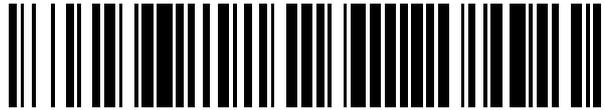


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 577**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2009 E 09718006 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 2257804**

54 Título: **Actividad anti-amiloide de la inmunoglobulina intravenosa (IVIG) in vitro**

30 Prioridad:

29.02.2008 US 32874 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.03.2014

73 Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)
One Baxter Parkway
Deerfield, IL 60015, US y
BAXTER HEALTHCARE S.A. (50.0%)

72 Inventor/es:

OLAS, KATARZYNA;
REIPERT, BIRGIT;
SCHWARZ, HANS-PETER y
EHRlich, HARTMUT

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 449 577 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

ACTIVIDAD ANTI-AMILOIDE DE LA INMUNOBLOGULINA INTRAVENOSA (IVIG) *IN VITRO*

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a un método para preseleccionar los lotes de inmunoglobulina intravenosa más adecuados para su administración a pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 La acumulación de A β citotóxico en el cerebro se considera un acontecimiento patogénico clave que contribuye a la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer (EA). Véase, Hardy y Selkoe, (2002), *Science* 297:353-336.

- A β es un metabolito producido durante el procesamiento de una glucoproteína transmembrana grande, la proteína precursora de A β (APP). El nivel de A β en el cerebro está controlado por la tasa de producción a partir de la proteína precursora de amiloide (APP) y la tasa de aclaramiento. Véase, Tanzi y col., (2004) *Neuron* 43:605-608. A β se forma tras la escisión secuencial de APP, que es una glucoproteína transmembrana de función no determinada. APP puede procesarse mediante enzimas secretasas α , β y γ , y la proteína A β se genera por acción sucesiva de las secretasas β y γ sobre APP. El extremo C-terminal del péptido A β se produce por la acción de la secretasa γ , que corta dentro de la región transmembrana de APP para generar diversas isoformas de una longitud de 39-43 restos de aminoácidos. Las isoformas más frecuentes son A β ₄₀ y A β ₄₂. La forma más corta (A β ₄₀) se produce normalmente mediante una reacción de escisión que se produce en el retículo endoplásmico, mientras que la forma más larga (A β ₄₂) se produce típicamente mediante una reacción de escisión en la red trans Golgi. Véase, *Nat. Med.* 3(9):1016-1020 (1997). La forma A β ₄₀ es la más frecuente de las dos, aunque la A β ₄₂ es más fibrillogénica y, por tanto, se asocia más frecuentemente con estados patológicos. Se ha observado que mutaciones en APP asociadas con el
- 15 Alzheimer de aparición temprana aumentan la producción relativa de A β ₄₂ y, por tanto, esto sugiere una vía de tratamiento del Alzheimer que suponga la modulación de la actividad de las secretasas β y γ para producir principalmente A β ₄₀. (Véase, Yin, Y. I., y col. (2007) *J Biol. Chem.*, 10 de agosto; 282(32):23639-44.

- Recientemente se ha demostrado que la vacunación con A β ₄₂, así como la inmunización pasiva con anticuerpos anti-A β ₄₂, reduce la carga de A β en el cerebro y mejora el comportamiento en modelos animales. Véase, por ejemplo, Schenk y col. (1999) *Nature* 400:173-177; DeMattos y col., (2001) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 98:8850-8855; Bard y col. (2000) *Nat. Med.* 6:916-919; Wilcock y col. (2003) *J. Neurosci.* 23:3745-3751. Aunque se ha publicado una reducción en el depósito de A β (Nicoll y col. (2006) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65:1040-1048) y un deterioro más lento de la función cognitiva (Hock y col., (2003) *Neuron* 38:547-554) en ensayos clínicos de
- 20 inmunización con anticuerpos anti-A β ₄₂ en pacientes con EA, los ensayos clínicos también mostraron efectos neuroinflamatorios adversos como resultado de la inmunización.

- En humanos, se han detectados anticuerpos naturales frente a A β tanto en líquido cefalorraquídeo (LCR) como en el suero de individuos sanos, mientras que se han detectado valores significativamente menores de anticuerpos anti-
- 25 A β en el LCR de pacientes con EA. Véase, Du y col. (2001) *Neurology* 57:801-805.

- Se detectan anticuerpos naturales anti-A β ₄₂ en preparaciones comerciales de inmunoglobulina intravenosa (IVIG) humana y se ha encontrado que modifican las concentraciones totales de A β y A β ₄₂ en el LCR. Véase, Dodel y col. (2002) *Ann. Neurol.* 52:253-256 y Dodel y col. (2004) *J. Neurosurg. Psychiatry* 75:1472-1474. Además, se ha
- 30 demostrado previamente que los anticuerpos naturales anti-A β , cuando se aíslan a partir de preparaciones de inmunoglobulinas, inhiben la actividad citotóxica inducida por A β *in vitro* (Du y col. (2003) *Brain* 126:1935-1939). B. Solomon describe el uso de IVIG en inmunoterapia para la enfermedad de Alzheimer (Solomon (2007) *Curr. Opin. Mol. Ther.* 9:79-85). Reipert y col. describen la variabilidad entre lotes de IVIG en la proporción de actividades de estimulación e inhibición anti-Fas y sugieren la preselección de lotes adecuados para diferentes objetivos
- 35 terapéuticos (Reipert y col. (2008) *Vox Sanguinis* 94:334-341).

- Por tanto, existe la necesidad de un método para analizar y comparar la capacidad de diversos agentes (p. ej., diferentes lotes de preparaciones de inmunoglobulinas) para inhibir la citotoxicidad inducida por A β *in vitro*. Este método permitirá la identificación de posibles fármacos candidatos así como la preselección de lotes de (IVIG)
- 40 plasmática humana para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Alzheimer. En la presente invención se aborda esta y otras necesidades.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

- 60 La invención proporciona un método para preseleccionar los lotes de IVIG más adecuados para administrar a pacientes que padecen EA, comprendiendo el método :

a) poner en contacto los cultivos celulares de ensayo con agregados de A β citotóxicos y con los lotes de IVIG,

- 65 b) determinar el nivel de citotoxicidad en los cultivos celulares de ensayo y

c) comparar el nivel de citotoxicidad en los cultivos de ensayo con el nivel de citotoxicidad en un cultivo celular

control, identificando y seleccionando de este modo el lote de IVIG que es más adecuado para administrar a los pacientes que padecen EA.

5 El nivel de citotoxicidad en el cultivo celular de ensayo se normaliza hasta el nivel de citotoxicidad del cultivo celular control y puede seleccionarse de este modo un lote de IVIG adecuado que inhibe la citotoxicidad inducida por A β . En algunas realizaciones, el cultivo celular control es idéntico al cultivo celular de ensayo excepto por la presencia del lote de IVIG. En algunas realizaciones, el cultivo celular control comprende los agregados de A β citotóxicos. En algunas realizaciones, el cultivo celular control comprende los agregados de A β citotóxicos y un agente control que se sabe inhibe la citotoxicidad inducida por A β .

10 En algunas realizaciones, el péptido A β tiene una longitud de 43 aminoácidos. En algunas realizaciones, el péptido A β tiene una longitud de entre 39 y 43 aminoácidos. En algunas realizaciones, el péptido A β tiene una longitud menor de 39 aminoácidos. En algunas realizaciones, el agregado de A β comprende al menos un dímero A β . En algunas realizaciones, los agregados de A β citotóxicos se caracterizan usando un ensayo cuantitativo de
15 fluorescencia de unión a tioflavina T.

En algunas realizaciones, los agregados de A β se usan en un intervalo de concentración de aproximadamente 2,5 μ M a aproximadamente 25 μ M. En algunas realizaciones, el intervalo de concentración de los agregados de A β es de aproximadamente 5 μ M a aproximadamente 30 μ M. En algunas realizaciones, el intervalo de concentración
20 de los agregados de A β es de aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 15 μ M.

En algunas realizaciones de la invención, la célula susceptible es una célula PC-12. En algunas realizaciones, una célula susceptible se identifica demostrando que la célula muestra una respuesta citotóxica detectable en presencia de una solución de agregado de A β citotóxico en el intervalo de aproximadamente 2,5 μ M a aproximadamente 25
25 μ M. En algunas realizaciones, las células se adaptan al crecimiento en condiciones sin suero. En algunas realizaciones, las células se crecen en presencia de suero o un suplemento sérico y, a continuación, se cambian a condiciones sin suero antes de realizar el ensayo.

En algunas realizaciones, el control se selecciona entre el grupo constituido por una proteína, un anticuerpo, un péptido, un complejo proteináico, un lípido, un hidrato de carbono, un lote de IVIG y una molécula pequeña. En algunas realizaciones, el agente de control es un anticuerpo que se une a A β .
30

En algunas realizaciones, los lotes de IVIG y/o el agente control se ponen en contacto con el cultivo celular antes que los agregados de A β citotóxicos. En algunas realizaciones, los agregados de A β citotóxicos se ponen en
35 contacto con los cultivos de ensayo y/o control antes que los lotes de IVIG y/o los agentes control. En algunas realizaciones, los lotes de IVIG y/o el agente control se mezclan previamente con los agregados de A β citotóxicos antes de ponerlos en contacto con los respectivos cultivos celulares.

En algunas realizaciones, los lotes de IVIG y el agente control se usan en concentraciones equimolares. En algunas
40 realizaciones, los lotes de IVIG y el agente control se añaden en una relación de concentración molar con los agregados de A β citotóxicos. En algunas realizaciones, la relación de concentración molar agente:agregado A β es de aproximadamente 1:30 a aproximadamente 30:1. En algunas realizaciones, la relación de concentración molar agente:agregado de A β es de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 5:1. En algunas realizaciones, la relación
45 de concentración molar agente:agregado de A β es de aproximadamente 1:1.

En algunas realizaciones el nivel de citotoxicidad en el cultivo se determina midiendo el nivel de lactato deshidrogenasa liberada al medio de cultivo. En algunas realizaciones el nivel de citotoxicidad se mide determinando el nivel de actividad de la deshidrogenasa mitocondrial. En algunas realizaciones el nivel de citotoxicidad se determina midiendo el nivel de apoptosis en el cultivo. En algunas realizaciones el nivel de citotoxicidad se mide
50 determinando la integridad de la membrana de las células cultivadas.

