

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 453 941**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 5/18 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2006 E 06838873 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014 EP 1976877**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales contra la proteína beta amiloide y usos de los mismos**

30 Prioridad:

30.11.2005 US 740866 P
03.03.2006 US 778950 P

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

09.04.2014

73 Titular/es:

ABBVIE INC. (50.0%)
1 North Waukegan Road
North Chicago, IL 60064, US y
ABBVIE DEUTSCHLAND GMBH & CO KG (50.0%)

72 Inventor/es:

LABKOVSKY, BORIS;
BARGHORN, STEFAN;
HILLEN, HEINZ;
EBERT, ULRICH;
STRIEBINGER, ANDREAS R. y
KELLER, PATRICK

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 453 941 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

Anticuerpos monoclonales contra la proteína beta amiloide y usos de los mismos

5 Antecedentes de la invención**Campo de la técnica**

10 La invención sujeto se refiere a anticuerpos monoclonales (p. ej., 8F5) que se pueden usar, por ejemplo, en la prevención, tratamiento y diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos.

Información básica

15 La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo que se caracteriza por una pérdida progresiva de capacidades cognitivas y por características neuropatológicas que comprenden depósitos de amiloide, marañas neurofibrilares y pérdida neuronal en varias regiones del cerebro, véase Hardy y Selkoe (Science 297, 353 (2002); Mattson (Nature 431, 7004 (2004). Los principales constituyentes de depósitos de beta-péptidos amiloides (A β), siendo el más importante el tipo de 42 aminoácidos de longitud (A β 1 - 42).

20 En concreto, la proteína amiloide β (1 - 42) es un polipéptido que tiene 42 aminoácidos que deriva de la proteína precursora de amiloides (APP) mediante procesamiento proteolítico. Esto también incluye, además de variantes humanas, isoformas de la proteína amiloide β (1 - 42) presente en organismos distintos a los seres humanos, en particular otros mamíferos, especialmente ratas. Esta proteína, que tiende a polimerizar en un ambiente acuoso, puede estar presente en formas moleculares muy diferentes.

25 Se ha demostrado que una sencilla correlación del depósito de proteínas insolubles con la aparición o progresión de los trastornos de demencia, tales como, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer no es convincente (Terry et al., Ann. Neurol. 30. 572 - 580 (1991); Dickson et al., Neurobiol. Aging 16, 285 - 298 (1995)). Por el contrario, la pérdida de sinapsis y de percepción cognitiva parece correlacionarse mejor con las formas solubles de A β (1 - 42)(Lue et al., Am. J. Pathol. 155, 853 - 862 (1999); McLean et al., Ann. Neurol. 46, 860 - 866 (1999)).

30 Aunque en el pasado se han producido anticuerpos policlonales y monoclonales contra A β (1 - 42), no se ha demostrado que ninguno produzca el efecto terapéutico deseado sin producir también efectos secundarios graves en animales y/o seres humanos. Por ejemplo, resultados de inmunización pasiva de estudios preclínicos en ratones APP23 muy viejos que recibieron un anticuerpo anti-A β (1 - 42) dirigido a N-terminal una vez a la semana durante 5 meses indican efectos secundarios terapéuticamente relevantes. En concreto, estos ratones mostraron un incremento del número y la gravedad de microhemorragias en comparación con los ratones tratados con solución salina (Pfeifer et al., Science 2002 298:1379). Recientemente también se ha descrito un incremento similar de las hemorragias en ratones Tg2576 y PDAPP muy viejos (>24 meses) (Wilcock et al., J Neuroscience 2003, 23: 3745 - 51; Racke et al., J Neuroscience 2005, 25:629 - 636). En ambas cepas, la inyección de anti-A β (1 - 42) tuvo como resultado un incremento significativo de microhemorragias. Por tanto, existe una tremenda necesidad terapéutica de desarrollo de productos biológicos que prevengan o ralenticen la progresión de la enfermedad sin inducir efectos negativos y potencialmente mortales sobre el cuerpo humano. Dicha necesidad es particularmente evidente a la luz del incremento de la longevidad de la población general y, con este incremento, una elevación asociada en el número de pacientes a los que anualmente se les ha diagnosticado enfermedad de Alzheimer. Además, dichos anticuerpos permitirán un diagnóstico correcto de la enfermedad de Alzheimer en un paciente que está experimentando síntomas de la misma, un diagnóstico que en la actualidad solo se puede confirmar tras la autopsia. Adicionalmente, los anticuerpos permitirán la elucidación de las propiedades biológicas de las proteínas y otros factores biológicos responsables de esta debilitante enfermedad.

50 Los documentos WO 2004/067561 y WO 2004/067561 describen oligómeros de A β (1 - 42) estables (globulómeros A β (1 - 42)) y anticuerpos dirigidos contra los globulómeros (véase también Barghorn et al., 2005, J Neurochem, 95, 834 - 847).

55 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a la materia sujeto definida en las reivindicaciones.

60 Por tanto, la presente invención incluye un anticuerpo aislado que se une con mayor especificidad a un globulómero proteico beta amiloide (A β) que a un monómero proteico beta amiloide. Por tanto, se observa una unión preferencial. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal tal como 8F5. La proporción de la especificidad de unión por el globulómero frente al monómero es de al menos 1,4. En concreto, la proporción es de al menos aproximadamente de 1,4 a al menos aproximadamente 16,9. (Una proporción de 1,0 - 17,5 incluidos los extremos) también se considera que entra dentro del alcance de la presente invención, así como los porcentajes decimales de la misma. Por ejemplo, , 1,1, 1,2, 1,3, ..., 2,0, 2,1, 2,2..., 17,1, 17,2, 17,3, 17,4, 17,5, así como los números enteros completos de entremedias y los porcentajes de los mismos se considera que entran dentro del alcance de la

presente invención. El monómero proteico beta amiloide puede ser, por ejemplo, monómero A β (1 - 42) o monómero A β (1 - 40).

Además, la presente invención también abarca un anticuerpo monoclonal (denominado en el presente documento "8F5") producido por un hibridoma con el número designado en la Colección Americana de Cultivos Tipo PTA-7238, así como el hibridoma que produce este anticuerpo monoclonal (es decir, 8F5).

Adicionalmente, la presente invención incluye un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada variable codificada por la SEC ID N° 1. Este anticuerpo puede ser murino, humano o humanizado.

Además, la presente invención incluye un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena ligera variable codificada por la SEC ID N° 2. Este anticuerpo también puede ser murino, humano o humanizado. El anticuerpo puede comprender además una cadena pesada ligera variable codificada por la SEC ID N° 1 y puede ser humano o humanizado.

Además, la presente invención incluye un anticuerpo monoclonal que comprende la SEC ID N° 3. El anticuerpo puede ser murino, humano o humanizado.

Adicionalmente, la presente invención abarca un anticuerpo monoclonal que comprende la SEC ID N° 4. Este anticuerpo puede ser murino, humano o humanizado. Este anticuerpo puede comprender además la SEC ID N° 3 y puede ser murino, humano o humanizado.

La presente invención también incluye un anticuerpo aislado que se une con mayor especificidad a un globulímero proteico beta amiloide que a una fibrilla proteica beta amiloide. Este anticuerpo puede ser, por ejemplo, monoclonal y puede ser el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma que tiene como número designado por la Colección Americana de Cultivos Tipo PTA-7243. Los hibridomas que producen estos anticuerpos monoclonales también entran dentro del alcance de la presente invención.

Además, la presente invención incluye un anticuerpo en el que al menos una de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada variable se selecciona del grupo que consiste en las SEC ID N° 5, SEC ID N° 6 y SEC ID N° 7.

Además, la presente invención también incluye un anticuerpo en el que al menos una de las CDR de la cadena ligera variable se selecciona del grupo que consiste en SEC ID N°8, SEC ID N°9 y SEC ID N°10. Este anticuerpo puede comprender además al menos una CDR de la cadena pesada variable seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°5, SEC ID N°6 y SEC ID N°7.

Adicionalmente, la presente invención se refiere a los anticuerpos de la invención para usar en un procedimiento de tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer en un paciente que necesite el tratamiento o la prevención. Este procedimiento comprende administrar al paciente uno cualquiera o más de los anticuerpos aislados descritos anteriormente en una cantidad suficiente para efectuar el tratamiento o prevención. El anticuerpo aislado se puede administrar, por ejemplo, mediante una vía seleccionada del grupo que consiste en administración intramuscular, administración intravenosa y administración subcutánea.

La presente invención también incluye un procedimiento de diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un paciente que se sospecha que tiene esta enfermedad. Este procedimiento comprende las etapas de: 1) poner en contacto una muestra biológica de dicho paciente con al menos uno de los anticuerpos descritos anteriormente durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de complejos antígeno/anticuerpo, y 2) detectar la presencia de los complejos antígeno/anticuerpo en dicha muestra, donde los complejos indican un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer en el paciente. El antígeno puede ser, por ejemplo, un globulímero o una porción o fragmento del mismo que tiene las mismas propiedades funcionales que el globulímero completo (p. ej., actividad de unión).

Además, la presente invención incluye otro procedimiento de diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un paciente que se sospecha que tiene esta enfermedad. Este procedimiento comprende las etapas de: 1) poner en contacto una muestra biológica de dicho paciente con un antígeno durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de complejos anticuerpo/antígeno; 2) añadir un conjugado a los complejos anticuerpo/antígeno resultantes durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que el conjugado se una al anticuerpo unido, en el que el conjugado comprende uno de los anticuerpos descritos con anterioridad, unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; y 3) detectar la presencia de un anticuerpo que puede estar presente en la muestra biológica a través de la detección de una señal generada por el compuesto generador de señal de modo que la señal indica un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer en el paciente. El antígeno puede ser un globulímero o una porción o fragmento del mismo que tiene las mismas propiedades funcionales que el globulímero completo (p. ej., actividad de unión).

La presente invención incluye un procedimiento adicional de diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un paciente que se sospecha que tiene la enfermedad de Alzheimer. Este procedimiento comprende las etapas de: 1)

poner en contacto una muestra biológica de dicho paciente con un anti-anticuerpo, en el que el anti-anticuerpo es específico de uno de los anticuerpos descritos con anterioridad, durante un tiempo y en condiciones específicas suficientes para permitir la formación de complejos anti-anticuerpo/anticuerpo, conteniendo los complejos el anticuerpo presente en la muestra biológica; 2) añadir un conjugado a los complejos anti-anticuerpo/anticuerpo durante un tiempo y en condiciones específicas suficientes para permitir que el conjugado se una al anticuerpo, donde el conjugado comprende un antígeno que se une a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; y 3) detectar una señal generada por el compuesto generador de señal de modo que la señal indica un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer en el paciente.

Adicionalmente, la presente invención incluye una composición que comprende uno cualquiera o más de los anticuerpos descritos con anterioridad (p. ej., 8F5), en particular para uso en un procedimiento de prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer en un paciente que necesite dicha prevención o tratamiento. Este procedimiento comprende la etapa de administrar la composición descrita directamente con anterioridad al paciente en una cantidad suficiente para efectuar el tratamiento o prevención.

Adicionalmente, la presente invención abarca una vacuna que comprende al menos uno de los anticuerpos descritos con anterioridad y un adyuvante farmacéuticamente aceptable, en particular para uso en un procedimiento adicional de prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer en un paciente que necesite dicha prevención o tratamiento. Este procedimiento comprende la etapa de administrar la vacuna indicada con anterioridad al paciente en una cantidad suficiente para efectuar el tratamiento o prevención.

Adicionalmente, la presente invención abarca un procedimiento de identificar compuestos adecuados para inmunización activa de un paciente que se ha predicho que va a desarrollar la enfermedad de Alzheimer. Este procedimiento comprende: 1) exponer uno o más compuestos de interés a uno o más de los anticuerpos descritos con anterioridad durante un tiempo y en condiciones suficientes para que el uno o más compuestos se unan al anticuerpo o anticuerpos; 2) identificar los compuestos que se unen al anticuerpo o anticuerpos, los compuestos identificados para uso en inmunización activa en un que se ha predicho que va a desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

Asimismo, la presente invención incluye un kit que comprende: a) al menos uno de los anticuerpos aislados descritos con anterioridad y b) un conjugado que comprende un anticuerpo unido a un compuesto generador de señal, en el que el anticuerpo del conjugado es diferente del anticuerpo aislado. El kit también puede incluir una ficha técnica con instrucciones sobre cómo usar los componentes del kit.

La presente invención también abarca un kit que comprende: a) un anti-anticuerpo frente a uno de los anticuerpos descritos con anterioridad y b) un conjugado que comprende un antígeno unido a un compuesto generador de señal. El antígeno puede ser un globulímero o un fragmento o porción del mismo que tiene las mismas características funcionales que el globulímero (p. ej., actividad de unión). De nuevo, el kit también puede incluir una ficha técnica con instrucciones sobre cómo usar los componentes del kit.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra la selectividad de 8F5 para los globulímeros frente a los monómeros A β (1 - 42), A β (1 - 40) y sAPP. Los factores de selectividad para 8F5 se pueden calcular como las proporciones entre los valores de CE₅₀ (frente al monómero A β (1 - 42) en HFIP: 555,8/90,74 = 6,1; frente al monómero A β (1 - 42) en NH₄OH: 1007/90,74 = 11,1; frente al monómero A β (1 - 40): 667,8/90,74 = 7,4 frente a sAPP: >100)

La Figura 2 ilustra el análisis SDS-PAGE de fibrillas unidas a anticuerpos de cadena pesada y ligera (Calles 4, 6, 8) y las correspondientes fracciones libres no unidas (Calles 3, 5, 7) en los sobrenadantes.

La Figura 3 ilustra el contenido en A β 42 y A β 40 en muestras de LCR de pacientes con deterioro cognitivo leve (DGL, izquierda) o enfermedad de Alzheimer (EA, derecha). En ambos grupos, se puede observar que 8F5 escoge una proporción más alta de A β (1 - 42) y una cantidad menor o igual de A β (1 - 40) si se compara con un anticuerpo estándar 6E10 o en comparación con el análisis de muestra directa con los mismos ELISA.

