento patológico dado que $\beta A4$ se deposita masivamente en forma de placas de β -amiloide en las regiones cortical e hipocámpica del cerebro de los pacientes de la enfermedad de Alzheimer. El análisis detallado de la secuencia del $\beta A4$ liberado por el cultivo celular revela que la especie principal termina en la posición 40 (Selkoe, 1994). Las placas de amiloide purificadas de cerebro postmortem muestran una realidad ligeramente diferente: los depósitos de amiloide de la angiopatía amiloide congófila (CAA) son agregados de $\beta A4$ que rodean los vasos sanguíneos y son predominantemente $\beta A4$ 1-40, mientras que por el contrario, los núcleos de las placas de β -amiloide (APC) que están presentes en el parénquima cerebral y no están asociados a los vasos sanguíneos muestran unos extremos N irregulares (que empiezan más habitualmente en los residuos 1, 4 Y 11) y terminan principalmente o bien en la posición 40 o 42 (Glennner y Wong, 1984, Biochem. Biophys. Res. Comm. 120: 885-890; Masters y cols., 1985, PNAS USA 82: 4245-4249; Miller y cols., 1993). Ocasionalmente se han descrito especies más largas que terminan en el 43 o que se extienden incluso más (Miller y cols., 1993). Debido a que la longitud del extremo C hidrófobo es crítica para la capacidad del péptido de agregarse *in vitro* (Burdick y cols., 1992; Jarrett y cols., 1993, Biochem. 32: 4693-4697), es completamente posible que los dos agregados patológicos diferentes, APC y CAA y otras placas de β -amiloide vasculares puedan justificarse gracias a las diferentes propiedades de las dos especies 1-40 y 1-42. Este podría ser el caso también de las denominadas "placas difusas" (Selkoe, 1994) que se observan con frecuencia en el cerebro de seres humanos ancianos y que no están asociadas a la AD pero que, sin embargo, se ha propuesto que son precursoras de los depósitos β -amiloide fibrilar. Se ha sugerido una agregación no fibrilar de $\beta A4$ para estas estructuras. Por lo tanto es de importancia capital determinar la producción específica de tejido de estas especies más largas de $\beta A4$ (es decir, las que terminan en la posición 42) y su aparición patológica en el cerebro de los pacientes de AD. Recientemente, se han publicado tres artículos en los que se han descrito anticuerpos que distinguen las especies 1-42 y 1-40 de $\beta A4$ (Suzuki y cols., 1994; Murphy Ycols., 1994; Yang y cols., 1994). Al contrario que los anticuerpos de la presente invención, los anticuerpos reseñados por Suzuki y cols., y Yang y cols., presentan reacción cruzada en un grado significativo tanto con la especie 1-43 como con la 1-42 el péptido $\beta A4$. El anticuerpo de Murphy y cols., aunque no se ha analizado su unión a la especie 1-43 del péptido $\beta A4$, muestra un patrón diferente de unión a los tejidos que los anticuerpos de la presente invención, y por lo tanto debe reconocer un epítomo diferente, o modificado, del que reconocen los anticuerpos de la presente invención.

Las posiciones 29 a 42 del péptido $\beta A4$ quedan completamente dentro de la putativa región transmembrana de la proteína precursora de amiloide y son de naturaleza hidrófoba (Miller y cols., 1993). Los péptidos sintéticos en las secuencias del extremo C de esta región deben contrarrestar la capacidad de la secuencia de 34-42 de formar una estructura inusualmente estable que es casi insoluble en agua y desnaturizantes potentes (Halverson y cols., 1990, Biochem. 29: 2639-2644) si van a usarse para provocar una buena respuesta inmunitaria contra $\beta A4$ soluble. Los presentes inventores diseñaron un espaciador hidrófilo de cinco residuos de longitud que resolvería esos problemas de insolubilidad y que también separarían el presunto epítomo del vehículo, Para reducir las probabilidades de reactividad cruzada con la especie de $\beta A4$ mas corta pero principal, 1-40, los presentes inventores eligieron un epítomo peptídico mínimo de 8 residuos que corresponde a las posiciones 35-42 de la secuencia de $\beta A4$. Toda la secuencia sintética diseñada de este modo se acopló, mediante un grupo sulfhidrilo libre en un residuo de cisteína del extremo N, a KLH (hemocianina de la lapa californiana).

El uso con éxito de espaciadores y residuos hidrófilos en la producción de anticuerpos contra péptidos está bien documentado al igual que el uso de estructuras hidrófilas para solubilizar haptenos insolubles para su conjugación (McMillan y cols., 1983, Cell 35: 859-863; Makela y Seppala, 1986, en Handbook of Experimental Immunology. Volumen 1: Inmunochimistry, Wier, D.M., editor. Blackwell Scientific Publicaciones, Oxford, paginas 3.1-3.13). El éxito de este procedimiento para producir anticuerpos específicos puede atribuirse al menos en parte a la presencia de un extremo carboxilo cargado libre, especialmente en el contexto de una secuencia hidrófila, ya que los residuos terminales de los antígenos peptídicos dan lugar a proporciones significativas de anticuerpos contra péptidos (GrasMasse y cols., 1985, en Synthetic Peptides in Biology and Medicine, Alitalo, K. y cols., editores, Elsevier, Amsterdam, página 105). Esto, junto con el uso selectivo y novedoso de una secuencia mínima de $\beta A4$ que se usa como inmunógeno maximizó la probabilidad de producir un anticuerpo que podría distinguir entre la especie de $\beta A4$ que termina en la posición 42 y las que no. Aunque los estudios competitivos de péptidos no localizaban exactamente el determinante antigénico, las secuencias de $\beta A4$ distintas de 1-42 no se unían de forma eficaz. El hecho de que 1-42 no competía totalmente con $\beta A4$ traducido *in vitro* marcado con ^{35}S -metionina puede deberse o bien a las propiedades particulares de la molécula misma o al hecho de que el inmunógeno peptídico 35-42 se presentó en el contexto de un espaciador y/o vehículo específicos, o a que un exceso de 200-1000 veces de péptido sin marcar no es suficiente para inactivar la serial. Los efectos no específicos de los residuos del extremo N en la actividad antigénica también están bien documentados (Benjamini y cols., 1968, Biochem. 7: 1261-1264).

El intrigante hallazgo de que 25-35 de hecho potencia la capacidad de 369.2B y otros anticuerpos de unirse $\beta A4$ puede deberse a una peculiar interacción entre el péptido acortado y la secuencia de $\beta A4$ de longitud completa. Se cree que los residuos 26-33 existen en forma de un enrollamiento aleatorio en solución acuosa (Halverson y cols. 1990) y pueden ser capaces de interactuar con $\beta A4$ soluble de tal forma que haga que el extremo C sea más accesible a los sitios de unión de los anticuerpos.