En algunas realizaciones, se selecciona un lote de IVIG si este reduce de forma detectable la citotoxicidad inducida por A β en comparación con un cultivo celular control. En algunas realizaciones, se selecciona un lote de IVIG si reduce la citotoxicidad inducida por A β al menos el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o más en
55 comparación con un cultivo celular control. En algunas realizaciones, se selecciona un lote de IVIG si reduce la citotoxicidad inducida por A β al menos el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o más en comparación con el nivel de citotoxicidad en presencia solo de los agregados de A β citotóxicos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

60 En la figura 1 se muestra la citotoxicidad inducida por A β ₄₂ dependiente de dosis en células PC-12 *in vitro*. El porcentaje de toxicidad se calculó según el método descrito en el ejemplo 2.

En la figura 2 se muestra la modulación de la citotoxicidad inducida por A β ₄₂ *in vitro* por 13 lotes diferentes de IVIG
65 GAMMAGARD® (N.º de lote 1-13). El péptido A β ₄₂ se incubó previamente con los 13 lotes de IVIG, el anticuerpo policlonal de conejo anti-A β ₄₂ (AA36-42) o medio y, a continuación, se añadió a las células PC-12 (n=3). La

liberación de LDH se midió después de 24 horas de incubación. La liberación espontánea de LDH a partir de las células PC-12 en medio solo (med) se consideró el 0% de toxicidad y la citotoxicidad inducida por A β ₄₂ 10 μ M (A β ₄₂ solo) como 100% de citotoxicidad. Se usó GAMMAGARD® a una concentración de 200 μ M

5 En la figura 3 se muestra la caracterización del péptido sintético A β ₄₂ mediante inmunotransferencia. El péptido sintético A β ₄₂ se disolvió en el momento, se separó mediante PAGE en presencia de SDS y se analizó mediante inmunotransferencia usando el anticuerpo monoclonal murino anti-A β ₄₂ 6E10. Se usaron como material de partida 1,25 μ g o 2,5 μ g de A β ₄₂. El análisis por inmunotransferencia muestra que el péptido A β ₄₂ sintético esta constituido predominantemente por oligómeros, trímeros o tetrámeros pequeños.

10

En la figura 4 se muestra la modulación dependiente de concentración de la citotoxicidad inducida por A β ₄₂ mediante GAMMAGARD® Liquid. El péptido A β ₄₂ se incubó previamente con los dos lotes de IVIG, el anticuerpo control IgG1 o medio durante 40 min y, a continuación, se añadió a las células PC-12 (n=3). La liberación de LDH se midió después de 24 horas de incubación. La neurotoxicidad inducida por A β ₄₂ se estableció como el 100% para en análisis de los datos. GAMMAGARD® Liquid daba lugar a una reducción dependiente de concentración de la neurotoxicidad inducida por A β ₄₂ *in vitro*, mientras que el anticuerpo control IgG1 humano no era eficaz a ninguna de las concentraciones probadas.

15

En la figura 5 se muestra la modulación de la neurotoxicidad inducida por A β ₄₂ mediante anticuerpos anti-A β ₄₂ disponibles en el mercado. El péptido A β ₄₂ sintético recién disuelto se incubó previamente con anticuerpos monoclonales (AcM) anti-A β ₄₂, un anticuerpo IgG1 murino control (mlgG1ctrl) o medio durante 40 min y, posteriormente, se añadió a las células PC-12. La liberación de LDH se midió después de 24 horas. La liberación espontánea de LDH a partir de células PC-12 cultivadas solo con medio se consideró el 0% de toxicidad y la citotoxicidad inducida por A β ₄₂ 10 μ M como el 100% de citotoxicidad. El anticuerpo monoclonal 6E10, que reconoce el epítotope N-terminal AA 3-8 de A β ₄₂, mostró la mejor protección. El anticuerpo control negativo no tenía ningún efecto.

20

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 Introducción

La acumulación de A β citotóxico en el cerebro es un acontecimiento patogénico clave que contribuye a la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer (EA). En las preparaciones de IVIG de individuos sanos se encuentran anticuerpos anti-A β naturales y se ha demostrado que estos anticuerpos modulan el contenido total de A β en el LCR. Sin embargo, el contenido de anticuerpos en las preparaciones de IVIG varía de un lote a otro. Por tanto, existe la necesidad de un ensayo de selección que permita la comparación y preselección de los productos IVIG que sean los más adecuados para su administración a pacientes que padecen EA.

35

En la presente descripción, como se detalla en esta invención, se proporciona un ensayo de selección *in vitro* de alto rendimiento a base de células para identificar agentes que inhiben la citotoxicidad inducida por A β . Los métodos descritos en esta invención también proporcionan un método de normalización que permita una comparación más directa entre diferentes agentes y/o concentraciones de los agentes para inhibir la citotoxicidad inducida por A β . Este método de normalización supone la asignación de una unidad arbitraria a un agente de control, frente a la que pueden compararse directamente los agentes de ensayo. Esta unidad arbitraria permite la comparación de los diferentes agentes de ensayo en su capacidad para inhibir *in vitro* la citotoxicidad inducida por A β o, alternativamente, proporciona unos criterios de selección para preseleccionar agentes en particular (p. ej., lotes de IVIG) adecuados para su administración a un paciente con EA. Además, los métodos descritos en esta invención proporcionan la caracterización de los agregados de A β utilizados en los ensayos.

40

45

50 La invención proporciona un método para preseleccionar los lotes de IVIG más adecuados para administrar a pacientes que padecen EA, comprendiendo el método:

a) pone en contacto los cultivos celulares de ensayo con agregados de A β citotóxicos y con los lotes de IVIG,

55 b) determinar el nivel de citotoxicidad en los cultivos celulares de ensayo y

c) comparar el nivel de citotoxicidad en los cultivos de ensayo con el nivel de citotoxicidad en un cultivo celular control, identificando y seleccionando de este modo el lote de IVIG que es más adecuado para administrar a los pacientes que padecen EA.

60

Estos y otros aspectos de la invención se describen con más detalles a continuación y en los ejemplos.

DEFINICIONES

65 Según se usa en esta invención, el término «amiloide β » o «A β » se refiere a un monómero peptídico que es un producto natural de la digestión proteolítica de la proteína precursora amiloide β (APP) o un fragmento del producto

proteolítico natural y está implicado en la formación de agregados de A β y en la β -amiloidosis. Entre los ejemplos no limitantes de péptidos A β adecuados para su uso con la invención se incluyen productos naturales de digestión con 39-43 aminoácidos (es decir, A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₁, A β ₁₋₄₂ y A β ₁₋₄₃).

5 Según se usa en esta invención, el término «agregado» de A β se refiere a cualquier estructura de orden superior formada mediante la asociación de más de un monómero de A β . Un «agregado citotóxico» según se usa en esta invención es un agregado de A β que induce una respuesta citotóxica en una célula susceptible. Un agregado puede estar compuesto por una mezcla de dímeros, trímeros, tetrámeros o pentámeros de A β , y así sucesivamente, e incluyendo una proteína A β oligomerizada o multimerizada, y puede aparecer como una estructura multimérica y/o
10 un ensamblaje de moléculas. Pueden usarse numerosos ensayos disponibles en la técnica y descritos en esta invención para detectar y caracterizar los agregados de A β adecuados para su uso con la presente invención. Los ejemplos de ensayos no limitantes adecuados para la detección y caracterización de agregados de A β para su uso en la invención incluyen ensayos fluorimétricos usando el colorante fluorescente tioflavina T, o tioflavina S, ensayos de densidad óptica, análisis de electroforesis en gel, así como visualización directa de agregados usando
15 microscopía electrónica.

Según se usa en esta invención, el término «citotoxicidad inducida por amiloide» se refiere a la capacidad de los agregados de A β para inducir un efecto dañino que tiene como resultado una lesión detectable sobre un tipo celular susceptible *in vitro*. Entre los ejemplos no limitantes de lesiones detectables pueden incluirse la pérdida de integridad
20 de la membrana, alteración del flujo de iones, marcadores precoces de apoptosis y muerte celular. Normalmente, la respuesta citotóxica se detecta usando un ensayo de viabilidad celular como se describe en esta invención. Por ejemplo, un aumento en el nivel de la lactato deshidrogenasa detectable en el medio de cultivo tras la exposición al agregado de A β es indicativo de citotoxicidad inducida por A β .

25 Según se usa en esta invención, la frase «determinando el nivel de citotoxicidad» se refiere a cuantificar el efecto citotóxico de los agregados de A β sobre un cultivo celular susceptible en presencia o ausencia de un agente de prueba o un agente control. El nivel de citotoxicidad puede medirse usando cualquier método conocido en la técnica y como se describe en esta invención. Por ejemplo, el nivel de citotoxicidad puede medirse como el nivel de lactato deshidrogenasa presente en el medio de cultivo o usando otros ensayos espectrofotométricos bien conocidos, como
30 la MTT. Alternativamente, la citotoxicidad puede medirse como la cantidad de células apoptóticas en el cultivo, o determinarse midiendo la integridad de la membrana de las células usando diversos colorantes como azul tripán, naranja de acridina o yoduro de propidio.

Según se usa en esta invención, el término «inhibe» la citotoxicidad inducida por A β se refiere a la capacidad de un agente para bloquear, disminuir, prevenir, retrasar, inactivar, desensibilizar o regular por disminución parcial o
35 totalmente la citotoxicidad inducida por A β . Se considera que un agente es inhibidor de la citotoxicidad inducida por A β si el nivel de citotoxicidad inducida por A β en presencia del agente es detectablemente menor que el nivel de citotoxicidad en ausencia del agente. En esta invención se describen los medios para detectar la citotoxicidad.

40 Según se usa en esta invención, el término «poner en contacto» se refiere al toque aparente o al contacto mutuo de A β o un agregado de A β con una célula, agente de ensayo o agente control. La puesta en contacto puede hacerse por medio de cualquier sistema conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, la puesta en contacto puede hacer mezclando los componentes en un volumen pequeño de la misma solución, como en una placa de cultivo celular. Además, poner en contacto no requiere que todos los componentes que se ponen en contacto estén
45 presentes a la misma vez. Más bien, es suficiente que todos los componentes que van a ponerse en contacto se encuentren juntos en algún momento durante el ensayo o tratamiento. También se reconocerá que la puesta en contacto puede conseguirse *in vitro* o *in vivo*.