La Figura 4 ilustra un nuevo índice de reconocimiento de objetos como el tiempo pasado con un objeto desconocido frente a familiar en tres grupos de ratones APP transgénicos (es decir, 6G1, 8F5, PBS) y un grupo de compañeros de camada no transgénicos (silvestres). Los animales (número que se da debajo de las columnas) se inmunizaron con anticuerpos monoclonales 6G1 o 8F5 o tratados con vehículo (es decir, solución salina tamponada con fosfato, PBS, y silvestre) mediante inyección intraperitoneal una vez a la semana durante tres semanas. El día de la última inyección se realizó una nueva tarea de reconocimiento de objetos nuevos. La diferencia entre los grupos de PBS y silvestre indicó un déficit cognitivo de los ratones APP transgénicos en este paradigma. Los ratones a los que se inyectó PBS realizaron un nivel de azar (es decir, no significativamente diferente de 50) mientras que todos los demás ratones mostraron reconocimiento del objeto (prueba t; estrellas). Cuando el funcionamiento de los ratones transgénicos APP tratados con anticuerpos se comparó con los grupos control se halló una diferencia significativa frente a los tratados con PBS pero no frente a los ratones silvestres (ANOVA con prueba t post-hoc; círculos), lo que indica que el tratamiento invertía el déficit cognitivo en estos ratones APP transgénicos.

La Figura 5(A) ilustra la secuencia del ADN (SEC ID N° 1) de la cadena pesada variable que codifica el

anticuerpo monoclonal al que se hace referencia en el presente documento como "8F5" y la Figura 5(B) ilustra la secuencia del ADN (SEC ID N° 2) de la cadena ligera variable que codifica el anticuerpo monoclonal 8F5. (Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) están subrayadas en cada secuencia, véase también la Figura 6).

La Figura 6(A) ilustra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 3) de la cadena pesada variable que codifica el anticuerpo monoclonal 8F5 y la Figura 6(B) ilustra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 4) de la cadena ligera variable que codifica el anticuerpo monoclonal 8F5. Una CDR de la cadena pesada variable está representada por la secuencia de aminoácidos SYGMS (SEC ID N°5). Otra CDR de la cadena pesada variable está representada por la secuencia de aminoácidos ASINSNGGSTYYPDSVKG (SEC ID N° 6) y otra CDR de la cadena pesada variable está representada por la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 7). Una CDR de la cadena ligera variable está representada por la secuencia de aminoácidos RSSQLVYSNGDITYLH (SEC ID N°8). Otra CDR de la cadena ligera variable está representada por la secuencia de aminoácidos KVSNRFS (SEC ID N° 9) y otra CDR de la cadena ligera variable está representada por la secuencia de aminoácidos SQSTHVPWT (SEC ID N° 10). Todas las CDR descritas con anterioridad están subrayadas en la Figura 6(A) y 6(B).

La Figura 7 muestra la unión de los anticuerpos a diferentes concentraciones a secciones transversales de las neocortezas de los pacientes de enfermedad de Alzheimer (EA) o ratones APP transgénicos viejos. En concreto, la Figura 7(A) ilustra la verificación de depósitos de amiloides mediante tinción con rojo Congo como placas en el tejido cerebral y como angiopatía amiloide cerebral (AAC) en vasos cerebrales de la línea de ratones transgénicos APP Tg2576 y en un paciente de EA (RZ55).

La Figura 7(B) ilustra que la tinción de depósitos parenquimatosos de A β (placas de amiloide) en un paciente de EA (RZ16) solo se produce con 6G1y el anticuerpo disponible comercialmente 6E10 mientras que 8F5 y 8C5 (anticuerpo de referencia) muestran una tinción considerablemente más débil. La Figura 7(C) ilustra que la fuerte tinción de depósitos parenquimatosos de A β (placas de amiloide) en ratones TG2576 solo se produce con 6G1y el anticuerpo disponible comercialmente 6E10 mientras que 8F5 y 8C5 muestran una tinción considerablemente más débil. Las Figuras 7(D)-(G) ilustran la cuantificación del análisis de la tinción de placas A β en las imágenes histológicas usando análisis de imagen. Los valores de densidad óptica (0 % = ausencia de tinción) se calcularon a partir de los valores en la escala de los grises de las placas restados de los valores en la escala de los grises del tejido de fondo. (Fig. (D)= unión de 0,7 μ g/ml del anticuerpo en ratones Tg2576; Fig. (E)= unión de 0,07 - 0,7 μ g/ml del anticuerpo en ratones APP/L; Fig. (F)= unión de 0,7 μ g/ml del anticuerpo en un paciente de EA (RZ55) ; y Fig. (G)= unión de 0,07 - 0,7 μ g/ml del anticuerpo en un paciente de EA (RZ16)). Las diferencias entre la tinción de los anticuerpos comercialmente disponibles 6E10 (estrellas) y 4G8 (círculos) y los anticuerpos 6G1, 8C5 y 8F5 (un asterisco/círculo: $p < 0,05$, dos asteriscos/círculos: $p < 0,01$, y tres asteriscos/círculos: $p < 0,001$ frente al control; prueba de Bonferroni post-hoc tras ANOVA con $p < 0,001$) se evaluaron estadísticamente (Fig. (D) y Fig. (E)). En las figuras (E) y (G), los anticuerpos 8C5 y 8F5 siempre mostraron una tinción significativamente menor que los anticuerpos disponibles comercialmente 6E10 y 4G8 ($p < 0,05$ en prueba t post-hoc tras $p < 0,001$ en ANOVA). La Figura (H) ilustra que la fuerte tinción de los depósitos vasculares de A β (flechas) solo se produce con 6G1 y el anticuerpo disponible comercialmente 6E10 mientras que la tinción con 8F5 y 8C5 fue mucho más débil. En los ratones Tg2576 se encontró una situación cualitativamente similar (no mostrado aquí).

La Figura 8 ilustra la selectividad de 8C5 (anticuerpo de referencia) para los globulómeros frente a los monómeros A β (1 - 42), A β (1 - 40) y sAPP. Los factores de selectividad para 8C5 se pueden calcular como las proporciones entre los valores de CE₅₀ (frente al monómero A β (1 - 42) en HFIP: 2346/568,2 = 4,1; frente al monómero A β (1 - 42) en NH₄OH: >100; frente al monómero A β (1 - 40): >100; frente a sAPP: >100)

La Figura 9(A) ilustra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 11) que codifica la cadena pesada de 8C5 (anticuerpo de referencia) y la Figura 9(B) ilustra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 12) que codifica la cadena ligera de 8C5. Las secuencias de nucleótidos que codifican las correspondientes CDR descritas en la Figura 10(A) y 10(B) están subrayadas.

La Figura 10(B) ilustra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 19) de la cadena pesada variable que codifica el anticuerpo monoclonal 8C5 (anticuerpo de referencia) y la Figura 10(B) ilustra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 20) de la cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 8F5. Una CDR de la cadena pesada variable está representada por la secuencia de aminoácidos SYGMS (SEC ID N° 13). Otra CDR de la cadena pesada variable está representada por la secuencia de aminoácidos SIKNNGGSTYYPDSLKG (SEC ID N° 14) y otra CDR de la cadena pesada variable está representada por la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 15). Una CDR de la cadena ligera variable está representada por la secuencia de aminoácidos RSSQLVHSNGDITFLH (SEC ID N° 16). Otra CDR de la cadena ligera variable está representada por la secuencia de aminoácidos KVSNRFS (SEC ID N° 17) y otra CDR de la cadena ligera variable está representada por la secuencia de aminoácidos SQSIHVPWT (SEC ID N° 18). Todas las CDR descritas con anterioridad están subrayadas en la Figura 10(A) y 10(B).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto monoclonal, al que se hace referencia en el presente documento como "8F5" así como otros anticuerpos relacionados. Estos anticuerpos se pueden usar, por ejemplo, en el diagnóstico, prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos.

El anticuerpo monoclonal 8F5 tiene muchas propiedades interesantes que le permiten ser un candidato terapéutico extremadamente interesante así como un candidato diagnóstico extremadamente útil. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 8F5 tiene una unión preferencial por los globulómeros A β (1 - 42) en comparación con monómeros o fibrillas.

5 El término "A β (X-Y)" hace referencia en el presente documento a la secuencia de aminoácidos desde la posición de aminoácido X a la posición de aminoácido Y de la proteína β amiloide humana que incluye X e Y y, en particular, hace referencia a la secuencia de aminoácidos desde la de aminoácido X a la posición de aminoácido Y de la secuencia de aminoácidos DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGW IA o cualquiera de sus
10 variantes de origen natural, en particular aquéllas con al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en A2T, H6R, D7N, A21G ("Flemish"), E22G ("Arctic"), E22Q ("Dutch"), E22K ("Italian"), D23N ("Iowa"), A42T y A42V, y donde las cifras son relativas a la posición de inicio del péptido A β , incluyendo la posición X y la posición Y o una secuencia con hasta tres sustituciones de aminoácidos adicionales ninguno de los cuales puede prevenir la formación del globulómero. Una sustitución de aminoácido "adicional" se define en el presente documento como
15 cualquier desviación con respecto a la secuencia canónica que no se encuentra en la naturaleza.

Más específicamente, el término "A β (1 - 42)" en el presente documento hace referencia a la secuencia de aminoácidos desde la posición de aminoácido 1 a la posición de aminoácido 42 de la proteína β amiloide, incluyendo
20 1 y 42, y, en particular, hace referencia a la secuencia de aminoácidos desde la posición de aminoácido 1 a la posición de aminoácido 42 de la secuencia de aminoácidos DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGW IA (correspondiente a las posiciones de aminoácidos 1 a 42) o cualquiera de sus variantes de origen natural. Dichas variantes pueden ser, por ejemplo, aquellas con al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en A2T, H6R, D7N, A21G ("Flemish"), E22G ("Arctic"), E22Q ("Dutch"), E22K ("Italian"), D23N ("Iowa"),
25 A42T y A42V, donde los números son relativos al inicio del péptido A β , incluyendo tanto 1 como 42 o una secuencia con hasta tres sustituciones de aminoácidos adicionales, ninguno de los cuales puede prevenir la formación de globulómero. Asimismo, el término "A β (1 - 40)" en el presente documento hace referencia a la secuencia de aminoácidos desde la posición de aminoácido 1 a la posición de aminoácido 40 de la proteína β amiloide, incluyendo
30 1 y 40, y, hace referencia, en particular, hace referencia a la secuencia de aminoácidos desde la posición de aminoácido 1 a la posición de aminoácido 40 de la secuencia de aminoácidos DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGW IA o cualquiera de sus variantes de origen natural. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, aquellas con al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en A2T, H6R, D7N, A21G ("Flemish"), E22G ("Arctic"), E22Q ("Dutch"), E22K ("Italian") y D23N ("Iowa"), donde los números son relativos a la posición inicio del péptido A β , incluyendo tanto 1 como 40 o una secuencia con hasta tres sustituciones de
35 aminoácidos adicionales, ninguno de los cuales puede prevenir la formación de globulómero.

La expresión "globulómero "A β (X-Y)" (también conocido como "oligómero globular A β (X-Y)") hace referencia en el presente documento a una asociación soluble, globular y no covalente de los péptidos A β (X-Y) μ , como se ha
40 definido anteriormente, que posee homogeneidad y claras características físicas. Los globulómeros A β (X-Y) son ensamblajes oligoméricos no fibrilares y estables de péptidos A β (X-Y) que se pueden obtener mediante incubación con detergentes aniónicos. En contraste con el monómero y las fibrillas, estos globulómeros se caracterizan por un número de ensamblaje definido de subunidades (p. ej., formas de ensamblaje precoces, n=3 - 6, oligómeros A" y formas de ensamblaje tardías, n=12- 14, " oligómeros B", como se describe en la publicación de solicitud internacional de PCT n° WO 04/067561). Los globulómeros tienen una estructura de tipo globular en 3 dimensiones ("glóbulo fundido", véase Barghorn et al., 2005, J Neurochem, 95, 834 - 847). Pueden además caracterizarse
45 mediante una o más de las siguientes características:

- escindibilidad de los aminoácidos en N-terminal X-23 con proteasas promiscuas (tales como termolisina o endoproteinasa GluC), dando las formas truncadas de globulómeros A β (X-Y),
- no accesibilidad de los aminoácidos en C-terminal 24-Y con proteasas promiscuas y anticuerpos; y
- las formas truncadas de estos globulómeros A β (X-Y) mantienen la estructura nuclear en 3 dimensiones de los
50 globulómeros con una mejor accesibilidad del epítipo nuclear A β (20-Y) en su conformación de globulómero.

De acuerdo con la invención y, en concreto, para el fin de la evaluación de las afinidades de unión de los anticuerpos de la presente invención, la expresión "globulómero A β (X-Y)" en el presente documento hace referencia a un
55 producto que se puede obtener mediante un procedimiento como se ha descrito en la publicación de solicitud internacional n° WO 04/067561. El procedimiento comprende desplegar un péptido A β (X-Y) natural, recombinante o sintético o un derivado de los mismos, exponiendo el péptido A β (X-Y) al menos parcialmente desplegado o derivado del mismo a un detergente, reduciendo la acción detergente y continuando la incubación.

60 Con objeto de desplegar el péptido, se puede permitir que agentes de rotura de puentes de hidrógeno, tales como, por ejemplo, hexafluoroisopropanol (HFIP) actúen sobre la proteína. Tiempos de acción de unos pocos minutos, por ejemplo de aproximadamente 10 a 60 minutos, son suficientes cuando la temperatura de acción es de aproximadamente 20 a 50 °C y, en concreto, de aproximadamente 35 a 40°C. La posterior disolución del residuo evaporado hasta sequedad, preferentemente en forma concentrada, en disolventes orgánicos adecuados miscibles
65 en tampones acuosos tales como, por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO), tiene como resultado una suspensión del péptido al menos parcialmente desplegado o derivado del mismo, que se puede usar después. Si es necesario, la

suspensión madre se puede almacenar a temperaturas bajas, por ejemplo a aproximadamente -29°C durante un periodo intermedio.

5 Como alternativa, el péptido o el derivado del mismo se pueden suspender en una solución ligeramente ácida, preferentemente acuosa, por ejemplo una solución de HCl acuoso aproximadamente 10 mM. Tras un tiempo de incubación de aproximadamente unos minutos, los componentes insolubles se eliminan mediante centrifugación. Unos minutos a 10.000 g es conveniente. Estas etapas del procedimiento se llevan a cabo, preferentemente, a temperatura ambiente, es decir a una temperatura en el intervalo de 20 a 30 °C. El sobrenadante obtenido tras la centrifugación contiene el péptido A β (X-Y) o derivado del mismo y se puede almacenar a temperatura baja, por ejemplo a aproximadamente -20°C, durante un periodo temporal.