El anticuerpo altamente específico de la presente invención, del que 369.2B es un ejemplo particular, se produjo contra un péptido $\beta A4$ sintético que tenía los residuos 35-42, y no reconoce la especie más corta de $\beta A4$ 1-40 en solución o en una fase sólida. Además, tanto 1-40 y 1-43 fueron incapaces de eliminar por absorción el anticuerpo cuando se usa inmunohistoquímicamente. Se aplicó un procedimiento de cribado secundario con capacidad de procesamiento media para el cribado de sobrenadantes de hibridoma usando $\beta A4$ traducido *in vitro* marcado radiactivamente de forma que los anticuerpos seleccionados en el cribado primario pudieran seleccionarse además por su capacidad de inmunoprecipitar $\beta A4$ soluble. Este procedimiento puede adaptarse fácilmente a otras proteínas/anticuerpos de interés. El MAb resultante 369.2B representa una herramienta superior para investigar el papel de los péptidos $\beta A4$ que terminan en la posición 42 *in situ*, en tejido postmortem, en animales transgénicos y para la generación *in vitro* de péptidos $\beta A4$ en modelos establecidos de producción de $\beta A4$ celular, para uso en el diagnóstico y terapéutico,

El anticuerpo monoclonal de la presente invención representa una herramienta importante necesaria para establecer un kit de prueba diagnóstica. Permite medir/cuantificar la cantidad del $\beta A4$ 1-42 o de sus derivados (por ejemplo la especie 4-42 y otras formas truncadas con el extremo carboxi "42") en fluidos corporales humanos (LCR, suero, orina, etc.) o en tejidos. También puede usarse para estudiar el patrón de distribución de 1-420 de la especie de $\beta A4$ que termina en el residuo 42, en cerebros con AD comparando con controles sanos. Su avidez excepcionalmente alta hace que sea una herramienta superior y novedosa para dichas pruebas. El anticuerpo monoclonal que se describe aquí puede usarse también en sistemas de modelos biológicos como por ejemplo cultivos de células transfectadas o modelos animales (ratones transgénicos), diseñados para medir y/o influenciar la presencia y/o producción de la especie de $\beta A4$ que termina en el aminoácido 42. Estos sistemas en modelos representan un medio para identificar los moduladores selectivos de la producción de $\beta A4$ que terminan en la posición del aminoácido 42 de $\beta A4$ en sistemas biológicos. Los anticuerpos de la presente invención proporcionan procedimientos de prevenir la agregación del péptido $\beta A4$ debido a que la especificidad del anticuerpo permitirá la interferencia específica con el residuo del extremo C libre, interfiriendo así y alterando la agregación que puede ser patógena en la AD.

De forma sorprendente, el anticuerpo de la presente invención difiere del de la técnica anterior en que tiñe amiloide difuso y fibrilar, ovillos neurofibrilares, y amiloide vascular aunque es específico para el residuo 42 del extremo C libre del péptido $\beta A4$. Este patrón de unión único muestra que el anticuerpo de la presente invención reconoce un epítipo diferente del de la técnica anterior y que la distribución tisular o accesibilidad del péptido $\beta A4$ que reconoce el anticuerpo de la presente invención es también diferente. Además, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que puede precipitar el péptido $\beta A4$ de la solución que no demuestran los anticuerpos de la técnica anterior. Así, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales únicos que reconocen un subconjunto único de especie de $\beta A4$ que tiene una distribución tisular distinta que lo más probablemente es un mejor indicador diagnóstico que los anteriormente disponibles, y una diana única para la intervención terapéutica.

En consecuencia la presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de los mismos que son específicos para la especie $\beta A4$ del péptido donde el C-terminal finaliza en el residuo 42. La presente invención también proporciona el uso de dichos anticuerpos, fragmentos de enlace y constructos de los mismos en

métodos de diagnóstico, análisis, terapéuticos y de purificación bioquímica que emplean la especificidad de enlace de los presentes anticuerpos monoclonales y su uso dentro de las formulaciones farmacéuticas.

Los siguientes ejemplos explicaran la presente invención adicionalmente y se muestran a modo de ilustración, no a modo de limitación, Los siguientes ejemplos ilustran ciertos aspectos de los procedimientos y composiciones identificados anteriormente así como los resultados ventajosos.

Ejemplo 1: Sistema de expresión del péptido β A4

Preparación del plásmido pGK002

Los procedimientos generales de clonado y de biología molecular se encuentran por ejemplo en Sambrook, Fritsch, y Maniatis, 1989, Molecular Cloning 2a edición, Cold Spring Harbor Lab Press. El plásmido pMTI-26, que es un clon Bluescript KS que contiene 2.415 kb (pares de kilobases) de la secuencia de APP con un codón de terminación TAG seguido de un sitio BamHI situado en marco mediante mutagénesis dirigida al sitio después del codón del aminoácido 42 de la región β A4, se modificó escindiendo un fragmento de 1,8 kb de XbaI/Bgl II y volviendo a ligar el plásmido después de completar los extremos. La construcción resultante, denominada pGK002, introduce el codón de iniciación que contiene la secuencia consenso de la secuencia de β A4 inmediatamente aguas abajo del promotor de Bluescript T7.

Preparación del plásmido pGK003

El plásmido pGK003 (Fig. 3), que se usa en todas las traducciones de β A4 *in vitro* en el sistema de germen de trigo que se describe anteriormente, se prepare subclonando un fragmento de 590 bp (pares de bases) NotI/Xho I de pGK002 que contiene toda la secuencia de β A4 humano con la terminación mutagenizada/Bam HI en un vector pSP64 polyA (Promega Corp.). Para preparar este plásmido, se digirió pGK002 con Not I y Xho I y el fragmento de 590 bp se completó con Klenow, se aisló y se ligo con pSP64polyA linearizado con Sma I. La Figura 3 es un diagrama del Clon pGK003. El marco de lectura abierto de β A41-42 se expresa *in vitro* a partir del promotor bacteriano SP6. La región 3' sin traducir (3' -UT) región de APP se muestra en negro.

Ejemplo 2: Transcripción y Traducción de pGK003 *in vitro*

El plásmido pGK003 se linearizó con EcoRV y la digestión completa se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa. La muestra se extrajo dos veces con fenol/cloroforno, seguido de dos extracciones con cloroforno y precipitación con etanol. El sedimento resultante se lava una vez en etanol al 70%, se secó parcialmente a vacío y se volvió a suspender en TE a una concentración de 1 μ g/ μ l.

Los transcritos *in vitro* usando plantillas linearizadas a 30 μ g/ml se prepararon en tampón de HEPES 80 mM KOH (a pH 7,5) que contenía MgCl₂ 16 mM, espermidina 2 mM, DTT 40 mM, ATP/CTP/GTPIUTP 3 mM, 800 unidades/ml de Inhibidor de ribonucleasas RNAsin (Promega Corp.), 5 unidades/ml de pirofosfatasa inorgánica de levaduras (Sigma Corp.), y 1800 unidades/ml de RNA polimerasa SP6 (Promega Corp.). La mezcla de reacción se mantuvo a 37°C durante 4 horas. El transcrito resultante se verificó mediante electroforesis a través de un gel de agarosa al 1,2% TBE/EtBr con muestras desnaturalizadas (65°C x 10 minutos).

Los transcritos se tradujeron usando extracto de germen de trigo (Sigma Corp.). Resumiendo, los transcritos se calentaron (65°C x 10 minutos), se mezclaron con el extracto de germen de trigo que contenía KAc, RNAsin, y una mezcla aminoácidos sin metionina, y se tradujeron a 25°C durante 1 hora en presencia de metionina marcada con ³⁵S (Amersham). La traducción de una proteína β A4 de 4 kD (kilodaltons) se verificó mediante SDS-PAGE usando gel de Tris al 16%/Tricina (Novex). Los geles se fijaron y las proteínas se visualizaron fluorográficamente usando un sistema comercial "Amplify" (Amersham).