Los términos «aislado», «purificado» o «biológicamente puro» se refieren a material que está sustancial o
50 esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan cuando se encuentra en su estado natural. La pureza y homogeneidad se determinan normalmente usando técnicas químicas analíticas como electroforesis en geles de poliacrilamida o cromatografía líquida de alta resolución. Una proteína o ácido nucleico que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. En particular, un ácido nucleico aislado se separa a partir de algunos marcos de lectura abierta que flanquean naturalmente al gen y codifican proteínas
55 distintas a la proteína codificada por el gen. El término «purificado» en algunas realizaciones indica que un ácido nucleico o proteína da lugar esencialmente a una banda en un gel de electroforesis. Preferiblemente, esto significa que el ácido nucleico o la proteína está puro al menos al 85%, más preferiblemente, puro al menos al 95% y, lo más preferible, puro al menos al 99%. «Pureza» o «purificación» en otras realizaciones significa eliminar al menos un contaminante de la composición que se va a purificar. En este sentido, la purificación no requiere que el compuesto
60 purificado sea homogéneo, es decir, puro al 100%.

Los términos «polipéptido», «péptido» y «proteína» se usan indistintamente en esta invención para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más
65 restos de aminoácidos son compuestos miméticos químicos artificiales de los aminoácidos naturales correspondientes, así como a polímeros de aminoácidos naturales, los cuales contienen restos modificados y un polímero de aminoácidos no naturales.

Según se usa en esta invención, el término «complejo proteináceo» según se usa en esta invención se refiere a una composición que comprende un componente proteico y un componente no proteico. El componente proteico puede incluir modificaciones postraduccionales, como glucosilación y glicación. El componente no proteico puede incluir una molécula orgánica pequeña, un lípido, un ácido nucleico o un hidrato de carbono, etc.

El término «aminoácido» se refiere a aminoácidos naturales y sintéticos así como análogos de aminoácido y miméticos de aminoácido que funcionan de forma similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son aquellos codificados por el código genérico así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que tienen la misma estructura básica que los aminoácidos naturales, por ejemplo, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina, sulfóxido o metionina metilsulfonio. Estos análogos pueden tener grupos R modificados (p. ej., norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Miméticos de aminoácidos se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura diferente de la estructura química general de un aminoácido pero que funcionan de forma similar a un aminoácido natural.

En esta invención, los aminoácidos pueden denominarse por los símbolos de tres letras normalmente conocidos recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. Asimismo, los nucleótidos pueden denominarse por sus códigos de una letra normalmente aceptados.

«Variantes modificadas de forma conservadora» se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos». Con respecto a secuencias de ácido nucleico en particular, variantes modificadas de forma conservadora se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticos o esencialmente idénticos, o en la que el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a por ejemplo, secuencias contiguas en la naturaleza, esencialmente idénticas o asociadas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican la mayoría de las proteínas. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Por tanto, en cualquier posición donde un codon especifica una alanina, el codon puede cambiarse por otro de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Estas variaciones del ácido nucleico son «variaciones sinónimas» que son un tipo de variaciones modificadas de forma conservadora. En esta invención, cada secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido también describe variaciones sinónimas del ácido nucleico. Un experto reconocerá que en determinados contextos cada codon de un ácido nucleico (excepto AUG, que es normalmente el único codon para la metionina y TGG que normalmente es el único codon para el triptófano) puede modificarse para obtener una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, a menudo las variaciones sinónimas de un ácido nucleico que codifica un polipéptido están implícitas en una secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a secuencias sonda reales.

Como en las secuencias de aminoácidos, un experto en la materia reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que altera, añade o elimina un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una «variante modificada de forma conservadora» en la que la alteración da lugar a la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservadoras en las que se proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Dichas variantes modificadas de forma conservadora son adicionales y no excluyen variantes polimórficas, homólogos interespecies y alelos de la descripción.

Los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras de uno por otro: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparragina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T) y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, p. ej., Creighton, *Proteins* (1984)).

Los términos «idéntico» o porcentaje «idéntico» en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son la misma o tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos (es decir, identidad de aproximadamente el 60%, preferiblemente, identidad del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o superior a lo largo de una región especificada, cuando se comparan y alinean para obtener la máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación o región designada) determinado usando los algoritmos de comparación de secuencia BLAST o BLAST 2.0 con parámetros predeterminados, descritos a continuación, o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, p. ej., la hoja web del NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ o similares); entonces se dice que estas secuencias son «sustancialmente idénticas». Esta definición también se refiere, o puede aplicarse, al complemento de una secuencia de ensayo. La definición también incluye secuencias que presentan deleciones y/o adiciones, así como aquellas que tienen sustituciones así como variantes naturales, por ejemplo, variantes polimórficas o alélicas y variantes realizadas por el hombre. Como se describe a continuación, los algoritmos preferidos pueden tener en cuenta huecos y similares. Preferiblemente, existe identidad a lo largo de una región que tiene una longitud de al menos aproximadamente 25 aminoácidos o nucleótidos o, más

preferiblemente, a lo largo de una región que tiene una longitud de 50-100 aminoácidos o nucleótidos.

Para la comparación de secuencia, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencia, se introducen en un ordenador las secuencias de ensayo y de referencia, se diseñan coordenadas en consecuencia y, si es necesario, se diseñan parámetros para el programa de algoritmo de secuencia. Preferiblemente, pueden usarse los parámetros predeterminados del programa o pueden diseñarse parámetros alternativos. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para las secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, en función de los parámetros del programa.

Una «ventana de comparación», según se usa en esta invención, incluye referencia a un segmento de una de las numerosas posiciones contiguas seleccionadas a partir del grupo compuesto por de 10 a 600, normalmente aproximadamente de 25 a aproximadamente 250, más normalmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 150 en la que la secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se hayan alineado de forma óptima. Los métodos de alineamiento de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación pueden llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante la búsqueda para el método de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), mediante implementación por ordenador de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de genética de Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) o alineamiento manual e inspección visual (véase, p. ej., *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel y col., eds. 1995, suplemento)).

Entre los ejemplos preferidos de algoritmos que son adecuados para la determinación del porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia se incluyen los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y col. *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 (1977) y Altschul y col., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). Para los objetivos de esta invención, se usan BLAST y BLAST 2.0 con parámetros predeterminados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los ácidos nucleicos y proteínas de la invención. El software para realizar análisis BLAST está a disposición de público a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés). El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, un valor esperado (E) de 10 y un punto de corte de 100, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos (proteínas), el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, un valor esperado (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915)). Para los objetivos de esta invención, se usa el algoritmo BLAST2.0 con parámetros predeterminados, y con el filtro desactivado.

Una indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticas es si el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico presenta reacción inmunológica cruzada con los anticuerpos generados frente al polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico. Por tanto, normalmente un polipéptido es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren sólo en las sustituciones conservadoras.

Según se usa en esta invención, «anticuerpo» incluye referencia a una molécula de inmunoglobulina inmunológicamente reactiva con un antígeno en particular, e incluye tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. El término también incluye formas obtenidas mediante ingeniería genética como anticuerpos quiméricos (p. ej., anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (p. ej., anticuerpos biespecíficos). El término «anticuerpo» también incluye formas de unión al antígeno, incluyendo fragmentos con capacidad de unión al antígeno (p. ej., Fab', F(ab')₂, Fab, Fv y rlgG). Véase también, *Pierce Catalog and Handbook*, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.). Véase también, por ejemplo, Kuby, J., *Immunology*, 3^a Ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York (1998). El término también se refiere a fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) recombinantes. El término anticuerpo también incluye moléculas bivalentes o biespecíficos, fragmentos de anticuerpo obtenidos por ingeniería genética y anticuerpos basados en soportes como minianticuerpos, dianticuerpos, trianticuerpos, tetraanticuerpos y nanoanticuerpos. Las moléculas bivalentes y biespecíficas se describen, por ejemplo, en Kostelny y col. (1992) *J Immunol.* 148:1547, Pack y Pluckthun (1992) *Biochemistry* 31:1579, Hollinger y col., 1993, *supra*, Gruber y col. (1994) *J Immunol.* :5368, Zhu y col. (1997) *Protein Sci.* 6:781, Hu y col. (1996) *Cancer Res.* 56:3055, Adams y col. (1993) *Cancer Res.* 53:4026 y McCartney, y col. (1995) *Protein Eng.* 8:301.

«Epítotope» o «determinante antigénico» se refiere a un sitio de un antígeno al cual se une un anticuerpo. Los epítotope pueden estar formados tanto por aminoácidos contiguos como por aminoácidos no contiguos juxtaponidos debido al plegamiento terciario de la proteína. Los epítotope formados por aminoácidos contiguos normalmente se conservan durante la exposición a solventes desnaturalizantes mientras que los epítotope formados por plegamiento terciario se pierden durante el tratamiento con solventes desnaturalizantes. Normalmente, un epítotope incluye al menos 3, y normalmente más, al menos 5, u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial exclusiva. Entre los métodos para determinar la conformación espacial de los epítotope se incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X

y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols en Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996).

Según se usa en esta invención, la frase «inmunoglobulina intravenosa» o «IVIG» se refiere a preparaciones de 5 gammaglobulina adecuadas para su uso intravenoso. Normalmente, un producto IVIG se prepara a partir de plasma sin procesar o de una fracción proteica de plasma sin procesar obtenido a partir de inmunoglobulina normal humana (INH) como se describe en la patente de EE. UU. N.º 7.138.120.

Según se usa en esta invención, la frase «cantidad terapéuticamente eficaz» se refiere a una cantidad del agente 10 que es suficiente para lograr un efecto terapéutico deseado sobre una determinada afección o enfermedad. Dicha cantidad puede variar dependiendo del agente en particular, el efecto que se quiere conseguir, el modo de administración, etc.

Metodología general

15

Monómeros de amiloide β

Los péptidos monoméricos A β adecuados para la producción de agregados para su uso en la invención pueden ser 20 sintéticos, recombinantes o aislados a partir de fuentes naturales. En algunas realizaciones, el resto aminoacídico del extremo NH terminal del péptido A β se corresponde con el resto de ácido aspártico en la posición 672 de la forma de 770 restos de aminoácidos de la proteína precursora de amiloide (APP) natural. Entre los ejemplos no limitantes de péptidos A β adecuados para su uso con la invención se incluyen péptidos A β con 39-43 aminoácidos (es decir, A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₁, A β ₁₋₄₂ y A β ₁₋₄₃). En algunas realizaciones la forma de 43 aminoácidos de longitud de la proteína A β ₁₋₄₃ tiene la secuencia de aminoácidos:

25 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT.