15 La siguiente exposición a un detergente se refiere a la oligomerización del péptido o el derivado del mismo, para dar el tipo intermedio de oligómeros (en la publicación de solicitud internacional nº WO 04/067561 se denominan oligómeros A). Con este fin, se permite que un detergente actúe sobre, opcionalmente, el péptido al menos parcialmente desplegado o derivado del mismo hasta producir suficiente oligómero intermedio. Se da preferencia al uso de detergentes iónicos, en particular detergentes aniónicos.

De acuerdo con una realización concreta, un detergente de la fórmula (I):

20 R-X,

en la cual el radical "R" es alquilo no ramificado o ramificado que tiene de 6 a 20 y, preferentemente, de 10 a 14 átomos de carbono o alqueno no ramificado o ramificado que tiene de 6 a 20 y, preferentemente, de 10 a 14 átomos de carbono y el radical "X" es un grupo ácido o sal del mismo, seleccionándose preferentemente X de entre -COOM⁺, -SO₃M y es, más preferentemente, OSO₃M⁺ y M⁺ es un catión de hidrógeno o un catión inorgánico u orgánico seleccionado preferentemente de cationes de metales alcalinos, cationes de metales alcalino térreos y cationes de amonio. Los más ventajosos son detergentes de la fórmula (I) en la que R es un alquilo no ramificado del cual se deben mencionar los radicales alq-1-uilo, en particular. Se da particular preferencia a dodecilsulfato sódico (SDS). De forma ventajosa también se puede usar ácido láurico y ácido oleico. La sal de sodio del detergente lauroilsarcosina (también conocido como sarkosil NL-30 o Gardol[®]) también es particularmente ventajoso.

El tiempo de acción del detergente, en particular, depende de si, y en caso afirmativo, en qué medida, el péptido o derivado del mismo sujeto a oligomerización se ha desplegado. Si, de acuerdo con la etapa de desplegado, el péptido o derivado del mismo se ha tratado con anterioridad con un agente de rotura de puentes de hidrógeno (es decir, en particular con hexafluoroisopropanol), los tiempos de acción en el intervalo de unas horas, de forma ventajosa desde aproximadamente 1 a 20 y, en particular, desde aproximadamente 2 a 10 horas, son suficientes cuando la temperatura de acción es de aproximadamente 20 a 50 °C y, en particular, de aproximadamente 35 a 40 °C. Si el punto de partida es un péptido o derivado del mismo menos desplegado o esencialmente no desplegado, son convenientes tiempos de acción consecuentemente más prolongados. Si péptido o derivado del mismo se ha pretratado, por ejemplo de acuerdo con el procedimiento indicado anteriormente como alternativa al tratamiento con HFIP o dicho péptido o derivado del mismo está directamente sometido a oligomerización, los tiempos de acción en e intervalo de aproximadamente 5 a 30 horas y, en particular, de aproximadamente 10 a 20 horas son suficientes cuando la temperatura de acción es de aproximadamente 20 a 50°C y, en particular, de aproximadamente 35 a 40°C. Tras la incubación, los componentes insolubles se eliminan de forma ventajosa mediante centrifugación. Unos minutos a 10.000 g es conveniente.

La concentración del detergente a elegir depende del detergente usado. Si se usa SDS, se ha demostrado que una concentración en el intervalo de 0,01 a 1% en peso, preferentemente de 0,05 a 0,5 % en peso, por ejemplo, de aproximadamente 0,2% en peso, es conveniente. Si se usa ácido láurico u oleico, son convenientes concentraciones algo más altas, por ejemplo en el intervalo de 0,05 a 2 % en peso, preferentemente de 0,1 a 0,5 % en peso, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 % en peso.

La acción del detergente debería tener lugar a una concentración de sales aproximadamente en el intervalo fisiológico. Por tanto, en particular, son convenientes concentraciones de NaCl en el intervalo de 50 a 500 mM, preferentemente de 100 a 200 mM y, más particularmente, a aproximadamente 140 mM.

La posterior reducción de la acción del detergente y la continuación de la incubación se refiere a la oligomerización posterior, para dar el globulómero A β (X-Y) de la invención (en la publicación de solicitud internacional nº WO 04/067561 se denominan oligómeros B). Dado que la composición obtenida de la etapa precedente contiene regularmente detergente y una concentración de sales en e intervalo fisiológico, es conveniente reducir la acción del detergente y, preferentemente, también la concentración de sales. Esto se puede llevar a cabo reduciendo la concentración del detergente y las sales, por ejemplo diluyendo convenientemente con agua o un tampón de menor concentración de sales, por ejemplo Tris-HCl, pH 7,3. Se ha demostrado que factores de dilución en el intervalo de aproximadamente 2 a 10, de forma ventajosa en el intervalo de aproximadamente 3 a 8 y, en particular, de aproximadamente 4, son adecuados. La reducción de la acción del detergente también se puede conseguir añadiendo sustancias que pueden neutralizar esta acción del detergente. Ejemplos de estos incluyen sustancias capaces de formar complejos con los detergentes, como sustancias capaces de estabilizar las células durante las

medidas de purificación y extracción, por ejemplo copolímeros de bloque EO/PO concretos, en particular el copolímero de bloque con la marca Pluronic[®] F 68. Igualmente se pueden usar alquiflenoles alcoxilados y, en particular, etoxilados, tales como los t-octilfenoles etoxilados de la serie Triton[®] X, en particular Triton[®] X100, 3-(3-colamidopropildimetilamonio)-1-propanosulfonato (CHAPS[®]) o ésteres de ácido graso de sorbitano alcoxilados y, en particular etoxilados, tales como los de la serie Tween[®], en particular, Tween[®] 20, en intervalos de concentración alrededor de o por encima de la concentración micelar crítica concreta.

Posteriormente, la solución se incuba hasta que se ha producido suficiente globulómero A β (X-Y). Los tiempos de acción en el intervalo de varias horas, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 10 a 30 horas y, en particular, en el intervalo de aproximadamente 15 a 25 horas, son suficientes cuando la temperatura de acción es de aproximadamente 20 a 50 °C y, en particular, de aproximadamente 35 a 40 °C. La solución puede concentrarse después y los posibles residuos se pueden eliminar mediante centrifugación. De nuevo, se ha demostrado que unos minutos a 10.000 g es conveniente. El sobrenadante obtenido después de la centrifugación contiene un globulómero A β (X-Y) como se ha descrito en el presente documento.

Un globulómero A β (X-Y) se puede recuperar finalmente, por ejemplo, mediante ultrafiltración, diálisis, precipitación o centrifugación. También se prefiere que la separación electroforética de los globulómeros A β (X-Y), en condiciones desnaturizantes, por ejemplo mediante SDS-PAGE, produce una banda doble (p. ej., con un peso molecular aparente de 38/48 kDa para A β (1 - 42)) y especialmente preferido si tras el tratamiento con glutaraldehído de los oligómeros, antes de la separación, estas dos bandas se funden en una. También se prefiere si la cromatografía de exclusión por tamaño de los globulómeros tiene como resultado un único pico (p. ej., correspondiente a un peso molecular de aproximadamente 60 kDa para A β (1 - 42)). Comenzando con el péptido A β (1 - 42), el procedimiento es, en particular, adecuado para obtener globulómeros A β (1 - 42).

Preferentemente, el globulómero muestra afinidad por las células neuronales y también exhibe efectos neuromoduladores.

Un "efecto neuromodulador" se define como un efecto inhibitorio duradero de una neurona que conduce a una disfunción de la neurona con respecto a la plasticidad neuronal.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, la expresión "globulómero A β (X-Y)" en el presente documento se refiere a un globulómero que consiste esencialmente en subunidades de A β (X-Y), en las que se prefiere si, de media, al menos 11 de 12 subunidades son del tipo A β (X-Y), más preferido, si menos del 10% de los globulómeros comprenden cualquier péptido no A β (X-Y) y, más preferido, si el contenido de los péptidos no A β (X-Y) en la preparación es inferior al umbral de detección. Más específicamente, la expresión "globulómero A β (1 - 42)" en el presente documento hace referencia a un globulómero que comprende unidades A β (12 - 42) como se ha definido anteriormente; la expresión "globulómero A β (1 - 42)" en el presente documento hace referencia a un globulómero que comprende unidades A β (12 - 42) como se ha definido anteriormente y la expresión "globulómero A β (20 - 42)" en el presente documento hace referencia a un globulómero que comprende unidades A β (20 - 42) como se ha definido anteriormente.

La expresión "globulómero A β (X-Y) reticulado" en el presente documento hace referencia a una molécula que se puede obtener a partir de un globulómero A β (X-Y) descrito anteriormente reticulando, preferentemente reticulando químicamente, más preferentemente reticulando con aldehído y, lo más preferentemente, reticulando con glutaraldehído de las unidades constituyentes del globulómero. En otro aspecto de la invención, un globulómero reticulado es esencialmente un globulómero en el que las unidades están unidas, al menos parcialmente, por enlaces covalentes en lugar de estar unidos mediante únicamente interacciones no covalentes.

La expresión "derivado de globulómero A β (X-Y)" en el presente documento hace referencia, en particular, a un globulómero que está marcado mediante unión covalente con un grupo que facilita la detección, preferentemente un fluoróforo, por ejemplo fluoresceína isocianato, ficoeritrina, proteína fluorescente de *Aequorea victoria*, proteína fluorescente de *Dictyosoma* o cualquier combinación de derivados de fluorescencia activa de los mismos; un cromóforo; un quimioluminóforo, por ejemplo luciferasa, preferentemente luciferasa de *Photinus pyralis*, luciferasa de *Vibrio fischeri*, o cualquier combinación o derivados de quimioluminiscencia activa de los mismos; un grupo enzimáticamente activo, por ejemplo peroxidasa, tal como peroxidasa de rábano, o un derivado enzimáticamente activo del mismo; un grupo electrógeno, por ejemplo un grupo que contiene un metal pesado tal como un grupo que contiene oro; un hapteno, por ejemplo un hapteno derivado de fenol; una estructura fuertemente antigénica, por ejemplo una secuencia peptídica que se ha predicho que es antigénica mediante el algoritmo de Kolaskar y Tongaonkar; un aptámero por otra molécula; un grupo quelante, por ejemplo hexahistidinilo; una estructura de proteína natural o derivada de la naturaleza que participa en otras interacciones específicas proteína-proteína, por ejemplo un miembro del par fos/jun; un grupo magnético, por ejemplo un grupo ferromagnético; o un grupo radioactivo tal como un grupo que comprende ¹H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S o ¹²⁵I o cualquier combinación de los mismos; o a un globulómero marcado estando unido covalente o no covalentemente mediante interacciones de alta afinidad, preferentemente unido covalentemente a un grupo que facilita la inactivación, el secuestro, degradación y/o precipitación, preferentemente marcado con un grupo que estimula la degradación *in vivo*, más preferentemente, con ubiquitina, donde es particularmente si este oligómero marcado está ensamblado *in vivo*; o a un globulómero modificado mediante cualquier combinación de los anteriores. Dichos grupos de marcaje o indicadores y procedimientos para unirlos a proteínas se conocen en la técnica. El marcaje y/o indicación se puede realizar antes,

durante o después de la globulomerización. En otro aspecto de la invención, un derivado de globulómero es una molécula obtenible a partir de un globulómero mediante una reacción de marcaje y/ indicación. De forma correspondiente, la expresión “derivado de monómero A β (X-Y)” en le presente documento hace referencia, en particular, a un monómero A β que está marcado o indicado como se describe para el globulómero.

La expresión “afinidad mayor” en el presente documento hace referencia a un grado de interacción donde el equilibrio entre, por un lado, el anticuerpo no unido y el globulómero no unido y, por otro, el complejo anticuerpo-globulómero, favorece además al complejo anticuerpo-globulómero. Asimismo, la expresión “afinidad menor” en el presente documento hace referencia a un grado de interacción donde el equilibrio entre, por un lado, el anticuerpo no unido y el globulómero no unido y, por otro, el complejo anticuerpo-globulómero, favorece además al anticuerpo no unido y al globulómero no unido.

La expresión “monómero de A β (X-Y)” en el presente documento hace referencia a la forma aislada del péptido A β (X-Y), preferentemente, una forma del péptido A β (X-Y) que no están implicada en interacciones esencialmente no covalentes con otros péptidos A β . Prácticamente, el monómero de A β (X-Y) normalmente se proporciona en forma de una solución acuosa. Preferentemente, la solución de monómero acuosa contiene de 0,05 % a 0,2 %, más preferentemente aproximadamente 0,1% de NaOH cuando se usa, por ejemplo, para determinar la afinidad de unión del anticuerpo de la presente invención. En otra situación preferible, la solución de monómero acuoso contiene de 0,05 % a 0,2 %, más preferentemente aproximadamente 0,1% de NaOH. Cuando se usa, puede ser conveniente diluir la solución de un modo adecuado. Además, normalmente es conveniente usar la solución en 2 horas, en particular en 1 hora y, especialmente en 30 minutos tras su preparación.

El término “fibrilla” en el presente documento hace referencia a una estructura molecular que comprende ensamblajes de péptidos A β (X-Y) individuales asociados no covalentemente que muestran estructuras fibrilares bajo el microscopio electrónico, que se unen al rojo Congo, exhiben birrefringencia bajo la luz polarizada y cuyo patrón de difracción de rayos X es una estructura β cruzada. La fibrilla también se puede definir como una estructura molecular que se puede obtener mediante un procedimiento que comprende la agregación polimérica autoinducida de un péptido A β adecuado en ausencia de detergentes, por ejemplo en HCl 0,1M, lo que conduce a la formación de agregados de más de 24, preferentemente más de 100 unidades. Este procedimiento es bien conocido en la técnica. De forma conveniente, la fibrilla A β (X-Y) se usa en forma de una solución acuosa. En una realización particularmente preferida de la invención, la solución de fibrilla acuosa se hace disolviendo el péptido A β en NH₄OH al 0,1%, diluyéndolo a 1:4 con NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 140 mM a pH 7,4, seguido de reajuste del pH a 7,4, incubando la solución a 37°C durante 20 horas, seguido de centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos y resuspensión en NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 140 mM a pH 7,4.

La expresión “fibrilla A β (X-Y)” en el presente documento se refiere a una fibrilla que comprende subunidades de A β (X-Y), donde se prefiere si, de media, al menos el 90% de las subunidades de tipo A β (X-Y), más preferido, si al menos el 98 % de las subunidades son del tipo A β (X-Y) y, lo más preferido, si el contenido de los péptidos no A β (X-Y) es inferior al umbral de detección.