La incorporación del marcador a β A4 traducido *in vitro*, que contiene un residuo de metionina por molécula, se determinó mediante separación en gel. Se solubilizaron geles de 2 mm en 1 ml de peróxido de hidrógeno al 30%, 10 NH₄OH 0,75 M hasta la mañana siguiente a 37°C. Después se añadió un volumen de 10 ml de un coctel de centelleo "Ready Value" (Beckman) y se determinaron las DPM (desintegraciones por minuto) usando un escintilometro Beckman LS6000IC en modo auto DPM. Las reacciones típicas producen ~250 ng de β A4/ml o ~56 nM.

La transcripción *in vitro* seguida de la traducción del clon de β A4, pGK003, en un sistema de germen de trigo produjo una única proteína de producto de 4 kD cuando se visualizó mediante fluorografía en un gel de SDS de poliacrilamida y Tris al 16%-Tricina (Figura 4A). La Figura 4A muestra los resultados de la SDS-PAGE en un gel de Tris al 16%/Tricina. Carril 1: Marcadores de PM alto. Carril 2: Marcadores de PM bajo. Carril 3: β A4 traducido *in vitro* en un sistema de germen de trigo. La identidad de este producto de 4 kD se confirmó mediante inmunoprecipitación con anticuerpos específicos contra β A4 (Figura 4B). La Figura 4B muestra los resultados de la SDS-PAGE en un gel 20 de Tris al 16%/Tricina. Carril 1: Marcadores de PM alto. Carril 2: Marcadores de PM bajo. Carril 3: β A4 traducido *in vitro* a partir de un sistema de germen de trigo inmunoprecipitado con el MAb 286.8A. La transcripción y traducción

de este así como de otros clones de $\beta A4$ en un sistema de lisado de reticulocitos combinado (TnT) no produjo el mismo rendimiento ni pureza de $\beta A4$ marcado radioactivamente (no se muestran los datos). Esto podría deberse al corto del transcrito o a la peculiar naturaleza del péptido $\beta A4$ mismo.

5 El anticuerpo monoclonal 286.8A, que se produjo contra el péptido 1-42 en bruto y cubre la región de 3-8 de $\beta A4$ fue capaz de precipitar esta proteína de forma dependiente de la concentración (Figura 5). La Figura 5 representa esta inmunoprecipitación de $\beta A4$ traducido *in vitro* (IVT *fJA4*). Se inmunoprecipitaron cantidades crecientes de IVT $\beta A4$ con una cantidad fija de 286.8A (7,4 μg) en 100 μl de tampón RIPA.

10 Ejemplo 3: Preparación de péptidos inmunógenos y de cribado

Los péptidos se prepararon mediante procedimientos estándar de Fmoc en fase sólida (véase por ejemplo Gras-Masse y cols., 1985).

15 El Péptido nº 959, un péptido sintético de 14 residuos que tiene una cisteína en el extremo N unida a un espaciador hidrófilo DGDGD y los residuos 35-42 de $\beta A4$ humano (que daba la secuencia completa: CDGDGDMVGGVVIA 40 (SEC. ID. N.O: 1)), se acoplo a un vehículo de KLH (hemocianina de lapa californiana) activada con maleimida usando el kit de conjugación de inmunógenos activados "Imject" disponible comercialmente (Pierce). Resumiendo, 2 mg de péptido se disolvieron en 200 μl de tampón de conjugación y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas con 2 mg de KLH activada con maleimida reconstituidos. El conjugado se purificó mediante filtración en gel y se usó como inmunógeno para la producción de anticuerpos monoclonales usando protocolos estándar tal como se describe en el Ejemplo 4.

25 El péptido nº 958, un péptido sintético de 14 residuos que tiene una cisteína en el extremo N unida a un espaciador GGGGG y los residuos 35-42 de $\beta A4$ humano (que daba la secuencia completa: CGGGGGMVGGVVIA (SEC. ID.Nº: 2)), se acoplo a ovalbimina disolviendo 2 mg de péptido en 200 μl de guanidina 6 M, fosfato 0,01 M a pH 7,0 50 Y se conjugó como anteriormente a 2 mg de una ovoalbumina activada con maleimida reconstituida. El conjugado purificado se usa en un cribado mediante ELISA de productos monoclonales de la fusión. Los anticuerpos cribados de esta forma son específicos para el determinante "35-42" no para el espaciador, ni para las porciones del puente de cisteínas ni de vehículo del inmunógeno,

30 Figura 6: Ilustra el péptido que se usó para generar la respuesta inmunitaria (el inmunógeno) y se muestra el péptido que se usó para cribar el suero de ratones, así como las fusiones, en la placa de inmunoensayo enzimático (EIA). La secuencia de *fJA4* 35-42 se sintetizó junto con un espaciador y una cisteína en el extremo C, que después se usó para acoplarla covalentemente mediante un puente de maleimida a una gran molécula de vehículo, Tanto el espaciador como la molécula de vehículo en el péptido inmunógeno y de cribado son diferentes para poder seleccionar los anticuerpos específicos contra una secuencia de $\beta A4$.

40 ELISA (Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas)

40 Biotinilación de MAb

Se usa el éster N-hidroxisuccinimidínico de biotina para biotinilar el anticuerpo monoclonal 286.8A. Primero se verifica la integridad del reactivo observando su hidrólisis espontánea en ausencia de las aminas primarias: se monitoriza una solución de 0,2 mg/ml de NHS-LC-Biotina (Vector Labs, Burlingame, CA) en PBS a 260 nm en función del tiempo. Una OD260 de 1,0 después de aproximadamente 2 horas (que aumenta a partir de una OD260 inicial de 0,55) indica la hidrólisis esperada.

50 En la reacción de biotinilación se ha encontrado que una relación molar de 66: 1 entre biotina y 286.8A monoclonal a pH neutro proporciona resultados óptimos cuando se analiza 286.8A biotinilado en un formato de Elisa. Se añaden 0,6 mg de NHS-LC-Biotina en H₂O a una concentración de 0,1 mg/ml (en el plazo de 5 minutos a partir de la disolución) a 1 ml (2 mg) de 286.8A en PBS. Se deja que se produzca el ataque nucleofilo del éster de NHS a 25°C durante 4 horas después de lo cual se añaden 10 mg de glicina en 50 μl de H₂O para terminar la reacción, La reacción después se introduce en una columna de desalación de dextrano reticulado de 10 ml equilibrada con PBS y se recogen alícuotas de 0,5 ml. El primer pico que representa el pico de IgG se agrupa y se almacena a 4°C hasta su uso.