En algunas realizaciones se utilizan formas más cortas de la proteína A β ₁₋₄₃. En algunas realizaciones se eliminan uno o más restos aminoacídicos (típicamente de 1 a 4) a partir del extremo carboxilo terminal de A β ₁₋₄₃ (p. ej., A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₁ o A β ₁₋₄₂). En algunas realizaciones, se eliminan uno o más restos de aminoácidos del extremo NH 30 terminal de la proteína A β ₁₋₄₃. En algunas realizaciones, se eliminan uno o más restos de aminoácidos de ambos extremos NH terminal y carboxilo terminal de la proteína A β ₁₋₄₃ (p. ej., A β ₂₅₋₃₅). Se entiende que las variantes de la proteína A β ₁₋₄₃ que tienen deleciones, adiciones o sustituciones conservadoras también pueden usarse con la invención siempre que el péptido A β sea capaz de formar agregados que induzcan citotoxicidad en tipos celulares susceptibles usando los métodos descritos en esta invención. Los péptidos A β adecuados para la producción de 35 agregados para su uso con la invención pueden obtenerse a partir de diversas fuentes, incluyendo aquellos producidos mediante tecnología recombinante, sintetizados, aislados a partir de fuentes naturales o adquiridos a casas comerciales (p. ej., American Peptide Inc, Sunnyvale CA. EE. UU.).

Producción y caracterización de agregados de A β

40

Los métodos para la producción de agregados de A β adecuados para su uso con la invención son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Findeis, y col. (1999) *Biochemistry* 38:6791-6800. Normalmente, la agregación se produce disolviendo el péptido A β en un tampón adecuado y agitando la solución enérgicamente durante una cantidad de tiempo variable hasta que se haya producido la agregación deseada. Entre los tampones 45 adecuados pueden incluirse cualquier tampón fisiológicamente aceptable, como sabe un experto en la materia. En el ejemplo 1 se describe un ejemplo no limitante de tampón adecuado para su uso con la invención. En algunas realizaciones, el tampón puede comprender el mismo medio de cultivo tisular en el que se realiza el ensayo de citotoxicidad.

50 Tras disolver el monómero A β en el tampón, la solución se agita enérgicamente. Esto puede conseguirse usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la solución puede agitarse a 700-800 rpm usando una plataforma giratoria o, alternativamente, la solución puede agitarse y/o sonicarse como se describe en el ejemplo 1. Los métodos adicionales para agitar la solución serán bien conocidos por los expertos en la materia. La cantidad de tiempo durante el que se agita la solución puede variar. En algunas realizaciones, la solución puede agitarse durante 55 un periodo de tiempo tan corto como un minuto o tan largo como una hora o más. En algunas realizaciones, la solución se agita, se controla la formación del agregado y el ciclo se repite hasta que se obtiene la composición de agregado deseada. En algunas realizaciones, antes de la disolución del monómero en el tampón apropiado, el A β se trata para obtener un monómero aleatorio. Esto puede conseguirse tratando el péptido A β con alcohol hexafluoroisopropílico (HFIPA) como se describe en la solicitud de patente de EE. UU. N.º 20020004194 o tratando 60 con un ácido como se describe en Findeis y col. (1999).

Una vez que se produce el agregado de A β usando cualquier método conocido en la técnica, o como se describe en esta invención, los agregados se caracterizan antes de su uso en el ensayo de selección. La caracterización de los 65 agregados de A β puede realizarse usando diversos ensayos conocidos en la técnica. Entre los ejemplos de métodos no limitantes de detección y caracterización de los agregados adecuados para su uso con la invención se incluyen análisis fluorométrico usando los colorantes fluorescentes tioflavina T o tioflavina S como se describe en Du y col.

(2003) *Brain* 126:1935-1939; M. Bourhima y col. (2007) *J. Neurosci. Meth.* 160(2): 264-268. En el ejemplo 1 se describe un ejemplo en particular en el que se detalla el estado de caracterización de una preparación de agregado de A β usando un ensayo fluorométrico con tioflavina T. Entre los ensayos adicionales no limitantes adecuados para su uso en la detección y caracterización de agregados de A β que son conocidos por los expertos en la materia se incluyen ensayos de densidad óptica, ensayos de unión a colorantes, ensayos estáticos de agregación, ensayos de electroforesis en gel y visualización directa de los agregados usando microscopia electrónica, como se describe en la publicación de patente de EE. UU. N.º 2002/0098173 y en la publicación internacional de patente PCT N.º WO 2007/094668. Los expertos en la materia conocen ensayos y métodos adicionales para la caracterización de los agregados de A β adecuados para su uso con la invención.

10

Agentes de ensayo

Otro componente del ensayo de selección es un agente de ensayo en el que se analizará su capacidad para inhibir el efecto citotóxico de los agregados de A β sobre una célula susceptible. Un agente de ensayo adecuado para su análisis con el ensayo puede ser cualquier molécula, macromolécula o mezcla completa de moléculas y macromoléculas.

15

En el método de la invención, el agente de ensayo es un producto de IVIG. En la materia se conocen numerosos productos IVIG que se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. N.º 7.138.120. Normalmente, una preparación de IVIG adecuada para su uso con la invención tiene al menos el 95% de IgG, con no más del 5% de proteínas contaminantes no IgG.

20

En algunas realizaciones, el agente de ensayo es una proteína o polipéptido aislado. Entre los ejemplos no limitantes de proteínas o polipéptidos que pueden usarse como agentes de ensayo en la presente descripción se incluyen péptidos bloqueantes (por ejemplo, fragmentos del A β o la APP que no forman agregados entre sí), un anticuerpo, un Fab o un ScFv que se une a A β o se une a una célula y bloquea de ese modo la interacción de los agregados de A β con la célula. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y también pueden ser parte de una mezcla compleja, como en la IVIG. En algunas realizaciones, el agente de ensayo es una molécula no proteica, como un lípido, un compuesto esteroide o un hidrato de carbono. En algunas realizaciones, el agente de ensayo es una proteína u oligopéptidos. En algunas realizaciones, el agente de ensayo proteico comprende moléculas de proteína con o sin modificaciones postraduccionales, como glucosilación y glicación. En algunas realizaciones, el agente de ensayo es una macromolécula que comprende un componente proteico y un componente no proteico. Entre los ejemplos no limitantes de complejos proteicos macromoleculares pueden incluirse complejos proteína-ácido nucleico (como ARN y/o ADN), complejos membrana-proteína, complejos proteína-lípido y complejos proteína-hidrato de carbono. En algunas realizaciones, el agente de ensayo se conjuga a una molécula pequeña. En algunas realizaciones, el agente de ensayo es una molécula pequeña.

25

30

35

Agentes control

Otro componente del ensayo de selección es un agente control, frente al que puede normalizarse el efecto del agente de ensayo. El agente control puede ser cualquier molécula o macromolécula que se ha demostrado inhibe la citotoxicidad inducida por A β . Se considera que un agente control inhibe la citotoxicidad inducida por A β cuando el nivel de citotoxicidad en presencia del agente control es estadísticamente menor que el nivel de citotoxicidad en ausencia del agente control. Un ejemplo de agente control adecuado para su uso con la presente invención es un anticuerpo anti- β amiloide.

40

45

Condiciones de cultivo celular y de crecimiento

El ensayo de selección de la invención se lleva a cabo *in vitro* usando un tipo celular susceptible. Las células adecuadas para su uso con los ensayos de selección de la invención incluyen a cualquier célula susceptible a la citotoxicidad inducida por A β . Estas células son conocidas para los expertos en la materia y pueden ser identificadas usando los métodos descritos en esta invención. Por ejemplo, un cultivo celular que muestra disminución de la viabilidad (o aumento de la citotoxicidad) cuando se incuba en presencia de los agregados de A β como se describe en esta invención, cuando se compara con la incubación en ausencia de los agregados de A β es un tipo celular que es susceptible a la citotoxicidad inducida por A β que puede usarse con los ensayos de selección de la invención. En algunas realizaciones, la concentración de agregados de A β que se usa para inducir una respuesta citotóxica en una célula susceptible están dentro del intervalo de aproximadamente 2,5 μ M a aproximadamente 25 μ M. Entre los ejemplos no limitantes adecuados para su uso con los ensayos de selección de la invención se incluyen la línea celular de feocromocitoma de rata PC-12 disponible en la American Type Culture Collection, Rockville Md. (ATCC CRL 1721). Una línea celular adicional adecuada para su uso con la presente invención es la línea celular derivada de neuronas humanas NT2 también disponible en la American Type Culture Collection (ATCC CRL 1973). El experto en la materia conocerá tipos celulares adicionales que puedan usarse con la invención o podrá identificar dichos tipos celulares usando los métodos descritos en esta invención, sin necesidad de experimentación injustificada.

50

55

60

Los cultivos control y de ensayo de esta prueba se crecen usando condiciones de cultivo convencionales y métodos conocidos por un experto en la materia. Véase, por ejemplo, R. Ian Freshney, Culture of Animal cells: A manual of

65

basic techniques, Wiley-Liss, (1987). En algunas realizaciones, las células se crecen en presencia de suero y, a continuación, se cambian a condiciones sin suero antes de realizar el ensayo de selección. En algunas realizaciones, las células se crecen y mantienen en condiciones sin suero. En el ejemplo 2 se detallan las condiciones de cultivo adecuadas para las células PC-12.

5

Ensayo de selección

Los componentes del ensayo de selección se han descrito anteriormente. Los métodos adecuados para llevar a cabo el ensayo de selección se describen a continuación. Como mínimo, el ensayo requiere un cultivo celular que comprenda una célula susceptible a la citotoxicidad inducida por A β , una solución que comprenda agregados de A β a una concentración suficiente como para inducir citotoxicidad en las células susceptibles y un agente de ensayo. En algunas realizaciones, pueden añadirse pasos o componentes adicionales, mientras que en otras realizaciones pueden omitirse algunos componentes o realizaciones opcionales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ensayo se realiza usando un único cultivo, mientras que en otras realizaciones, el ensayo se realiza en un formato de alto rendimiento usando cultivos múltiples como en una placa de 96 o 384 pocillos. En los ejemplos 2 y 3 se detallan variaciones del ensayo de selección que son adecuadas para su uso con la invención. A continuación se describen variaciones adicionales que serán reconocidas por un experto en la materia.