Volviendo a 8F5, como queda de manifiesto en la Figura 1, así como 8C5 (Figura 8), los anticuerpos monoclonales específicos del globulómero A β (1 - 42) 8F5 y 8C5 reconocen predominantemente las formas de globulómero A β (1 - 42) y no preparaciones estándar de monómeros A β (1 - 40) o A β (1 - 42), incluyendo A β (1 - 42) agregados en contraste con los anticuerpos inespecíficos 6G1 y 6E10. En particular, 8F5 detecta globulómeros A β (1 - 42) únicamente mediante transferencia de tipo Western-PAGE y no mediante análisis de transferencia de tipo Western-SDS-PAGE, lo que indica un epítipo entre subunidades disociable con detergente más complejo en la estructura del globulómero A β (1 - 42) del núcleo. Un epítipo entre subunidades se define como un epítipo ocupante de espacio no lineal complejo localizado en al menos dos subunidades. Más específicamente, el análisis de transferencia puntual contra varias preparaciones estándar de A β (1 - 42) y A β (1 - 40) mostró diferencias significativas en el reconocimiento del globulómero A β (1 - 42) frente a las formas A β no globuloméricas (preparación de monómero A β (1 - 40)/(1 - 42) patrón, A β (1 - 42) agregado para 8F5 y 8C5 específicos pero no para los anticuerpos no específicos de isoforma 6G1 y 6E10. La especificidad del globulómero de 8F5 y 8C5 pero no de 6G1 y 6E10 se confirmó cuantificando el globulómero A β (1 - 42), monómero A β (1 - 42), monómero A β (1 - 40) y la unión a alfa proteína precursora de amiloides soluble en ELISA de tipo sándwich. Además, dado que estos anticuerpos acceden al globulómero después del nativo pero no después de la transferencia de tipo Western SDS, es probable que cada anticuerpo reconozca un epítipo no lineal estructural entre subunidades en la región de los aminoácidos 20 a 30 de A β (1 - 42). Dicha especificidad por los globulómeros es importante porque apuntar específicamente a la forma globulomérica de A β con un anticuerpo preferencial del globulómero tal, como, por ejemplo, 8F5 o 8C5: 1) evitará apuntar a los depósitos amiloides insolubles, cuya unión puede representar efectos secundarios inflamatorios observados durante las inmunizaciones con A β insoluble; 2) salvar el monómero A β y APP que se ha notificado que tienen funciones fisiológicas precognitivas (Plan et al., J. of Neuroscience 23:5531 - 5535 (2003); y 3) incrementar la biodisponibilidad del anticuerpo, ya que no estaría oculto o inaccesible a través de una extensa unión a depósitos insolubles.

La invención sujeto también divulga secuencias de nucleótidos (o fragmentos de las mismas) que codifican las cadenas ligera y pesada variables del anticuerpo monoclonal 8F5, así como las secuencias de nucleótidos (o

fragmentos de las mismas) que tienen secuencias que comprenden, que corresponden a, son idénticas a, son hibridables a o complementarias de al menos aproximadamente 70 % (p. ej., 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 % o 79 %), preferentemente al menos aproximadamente 80 % (p. ej., 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 % o 89 %), y, más preferentemente, al menos aproximadamente 90 % (p. ej., 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad a estas secuencias de nucleótidos codificantes. (Todos los números enteros (o porciones de los mismos) entre e incluyendo 70 % y 100 % se consideran dentro del alcance de la presente invención con respecto al porcentaje de identidad). Dichas secuencias pueden derivar de cualquier fuente (p. ej., aisladas de una fuente natural producidas por una vía semisintética o sintetizadas de novo). En particular, dichas secuencias se pueden aislar o derivar de fuentes distintas a las descritas en los ejemplos (p. ej., bacterias, hongos, alfas, ratones o seres humanos),

Además de las secuencias de nucleótidos descritas anteriormente, la presente invención también divulga secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera variables del anticuerpo monoclonal 8F5 (o fragmentos de estas secuencias de aminoácidos). Además, la presente invención también divulga secuencias de aminoácidos (o fragmentos de los mismos) que comprende, corresponden a, son idénticas a o son complementarias de al menos aproximadamente 70%, preferentemente al menos aproximadamente 80% y, más preferentemente, al menos aproximadamente 90% de identidad con las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la presente invención. (De nuevo, todos los números enteros (o porciones de los mismos) entre e incluyendo 70 % y 100 % (como se cita en relación con las identidades de las secuencias de nucleótidos indicadas anteriormente) también se consideran dentro del alcance de la presente invención con respecto al porcentaje de identidad).

Para los fines de la presente invención, un "fragmento" de una secuencia de nucleótidos se define como una secuencia contigua de aproximadamente al menos 6, preferentemente al menos aproximadamente 8, más preferentemente al menos aproximadamente 10 nucleótidos e incluso más preferentemente al menos aproximadamente 15 nucleótidos correspondientes a una región de la secuencia nucleotídica especificada.

El término "identidad" se refiere a la relación de dos secuencias en base a nucleótido por nucleótido sobre una ventana o segmento de comparación concreta. Por tanto, la identidad se define como el grado de igualdad, correspondencia o equivalencia entre las mismas hebras (sentido o antisentido) de dos segmentos de ADN (o dos secuencias de aminoácidos). "Porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas óptimamente sobre una región concreta, determinando el número de las posiciones en la cuales está la base o aminoácido idénticos en ambas secuencias con el fin de dar el número de posiciones equivalentes, dividiendo el número de estas posiciones por el número total de posiciones en el segmento que se están comparando y multiplicando el resultado por 100. La alineación óptima de las secuencias se puede realizar mediante el algoritmo de Smith & Waterman, Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante el método de Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85:2444 (1988) y mediante los programas informáticos que implementan los algoritmos relevantes (p. ej., Clustal Macaw Pileup (<http://cmgm.stanford.edu/biochem218/11Multiple.pdf>); Higgins et al., CABIOS. 5L151 - 153 (1989)), FASTDB (Intelligenetics), BLAST (National Center for Biomedical Information; Altschul et al., Nucleic Acids Research 25:3389 - 3402 (1997)), PILEUP (Genetics Computer Group, Madison, WI) o GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA (Wisconsin Genetics Software Package Release 7,0, Genetics Computer Group, Madison, WI). (véase la patente de EE.UU. N° 5.912,120).

Para los propósitos de la presente invención, "complementariedad" se define como el grado de relación entre dos segmentos de ADN. Se determina midiendo la capacidad de la hebra sentido de un segmento de ADN para hibridar con la hebra antisentido del otro segmento de ADN, en las condiciones adecuadas, para formar una doble hélice. Un "complemento" se define como una secuencia que se aparea con una secuencia dada en base a las normas de apareamiento de bases canónicas. Por ejemplo, una secuencia A-G-T en una hebra de nucleótidos es "complementaria" a T-C-A en la otra hebra.

En la doble hélice, la adenina aparece en una hebra, la timina aparece en la otra hebra. De un modo similar, cuando la guanina se encuentra en una hebra, la citosina se encuentra en la otra. Cuando mayor es la relación entre las secuencias nucleotídicas de los dos segmentos de ADN, mayor es la capacidad para formar dúplex híbridos entre las hebras de los dos segmentos de ADN.

"Similitud" entre dos secuencias de aminoácidos se define como la presencia de una serie de residuos de aminoácidos idénticos además de conservados en ambas secuencias. Cuando mayor es el grado de similitud entre dos secuencias de aminoácidos, mayor es la correspondencia, igualdad o equivalencia de las dos secuencias. ("Identidad entre dos secuencias de aminoácidos se define como la presencia de una serie de residuos de aminoácidos exactamente iguales o invariables en ambas secuencias.) Las definiciones de "complementariedad", "identidad" y "similitud" son bien conocidas para los expertos en la técnica.

"Codificado por" hace referencia a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica, donde la secuencia polipeptídica o una porción de la misma contiene una secuencia de aminoácidos de al menos 3 aminoácidos, más preferentemente al menos 8 aminoácidos e incluso más preferentemente al menos 15 aminoácidos de un polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico.

Adicionalmente, una molécula de ácido nucleico es "hibridable" con otra molécula de ácido nucleico cuando una forma monocatenaria de la molécula de ácido nucleico puede hibridar con la otra molécula de ácido nucleico en las condiciones adecuadas de temperatura y fuerza iónica (véase Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)). Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determinan la "rigurosidad" de la hibridación.

El término "hibridación", como se usa en el presente documento, generalmente se usa para implicar hibridación de ácidos nucleicos en condiciones de rigurosidad adecuadas, como será fácilmente evidente para los expertos en la técnica dependiendo de la naturaleza de la secuencia de la sonda y las secuencias diana. Las condiciones de hibridación y lavado son bien conocidas en la técnica y el ajuste de las condiciones dependiendo de la rigurosidad deseada variando el tiempo de incubación, la temperatura y/o la fuerza iónica de la solución se alcanzan fácilmente. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, como se ha indicado anteriormente. (Véase también Short Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel et al. y Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Específicamente, la elección de las condiciones viene dictada por la longitud de las secuencias que se están hibridando, en particular la longitud de la secuencia de la sonda, el contenido G-C relativo de los ácidos nucleicos y la cantidad de apareamientos erróneos que se permiten. Las condiciones de rigurosidad baja se prefieren cuando se desea una hibridación parcial entre hebras que tengan grados menores de complementariedad. Cuando se desea una complementariedad perfecta o casi perfecta se prefieren condiciones de rigurosidad alta. Para las condiciones de rigurosidad alta típicas, la solución de hibridación contiene 6 X S.S.C., 0,01 M EDTA, 1x solución de Denhardt y 0,5 % de SDS. La hibridación se lleva a cabo a aproximadamente 68°C durante aproximadamente 3 a 4 horas para los fragmentos de ADN clonado y durante aproximadamente 12 a aproximadamente 16 horas para el ADN eucariótico total. Para las rigurosidades moderadas, se pueden usar prehibridación con filtro e hibridación con una solución de 3 x cloruro sódico, citrato sódico (SSC), 50% de formamida (0,1M de este tampón a pH 7,5) y 5 X solución de Denhardt. Después, se puede prehibridar a 37 °C durante 4 horas, seguida de hibridación a 37°C con una cantidad de sonda marcada igual a 3.000,000 cpm total durante 16 horas, seguido de un lavado en 2 X SSC y solución de SDS al 0,1%, un lavado de 4 veces durante 1 minuto cada uno a temperatura ambiente y 4 veces a 60°C durante 30 minutos cada uno. Después del secado, se expone a la película. Para rigurosidades menores, la temperatura de hibridación se reduce a aproximadamente 12 °C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) del dúplex. Se sabe que la T_m es una función del contenido de G-C y la longitud de dúplex, así como la fuerza iónica de la solución.

"Hibridación" requiere que dos ácidos nucleicos contienen secuencias complementarias. No obstante, dependiendo de la rigurosidad de la hibridación se pueden producir apareamientos erróneos entre bases. Como se ha indicado anteriormente, la rigurosidad adecuada para hibridar ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y del grado de complementariedad. Dichas variables son bien conocidas en la técnica. Más específicamente, cuando mayor es el grado de similitud u homología entre dos secuencias de nucleótidos, mayor es el valor de la T_m para los híbridos de los ácidos nucleicos que tienen dichas secuencias. Para híbridos de una longitud mayor de 100 nucleótidos se han derivado ecuaciones para calcular la T_m (véase, Sambrook y col., *supra*). Para la hibridación con ácidos nucleicos más cortos, la posición de los apareamientos erróneos se convierte en más importante, y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (véase, Sambrook y col., *supra*).

Como se usa en el presente documento, un "fragmento o secuencia de ácido nucleico aislado" es un polímero de ARN o ADN que es monocatenario o bicatenario, que opcionalmente contiene bases nucleotídicas sintéticas, no naturales o alteradas. Un fragmento de ácido nucleico aislado en forma de un polímero de ADN puede estar compuesto por uno o más segmentos de ADNc, ADN genómico o ADN sintético. (Un "fragmento" de un polinucleótido específico hace referencia a una secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia contigua de aproximadamente al menos aproximadamente 6 nucleótidos, preferentemente al menos aproximadamente 8 nucleótidos, más preferentemente al menos aproximadamente 10 nucleótidos e incluso más preferentemente al menos aproximadamente 15 nucleótidos y, lo más preferible, al menos aproximadamente 25 nucleótidos idénticos o complementarios a una región de la secuencia nucleotídica especificada). Los nucleótidos (normalmente hallados en su forma de 5'-monofosfato) se prefieren por su designación con una sola letra del siguiente modo: "A" para adenilato o desoxiadenilato (para ARN o ADN, respectivamente), "C" para citidilato o desoxicitidilato, "G" para guanilato o desoxiguanilato, "U" para uridilato, "T" para desoxitimidilato, "R" for purinas (A o G), "Y" para pirimidinas (C o T), "K" para G o T, "H" para A o C o T, "I" para inosina y "N" para cualquier nucleótido.

Las expresiones "fragmento o subfragmento que es funcionalmente equivalente" y "fragmento o subfragmento funcionalmente equivalente" se usan de forma intercambiable en el presente documento. Estas expresiones hacen referencia a una porción o subsecuencia de un fragmento de ácido nucleico aislado en el que la capacidad para alterar la expresión génica o producir un determinado fenotipo se conserva si el fragmento o subfragmento codifica o no una enzima activa. Por ejemplo, e fragmento o subfragmento se pueden usar en el diseño de construcciones quiméricas para producir el fenotipo deseado en una planta transformada. Las construcciones quiméricas se pueden diseñar para usar en co-supresión o antisentido uniendo un fragmento de ácido nucleico o subfragmento del mismo, codifique o no una enzima activa, en la orientación adecuada respecto a una secuencia promotora de una planta.

Los términos “homología”, “homólogo”, “sustancialmente similar” y “correspondiente sustancialmente” se usan de forma intercambiable en el presente documento. Hacen referencia a fragmentos de ácido nucleico en los que los cambios de una o más bases de nucleótidos no afectan a la capacidad del fragmento de ácido nucleico a participar en expresión génica o producir un determinado fenotipo. Estos términos también hacen referencia a modificaciones de los fragmentos de ácido nucleico de la presente invención, tales como delección o inserción de uno o más nucleótidos que no alteran sustancialmente las propiedades funcionales del fragmento de ácido nucleico resultante respecto al fragmento inicial no modificado. Por tanto, se entiende que los expertos en la técnica apreciarán que la invención abarca más que las secuencias de ejemplo específicas.