55 Procedimientos de Elisa

60 Se recubren placas de Elisa Corning 25801 de 96 pocillos hasta la mañana siguiente a 4°C con 100 μl de 4G8 u otro anticuerpo de captura a 5 $\mu g/ml$ habitualmente en H₂O o tampón. La placa después se lava con PBS que contiene Triton X-100 al 1% en un Dynatech Ultrawash plus. Después los pocillos se bloquean durante 90 minutos con 300 μl de PBS que contiene Triton X-100 al 1% y BSA de calidad de Elisa al 1% (tampón de bloqueo). Después de lavar, se añade el antígeno o la incógnita diluidos en tampón de bloqueo a los pocillos por triplicado y se incuban a temperatura ambiente durante 2 horas. La placa se lava 2 veces y se añaden 400 ng de 286.8A biotinilado o de otro anticuerpo de detección, Después de 30 minutos, la placa se lava mas profusamente (lavado 2 veces, remojado de 2 minutos, lavado 2 veces) y se añaden 100 μl de complejos de Avidina-Biotina-Fosfatasa alcalina previamente

formados (Vector Labs). La placa se lava (lavado 2 veces, remojo de 2 minutos, lavado 2 veces, remojo de 5 minutos, 4 lavados) y se añade sustrato MUP a 0,06 mg/ml 1 x tampón de dietanolamina. Las placas se leen en un Millipore Cytoflour después de 15 minutos usando un filtro de excitación de 360 nm y un filtro de emisión de 460 nm.

Ejemplo 4: Generación de anticuerpos monoclonales

Se inmunizó a ratones Balb/c con inoculaciones múltiples por vía I.P. de péptido nº 959 conjugado con KLH. Los esplenocitos de los animales inmunizados se fusionaron con el mieloma de ratón AG8 usando protocolos estándar (Wunderlich y cols., 1992, J. Immunol. Methods 147: 1-11). Los sobrenadantes de los hibridomas resultantes se cribaron para detectar la inmunorreactividad contra el péptido nº 958 acoplado a ovoalbumina usando protocolos estándar de Elisa tal como se describe anteriormente. Los hibridomas positivos para la expresión de los MAb inmunorreactivos se clonaron al menos dos veces mediante dilución limitada y se realizó un análisis del isotipo de los MAb. Se preparó IgG de MAb purificada a partir de fluido de ascitis usando cromatografía por afinidad con Proteína-A.

Después el cribado de la fusión demostró que la inmunización de los ratones con el péptido nº 959 conjugado con KLH y el cribado en formato ELISA de fase sólida con el péptido nº 958 acoplado a ovoalbumina produjo seis señales progenitoras positivas (numeradas de 369.1 a 369.6). Ambos péptidos tienen la región de $\beta A4$ de los aminoácidos 35-42, diferentes espaciadores en el extremo N y una cisteína para el acoplamiento covalente a las proteínas de vehículo (Figura 6). El extremo C libre con el grupo carboxi cargado y una longitud limitada de solo 8 aminoácidos favorece la generación de anticuerpos que se dirigen de forma específica contra formas más largas de los péptidos $\beta A4$; por lo tanto, los péptidos $\beta A4$ que terminan antes del aminoácido 42 no serían reconocidos.

La Figura 6 representa el diagrama de la estructura del inmunógeno (vehículo-péptido) y el péptido de cribado (vehículo-péptido de cribado) que se usa.

Dos de las seis señales parentales finalmente no pudieron clonarse. De las cuatro restantes, dos dieron señales de inmunoprecipitación/centelleo superiores a los controles no inmunitarios normales solo en un pequeño porcentaje; los otros dos (identificados como 369.6 y 369.2) mostraron señales del 18% y el 19%, respectivamente. Se llevó a cabo la producción de anticuerpos monoclonales a partir del fluido de ascitis y la posterior inmunopurificación de estos clones. La Tabla 1 compara los datos obtenidos con el IPSA para los sobrenadantes de los hibridomas y los anticuerpos purificados.

TABLA 1

| Estirpe celular | Isotipo | IPSA (sobrenadante) | IPSA (purificado) |
|-----------------|------------|---------------------|---------------------|
| 369.1 | IgG1/IgG2b | 3% | N.D. |
| 369.2 | IgG1 | 19% | 25% (con 5 μ g) |
| 369.3 | IgG1 | 2% | N.D. |
| 369.6 | IgG2b | 18% | 7% (con 10 μ g) |

Tabla 1. Comparación de las actividades de los anticuerpos en estirpes celulares de hibridoma. Los datos de los IPSA representan el porcentaje de $\beta A4$ traducido *in vitro* que pudo ser inmunoprecipitado o bien por los sobrenadantes de los hibridomas o por el anticuerpo purificado.

Ejemplo 5: Ensayo de inmunoprecipitación/centelleo para el cribado de hibridomas

Para desarrollar y cribar anticuerpos monoclonales que reconocen el péptido $\beta A4$ en solución en lugar de cuando está unido a una fase sólida, se desarrolló un ensayo en el que se cuantifica la inmunoprecipitación de un $\beta A4$ traducido *in vitro* (IVT $\beta A4$) marcado con ³⁵S-metionina. Se permite que una cantidad estándar de $\beta A4$ traducido *in vitro* forme complejos de anticuerpo/antígeno en una solución que puede optimizarse para determinar la potencia iónica, el pH, y la composición del detergente. Después, los complejos inmunitarios se precipitan con Proteína G (células Omnisorb) y se lavan profusamente, la radioactividad unida se cuenta en un escintiómetro de líquidos, se resta el ruido de fondo y se calcula la eficacia de la precipitación. Este ensayo de inmunoprecipitación/centelleo (IPSA) permite la rápida identificación y caracterización de anticuerpos, y se ha usado para analizar una variedad de anticuerpos contra $\beta A4$. El ensayo puede aplicarse en general a sobrenadantes de hibridomas monoclonales así como a suero policlonal para identificar anticuerpos que pueden usarse para inmunoprecipitaciones. Habitualmente

pueden realizarse 18 IPSA en un día. Por lo tanto este es un procedimiento de cribado secundario de hibridomas rápido e informativo.

Resumiendo, se añadieron aproximadamente $1,5 \times 10^5$ DPM de $\beta A4$ traducido *in vitro* marcado con 35 S-metionina (IVT $\beta A4$) a $10 \mu\text{l}$ de $10 \times$ tampón de inmunoprecipitación (NaCl 150 mM, NP-40 al 10%, ácido desoxicólico al 5%, SDS ~ 1%, Tris 500 mM a pH 8). A esto, se añadieron $90 \mu\text{l}$ de sobrenadante de células monoclonales de la fusión monoclonal de interés (denominada n° 369) y se dejaron reaccionar durante 2 horas a 4°C . El ruido de fondo se determinó usando $90 \mu\text{l}$ de sobrenadante de un clon no reactivo; el control positivo era $90 \mu\text{l}$ de sobrenadante que contenía anticuerpo monoclonal 286.8A que se había obtenido primero contra una preparación de $\beta A4$ (1-42) sintético en bruto. Después de 2 horas, se añadieron $40 \mu\text{l}$ de una solución al 10% de células Omnisorb (Calbiochem) equilibradas en $1 \times$ tampón de inmunoprecipitación (tampón de RIPA, NaCl 150 mM, NP-40 al 10%, ácido desoxicólico al 0,5%, SDS al 0,1%, Tris 50 mM a pH 8) y se dejaron reaccionar durante otras 2 horas más a 4°C agitando. Las células se sedimentaron mediante centrifugación durante 5 minutos a $4500 \times g$ y a 4°C , y se lavaron 3 veces con $800 \mu\text{l}$ de tampón de inmunoprecipitación frío. Los sedimentos se transfirieron cuantitativamente a viales de centelleo y se contaron en un contador de centelleo Beckman LS6000 en modo Auto DPM. Se calculó el porcentaje de $\beta A4$ inmunoprecipitado.