En algunas realizaciones, el ensayo se realiza mezclando el agente de ensayo con una solución de agregados de A β y, a continuación, se pone en contacto la mezcla con las células en el cultivo de ensayo, el cual se incuba después durante un periodo de tiempo especificado. Normalmente, el periodo de incubación oscila de 2 horas a 48 horas. En algunas realizaciones, el cultivo celular se trata con un agente de ensayo (o control) antes de la adición de los agregados de A β . En algunas realizaciones, los agregados de A β pueden añadirse al cultivo celular antes de la adición de un agente de ensayo (o control). En algunas realizaciones, los agregados de A β y el agente de ensayo (o control) se añaden simultáneamente al cultivo celular sin mezcla previa. En algunas realizaciones, la concentración de los agregados de A β está en el intervalo de aproximadamente 2,5 μ M a aproximadamente 25 μ M.

En algunas realizaciones, se realiza un cultivo control en paralelo con el cultivo de ensayo, siendo la única diferencia entre el cultivo control y de ensayo que el agente de ensayo se sustituye por un agente control en el cultivo control. Un agente control puede ser cualquier compuesto, molécula o complejo o mezcla macromolecular que haya mostrado inhibición de la citotoxicidad inducida por A β , como se describe en esta invención. En algunas realizaciones, el agente control es un anticuerpo anti-A β . En algunas realizaciones, un agente de ensayo que muestra su eficacia para inhibir la citotoxicidad inducida por A β puede usarse como agente control en un ensayo posterior. En algunas realizaciones, el cultivo control es idéntico al cultivo de ensayo pero sin el agente de ensayo (es decir, un cultivo control puede incluir solo los agregados de A β con las células susceptibles).

En algunas realizaciones, el ensayo se lleva a cabo usando concentraciones equimolares del agente control y el agente de ensayo. En algunas realizaciones, se comparan diferentes concentraciones de agente de ensayo frente a una única concentración de agente control. En algunas realizaciones, el agente control y el agente de ensayo se añaden en una relación de concentración molar con los agregados de A β . En algunas realizaciones, la relación de concentración molar agente:agregado de A β esta en un intervalo de aproximadamente 1:30 a aproximadamente 30:1. En algunas realizaciones, la relación de concentración molar es 1:1.

Al final del periodo de incubación, el cultivo (de ensayo y/o control) se examina para determinar el nivel de citotoxicidad. En algunas realizaciones, el nivel máximo de citotoxicidad se determina poniendo en contacto un cultivo celular con la solución de A β agregada en ausencia de agente de ensayo o control. En algunas realizaciones, el nivel de citotoxicidad en el cultivo de ensayo se expresa como porcentaje del nivel de citotoxicidad en el cultivo control. En los ejemplos 2 y 3 se describen métodos adicionales para medir y comparar el nivel de citotoxicidad en los cultivos.

50

Determinación de la citotoxicidad inducida por A β

Tras la incubación del cultivo de ensayo y/o control con los agregados de A β como se describe anteriormente, se determina el nivel de citotoxicidad inducida por A β en el cultivo. Hay disponibles en el mercado una variedad de ensayos para determinar la viabilidad celular y son conocidos en la técnica. En los ejemplos 2 y 3 se describen ejemplos no limitantes de ensayos de viabilidad adecuados para su uso con la invención, incluyendo la determinación espectrofotométrica de la concentración de lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo usando un «kit de detección de citotoxicidad (LDH)» (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). De forma alternativa, la viabilidad celular puede determinarse midiendo la deshidrogenasa mitocondrial (MTT) usando un kit de detección comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como se describe en la publicación de patente de EE. UU. N.º 20020004194. Los expertos en la materia conocen bien ensayos adicionales para medir la viabilidad celular como los que se describen en Shearman, M. S. y col. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1470-1474; Hansen M. B. y col. (1989) *J. Immunol. Meth.* 1(19)203-210.

65 Registro de los resultados de los ensayos de la invención

Los métodos de la invención también puede conllevar el registro de los resultados de los ensayos de selección de la invención. Esta información puede ser almacenada en formato legible en un ordenador. Dicho sistema informático normalmente comprende subsistemas principales como un procesador central, una memoria del sistema (normalmente RAM), un controlador de entrada y salida (I/O), un dispositivo externo como una pantalla a través de un adaptador de pantalla, puertos en serie, un teclado, una disquetera que lea disquetes y un dispositivo CD-ROM (o DVD-ROM) para leer CD-ROM. Pueden conectarse muchos otros dispositivos, como una interfaz de red conectada a través de un puerto en serie.

El sistema informático también puede estar conectado a una red, que comprenda diversos dispositivos informáticos conectados a través de un medio de transmisión de datos, como un cable Ethernet (coaxial o 10BaseT), línea de teléfono, línea ISDN, red inalámbrica, fibra óptica u otro medio de transmisión de señales adecuado, donde al menos un dispositivo de red (p. ej., ordenador, matriz de discos, etc.) comprende un patrón de dominios magnéticos (p. ej., disco magnético) y/o dominios de carga (p. ej., una matriz de células DRAM) que componen un patrón de bits para codificar los datos adquiridos de un ensayo de la invención.

El sistema informático puede comprender un código para interpretar los resultados de un ensayo citotóxico. En algunas realizaciones, el sistema informático también comprende un código para interpretar los resultados del ensayo. Por tanto, en un ejemplo de realización, se introducen los resultados del ensayo de selección en un ordenador en el que un procesador central ejecuta un programa de ordenador para determinar la capacidad de un agente de ensayo para inhibir el efecto citotóxico de los agregados de A β sobre una célula susceptible, en comparación con el control.

En la descripción también se proporciona el uso de un sistema informático, como el descrito anteriormente, que comprende: 1) un ordenador; 2) un patrón de bit almacenado que codifica los resultados de genotipado obtenidos mediante los métodos de la descripción, que pueden estar almacenados en el ordenador; 3) y, opcionalmente 4) un programa para determinar la capacidad de un agente de ensayo para inhibir el efecto citotóxico de los agregados de A β .

Selección de un agente que inhibe la citotoxicidad inducida por A β

Después de determinar el nivel de citotoxicidad en los cultivos de ensayo y/o control, pueden seleccionarse agentes de ensayo adecuados que, a continuación pueden optimizarse, probarse o usarse adicionalmente para su administración a un paciente con EA. En algunas realizaciones, el agente se identifica comparando el nivel de citotoxicidad inducida por A β en presencia del agente de ensayo con el nivel de citotoxicidad inducida por A β en un cultivo control que contiene un agente control o solo agregados de A β . En algunas realizaciones, se considera que un agente de ensayo inhibe la citotoxicidad inducida por A β cuando el nivel de citotoxicidad en presencia del agente de ensayo es detectablemente menor que el nivel de citotoxicidad en un cultivo control. En algunas realizaciones, se considera que un agente de ensayo inhibe la citotoxicidad inducida por A β cuando el nivel de citotoxicidad en presencia del agente de ensayo es al menos el 5% menor que el nivel de citotoxicidad en un cultivo control que comprende un agente control o solo agregados de A β . En algunas realizaciones, se selecciona un agente de ensayo cuando el nivel de citotoxicidad inducida por A β en presencia del agente de ensayo se reduce al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o más en comparación con el nivel de citotoxicidad en un cultivo control que contiene un agente control o solo agregados de A β . En los ejemplos 2 y 3 se detallan fórmulas y métodos adicionales para comparar y seleccionar agentes de ensayo que inhiben la citotoxicidad inducida por A β .

Métodos terapéuticos y composiciones farmacéuticas

Usando los ensayos de selección descritos en esta invención, pueden identificarse diferentes agentes de ensayo terapéuticos que inhiben la citotoxicidad inducida por A β *in vitro*. Como se describe con más detalle a continuación, se contempla explícitamente que los agentes inhibidores seleccionados usando los ensayos descritos en esta invención pueden optimizarse adicionalmente para su administración, opcionalmente con vehículos farmacéuticos, en cualquier forma adecuada para el tratamiento de pacientes que padecen enfermedad de Alzheimer (EA) o enfermedades similares que conllevan toxicidad inducida por A β . En la invención los métodos de selección se usan para preseleccionar lotes de productos de IVIG para su administración a pacientes con EA. Se conocen protocolos para la administración de agentes inhibidores y pueden optimizarse adicionalmente para pacientes con EA en función de principios conocidos en las técnicas farmacológicas (véase, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18^a ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990).

Los inhibidores identificados usando los ensayos de selección de la descripción pueden administrarse a un paciente a dosis terapéuticamente eficaces para prevenir, tratar o controlar la citotoxicidad inducida por A β . Los compuestos pueden administrarse a un paciente en una cantidad suficiente como para que muestren una respuesta protectora o terapéutica eficaz en el paciente. Una respuesta terapéutica eficaz es una respuesta que detiene y ralentiza al menos parcialmente los síntomas o las complicaciones de la enfermedad. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como «dosis terapéuticamente eficaz». La dosis se determinará mediante la eficacia del inhibidor en particular empleado, de la afección de sujeto y de la vía de administración. El tamaño de la dosis también se determinará por la existencia, naturaleza y grado de cualquier efecto secundario adverso que acompañe a la

administración de una composición en particular a un paciente en especial.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de estos compuestos pueden determinarse mediante métodos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o en animales de experimentación, por ejemplo, determinando la DL₅₀ (dosis letal para el 50% de la población) y la DE₅₀ (dosis terapéutica eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL₅₀/DE₅₀. Se prefiere los compuestos que muestran índices terapéuticos grandes.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos en cultivos celulares y en estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosis para su uso en humanos. Preferiblemente, la dosis de estos compuestos está contenida dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluye la DE₅₀ con una toxicidad mínima o nula. La dosis puede variar dentro de este intervalo, dependiendo de la forma de administración empleada y de la vía de administración. Para cada compuesto utilizado en los métodos de la descripción, puede estimarse la dosis terapéuticamente eficaz estimada inicialmente a partir de los ensayos en cultivos celulares. En general, el equivalente de dosis de un modulador es de aproximadamente 1 ng/kg a 100 mg/kg para un sujeto típico.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse mediante técnicas convencionales usando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. Los compuestos y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables pueden formularse para su administración a través de cualquier vía adecuada, incluido mediante inhalación, por vía tópica, nasal, oral, parenteral (p. ej., intravenosa, intraperitoneal, intravesical o intratecal) o rectal.