“Gen” hace referencia a un fragmento de ácido nucleico que expresa una proteína específica, incluidas secuencias reguladoras precedentes (secuencias no codificantes en 5’) y posteriores (secuencias no codificantes en 3’) a la secuencia de codificación.

“Gen nativo” se refiere a un gen como se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. Por el contrario, “construcción quimérica” hace referencia a una combinación de fragmentos de ácido nucleico que normalmente no se encuentran juntos en la naturaleza. En consecuencia, una construcción quimérica puede comprender secuencias reguladoras y secuencias de codificación derivadas de diferentes fuentes o secuencias reguladoras y secuencias de codificación de la misma fuente, pero dispuestas de un modo distinto a como se encuentran normalmente en la naturaleza. (El término “aislado” significa que la secuencia se elimina de su ambiente natural).

Un gen “extraño” hace referencia a un gen que normalmente no se encuentra en el organismo huésped, pero que se introduce en el organismo huésped mediante transferencia génica. Los genes extraños pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo o construcciones quiméricas. Un “transgén” es un gen que se ha introducido en el genoma mediante un procedimiento de transformación.

“Secuencia de codificación” hace referencia a una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos específica. “Secuencias reguladoras” se refieren a secuencias nucleotídicas localizadas cadena arriba (secuencias no codificantes en 5’), dentro, o cadena abajo (secuencias no codificantes en 3’) de una secuencia de codificación y que influyen sobre la transcripción, el procesamiento o la estabilidad del ARN o la traducción de la secuencia de codificación asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir, entre otros, promotores, secuencias líder de la traducción, intrones y secuencias de reconocimiento de la poliadenilación.

“Promotor” o “secuencia génica reguladora” hace referencia a una secuencia de ADN capaz de controlar la expresión de una secuencia de codificación o ARN funcional. La secuencia consiste en elementos cadena arriba proximales y más distales, estos últimos elementos a menudo se denominan potenciadores. De acuerdo con esto, un “potenciador” es una secuencia de ADN que puede estimular la actividad de la secuencia génica del promotor o reguladora y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para potenciar el nivel de especificidad e tejido de un promotor. Las secuencias del promotor también se pueden localizar dentro de las porciones transcritas de los genes y/o cadena debajo de las secuencias transcritas. Los promotores pueden derivar en su totalidad de un gen nativo o estar compuestos por diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de ADN sintético. Los expertos en la técnica entienden que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos celulares, o en diferentes etapas de desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales o ambientales. Los promotores que hacen que un gen se exprese en la mayoría de los tipos de células huésped se denominan, en la mayoría de los casos, “promotores constitutivos”. Constantemente se están descubriendo nuevos promotores de varios tipos útiles en células vegetales; se pueden encontrar numerosos ejemplos en la recopilación de Okamura y Goldberg, *Biochemistry of Plants* 15:1 - 82 (1989). Además se reconoce que, ya que en la mayoría de los casos los límites exactos de las secuencias reguladoras no se han definido completamente, los fragmentos de ADN de alguna variación pueden tener una actividad promotora idéntica.

Un “intrón” es una secuencia intermedia en un gen que no codifica una porción de la secuencia proteica. Por tanto, dichas secuencias se transcriben en ARN pero después se escinden y no se traducen. El término también se usa para las secuencias de ARN escindidas. Un “exón” es una porción de la secuencia génica que se transcribe y se encuentra en el ARN mensajero maduro derivado del gen pero no necesariamente es una parte de la secuencia que codifica el producto génico final.

La “secuencia líder de traducción” hace referencia a una secuencia de ADN localizada entre la secuencia promotora de un gen y la secuencia de codificación. La secuencia líder de traducción está presente en el ARNm completamente procesado cadena arriba de la secuencia de iniciación de la traducción. La secuencia líder de traducción puede afectar al procesamiento del transcrito primario en ARNm, a la estabilidad del ARNm o a la eficiencia de la traducción. Se han descrito ejemplos de secuencias líder de traducción (Turner, R. and Foster, G. D. (1995) *Molecular Biotechnology* 3:225).

Las “secuencias no codificantes en 3’” hacen referencia a secuencias de ADN localizadas cadena abajo de una secuencia de codificación e incluyen secuencias de reconocimiento de poliadenilación y otras secuencias que

codifican señales reguladoras capaces de afectar al procesamiento del ARNm o a la expresión génica. La señal de poliadenilación normalmente se caracteriza porque afecta a la adición de tramos de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de ARNm. El uso de diferentes secuencias no codificantes en 3' lo ilustran Ingelbrecht et al., Plant Cell 1:671 - 680 (1989).

5 “Tránsito de ARN” hace referencia al producto resultante de la transcripción catalizada por la ARN polimerasa de una secuencia de ADN. Cuando el tránsito de ARN es una copia complementaria perfecta de la secuencia de ADN, se denomina tránsito primario o puede ser una secuencia de ARN derivada del procesamiento postranscripcional del tránsito primario y se denomina ARN maduro. “ARN mensajero (ARNm)” se refiere al ARN
10 que no tiene intrones y que se puede traducir en proteínas en la célula. “ADNc” hace referencia a un ADN que es complementario y se sintetiza a partir de un molde de ARNm usando la enzima transcriptasa inversa. El ADNc puede ser monocatenario o convertirse en bicatenario usando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I. ARN “sentido” hace referencia a un tránsito de ARN que incluye el ARNm y se puede traducir en proteínas dentro de una célula o *in vitro*. “ARN antisentido” se refiere a un tránsito de ARN que es complementario a todo o parte de un tránsito primario diana o ARNm y que bloquea la expresión de un gen diana (patente de EE.UU. N° 5.107.065). La complementariedad de un ARN antisentido puede ser cualquier parte del tránsito génico específico, es decir en la secuencia no codificante en 5', la secuencia no codificante en 3', intrones o la secuencia de codificación. “ARN funcional” se refiere a ARN antisentido, ARN de ribozima u otro ARN que puede no traducirse, aunque tiene un efecto sobre los procesos celulares. Los términos y expresiones “complementario” y “complementario inverso” se usan de
20 forma intercambiable en el presente documento con respecto a los tránsitos de ARNm y se pretende que definan el ARN antisentido del mensaje.

La expresión “ARN endógeno” hace referencia a cualquier ARN que está codificado por una secuencia de ácido nucleico presente en el genoma del huésped antes de la transformación con la construcción recombinante de la presente invención, sea de origen natural o no natural, es decir, introducido por medios recombinantes, mutagénesis etc.

La expresión “de origen no natural” significa artificial, no consistente con lo que normalmente se encuentra en la naturaleza.

30 La expresión “operablemente unido” se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un único fragmento de ácido nucleico de modo que la función de una está regulada por la otra. Por ejemplo, un promotor está operablemente unido a una secuencia de codificación cuando es capaz de regular la expresión de dicha secuencia de codificación (es decir, que la secuencia de codificación está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias de codificación pueden estar operablemente unidas a secuencias reguladoras en orientación sentido o antisentido. En otro ejemplo, las regiones de ARN complementarias de la invención pueden estar unidas operablemente, bien directa o indirectamente, en 5' del ARNm diana o en 3' del ARNm diana o dentro del ARNm diana, o una primera región complementaria está en 5' y su complementaria está en 3' del ARNm diana.

40 El término “expresión” tal como se usa en el presente documento, hace referencia a un producto final funcional. La expresión de un gen implica la transcripción del gen y la traducción del ARNm en una proteína precursora o madura. “Inhibición antisentido” hace referencia a la producción de tránsitos de ARN antisentido capaces de suprimir la expresión de la proteína diana. “Cosupresión” hace referencia a la producción de tránsitos de ARN sentido capaces de suprimir la expresión de genes endógenos o extraños idénticos o sustancialmente similares (patente de EE.UU. N° 5.231.020).

Una “proteína madura” hace referencia a un polipéptido procesado postraduccionalmente, es decir uno del que se ha eliminado cualquier pre o propéptido presente en el producto primario de la traducción. Proteína “precursora” hace referencia al producto primario de la traducción del ARNm, es decir cuando todavía hay pre y propéptidos. Los prepéptidos y los propéptidos pueden ser, entre otros, señales de localización intracelular.

55 “Transformación estable” se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico en un genoma de un organismo huésped, que tiene como resultado una herencia genéticamente estable. Por el contrario, “transformación transitoria” se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico en el núcleo u orgánulo que contiene ADN, de un organismo huésped, que tiene como resultado la expresión sin integración o herencia estable. Los organismos huésped que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se denominan organismos “transgénicos”. El término “transformación”, tal como se usa en el presente documento, hace referencia tanto a la transformación estable como a la transformación transitoria.

60 Las técnicas convencionales de ADN recombinante y de clonación molecular usadas en el presente documento son bien conocidas en la materia y se describen más completamente en Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989 (en lo sucesivo en el presente documento “Sambrook”).

65 El término “recombinante” hace referencia a una combinación artificial de dos segmentos de secuencia, por lo demás separados, por ejemplo mediante síntesis química o mediante la manipulación de segmentos aislados de

ácidos nucleicos mediante técnicas de ingeniería genética.

“PCR” o “Reacción en cadena de la polimerasa” es una técnica para la síntesis de grandes cantidades de segmentos de ADN específicos y consiste en una serie de ciclos repetidos (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT). Normalmente, el ADN bicatenario se desnaturaliza por calor, los dos cebadores complementarios a los extremos 3' del segmento diana se hibridan a temperatura baja y después se extienden a una temperatura intermedia. Un conjunto de estas tres etapas consecutivas se denomina ciclo.

La reacción en cadena de la polimerasa (“PCR”) es una potente técnica usada para amplificar ADN millones de veces mediante replicación repetida de un molde en un periodo de tiempo corto. (Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263 - 273 (1986); Erlich et al., solicitud de patente europea N° 50.424; solicitud de patente europea 84.796; solicitud de patente europea N° 258.017; solicitud de patente europea N° 237.362; Mullis, solicitud de patente europea N° 201.184; Mullis et al., patente de EE.UU. N° 4.683,202; Erlich, patente de EE.UU. N° 4.582,788; y Saiki et al., patente de EE.UU. N° 4.683,194). El proceso usa conjuntos de oligonucleótidos específicos sintetizados *in vitro* para cebar la síntesis de ADN. El diseño de los cebadores depende de las secuencias de ADN que se van a analizar. La técnica se lleva a cabo a través de muchos ciclos (normalmente 20-50) de fusión del molde a temperatura alta, o que permite a los cebadores hibridar con secuencias complementarias dentro del molde y después replicar el molde con la ADN polimerasa.

Los productos de las reacciones de PCR se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa seguido de tinción con bromuro de etidio y visualización con transiluminación UV. Como alternativa, se pueden añadir dNTP radioactivos a la PCR con el fin de incorporar marcadores en los productos. En este caso, los productos de la PCR se visualizan mediante exposición del gel a una película de rayos X. La ventaja añadida de radiomarcarse los productos de PCR es que los niveles de los productos de amplificación individuales se pueden cuantificar.

Las expresiones “construcción recombinante”, “construcción de la expresión” y “construcción de expresión recombinante” En el presente documento, los términos “de acción rápida” y “de acción veloz” se usan de forma intercambiable en el presente documento. Estos términos hacen referencia a una unidad funcional de material genético que se puede insertar en el genoma de una célula usando metodología estándar bien conocida por un experto en la técnica. Dicha construcción puede usarse sola o junto con un vector. Si se usa un vector, la elección del vector depende del método que se usará para transformar plantas huésped como es bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar un plásmido. El experto en la técnica conoce bien los elementos genéticos que deben estar presentes en el vector con el fin de transformar con éxito, seleccionar y propagar células huésped que comprenden cualquiera de los fragmentos de ácido nucleico aislados de la invención. El experto en la técnica también reconocerá que diferentes acontecimientos de transformación independientes tendrán como resultado diferentes niveles y patrones de expresión (Jones et al., (1985) EMBO J. 4:2411 - 2418; De Almeida et al., (1989) Mol. Gen. Genetics 218:78 - 86) y, por tanto, que se pueden someter a detección selectiva múltiples acontecimientos para obtener líneas que muestran el nivel y patrón de expresión deseados. Dicha detección selectiva se puede conseguir mediante análisis de tipo Southern de ADN, análisis de tipo Northern de la expresión de ARNm, análisis de tipo Western o análisis fenotípico.

Con un “anticuerpo monoclonal”, como se usa en el presente documento, se pretende hacer referencia a una de una preparación de moléculas de anticuerpo que contienen anticuerpos que comparten una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada común o la cadena ligera común, en contraste con un anticuerpo a partir de una preparación de anticuerpo “policlonal” que contiene una mezcla de diferentes anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales se pueden generar mediante varias tecnologías nuevas, como fagos, bacterias, levaduras o expresión ribosómica, así como procedimientos clásicos ilustrados por anticuerpos derivados de hibridoma (p. ej., un anticuerpo secretado por un hibridoma preparado mediante tecnología de hibridoma, tal como la metodología convencional de hibridomas de Kohler y Milstein ((1975) Nature 256:495 - 497). Por tanto, un anticuerpo agonista no derivado de hibridoma de la invención todavía se denomina anticuerpo monoclonal, aunque puede obtenerse mediante metodologías no clásicas.

Con un “anticuerpo aislado”, como se usa en el presente documento, se pretende hacer referencia a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (p. ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a un globulímero está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos a un globulímero). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un globulímero puede, por tanto, tener reactividad cruzada con otros antígenos. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o sustancias químicas.

La expresión “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “fragmento de anticuerpo”), como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad para unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Dichas realizaciones de anticuerpos también pueden tener formatos de bispecíficos, específicos dobles o multiespecíficos; específicamente se unen a dos o más antígenos diferentes. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab es un fragmento monovalente compuesto por los dominios

VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂ es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consta de los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consta de los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward y col., Nature 341 :544.546, que comprende de un dominio variable sencillo; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, están codificados por genes distintos, pueden unirse, usando procedimientos recombinantes, mediante un ligador sintético que permite que se formen en forma de una proteína de una cadena en la que las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird y col. (1988) Science 242:423 - 426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879 - 5883). Estos anticuerpos de cadena sencilla también se pretende que entren dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. También se abarcan otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena polipeptídica pero usando un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios de la misma cadena, forzando de este modo a que los dominios se apareen con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., y col., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444 - 6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121 - 1123). Dichas porciones de unión al anticuerpo se conocen en la técnica (Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pág. (ISBN 3 - 540 - 41354 - 5).