Los ensayos de inmunoprecipitación/centelleo se realizaron con $1 \mu\text{g}$ de anticuerpo monoclonal purificado 369.2B en un volumen total de $100 \mu\text{l}$ x tampón de inmunoprecipitación al que se añadieron $5 \mu\text{g}$ de péptido competitivo. Las incubaciones y precipitaciones fueron las descritas anteriormente.

La Figura 7 representa el porcentaje de IVT $\beta A4$ inmunoprecipitado en función de la concentración de anticuerpo para los MAb 369.2, 369.6 y el MAb 286.8A. En las condiciones de este ensayo, 369.2 (y además el subclon 369.2B) es aproximadamente cuatro veces mejor que 369.6 para inmunoprecipitar IVT $\beta A4$ soluble, pero precipita un poco menos de la mitad que 286.8A. La Figura 7 muestra los resultados de la inmunoprecipitación de $\beta A4$ traducido *in vitro* en función de la concentración de anticuerpo (μg de anticuerpo/ $100 \mu\text{l}$ de tampón de RIPA) donde:

$$\% \text{ de } \beta A4 \text{ inmunoprecipitado} = \frac{(\text{dpm con MAb}) - (\text{dpm con control no o preinmunitario})}{(\text{dpm totales de } \beta A4/\text{reacción})}$$

Los porcentajes con una concentración de MAb dada variaban únicamente algunos puntos porcentuales entre los experimentos.

IPSA para la caracterización monoclonal

Se añadieron aproximadamente $1,5 \times 10^5$ DPM de $\beta A4$ traducido *in vitro* marcado con 35 S-metionina a diversas cantidades de anticuerpo monoclonal purificado, 0 bien 369.2B, 369.6, 0 286.8A, en un volumen total de $100 \mu\text{l}$ de tampón de inmunoprecipitación, y se dejaron reaccionar tal como se describe anteriormente. Los complejos inmunitarios se precipitaron con Omnisorb, se lavaron y se contaron tal como se describe anteriormente.

Ejemplo 6: Caracterización del MAb 369.2B

Para caracterizar adicionalmente la mejor estirpe celular, 369.2B, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación/centelleo competitivo (IPSA competitivo). En esta variación se añadió 369.2B a un exceso molar de aproximadamente 200 veces de un péptido competidor marcado al mismo tiempo que $\beta A4$ 1-42 traducido *in vitro* marcado. Tal como era de esperar, los péptidos de la región de $\beta A4$ humano, 1-40, 1-11, 1-28, 12-28, así como el péptido inverso 40-1 no compitieron con el $\beta A4$ traducido *in vitro* marcado con 35 S-metionina en la inmunoprecipitación, mientras que el péptido 1-42 sí (Figura 8).

Estos resultados fueron corroborados en un formato ELISA en fase solida: el péptido de cribado acoplado a ovoalbumina absorbido que contiene la región de $\beta A4$ 35-42, así como el péptido 1-42 compiten, mientras que 1-40 no (Figura 9). La menor competitividad del péptido 1-42 comparado con el 35-42 acoplado a ovoalbumina puede deberse a factores de conformación y/o solubilidad relacionados con el determinante antigénico, o quizá simplemente a la estequiometría particular de la conjugación (ovoalbumina, un vehículo con peso molecular de 45 kD comparado con 4 kD del péptido 1-42, y que tiene entre 5 y 15 grupos maleimida conjugables por mol de vehículo).

La Figura 8 muestra el ensayo de competición de péptidos por inmunoprecipitación/centelleo para la determinación de los epítomos de MAb 369.2. El péptido competidor ($5 \mu\text{g}$) se mezcló con $\beta A4$ traducido *in vitro* ($\sim 1,5 \times 10^5$ DPM o $\sim 200 \mu\text{g}$) después se inmunoprecipitó con $2 \mu\text{g}$ de 369.2, donde:

$$\% \text{ de } \beta A4 \text{ inmunoprecipitado} = \frac{(\text{dpm con MAb}) - (\text{dpm con control no o preinmunitario})}{(\text{dpm totales de } \beta A4/\text{reacción})}$$

Los porcentajes con una concentración de MAb dada variaban habitualmente solo algunos puntos porcentuales entre los experimentos.

5 La Figura 9 muestra la situación de los epítomos del MAb 369.2 mediante el ensayo competitivo. C369.2 (50 ng de IgG/100 μ l) se preincubó con o sin competidores péptidos sintéticos (22°C, 1 hora), después se sometió a Elisa contra 35-42 acoplado a ovoalbumina unido a la placa (200 ng/pocillo). La competición porcentual se calcula relativa a la unión de MAb en ausencia de competidor, es decir dónde:

$$\% \text{ de competición} = \frac{(\text{señal sin competidor}) - [(\text{señal con competidor}) - (\text{ruido de fondo})]}{(\text{señal sin competidor})}$$

10 El cuadrado negro es el conjugado peptídico 35-42 (OVA); el cuadrado blanco es el péptido 1-42; y el diamante negro es el péptido 1-40.

15 A partir de estos datos, los presentes inventores concluyen que 369.2B monoclonal es específico para el extremo C del péptido β A4 de longitud completa (1-42). Aunque el determinante antigénico exacto no se ha localizado exactamente, claramente afecta a los residuos posteriores al 40 y, dado que el anticuerpo se produjo contra un péptido sintético corto, es improbable que el determinante afecte a otros residuos de β A4 que pueden estar yuxtapuestos por la conformación. De forma específica, 369.2B es una herramienta muy importante en el reconocimiento de la especie β A4 que termina en la posición 42.

20 Una observación adicional e interesante del ensayo de competición de péptidos es la capacidad de inmunoprecipitación mejorada de β A4 traducido *in vitro* por el decapeptido 25-35. Este fenómeno se observa también en ensayos que usaban otro anticuerpo monoclonal (es decir, 286.8A) así como un antisuero policlonal de conejo (no se muestran los datos). Los presentes inventores también saben por otros experimentos en los que se usaron cantidades variables de detergente, específicamente SDS, en ensayos de IPISA con MAb 286.8A, que puede
25 inmunoprecipitarse mas β A4 con cantidades crecientes de detergente (no se muestran los datos). De forma interesante, se ha demostrado que SDS es ineficaz para solubilizar agregados de β A4, al menos tal como se muestra mediante SDS-PAGE (Burdick y cols.,1992). Sin embargo, no está completamente claro porque SDS mejora la capacidad de inmunoprecipitación de β A4.

30 **Ejemplo 7: Estudios inmunohistoquímicos**

Los presentes inventores han acometido estudios inmunohistoquímicos con 369.2E. El patrón de tinción de 369.2B (dilución de 1/10.000 de una solución de anticuerpo purificado de ascitis a 22 mg/ml) mostró diferencias interesantes con el anticuerpo monoclonal 286.8A que los presentes inventores han demostrado que reconoce el 3-8
35 de β A4 y es específico para β A4 humano (no se muestran los datos). Los resultados obtenidos a partir de la inmunohistoquímica demostraron que 369.2B es un anticuerpo excelente (a una dilución de 1/10.000) para marcar de forma específica los núcleos de las placas de amiloide difusas, así como los depósitos de amiloide fibrilar y los depósitos de amiloide vascular (Figura 10).