Para su administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparadas mediante sistemas convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, incluyendo agentes de unión, que son bien conocidos por los expertos en la materia. Los comprimidos pueden recubrirse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso y puede incluir aditivos farmacéuticamente aceptables que son bien conocidos para los expertos en la materia.

Los compuestos pueden formularse para su administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas o recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación como, por ejemplo, agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado. por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso. Los expertos en la materia conocen bien los modos de administración y formulaciones adicionales para composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso con agentes identificados usando ensayos de selección de la descripción.

40 Kits para su uso en aplicaciones diagnósticas y/o pronósticas

La descripción también proporciona kits para aplicaciones diagnósticas o terapéuticas. Para las aplicaciones diagnósticas/pronósticas, estos kits pueden incluir cualquiera o todos los siguientes compuestos: reactivos de ensayo, tampones, péptidos A β o soluciones agregadas, tipos celulares susceptibles, agentes de control o similares.

Además, los kits pueden incluir material didáctico que contenga indicaciones (es decir, protocolos) para poner en práctica los métodos de esta descripción. Si bien el material didáctico típicamente comprende material escrito o impreso, no se limita a estos tipos. Se indica cualquier medio capaz de almacenar dichas instrucciones y comunicarlás a un usuario final. Entre estos medios se incluyen, pero sin limitaciones, medios de almacenamiento electrónico (p. ej., discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (p. ej., CD ROM) y similares. Estos medios pueden incluir direcciones a sitios de Internet en los que se proporcione dicho material didáctico.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, pero no a modo de limitación. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente diferentes parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para obtener esencialmente resultados iguales o similares.

Ejemplo 1 Análisis fluorimétrico del péptido A β ₁₋₄₂

Para confirmar que A β ₁₋₄₂ se agrega *in vitro*, se utilizó un ensayo de unión a tioflavina T como se describe a continuación. El péptido sintético liofilizado A β ₁₋₄₂ se obtuvo de American Peptide Inc. (Sunnyvale, CA, EE. UU.). El péptido A β ₁₋₄₂ se disolvió en tampón Tris/HCl 10 mM, pH 8,6 hasta una concentración de A β ₁₋₄₂ de 1 mg/ml. La solución de A β ₁₋₄₂ se agitó enérgicamente durante 1 minuto y se sonicó durante 5 minutos, tras lo cual se ajustó a pH neutro (6,8-7,4) usando tampón HCl al 0,1%.

El análisis fluorométrico para evaluar el estado de fibrilización de la preparación de A β ₁₋₄₂ se hizo con un ensayo de unión a tioflavina T. Véase, Du y col. (2003) *Brain* 126:1935-1939. Brevemente, la tioflavina T se une a estructuras en lámina β de las proteínas (p. ej., en los agregados de A β ₁₋₄₂) y, por tanto, un aumento en la fluorescencia de tioflavina T indica un aumento del nivel de agregados de A β ₁₋₄₂ en la solución. La tioflavina T (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU.) se usó a una concentración de 2 μ M en tampón glicina HCl 50 mM, pH 9.2. Las mediciones de agregación se realizaron en microplacas de 96 pocillos por triplicado usando un fluorímetro Synergy 2 (BioTek, Winooski, VT, EE. UU.) a longitudes de onda de excitación y emisión de 435 y 485 nm, respectivamente.

10 Ejemplo 2 Ensayo de citotoxicidad

Para evaluar los efectos citotóxicos de A β ₄₂ sobre las células *in vitro* se utilizó el ensayo que aparece a continuación. Se sabe que las células PC-12 de feocromocitoma de rata (ATCC Manassas, VA, EE. UU.) son susceptibles a la citotoxicidad inducida por A β . Véase, Solomon, B., y col. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4109-4112. Las células se adaptaron a condiciones sin suero en medio de cultivo Neurobasal con sustituto de suero B27 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) y L-glutamina 2 mM (Gibco-Invitrogen, Reino Unido). Las células PC-12 se recogieron a partir de botellas de cultivo, se lavaron y sedimentaron mediante centrifugación a 224 x g. A continuación, las células se resuspendieron y filtraron a través de filtros Cell Trics (20 μ m) para eliminar los agregados celulares. Las células filtradas se sembraron en microplacas (100 μ l/pocillo) a una densidad de 1-1,5 x 10⁵ células/ml en medio suplementado con albúmina sérica humana al 1% (Baxter). El volumen total por pocillo para todos los experimentos era de 200 μ l.

El péptido A β ₄₂ preparado como se describe en el ejemplo 1 anterior se añadió a los pocillos que contenían las células a una concentración de aproximadamente 2,5 μ M a aproximadamente 25 μ M. Cada ensayo se realizó por cuadruplicado.

Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C y CO₂ al 5%. Después de un periodo de incubación de 24 horas, las placas se centrifugaron a 300 x g durante 20 minutos y los sobrenadantes celulares (100 μ l/pocillo) se aspiraron para la determinación fluorométrica de la lactato deshidrogenasa (LDH).

El análisis de citotoxicidad se realizó usando la medición fotométrica de LDH liberada por las células al sobrenadante del cultivo celular usando un «kit de detección de citotoxicidad (LDH)» (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) según las indicaciones del fabricante. La LDH es una enzima citoplasmática estable presente en todas las células que se libera rápidamente al sobrenadante del cultivo celular tras el daño de la membrana plasmática. El kit consta de dos componentes: un catalizador (mezcla de diaforasa liofilizada/NAD⁺) y una solución de colorante (cloruro de yodotetrazolio/lactato sódico). La actividad LDH se determina en una prueba enzimática. En el primer paso de la reacción, el NAD⁺ se reduce a NADH/H⁺ mediante la conversión catalizada por la LDH de lactato en piruvato. En el segundo paso, el catalizador (diaforasa) transfiere H/H⁺ del NADH/H⁺ a la sal tetrazolio que, a continuación, se reduce a formazán que se mide a 492 nm (la referencia es 620 nm). Un aumento en la cantidad de células dañadas da lugar a un aumento en la cantidad de LDH en el sobrenadante de cultivo, que se correlaciona con la cantidad de formazán formada durante un periodo de tiempo limitado. En el presente ejemplo, la medición se realiza después de 15 y 30 minutos de la incubación protegida de la luz con los reactivos del kit.

Para determinar el porcentaje de citotoxicidad, se calcularon los valores medios de absorbancia por triplicado. Los valores de fondo de los medios de cultivo control se restaron de cada media y se determinó el porcentaje de citotoxicidad usando la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{Valor experimental} - \text{liberación espontánea de LDH})}{(\text{Liberación máxima de LDH} - \text{liberación espontánea de LDH})} \times 100\%$$

La liberación máxima de LDH se alcanzaba mediante la adición de una solución de Tritón X-100 al 1% al cultivo celular durante 2 horas. Como se muestra en la figura 1, el péptido sintético A β ₄₂ era citotóxico a concentraciones que oscilaban de 5 μ M a 25 μ M, con el máximo a aproximadamente 20 μ M

Ejemplo 3 La IgG (IVIG) plasmática humana reduce la citotoxicidad inducida por A β ₄₂ *in vitro*

Este ejemplo demuestra que el ensayo *in vitro* puede usarse para seleccionar rápidamente diferentes lotes de IVIG para identificar aquellos lotes con el mayor efecto neuroprotector frente a la citotoxicidad inducida por A β ₁₋₄₂. La IVIG GAMMAGARD[®] (Baxter AG) se dializó frente a solución salina tamponada con fosfato (Gibco Invitrogen, Escocia, Reino Unido) a 4 °C durante toda la noche y se diluyó posteriormente para obtener una concentración final de 200 μ M, 133 μ M y 67 μ M. El péptido A β ₁₋₄₂ según se describe anteriormente en el ejemplo 1 se incubó con IVIG GAMMAGARD[®] durante diferentes periodos de tiempo a 37°C y CO₂ al 5% antes de añadirlo a las células PC-12 cultivadas anteriormente como se describe en el ejemplo 2. Las células se incubaron con péptido A β ₁₋₄₂ (con o sin IVIG GAMMAGARD[®]) durante 24 horas a 37°C y CO₂ al 5%. La citotoxicidad se determinó midiendo la liberación de LDH como se describe anteriormente en el ejemplo 2 con una modificación. La liberación de LDH por Ab42(A β ₁₋₄₂)

en ausencia de IVIG GAMMAGARD® se consideró como la liberación máxima de LDH (100%). Los resultados se muestran en la Fig. 2.

Estos resultados sugieren que diferentes lotes de IVIG GAMMAGARD®, podrían tener capacidades diferentes para prevenir la citotoxicidad inducida por Aβ en pacientes con EA. Por tanto, la preselección de lotes y productos de IVIG adecuados puede mejorar el tratamiento de los pacientes con EA.

Ejemplo 4 Validación del ensayo de citotoxicidad *in vitro*

El ensayo de citotoxicidad se realizó como se describe en el ejemplo 2. Las placas se incubaron durante 24 horas y se analizó la liberación de LDH en los sobrenadantes celulares.

Evaluación de la variación intraensayo

El ensayo se realizó con seis lotes diferentes de Gammagard Liquid y 14 replicados de cada lote a una concentración de 200 μM. La variación intraensayo de cada lote se calculó usando la siguiente fórmula:

$$VC_{\text{intraensayo}} (\%) = 100 \times \frac{\text{DT de la media aritmética}}{\text{media aritmética de la DO obtenida para 14 muestras diferentes}}$$

La media de VC_{intraensayo} para los seis lotes diferentes fue de 2,9 ± 1,4% (media ± DT)

Evaluación de la variación interensayo

El ensayo se realizó con cinco lotes diferentes de Gammagard Liquid en 8 días diferentes (por cuadruplicado) a una concentración de 200 μM. La variación interensayo de cada lote se calculó usando la siguiente fórmula:

$$VC_{\text{interensayo}} (\%) = 100 \times \frac{\text{DT de la media aritmética en 8 experimentos}}{\text{media aritmética de la DO de muestras en 8 experimentos}}$$

La media de VC_{interensayo} para los cinco lotes diferentes de Gammagard Liquid fue de 9,2 ± 2,3% (media ± DT)

Ejemplo 5 Caracterización del péptido sintético Aβ₄₂ mediante inmunotransferencia

El análisis por inmunotransferencia se realizó para estudiar el estado de agregación de la preparación del péptido Aβ₄₂ sintético. El péptido Aβ₄₂ se analizó mediante PAGE en presencia de SDS usando geles en gradiente Bis-Tris del 4%-12% NuPAGE Novex (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). El análisis mediante inmunotransferencia posterior se realizó sobre membranas de transferencia de nitrocelulosa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) usando el anticuerpo monoclonal IgG1 murino 6E10 (Covance, Emeryville, CA, EE. UU.) que reconoce todos los conformeros de Aβ₄₂. La unión del anticuerpo se visualizó usando un anticuerpo IgG de cabra anti-ratón que se conjugó con peroxidasa de rábano picante (HRP, Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) y un kit de sustrato conjugado con HRP (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.).