Todavía más, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo puede formar parte de una molécula de inmunoadhesión más grande formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos. Ejemplos de dichas moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región del núcleo con estreptavidina para formar una molécula de scFv tetramérica (Kipriyanov, S.M., y col., (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93 - 101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una cola de polihistidina en C-terminal para formar moléculas de scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S.M., y col., (1994) Mol. Immunol. 31:1047 - 1058). Las porciones de anticuerpos, tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, se pueden preparar a partir de anticuerpos enteros usando técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de los anticuerpos enteros. Además, los anticuerpos, porciones de anticuerpos y moléculas de inmunoadhesión se pueden obtener usando técnicas de ADN recombinante convencionales, como se ha descrito en el presente documento.

Con la expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, se pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos recombinantes combinatorios (Hoogenboom H.R., (1997) TIB Tech. 15:62 - 70; Azzazy H., and Highsmith W.E., (2002) Clin. Biochem. 35:425 - 445; Gavilondo J.V., and Larrick J.W. (2002) BioTechniques 29:128 - 145; Hoogenboom H., y Chames P. (2000) Immunology Today 21:371 - 378), antibodies isolated from an animal (e.g., a mouse) that is transgenic for human immunoglobulin genes (véase, por ejemplo, Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287 - 6295; Kellermann S-A., and Green L.L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593 - 597; Little M. et al (2000) Immunology Today 21:364 - 370) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana en otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivados de las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. No obstante, en ciertas realizaciones, dichos anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o cuando se usa un animal transgénico de las secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan y están relacionadas con las secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la líneas germinales de anticuerpos humanos *in vivo*. (Véase también Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publicación Nº 91 - 3242, 1991). No obstante, los anticuerpos humanos de la presente invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o especificad e sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). (Véase también Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990).

La expresión "anticuerpo quimérico" hace referencia a anticuerpos que comprenden secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de una especie y secuencias de las regiones constantes de otras especies, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de las cadenas pesada y ligera murinas unidas a las regiones constantes humanas.

La expresión "anticuerpo injertado en CDR" hace referencia a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera de una especie pero en las que las secuencias de una o más de las regiones de CDR de V_H y/o V_L están sustituidas con las secuencias de CDR de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de las cadenas pesada y ligera murinas en las que una o más de las CDR murinas (p. ej., CDR3) se han sustituido con secuencias de CDR humanas.

Los anticuerpos humanos recombinantes de la presente invención tienen regiones variables y también pueden incluir regiones constantes, derivadas de las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. (Véase Kabat y col., (1991) *ant.*). No obstante, en ciertas realizaciones, dichos anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o cuando se usa un animal transgénico de las secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan y están relacionadas con las secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la líneas germinales de anticuerpos humanos *in vivo*. No obstante, en ciertas realizaciones, dichos anticuerpos recombinantes son el resultado de mutagénesis selectiva o de retromutación o de ambos.

El término "retromutación" hace referencia a un proceso por el cual algunos o todos los aminoácidos mutados somáticamente de un anticuerpo humano están sustituidos con los correspondientes residuos de la línea germinal de una secuencia de anticuerpo de la línea germinal homóloga. Las secuencias de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo humano de la invención están alineadas por separado con las secuencias de la línea germinal en la base de datos VBASE para identificar las secuencias con la mayor homología. VBASE es un directorio exhaustivo de todas las secuencias de la región variable de la línea germinal humana recopiladas de secuencias publicadas, incluyendo las emisiones actuales de las bibliotecas de datos GenBank y EMBL. La base de datos se ha desarrollado en el MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, UK) como depositario de los genes de anticuerpos humanos secuenciados (sitio web: <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase-intro.php?menu=901>). Las diferencias en el anticuerpo humano de la invención se devuelven a la secuencia de la línea germinal mutando posiciones de nucleótidos definidas que codifican dichos aminoácidos diferentes. El papel de cada aminoácido identificado de este modo como candidato para la retromutación deberá investigarse para determinar la existencia de un papel directo o indirecto en la unión a antígeno y cualquier aminoácido que después de la mutación se ha hallado que afecta a alguna característica deseable del anticuerpo humano no debería incluirse en el anticuerpo humano final. Para minimizar el número de aminoácidos sujetos a retromutación, las posiciones de aminoácidos que se han hallado que son diferentes de la secuencia de la línea germinal más cercana pero idénticas al correspondiente aminoácido en una segunda secuencia de la línea germinal puede permanecer, siempre que la segunda secuencia de la línea germinal sea idéntica y colineal a la secuencia del anticuerpo humano de la invención para al menos 10, preferente 12, aminoácidos en ambos lados del aminoácido en cuestión. La retromutación se puede producir en cualquier estado de optimización de los anticuerpos.

Una "proteína de unión marcada" es una proteína en la que un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención deriva o está unido a otra molécula funcional (p. ej., otro péptido o proteína). Por ejemplo, una proteína de unión marcada de la invención se puede derivar mediante unión funcional de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares distintas, tal como otro anticuerpo (p. ej., un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente de detección, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o péptido que puede mediar en la asociación del anticuerpo o porción de anticuerpo con otra molécula (tal como una región central de estreptavidina o una cola de polihistidina).

Para los fines de la presente invención, una "proteína de unión glicosilada" comprende una proteína en la que el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo comprende uno o más residuos de hidratos de carbono. La producción de proteína naciente *in vivo* puede sufrir procesamiento adicional, conocido como modificación postraduccional. En particular se pueden añadir enzimáticamente residuos de azúcar (glicosilo), un proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes portadoras de cadenas laterales de oligosacáridos unidas covalentemente se conocen como proteínas glicosiladas o glicoproteínas. Los anticuerpos son glicoproteínas con uno o más residuos de hidratos de carbono en el dominio Fc, así como el dominio variable. Los residuos de hidratos de carbono en el dominio Fc tienen un efecto importante sobre la función efectora del dominio Fc, con un mínimo efecto sobre la unión al antígeno o la semivida del anticuerpo (R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005), pág. 11 - 16). En contraste con ello, la glicosilación del dominio variable puede tener un efecto sobre la actividad de unión a antígeno del anticuerpo. La glicosilación en el dominio variable puede tener un efecto negativo sobre la afinidad de unión al antígeno, probablemente debido a la hidrancia estérica (Co, M.S., et al., *Mol. Immunol.* (1993) 30:1361-1367), o tiene como resultado un incremento de la afinidad por el antígeno (Wallick, S.C., et al., *Exp. Med.* (1988) 168:1099 - 1109; Wright, A., et al., *EMBO J.* (1991) 10:2717 2723). Además, se pueden fabricar mutantes del sitio glicosilación en los que se ha mutado el sitio de glicosilación unido a O o unido a N de la proteína de unión. Un experto en la técnica puede generar dichos mutantes usando tecnologías convencionales bien conocidas. También se contemplan los mutantes en el sitio de glicosilación que retienen la actividad biológica pero que tienen una actividad de unión aumentada o disminuida.

Además, la glicosilación del anticuerpo o porción de unión a antígeno de la invención se puede modificar. Por ejemplo, se puede realizar un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar para, por ejemplo, incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dichas modificaciones en el hidrato de carbono se pueden conseguir mediante, por ejemplo, alteración de uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden efectuar una o más sustituciones de aminoácidos que tengan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación en la región variable para eliminar de este modo la glicosilación en dicho sitio. Dicha glicosilación puede incrementar la afinidad del anticuerpo

por el antígeno. Dicho enfoque se describe con mayor detalle en la publicación de la solicitud internacional N° WO 03/016466A2y las patentes de EE.UU. N° 5.714.350 y 6.350.861.

5 Adicionalmente o como alternativa, se puede fabricar un anticuerpo modificado que tiene un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades mejores de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tiene mayores estructuras de GlcNac de bisección. Se ha demostrado que dichos patrones de glicosilación alterada incrementan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Dichas modificaciones en el hidrato de carbono se pueden conseguir mediante, por ejemplo, expresión del anticuerpo en una célula huésped con una maquinaria de glicosilación alterada. Las células con una maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la
10 técnica y se pueden usar como células huésped en las que expresar anticuerpos recombinantes de la presente invención para producir, de este modo, un anticuerpo con glicosilación alterada. (Véase, por ejemplo, Shields, R.L. y col., (2002) J. Biol. Chem. 277:26733 - 26740; Umana y col., (1999) Nat. Biotech. 17:176 - 1, así como la patente europea N° EP 1.176.195; la publicación de solicitud internacional número WO 03/035835 y WO 99/5434280.)

15 La glicosilación de proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como la célula huésped en la que se expresa la proteína. Diferentes organismos pueden producir diferentes enzimas de glicosilación (p. ej., glicosiltransferasas y glicosidasas) y tener diferentes sustratos (azúcares de nucleótidos) disponibles. Debido a estos factores, el patrón de glicosilación de proteínas y la composición de los residuos de glicosilo pueden diferir en función del sistema del huésped en el que se expresa la proteína concreta. Los residuos
20 de glicosilo útiles en la invención pueden incluir, entre otros, glucosa, galactosa, manosa, mucosa, n-acetilglucosamina y ácido siálico. Preferentemente, la proteína de unión glicosilada comprende residuos de glicosilo de modo que el patrón de glicosilación es humano.

Los expertos en la técnica saben que una glicosilación proteica diferente puede tener como resultado características de proteína diferentes. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida en un huésped microorganismo, tal como levaduras, y glicosilada usando la vía endógena de levaduras se puede reducir en comparación con la de la misma proteína expresada en una célula de mamífero, tal como una línea celular CHO. Dichas glicoproteínas también pueden ser inmunogénicas en seres humanos y mostrar una semivida reducida *in vivo* tras la administración. Receptores específicos en seres humanos y otros animales pueden reconocer residuos
30 glicosilo específicos y estimular el rápido aclaramiento de la proteína de la circulación sanguínea. Otros efectos adversos pueden incluir cambios en el plegamiento, solubilidad, susceptibilidad de la proteína a las proteasas, tráfico, transporte, compartimentalización, secreción, reconocimiento por otras proteínas o factores, antigenicidad o alergenicidad. De acuerdo con esto, el encargado de ponerla en práctica puede preferir una proteína terapéutica con una composición y patrón de glicosilación específicos, por ejemplo una composición y patrón de glicosilación idénticos, o al menos similares, a los producidos en células humanas o en las células específicas de la especie del animal sujeto objetivo.

La expresión de proteínas glicosiladas diferente de la de una célula huésped se puede conseguir modificando genéticamente la célula huésped para expresar encimas de glicosilación heterólogas. Usando técnicas conocidas en la técnica, un encargado de ponerlas en práctica puede generar anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos que exhiben glicosilación de proteínas humanas. Por ejemplo, las cepas de levaduras se han modificado genéticamente para expresar encimas de glicosilación de origen no natural de modo que las proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en estas cepas de levadura exhiben una glicosilación de proteínas idéntica a la de las células de animales, especialmente células humanas (publicación de la solicitud de patente de EE.UU. N°
40 20040018590 y 20020137134 y la publicación de solicitud internacional WO 05/100584 A2).

Además, el experto en la técnica apreciará que una proteína de interés se puede expresar usando una biblioteca de células huésped modificada genéticamente para expresar varias enzimas de glicosilación, de modo que las células huésped miembros de la biblioteca producen la proteína de interés con patrones de glicosilación variables. Un encargado de la puesta en práctica puede seleccionar y aislar la proteína de interés con nuevos patrones de glicosilación concretos. Preferentemente, la proteína que tiene un nuevo patrón de glicosilación particularmente seleccionado exhibe propiedades biológicas mejoradas o alteradas.

La invención también proporciona un procedimiento para fabricar los anticuerpos monoclonales de la invención a partir de animales no humanos, no ratones mediante la inmunización de animales transgénicos no humanos que comprenden loci de inmunoglobulina humana. Se pueden producir estos animales usando procedimientos conocidos en la técnica. En una forma de realización preferida, los animales no humanos pueden ser ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado vacuno o caballos. Se pueden preparar hibridomas inmortalizados productores de anticuerpos a partir del animal inmunizado. Tras la inmunización, se sacrifica al animal y las células B esplénicas se condensan con células de mieloma inmortalizadas como se conoce bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *ant.*
60 En una forma de realización preferida, las células de mieloma no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea de células no secretoras). Tras la fusión y selección de anticuerpos, los hibridomas se someten a detección selectiva usando un antígeno (por ejemplo, un globulímero) o una porción del mismo o una célula que expresa un antígeno de interés. En una forma de realización preferida, la detección selectiva inicial se realiza usando un inmunoensayo unido a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA), preferentemente un ELISA. Un ejemplo de detección selectiva con ELISA se proporciona en la publicación de solicitud internacional N° WO 00/37504.
65