40 La Figura 10 es una fotomicrografía que muestra las placas de β -amiloide, los vasos sanguíneos y los depósitos perivascuales de β A4 en un corte de 10 μ m de grueso embebido en parafina del cerebro de una paciente de 76 años con enfermedad de Alzheimer. Las secciones de los tejidos se pretrataron con ácido fórmico al 88% (30 minutos), después se marcaron usando un kit de avidina-biotina-peroxidasa (Vector Laboratories, Burlington, CA) con niqueldiaminobencidina como cromógeno. El anticuerpo monoclonal 369.2B marca placas con una variedad de
45 morfologías, entre otras placas nucleadas, perivascuales, y difusas (no amiloidóticas). También marca un subconjunto de vasos sanguíneos amiloidóticos.

Estudios adicionales han demostrado también que el péptido β A4 1-43 no es capaz de competir por la tinción (a un exceso de más de 1000 veces de péptido), mientras que β A4 1-42 suprimió completamente la señal (Tabla 2). De nuevo, tal como era de esperar, 1-40 o 40-1 no compitieron por la tinción. A partir de estos estudios los presentes inventores pueden concluir ya que este anticuerpo es una herramienta excelente para las pruebas
50 inmunohistoquímicas. Tal como sugieren los estudios *in vitro* que muestran diferencias fisicoquímicas entre 1-40 y 1-42, es posible que estas dos especies de β A4 muestren patrones distintos en el cerebro con enfermedad de Alzheimer. Con el anticuerpo monoclonal de la presente invención, los presentes inventores son ahora capaces de comenzar a responder a esta pregunta. Así, el anticuerpo monoclonal y los procedimientos de la presente invención son de utilidad para el uso diagnóstico y terapéutico en todas las metodologías inmunológicas y relacionadas que pueden aplicarse a la detección, control, extracción, inhibición y modificación de una única especie de β A4, en el diagnóstico y tratamiento de AD.
55

60

TABLA 2

Anticuerpo monoclonal usado para la tinción

| Péptido competitivo | MAB 286.8A contra el extremo N | MAB 369.2B contra el extremo C |
|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Ninguno/tampón | +++ | +++ |
| Ninguno/DMSO | +++ | +++ |
| "40-1" humano | +++ | +++ |
| "1-16" humano | - | +++ |
| "1-16" murino | +++ | +++ |
| "1-40" humano | - | +++ |
| "1-42" humano | - | - |
| "1-43" humano | - | +++ |
| "35-42" humano con espaciador | +++ | - |

Tabla 2. Resultados de los experimentos de unión competitiva e inhibición de la tinción, + + + indica una tinción fuerte. - Indica una tinción no detectable.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACION GENERAL:

- (i) SOLICITANTE: König, Gerhard Graham, Paul
- (ii) TITULO DE LA INVENCION: Anticuerpo Monoclonal Especifico para el péptido BA4
- (iii) NUMERO DE SECUENCIA: 3
- (iv) DIRECCION PARA LA CORRESPONDENCIA:

- (A) DESTINATARIO: Allegretti & Witcoff, Ltd.
- (B) CALLE: 10 South Wacker Drive Suite 3000
- (C) CIUDAD: Chicago
- (D) ESTADO: Illinois
- (E) PAIS: USA
- (F) ZIP: 60606

(v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
- (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.25

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUALES:

- (A) NUMERO DE SOLICITUD:
- (B) FECHA DE PRESENTACION: (C) CLASIFICACION:

(viii) INFORMACION DEL ABOGADO/AGENTE:

- (A) NOMBRE: McDonnell, John J
- (B) NUMERO DE REGISTRO: 26,949
- (C) NUMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 95,216

(ix) INFORMACION DE TELECOMUNICACIONES:

- (A) TELEFONO: 312-715-1000
- (B) TELEFAX: 312-715-1234

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 14 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácidos
 (C) CADENA: única
 (D) TOPOLOGIA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLECULA: péptido
 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:1:

Cys Asp Gly Asp Gly Asp Met
1 5

10

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 14 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácidos
 (C) CADENA: única
 (D) TOPOLOGIA: lineal

- 20 (ii) TIPO DE MOLECULA: péptido
 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:2:

Cys Gly Gly Gly Gly Gly Me
1 5

2) INFORMACION PARA SEQ ID NO:3:

25 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 30 (A) LONGITUD: 59 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácidos
 (C) CADENA: única
 (D) TOPOLOGIA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLECULA: péptido
 (ix) CARACTERISTICA:

- 35 (A) NOMBRE/CLAVE: Sitio de escisión
 (B) LOCALIZACION: 4..5
 (D) OTRA INFORMACION: /etiqueta - Beta /nota- "Sitio de escisión Beta en APP"

40 (ix) CARACTERISTICA:

- A) NOMBRE/CLAVE: Sitio de escisión
 (B) LOCALIZACION: 20..21
 (D) OTRA INFORMACION: /etiqueta- Alfa /nota- " Sitio de escisión Alfa en APP, residuos 16/17 de BA4."

45 (ix) CARACTERISTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Sitio de escisión
 (B) LOCALIZACION: 46..47 (D) OTRA INFORMACION: /etiqueta= Gamma /nota= " Sitio de escisión Gamma en APP"

50

(ix) CARACTERISTICA:

- 55 (A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
 (B) LOCALIZACION: 5..47
 (D) OTRA INFORMACION: /etiqueta= BA4 /nota- "BA4 péptido"

(ix) CARACTERISTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Región
- (B) LOCALIZACION: 33..56
- (D) OTRA INFORMACION: / etiqueta = Tm /nota= "Región de la Transmembrana de APP"

5

(ix) CARACTERISTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Región
- (B) LOCALIZACION: 1..32
- (D) OTRA INFORMACION: / etiqueta = Ex . /nota= "parte extracelular N-terminal de APP"

10

(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO:3:

Glu Val Lys Met Asp Al
1 5
His His Gln Lys Leu Va
20
Gly Ala Ile Ile Gly Le
35
Ile Val Ile Thr Leu Va
50

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un anticuerpo monoclonal que enlaza específicamente con el péptido β A4 que contiene un aminoácido terminal carboxi libre que se corresponde con el aminoácido 42 de la secuencia de aminoácidos del péptido β A4 y no con la de los péptidos β A4(1-40) y β A4(1-43).
- 10 **2.** Un anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 que reconoce el aminoácido C-terminal 42 del péptido β A4 (SEQ ID NO:3).
- 10 **3.** Un anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 que es un anticuerpo de la clase IgG.
- 4.** Un anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 que es un anticuerpo de la subclase IgG1 o IgG2b.
- 15 **5.** Un fragmento inmunológicamente activo del anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 que tiene la misma especificidad de enlace que el anticuerpo de la reivindicación 1.
- 6.** Una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 5.
- 20 **7.** Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 5, o una formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 para el uso en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer.