Como se muestra en la figura 3, el péptido sintético Aβ₄₂ constaba predominantemente de oligómeros pequeños, trímeros y tetrámeros. Estas formas representan las especies Aβ₄₂ consideradas como más relevantes para la neurotoxicidad (véase, Klein y col., (2001) *Trends Neurosci* 24:219-24).

Ejemplo 6 Modulación dependiente de concentración de neurotoxicidad inducida por Aβ₄₂ mediante IVIG

El ensayo de citotoxicidad se realizó como se describe en el ejemplo 3. Antes de añadirlo a las células PC-12 el péptido Aβ₄₂ (10 μM) se incubó previamente con dos lotes diferentes de GAMMAGARD® Liquid y un anticuerpo IgG1 humano dirigido frente a una proteína no relacionada con Aβ que sirvió como control negativo. Las concentraciones finales de la IVIG y del anticuerpo IgG1 eran de 200 μM (que se correspondían con 30 mg/ml), 133 μM (20 mg/ml) y 67 μM (10 mg/ml). Las placas de cultivos celulares se incubaron con péptido Aβ₄₂ (con o sin GAMMAGARD) durante 24 horas. Para determinar el porcentaje de citotoxicidad, los cálculos se realizaron como en el ejemplo 3. Como se muestra en la figura 4, GAMMAGARD® Liquid daba lugar a una reducción dependiente de concentración de la neurotoxicidad inducida por Aβ₄₂ *in vitro*, mientras que el anticuerpo IgG1 humano control no era eficaz a ninguna de las concentraciones probadas.

Ejemplo 7 Modulación de la neurotoxicidad inducida por Aβ₄₂ mediante anticuerpos comerciales anti-Aβ₄₂

Se comprobó la capacidad de los siguientes anticuerpos anti-Aβ₄₂ comerciales para interferir con la neurotoxicidad inducida por Aβ₄₂:

Anticuerpos monoclonales: 6E10 (IgG1 murina), dirigido frente al péptido AA 1-16 del extremo N-terminal (Covance, Emeryville, CA, EE. UU.); DE2B4 (IgG1 murina), dirigido frente al péptido AA 1-17 del extremo N-terminal (Serotec, MorphoSys, Reino Unido); 2C8 (IgG2b murino), dirigido frente al péptido AA 1-16 del extremo N-terminal (MBL, Naka-ku Nagoya, Japón). Se usó como control negativo un anticuerpo IgG1 murino dirigido frente a KLH (R&D Systems, Minneapolis, MN., EE. UU.).

Anticuerpos policlonales: IgG de conejo dirigido frente al péptido AA 1-43 de longitud completa (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU.); Ig de conejo, dirigida frente al péptido AA 15-30 (Biosource, Camarillo, CA, EE. UU.); Ig de conejo, dirigida frente al péptido AA 36-42 (Biosource, Camarillo, CA, EE. UU.).

El estado de fibrilización del péptido A β ₄₂ recién preparado se analizó mediante medición fluorimétrica. El péptido A β ₄₂ se añadió a las células con o sin incubación previa con los anticuerpos monoclonales. Las placas se incubaron durante 24 horas y se analizó la liberación de LDH a los sobrenadantes celulares.

15

Para determinar el porcentaje de citotoxicidad, los cálculos se realizaron como en el ejemplo 3. En la figura 5 se muestra que los anticuerpos monoclonales y policlonales comerciales difieren en su capacidad para prevenir la neurotoxicidad inducida por A β ₄₂ *in vitro*, mientras que el anticuerpo IgG1 control no presentaba ningún efecto.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preseleccionar los lotes de inmunoglobulina intravenosa (IVIG) más adecuados para administrar a los pacientes que padecen enfermedad de Alzheimer (EA), comprendiendo el método:
- 5 a) poner en contacto cultivos celulares de ensayo con agregados de A β citotóxicos y con lotes de IVIG.
- b) determinar el nivel de citotoxicidad en los cultivos celulares de ensayo y
- 10 c) comparar el nivel de citotoxicidad en los cultivos de ensayo con el nivel de citotoxicidad en un cultivo celular control, identificando y seleccionando de este modo el lote de IVIG que es el más adecuado para su administración a pacientes que padecen EA.
2. El método de la reivindicación 1, que además comprende los pasos de:
- 15 poner en contacto el cultivo celular control con el agregado de A β citotóxico y
- determinar el nivel de citotoxicidad en el cultivo celular control.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, en el que el cultivo celular control se pone en contacto con el agregado de A β citotóxico y con un agente control, en el que es sabido que el agente control inhibe la citotoxicidad inducida por A β .
4. El método de la reivindicación 1, en el que los lotes de IVIG se ponen en contacto con los cultivos
- 25 celulares de ensayo antes que los agregados de A β citotóxicos.
5. El método de la reivindicación 1, en el que los agregados de A β citotóxicos se ponen en contacto con los cultivos celulares de ensayo antes que los lotes de IVIG.
- 30 6. El método de la reivindicación 1, en el que los lotes de IVIG y los agregados de A β citotóxicos se mezclan previamente antes de ponerlos en contacto con los cultivos celulares de ensayo.
7. El método de la reivindicación 1, en el que los cultivos celulares de ensayo y el cultivo celular control se crecen en condiciones sin suero.
- 35 8. El método de la reivindicación 1, en el que el cultivo celular de ensayo y el cultivo celular control contienen células PC-12.
9. El método de la reivindicación 3, en el que el agente control es un anticuerpo anti-A β .
- 40 10. El método de la reivindicación 1, en el que el agregado de A β está compuesto por A β ₁₋₄₀ o A β ₁₋₄₂.
11. El método de la reivindicación 1, en el que el agregado de A β citotóxico está compuesto por al menos un dímero de A β .
- 45 12. El método de la reivindicación 11, en el que el contenido fibrilar del agregado de A β citotóxico se cuantifica usando un ensayo de fluorescencia de tioflavina T.
13. El método de la reivindicación 1, en el que los agregados de A β citotóxicos se presentan en un
- 50 intervalo de concentración de aproximadamente 2,5 μ M a aproximadamente 25 μ M.
14. El método de la reivindicación 1, en el que los agregados de A β citotóxicos se presentan en un intervalo de concentración de aproximadamente 5 μ M a aproximadamente -30 μ M.
- 55 15. El método de la reivindicación 1, en el que los agregados de A β citotóxicos se presentan en un intervalo de concentración de aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 15 μ M.
16. El método de la reivindicación 3, en el que los lotes de IVIG y el agente control se presentan en concentraciones equimolares.
- 60 17. El método de la reivindicación 3, en el que los lotes de IVIG y el agente control se presentan en un intervalo de relaciones de concentración molar con el agregado de A β citotóxico (agente:A β) de aproximadamente 30:1 a aproximadamente 1:30.
- 65 18. El método de la reivindicación 1, en el que el nivel de citotoxicidad se determina midiendo la

concentración de lactato deshidrogenasa en los medios de cultivo.

19. El método de la reivindicación 1, en el que el nivel de citotoxicidad se determina midiendo el nivel de apoptosis en los cultivos celulares.