- Los hibridomas productores de anticuerpos clonados y seleccionados después según características deseables, incluido el crecimiento sólido del hibridoma, producción elevada de anticuerpos y características deseables de anticuerpos, como se trata con más detalle más adelante. Los hibridomas se pueden cultivar y expandir *in vivo* en animales singéneos, en animales que carecen de un sistema inmunitario, por ejemplo ratones desnudos, o en cultivo celular *in vitro*. Procedimientos de selección, clonación y expansión de hibridomas son bien conocidos por los expertos en la técnica. Preferentemente, el animal inmunizado es un animal no humano que expresa genes de inmunoglobulina humana y las células B esplénicas se condensan con un mieloma derivado de la misma especie que el animal no humano.
- En un aspecto, la invención proporciona hibridomas que producen anticuerpos monoclonales para uso en el tratamiento, diagnóstico y prevención de la enfermedad de Alzheimer. En una forma de realización preferida, los hibridomas son hibridomas de ratón. En otra forma de realización preferida, los hibridomas se producen en una especie no humana no ratón, tal como ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado vacuno o caballos. En otra forma de realización, los hibridomas son hibridomas humanos, en los que un mieloma humano no secretor se condensa con una célula humana que expresa un anticuerpo contra un glóbulo.
- Se pueden generar anticuerpos recombinantes a partir de linfocitos aislados únicos usando un procedimiento al que en la técnica se hace referencia como procedimiento de anticuerpos de linfocitos seleccionados (SLAM), como se describe en la patente de EE.UU. N° 5.627.052, la publicación de solicitud internacional N° WO 92/02551 y Babcock, J.S. y col., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843 - 7848. En este procedimiento se someten a detección selectiva los anticuerpos secretores de células únicas de interés (p. ej., linfocitos derivados del animal inmunizado) usando un ensayo de placas hemolíticas específicas de antígeno, donde el antígeno (p. ej., glóbulo) o un fragmento del mismo, está acoplado a glóbulos rojos de carnero usando un ligador, tal como biotina, y se usan para identificar células únicas que secretan anticuerpos con especificidad por el antígeno. Tras la identificación de células secretoras de anticuerpos de interés, los ADNc de la región variable de las cadenas pesada y ligera se rescatan de las células mediante PCR-transcriptasa inversa y estas regiones variables se pueden expresar después en el contexto de las regiones constantes de inmunoglobulina adecuadas (p. ej., regiones constantes humanas) en células de mamífero, tales como células COS o CHO. Las células huésped transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas, derivadas de linfocitos seleccionados *in vivo* pueden sufrir después análisis y selección adicionales *in vitro*, por ejemplo mediante PANNING de las células transfectadas para aislar células que expresan anticuerpos frente a IL-18. Las secuencias de inmunoglobulina amplificadas se pueden manipular después *in vitro*, tal como mediante procedimientos de maduración por afinidad *in vitro*, como los descritos en la publicación de solicitud internacional N° WO 97/29131 y la publicación de solicitud internacional N° WO 00/56772.
- La expresión "anticuerpo humanizado" hace referencia a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera de una especie no humana (p. ej., un ratón) pero en la que al menos una porción de la secuencia de VH y/o VL se ha alterado para que sea más "de tipo humano", es decir más similar a las secuencias variables de la línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo injertado con CDR en el que las secuencias de CDR humanas se introducen en secuencias de VH y VL no humanas para sustituir las correspondientes secuencias de CDR no humanas. En particular, la expresión "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo o una variante, derivado, análogo o fragmento del mismo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de interés y que comprende una región marco (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región determinante de la complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente" en el contexto de una CDR hace referencia a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 80%, preferentemente al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 98%, al menos un 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una CDR de anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos o al menos uno, y normalmente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas las regiones de estructura son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Preferentemente, un anticuerpo humanizado puede también comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana. En algunas formas de realización, un anticuerpo humanizado contiene tanto la cadena ligera como, al menos, el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4, de la cadena pesada. En algunas formas de realización, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena ligera humanizada. En otras formas de realización, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena pesada humanizada. En formas de realización específicas, un anticuerpo humanizado solo contiene un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o una cadena pesada humanizada.
- El anticuerpo humanizado se puede seleccionar de cualquier tipo de inmunoglobulinas, incluidas IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y de cualquier isotipo, incluidos, sin limitaciones, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo y dominios constantes concretos se pueden seleccionar para optimizar las funciones efectoras deseadas usando técnicas bien conocidas en la materia.
- Las regiones de estructura y CDR de un anticuerpo humanizado no tienen que corresponder exactamente con las secuencias parentales, por ejemplo, la CDR del anticuerpo donante o la estructura consenso pueden estar

mutageneizadas mediante sustitución, inserción o delección de al menos un residuo de aminoácido, de modo que la CDR o el residuo de estructura en el punto no corresponde ni con el anticuerpo donante ni con la estructura consenso. Por tanto, en una forma de realización preferida, dichas mutaciones no serán extensas. Normalmente, al menos el 80%, preferentemente al menos el 85%, más preferentemente al menos el 90% y, lo más preferentemente, al menos el 95% de los residuos de anticuerpos humanizados corresponderá a los de las secuencias FR y CDR parentales. Como se usa en el presente documento, la expresión "estructura consenso" se refiere a la región de estructura en la secuencia de inmunoglobulina consenso. Además, como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia de inmunoglobulina consenso" hace referencia a la secuencia formada por los aminoácidos (o nucleótidos) más frecuentes en una familia de secuencias de inmunoglobulina (véase, por ejemplo, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1987). En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que está con mayor frecuencia en dicha posición en la familia. Si hay dos aminoácidos igualmente frecuentes, cada uno se puede incluir en la secuencia consenso.

El término "actividad" incluye actividades tales como especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno.

El término "epítipo" incluye cualquier polipéptido determinante capaz de unirse de forma específica a una inmunoglobulina o receptor de células T. En ciertas realizaciones, los determinantes epitópicos incluyen grupos de superficie químicamente de moléculas, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo, orosulfonilo y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales, así como características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que está unido a un anticuerpo. En ciertas realizaciones, se dice que un anticuerpo está unido específicamente a un antígeno cuando reconoce preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

La expresión "resonancia de plasmón superficial", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de las interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz biosensora, usando, por ejemplo, el sistema BIAcore system (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N.J.). Para descripciones adicionales, véase Jönsson, U., y col. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19 - 26; Jönsson, U., y col., (1991) Biotechniques 11:620 - 627; Johnsson, B., y col., (1995) J. Mol. Recognit. 8:125 - 131; y Johnsson, B., y col., (1991) Anal. Biochem. 198:268 - 277.

Con el término " K_{on} ", como se usa en el presente documento, se pretende hacer referencia a la constante "on rate" de asociación de un anticuerpo al antígeno para formar el complejo anticuerpo/antígeno como se conoce en la técnica.

Con el término " K_{off} ", como se usa en el presente documento, se pretende hacer referencia a la constante "off rate" de disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno como se conoce en la técnica.

Con el término " K_d ", como se usa en el presente documento, se pretende hacer referencia a la "constante de disociación" de una interacción anticuerpo-antígeno concreta como se conoce en la técnica.

La expresión "proteína de unión marcada", como se usa en el presente documento, hace referencia a una proteína con un marcador incorporado que proporciona la identificación de la proteína de unión. Preferentemente, la marca es un marcador detectable, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la fijación a un polipéptido de restos de biotínilo que se puede detectar mediante avidina marcada (p. ej., estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que se puede detectar mediante procedimientos ópticos o colorimétricos). Ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, entre otros, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (p. ej., ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho o ^{153}Sm); marcadores fluorescentes (p. ej., FITC, rodamina, fósforos lantánidos), marcadores enzimáticos (p. ej., peroxidasa de rábano, luciferasa o fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, marcadores de hapteno tales como grupos de biotínilo y epítipos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (p. ej., pares de secuencias en cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, marcadores de epítipos); y agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio.

La expresión "conjugado de anticuerpo" hace referencia a una proteína de unión, tal como un anticuerpo, químicamente unida a un segundo resto químico, tal como un agente terapéutico o citotóxico. En la presente memoria descriptiva, el término "agente" se usa para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto hecho de materiales biológicos. Preferentemente, los agentes terapéuticos y citotóxicos incluyen, entre otros, la toxina pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, timidina cinasa, endonucleasa, ARNasa y puromicina, así como análogos y homólogos de estos agentes.

Los términos “cristal” y “cristalizado”, como se usa en el presente documento, hacen referencia a un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que existe en forma de un cristal. Los cristales son una forma del estado sólido de la materia.

5 El término “inmunizar” se refiere en el presente documento al proceso de presentar un antígeno a un repertorio inmune ya sea que el repertorio existe en un organismo natural no alterado genéticamente o un organismo transgénico modificado para mostrar un repertorio inmune humano artificial. De un modo similar, una “preparación inmunogénica” es una formulación de antígeno que contiene adyuvantes u otros aditivos que potenciarían la inmunogenicidad del antígeno. Un ejemplo de esto sería la coinyección de una forma purificada del receptor de GLP-
10 1 con adyuvante completo de Freund en un ratón. “Hiperinmunización”, como se define en el presente documento, es el acto de varias presentaciones en serie de un antígeno en una preparación inmunogénica a un animal huésped con la intención de desarrollar una respuesta inmunitaria fuerte.

15 Un modo de medir la cinética de la unión de un anticuerpo es mediante resonancia en plasmón superficial. La expresión “resonancia en plasmón superficial”, como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de las interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz biosensora, usando, por ejemplo, el sistema Biacore (Biacore International, Upsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para descripciones adicionales, véase Jönsson y col., (1993) *Annales de Biologie Clinique* (Paris) 51:19 - 26; Jönsson y col., (1991) *Biotechniques* 11:620 - 627; Johnson y col., (1995) *Journal of Molecular Recognition* 8:125 - 131; y Johnson y col., (1991) *Analytical Biochemistry* 198:268 - 277.

25 Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. Vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades minoritarias de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida de almacenamiento o la eficacia del anticuerpo o porción del mismo.
30

35 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una “cantidad terapéuticamente eficaz” o una “cantidad profilácticamente eficaz” de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención. Una “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o porción de anticuerpo puede determinarla un experto en la técnica y puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una con la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o porción de anticuerpo se superan por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Normalmente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes, o en una etapa prematura de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.
45

50 Los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención se pueden incorporar en una composición farmacéutica adecuada para, por ejemplo, administración parenteral. Preferentemente, el anticuerpo o porciones de anticuerpo se prepararán como una solución inyectable que contiene 0,1 - 250 mg/ml de anticuerpo. La solución inyectable se puede componer de una forma de dosificación líquida o liofilizada en un vial de pedernal o ámbar, ampolla o jeringa precargada. El tampón puede ser L-histidina (1 - 50 mM), ópticamente 5 - 10 mM, a pH 5,0 a 7,0 (ópticamente a pH 6,0). Otros tampones adecuados incluyen, entre otros, succinato sódico, citrato sódico, fosfato sódico o fosfato potásico. Se puede usar cloruro sódico para modificar la toxicidad de la solución a una concentración de 0 - 300 mM (ópticamente 150 mM para una forma de dosificación líquida). Se pueden incluir crioprotectores para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 0 - 10% de sacarosa (ópticamente 0,5 - 1,0 %). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Se pueden incluir agentes espesantes para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 1 - 10% de manitol (ópticamente 2 - 4 %). Se pueden usar estabilizantes en formas de dosificación tanto líquidas como liofilizadas, principalmente L-metionina 1 - 50 mM (ópticamente 5 - 10 mM). Otros agentes espesantes adecuados incluyen glicina, arginina y se pueden incluir como 0 - 0,05 % de polisorbato 80 (ópticamente 0,005 - 0,01 %). Tensioactivos adicionales incluyen, entre otros, polisorbato 20 y tensioactivos BRIJ.
60

65 Las composiciones de la presente invención pueden estar en diversas formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (p. ej., soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración y la aplicación terapéutica previstos. Las composiciones típicas preferidas están en forma de soluciones inyectables o infundibles, tales como composiciones similares a las usadas para inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos. El modo de administración preferido es

parenteral (p. ej., vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). En una forma de realización preferida, el anticuerpo se administra mediante infusión o inyección intravenosa. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea.

5 Normalmente, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular en forma de una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para la elevada concentración del fármaco. Se pueden preparar soluciones inyectables estériles mediante la incorporación del compuesto activo (p. ej., un anticuerpo o porción de anticuerpo) en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en lo que antecede, según se requiera, seguido por esterilización filtrada. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados en lo que antecede. En el caso de polvos estériles liofilizados para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son secado al vacío y secado por pulverización, que da un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución del mismo previamente filtrada para esterilizar. La fluidez adecuada de una solución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede efectuar incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo sales de monoestearato y gelatina.

20 Los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la presente invención se pueden administrar mediante varios procedimientos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la vía/modo de administración preferida es inyección subcutánea, inyección intravenosa o infusión. Como apreciará el experto en la técnica, la vía y/o modo de administración variará en función de los resultados deseados. En ciertas formas de realización, el compuesto activo se puede preparar con un transportador que proteja al compuesto frente a una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluidos implantes, parches transdérmicos y sistemas de liberación microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos procedimientos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o son generalmente conocidos para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

35 En ciertas formas de realización, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención se puede administrar por vía oral, por ejemplo con un diluyente inerte o un transportador comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes si se desea) puede también incluirse en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimirse en comprimidos o incorporarse directamente en la dieta del sujeto. Para el fin de la administración terapéutica oral, los compuestos pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un compuesto de la invención mediante una vía distinta a la administración parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto, o coadministrar el compuesto, con un material para prevenir su inactivación.

45 En las composiciones también pueden incorporarse compuestos activos suplementarios. En ciertas formas de realización, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención se formula junto con y/o coadministra con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para tratar la enfermedad de Alzheimer o enfermedades o afecciones relacionadas. Por ejemplo, uno de los anticuerpos de la invención sujeto o porción de anticuerpo del mismo se puede formular conjuntamente y/o coadministrar con uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otras dianas.

50 En ciertas formas de realización, un anticuerpo monoclonal de la invención sujeto o fragmento del mismo puede estar unido a un vehículo de extensión de la semivida conocido en la técnica. Dichos vehículos incluyen, entre otros, el dominio Fc, polietilenglicol y dextrano. Dichos vehículos se describen en, por ejemplo, en la solicitud de EE.UU. N° de serie 09/428.082 y solicitud de PCT publicada N° WO 99/25044.

55 Además de los procedimientos tratados anteriormente, los encargados de la puesta en práctica están familiarizados con los materiales de recurso estándar que describen afecciones específicas y procedimientos para la construcción, manipulación y aislamiento de macromoléculas (p. ej., moléculas de ADN, plásmidos etc.), generación de organismos recombinantes y la detección selectiva y aislamiento de clones (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1989); Maliga y col., Methods in Plant Molecular Biology, Cold Spring Harbor Press (1995); Birren y col., Genome Analysis: Detecting Genes, 1, Cold Spring Harbor, New York (1998); Birren y col., Genome Analysis: Analyzing DNA, 2, Cold Spring Harbor, New York (1998); Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual, eds. Clark, Springer, New York (1997)).

Usos del anticuerpo monoclonal

65 Los anticuerpos monoclonales de la presente invención (p. ej., 8F5 y 8CF) tienen muchas utilidades interesantes. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden usar en la prevención, tratamiento y diagnóstico de la

enfermedad de Alzheimer como se ha descrito con anterioridad. Además, los anticuerpos se pueden usar en el desarrollo de anti-anticuerpos. Además, el hibridoma productor del respectivo anticuerpo permite la producción constante de una fuente continua de anticuerpos monoclonales idénticos (es decir, reactivos), de modo que se garantiza la identidad entre anticuerpos en varios experimentos así como usos terapéuticos.