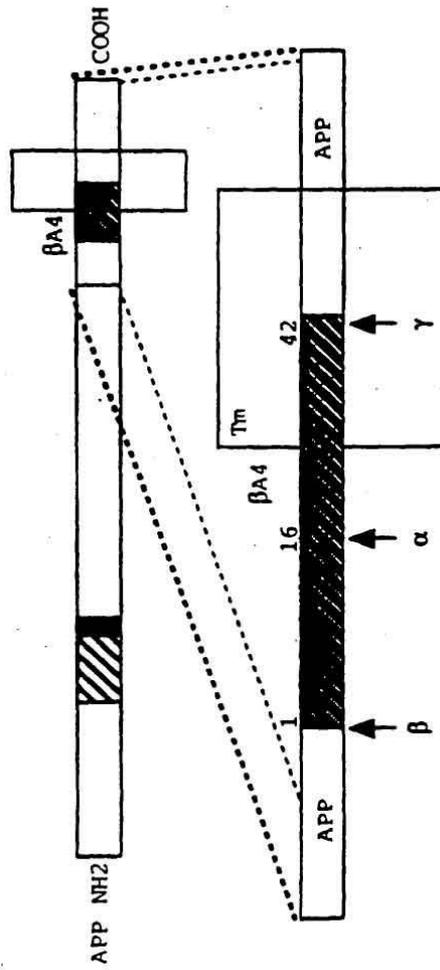


FIGURA 1

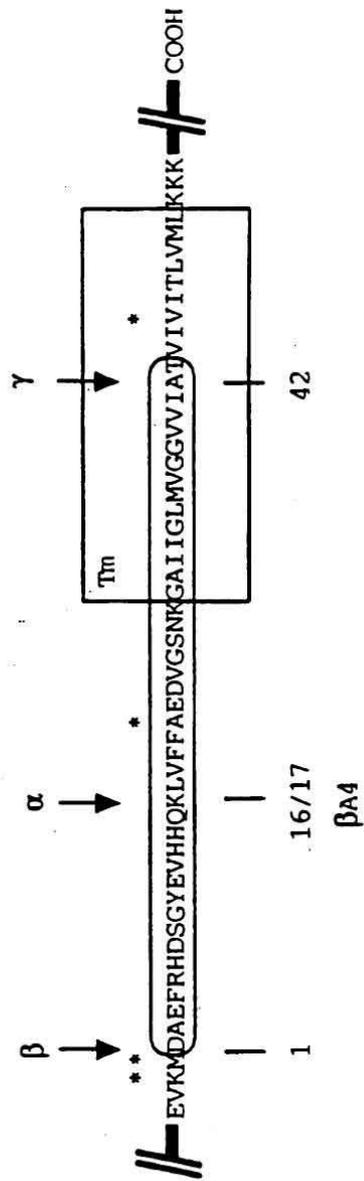


FIGURA 2

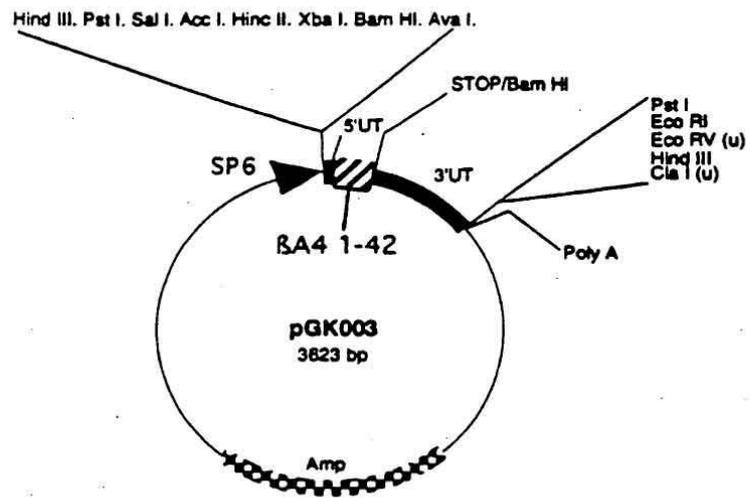


FIGURA 3

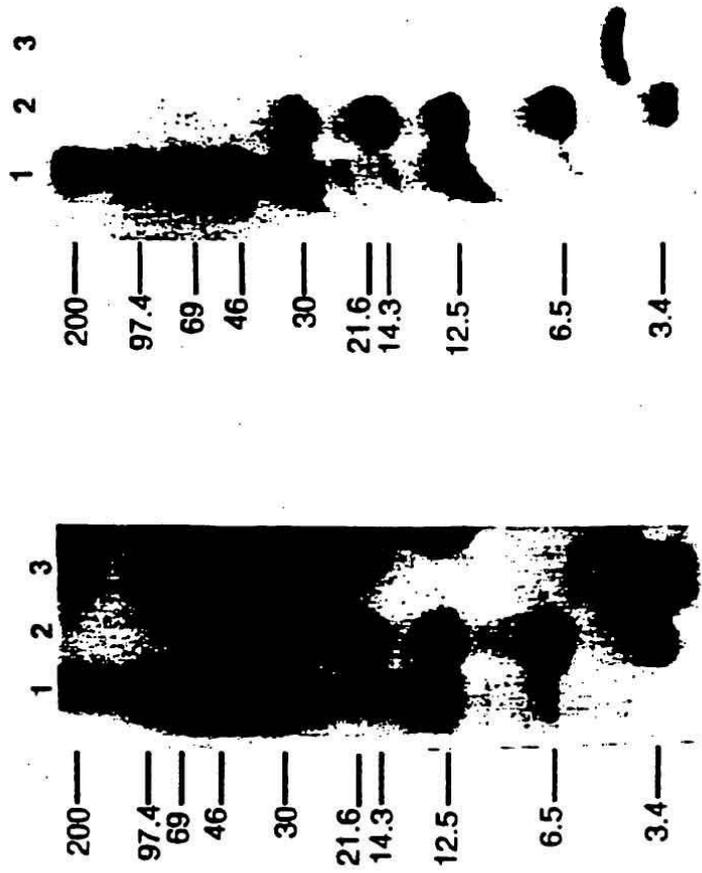


FIGURA 4A

e gel.