5

Citotoxicidad inducida por $A\beta_{42}$ in vitro

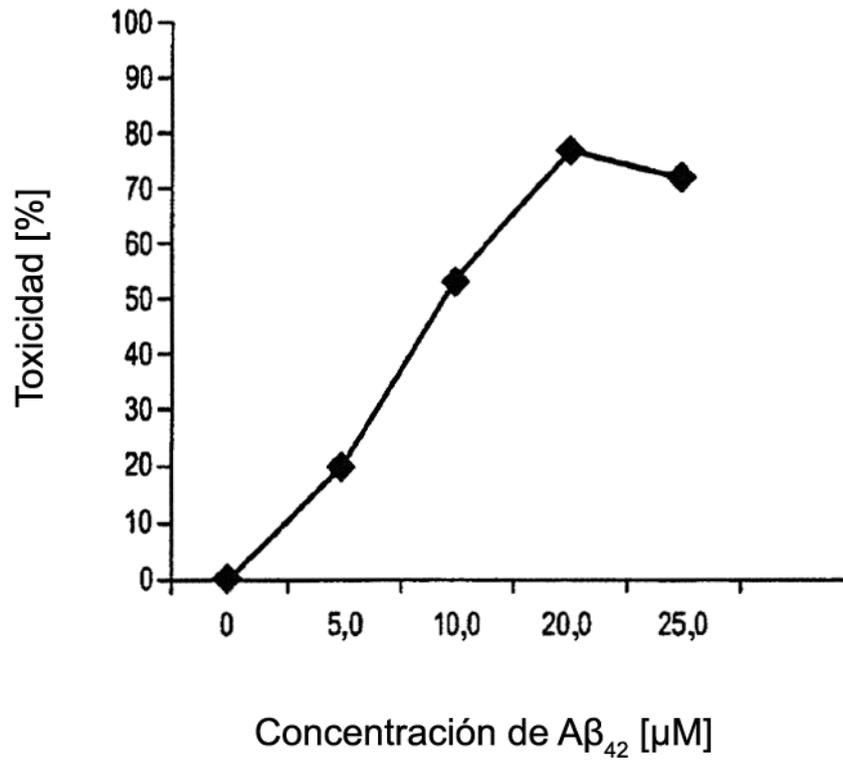


FIG. 1

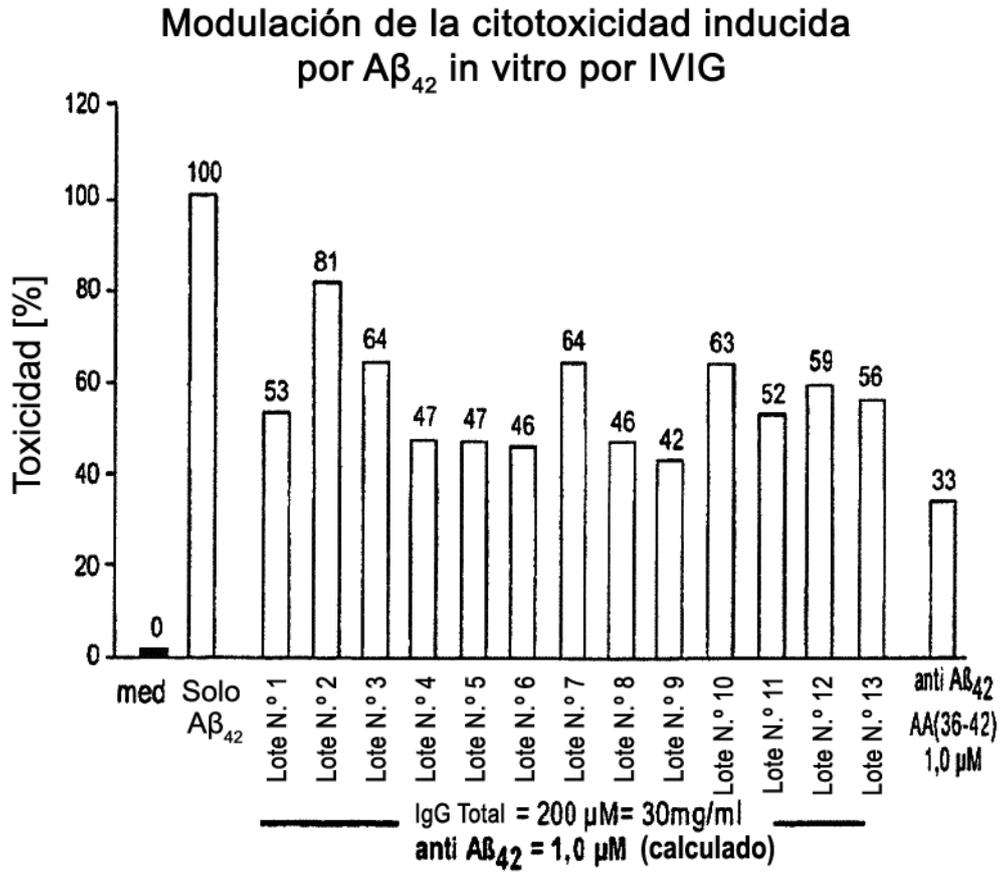


FIG. 2

Inmunotransferencia de
péptido $A\beta_{42}$ natural

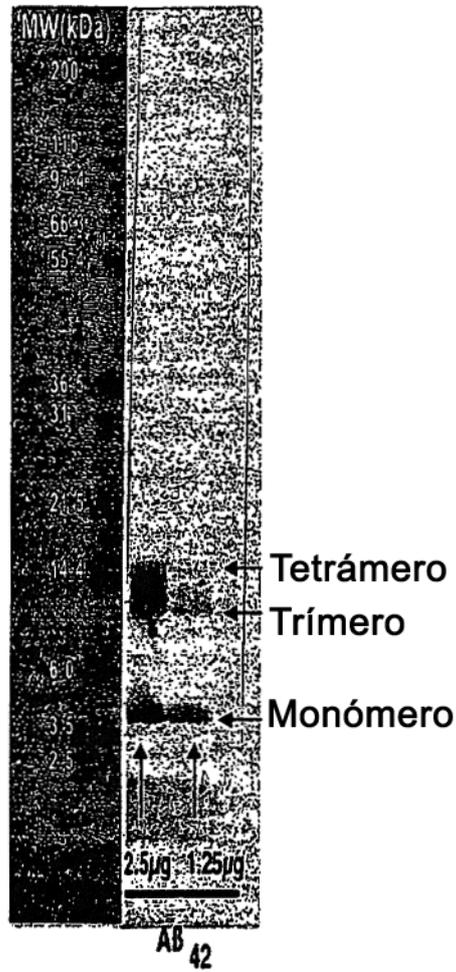


FIG. 3

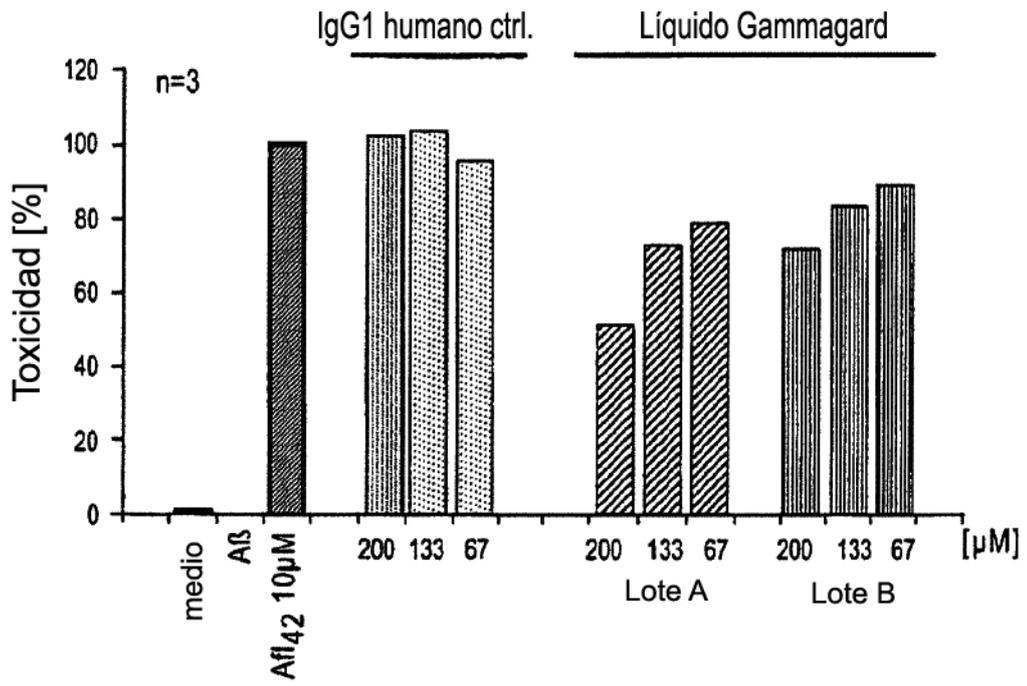


FIG. 4

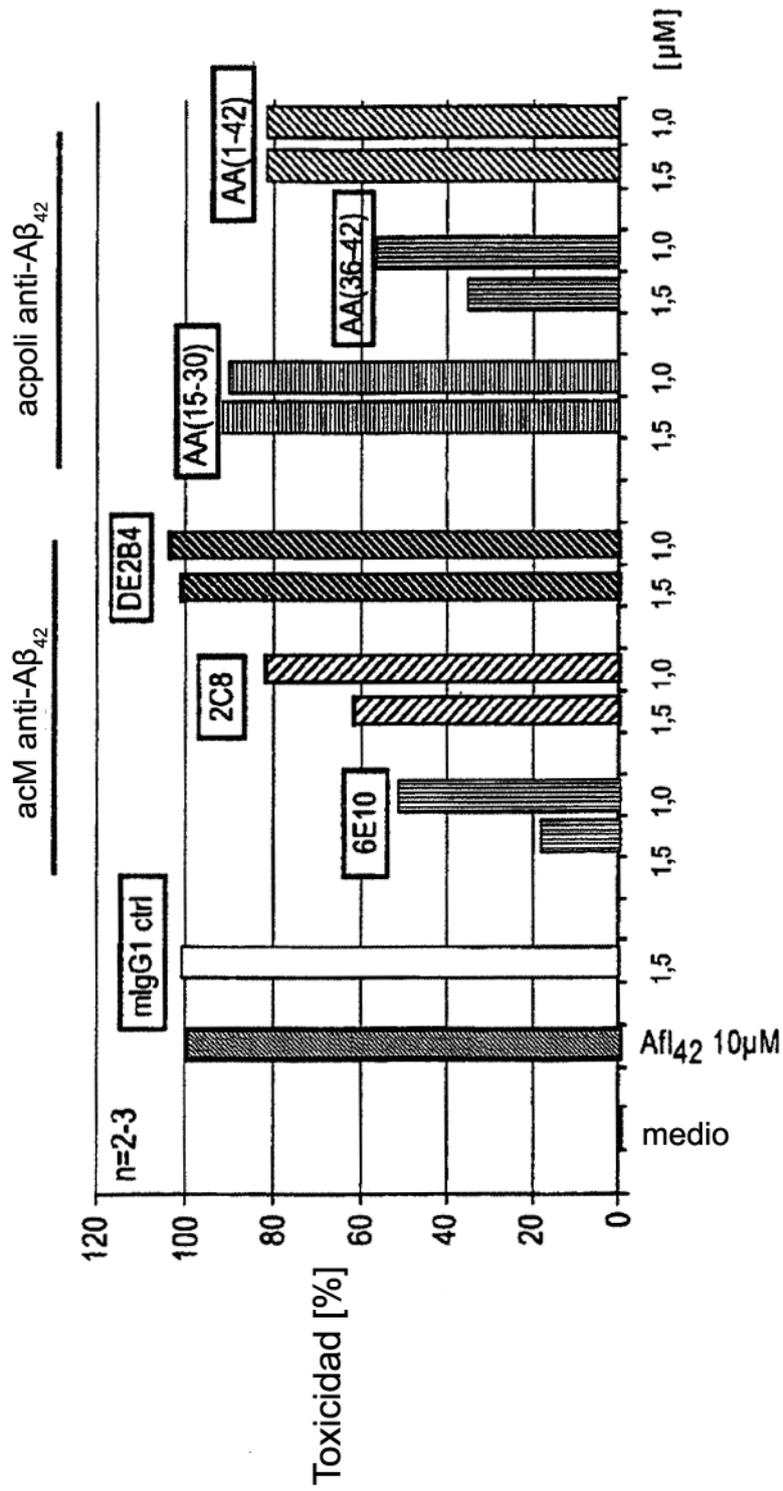


FIG. 5