FIGURA 4B

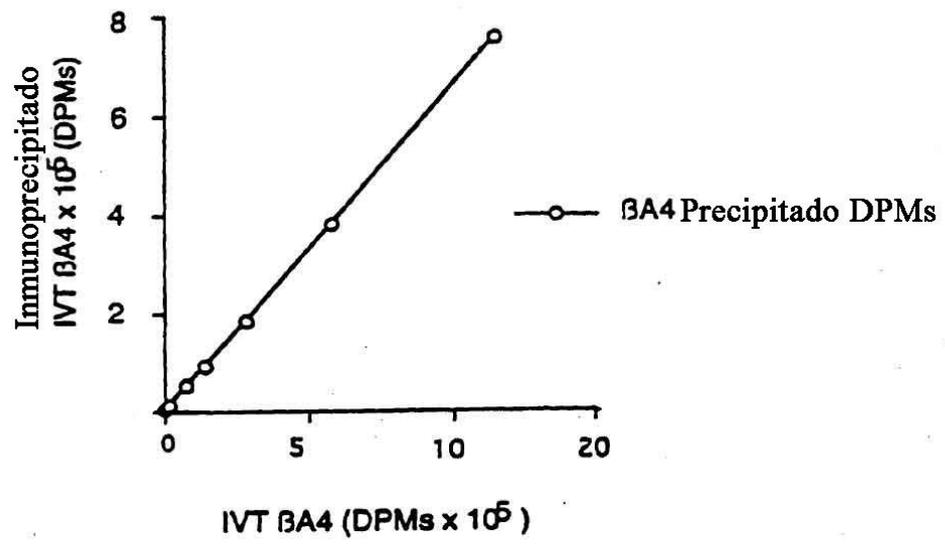


FIGURA 5

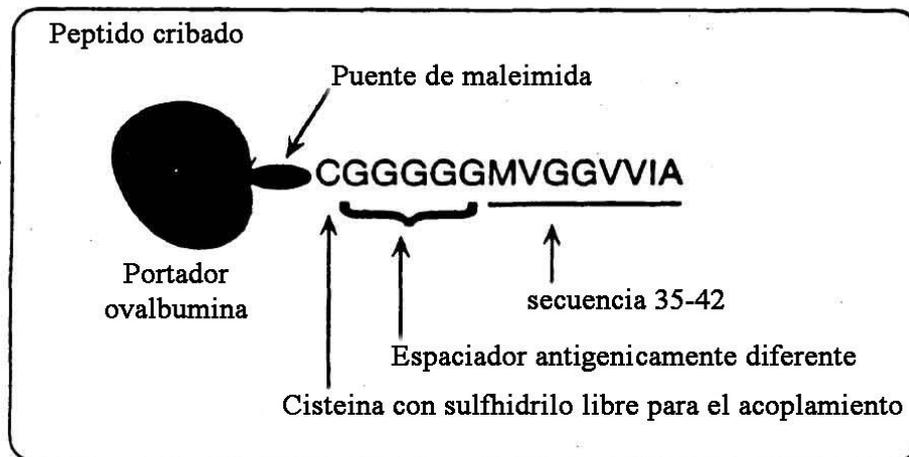
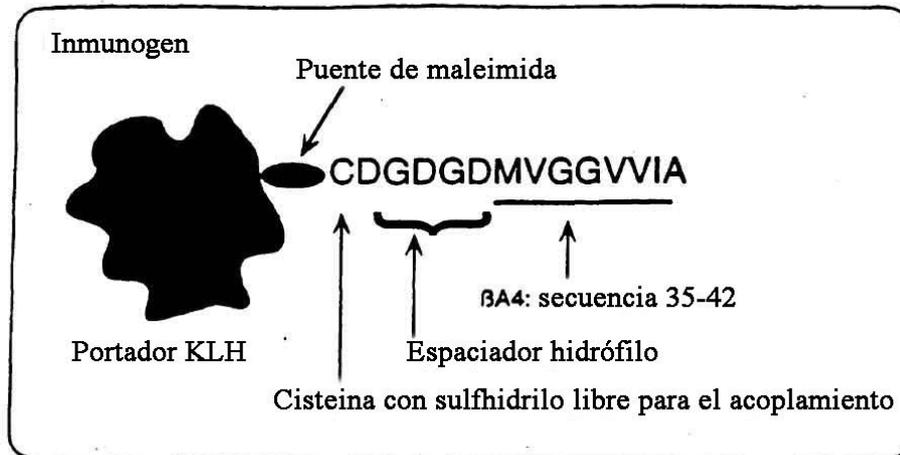


FIGURA 6

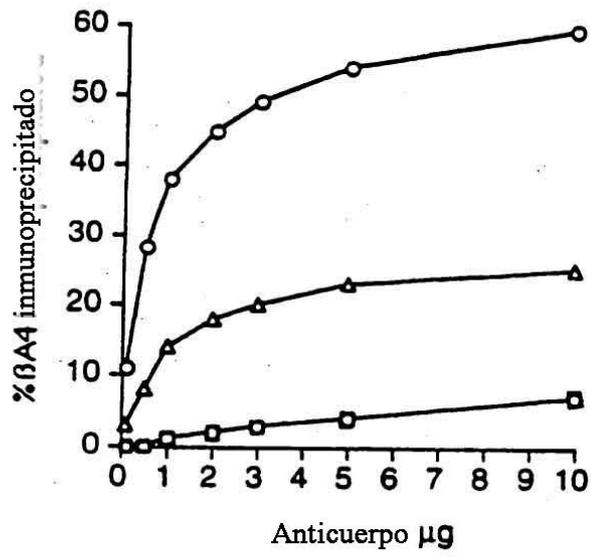


FIGURA 7

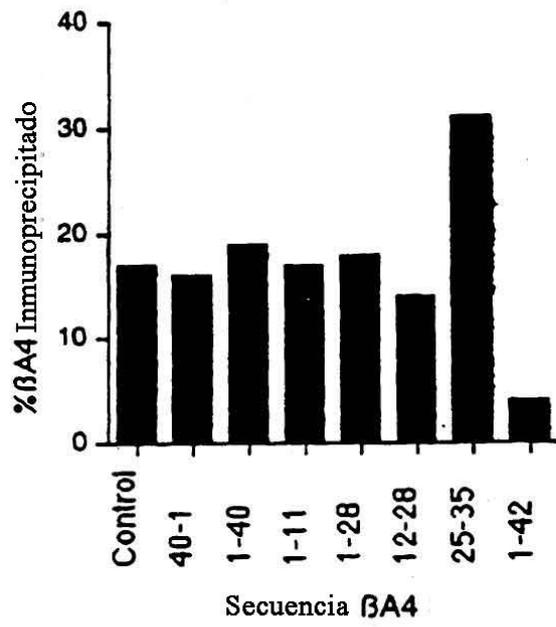


FIGURA 8

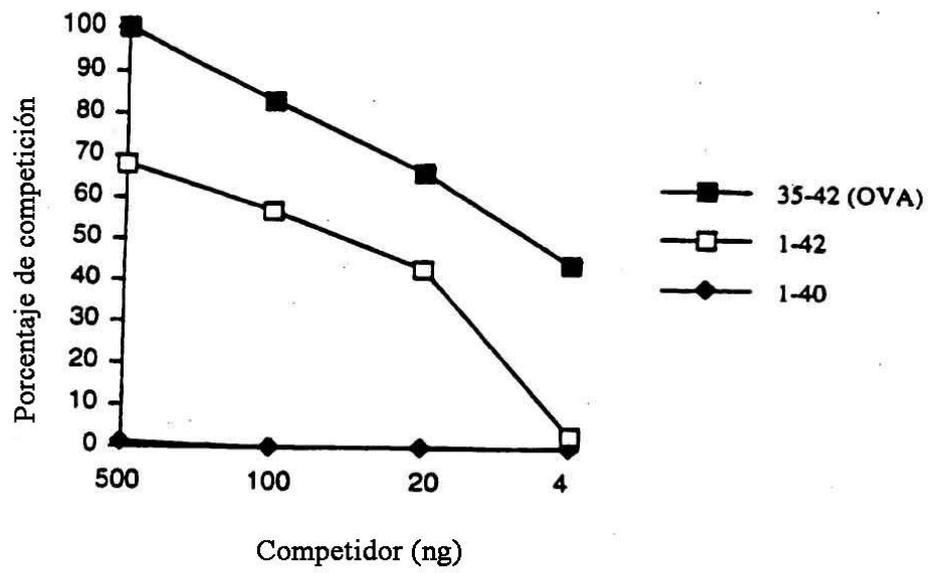


FIGURA 9



FIGURA 10