5 Asimismo, los procedimientos de la presente invención permiten preparar cantidades adecuadas del material de partida para uso en la preparación de materiales adicionales que, a su vez, se pueden usar en la producción de anticuerpos monoclonales (u otros anticuerpos) para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos también se pueden usar para inmunización pasiva con el fin de prevenir la enfermedad de Alzheimer u otras afecciones neurológicas relacionadas caracterizadas por los mismos síntomas que la enfermedad de Alzheimer, tal como deterioro cognitivo.

15 En una forma de realización diagnóstica de la presente invención, un anticuerpo de la presente invención (p. ej., 8F5), o una porción del mismo, está revestido sobre una fase sólida (o está presente en una fase líquida). La muestra de ensayo o biológica (p. ej., sangre entera, líquido cefalorraquídeo, suero etc.) se pone en contacto con la fase sólida. Si hay presente antígeno (p. ej., globulímero) en la muestra, dichos antígenos se unen a los anticuerpos sobre la fase sólida y después se detectan mediante un procedimiento directo o indirecto. El procedimiento directo comprende simplemente detectar la presencia del propio complejo y, por tanto, la presencia de los antígenos. En el procedimiento indirecto se añade un conjugado al antígeno unido. El conjugado comprende un segundo anticuerpo que se une al antígeno unido, fijado a un compuesto o marcador generador de señal. Si el segundo anticuerpo se une al antígeno unido, el compuesto generador de señal genera una señal mensurable. Después, dicha señal indica la presencia del antígeno en la muestra de ensayo.

25 Ejemplos de fases sólidas usadas en inmunoensayos diagnósticos son materiales porosos y no porosos, partículas de látex, partículas magnéticas, micropartículas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.705.330), esferas, membranas, pocillos de microtitulación y tubos de plástico. La elección del material de fase sólida y el procedimiento de marcaje del antígeno o anticuerpo presente en el conjugado, si se desea, se determinan en base a las características de rendimiento del formato de ensayo deseado.

30 Como se ha indicado anteriormente, el conjugado (o reactivo indicador) comprenderá un anticuerpo (o quizá anti-anticuerpo, dependiendo del ensayo) fijado al compuesto generador de señal o marcador. Este compuesto generador de señal o "marcador" se puede detectar o puede hacerse reaccionar con uno o más compuestos adicionales para generar un producto detectable. Ejemplos de compuestos generadores de señal incluyen cromógenos, radioisótopos (p. ej., ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^3H , ^{35}S y ^{14}C), compuestos quimioluminiscentes (p. ej., acridinio), partículas (visibles o fluorescentes), ácidos nucleicos, agentes de formación de complejos o catalizadores, tales como enzimas (p. ej., fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, peroxidasa de rábano, beta-galactosidasa y ribonucleasa). En el caso del uso de enzimas (p. ej., fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano), además de un sustrato cromo, fluoro o lumogénico tiene como resultado la generación de una señal detectable. También son útiles otros sistemas de detección tales como fluorescencia resuelta por tiempo, fluorescencia de reflejo interno, amplificación (p. ej., reacción en cadena de la polimerasa) y espectroscopia de Raman.

45 Ejemplos de fluidos biológicos que se pueden analizar mediante los inmunoensayos anteriores incluyen plasma, sangre entera, sangre entera seca, suero, líquido cefalorraquídeo o extractos acuosos u organoacuosos de tejidos y células.

50 La presente invención también abarca un procedimiento de detección de la presencia de anticuerpos en una muestra de ensayo. Este procedimiento comprende las etapas de: (a) poner en contacto la muestra de ensayo de la que se sospecha que contiene anticuerpos con un anti-anticuerpo específico de los anticuerpos en la muestra del paciente con un tiempo y condiciones suficientes para permitir la formación de complejos de anti-anticuerpo/anticuerpo, donde el anti-anticuerpo es un anticuerpo de la presente invención que se une a un anticuerpo en la muestra del paciente; (b) añadir un conjugado a los complejos de anti-anticuerpo/anticuerpo resultantes, comprendiendo el conjugado un antígeno (que se une al anti-anticuerpo) fijado a un compuesto generador de señal capaz de detectar una señal detectable; y (d) detectar la presencia de los anticuerpos que pueden estar presentes en la muestra de ensayo detectando la señal generada por el compuesto generador de señal. Se puede usar un control o calibrador que comprende anticuerpo frente al anti-anticuerpo.

60 La presente invención también incluye una vacuna que comprende uno o más de los anticuerpos descritos en el presente documento o una porción del mismo y un adyuvante farmacéuticamente aceptable (p. ej., adyuvante de Freund o solución salina tamponada con fosfato).

65 También se incluyen kits dentro del ámbito de la presente invención. Más específicamente, la presente invención incluye kits para determinar la presencia de antígenos (p. ej., globulímeros) en un paciente que se sospecha que tiene enfermedad de Alzheimer u otra afección caracterizada por deterioro cognitivo. En concreto, un kit para determinar la presencia de antígenos en una muestra de ensayo comprende a) un anticuerpo como se define en el presente documento o porción de mismo; y b) un conjugado que comprende un segundo anticuerpo (que tiene especificidad por el antígeno) unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable. El kit

también puede contener un control o calibrador que comprende un reactivo que se une al antígeno, así como una hoja de instrucciones que detallan cómo se debe usar el kit y los componentes del kit.

5 La presente invención también incluye un kit para detectar anticuerpos en una muestra de ensayo. El kit puede comprender a) un anti-anticuerpo específico (por ejemplo, uno de la invención sujeto) para el anticuerpo de interés y b) un antígeno o porción del mismo como se ha definido anteriormente. También se puede incluir un control o calibrador que comprende un reactivo que se une al antígeno. Más específicamente, el kit puede comprender a) un anti-anticuerpo (tal como el de la presente invención) específico del anticuerpo y b) un conjugado que comprende un antígeno (p. ej., globulímero) unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable. De nuevo, el kit también puede comprender un control o calibrador que comprende un reactivo que se une al antígeno y también puede comprender una hoja de instrucciones o ficha técnica en la que se describen cómo se debe usar el kit y los componentes del kit.

15 El kit puede también comprender un contenedor tal como vial, frascos o tiras, donde cada contenedor tiene una fase sólida prefijada y los otros contenedores contienen los respectivos conjugados. Estos kits pueden contener también viales o contenedores de otros reactivos necesarios para realizar el ensayo, tales como reactivos de lavado, procesamiento e indicadores.

20 También cabe destacar que la invención sujeto no solo incluye los anticuerpos de longitud completa descritos anteriormente sino también porciones o fragmentos de los mismos, por ejemplo la porción Fab de los mismos. Adicionalmente, la invención sujeto abarca cualquier anticuerpo que tiene las mismas propiedades de los presentes anticuerpos en términos de, por ejemplo, especificidad de unión, estructura etc.

25 Información de los depósitos: El hibridoma (ML5 - 8F5,1F2,2A2) que produce el anticuerpo monoclonal 8F5 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 el 1 de diciembre de 2005 de conformidad con los términos del Tratado de Budapest y se le asignó el N° ATCC PTA-7238.

30 El hibridoma (ML5 - 8C5,2C1,8E6,2D5) que produce el anticuerpo monoclonal 8C5 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 el 28 de febrero de 2006 de conformidad con los términos del Tratado de Budapest y se le asignó el N° ATCC PTA-7407.

La presente invención se puede ilustrar mediante el uso de los siguientes ejemplos no limitantes, usándose el anticuerpo monoclonal 8C5 como anticuerpo de referencia.

35 EJEMPLO I (A)

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES 8F5 Y 8C5

40 Ratones Balb/c fueron inmunizados sub-c con 50 microgramos del globulímero A-beta (1 - 42) como se describe en Barghorn et al., 2005, J Neurochem, 95, 834 – 847 en CFA (Sigma) y se les administró refuerzo dos veces a intervalos de un mes. Se extrajeron los bazo y los esplenocitos se fusionaron con células SP2/0 de mieloma de ratón en una proporción de 5:1 mediante un procedimiento PEG. Las células de fusión se sembraron en placas de 96 pocillos en medio de selección con azaserina/hipoxantina a 2×10^5 células/ml, 200 ml por pocillo. Se dejó que las células crecieran para formar colonias visibles y se analizaron los sobrenadantes para determinar la reactividad del oligómero A-beta mediante ensayo de ELISA directo. Los hibridomas secretoras de anticuerpos frente a los oligómeros A-beta se subclonaron mediante dilución límite hasta que la expresión de anticuerpos pareciera estable.

EJEMPLO II

50 UNIÓN PREFERENCIAL DEL GLOBULÍMERO A 8F5 Y 8C5 EN COMPARACIÓN CON LAS PREPARACIONES MONOMÉRICAS DE AB(1 - 40) Y AB(1 - 42)

55 Para analizar la selectividad de 8F5 se usaron dos preparaciones del monómero A β (1 - 42) disueltas de forma diferente, así como A β (1 - 40) recién preparado como sustitutos de los monómeros. Se realizaron dos tipos de experimentos. En un primer experimento, se analizó 8F5 en cuanto a la selectividad del globulímero A β mediante un ELISA de tipo sándwich con globulímero derivado pero MA6 6G1 confómero inespecífico (véase S. Barghorn et al. J. Neurochemistry, 95:834 (2005)) como anticuerpo de captura. El 8F5 biotinilado se usó como el segundo y anticuerpo selectivo confómero. Este experimento se describe en el Ejemplo 2.1, a continuación.

60 En un segundo ejemplo, descrito en el ejemplo 2.2 siguiente, la selectividad del oligómero frente al monómero A β (1 - 42) y al monómero A β (1 - 40) se examinó mediante inmunoensayo de transferencia puntual. En este experimento, 8F5 exhibió unión preferencial al globulímero A β (1 - 42) (comparado con un anticuerpo conocido 4G8 mapeando con una región similar a 8F5, pero derivados de inmunización con un péptido lineal A β (17 - 24) (Abcam Ltd., Cambridge, MA)), en comparación con el monómero A β (1 - 42) así como en comparación con el monómero A β (1 - 40). El 8C5 se analizó en un protocolo idéntico al 8F5.

EJEMPLO 2.1: SELECTIVIDAD DE OLIGÓMERO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES 8F5 Y 8C5

a) Preparación del globulómero A β (1 - 42)

- 5 9 mg de A β (1 - 42) Fa. Bachem se disolvieron en 1,5 ml de HFIP (1,1,1,3,3,3 Hexafluor-2-propanol) y se incubaron 1,5 h a 37° C. La solución se evaporó en un SpeedVac y se suspendió en 396 μ l de DMSO (solución madre de A β 5 mM). La muestra se sometió a ultrasonidos durante 20 segundos en un baño de agua sónica, se agitó durante 10 minutos y se almacenó durante la noche a -20°C.
- 10 La muestra se diluyó con 4,5 ml de PBS (NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 140 mM; pH 7,4) y se añadieron 0,5 ml de solución al 2% de SDS acuoso (0,2% de contenido en SDS). La mezcla se incubó durante 7 horas a 37°C, se diluyó con 16 ml de H₂O y se incubó durante 16 horas a 37°C. Después, la solución del globulómero A β (1 - 42) se centrifugó durante 20 minutos a 3.000 g. El sobrenadante se concentró hasta 0,5 ml mediante centriprep. 30KDa. El concentrado se dializó frente a NaH₂PO₄ 5 mM; NaCl 35 mM a pH7,4 durante la noche a 6° C. Después, el concentrado de globulómero de A β (1 - 42) se centrifugó durante 10 min a 10.000 g. Después, el sobrenadante se alicuotó y almacenó a -20° C.

b) Preparación del monómero A β (1 - 42) pretratado con HFIP:

- 20 Se disolvieron 3 mg de A β (1 - 42) humano (Bachem Inc) n° cat. H-1368 en 0,5 ml de HFIP (suspensión de 6 mg/ml) en un tubo de Eppendorff de 1,7 ml y se agitó (Eppendorff Thermo mixer, 1400 rpm) durante 1,5 h a 37°C hasta obtener una solución transparente. La muestra se secó en un concentrado SpeedVac (1,5 h) y se resuspendió en 13,2 μ l de DMSO, se agitó durante 10 segundos, seguido de sonicación en baño de ultrasonidos (20 s) y en agitación (p. ej., en Eppendorff Thermo mixer, 1400 rpm) durante 10 minutos.
- 25 Se añadieron 6 ml de NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 140 mM; 0,1% de Pluronic F68; pH 7,4 y se agitaron durante 1 hora a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó durante 20 minutos a 3.000 g. El sobrenadante se desechó y el precipitado se resolvió en 0,6 ml de NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 140 mM; 1% de Pluronic F68; pH 7,4. Se añadieron 3,4 ml de agua y se agitaron durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de 20 minutos de centrifugación a 3.000 g.
- 30 8 alícuotas de 0,5 ml del sobrenadante se almacenaron a -20°C.

c) Preparación del monómero A β (1 - 42) en NH₄OH:

- 35 1 mg de polvo sólido de A β (1 - 42) (Bachem Inc. N° de cat. H-1368) se disolvió en 0,5 ml de 0,1 % de NH₄OH en agua (recién preparada)(2 mg/ml) e inmediatamente se agitó durante 30 segundos a temperatura ambiente para obtener una solución transparente. La muestra se almacenó a -20°C para su uso posterior.

d) Preparación del monómero A β (1 - 40):

- 40 1 mg de A β (1 - 40) humano, (Bachem Inc) n° de cat. H-1194 se suspendió en 0,25 ml de HFIP (4 mg/ml de suspensión) en un tubo Eppendorff. El tubo se agitó (p. ej., en un Eppendorff Thermo mixer, 1400 rpm) durante 1,5 horas a 37°C para obtener una solución transparente y después se secó en un concentrador SpeedVac (1,5 h). La muestra se redisolvió en 46 μ l de DMSO (21,7 mg/ml de solución), se agitó durante 10 segundos, seguido de 20 segundos de sonicación en un baño de ultrasonidos. Después de 10 minutos de agitación (p. ej., en un Eppendorff
- 45 Thermo mixer, 1400 rpm), la muestra se almacenó a -20°C para su uso posterior.

e) Biotinilación del Mab 8F5 anti-A β de ratón:

- 50 500 μ l del Mab 8F5 anti-A β de ratón (0,64 mg/ml) en PBS se añadieron a 2 μ l de 20 mg/ml de Sulfo-NHS-Biotina (Pierce Inc. N° de cat. 21420) disueltos recientemente en agua y se agitaron (p. ej., en Eppendorff Thermo mixer, 1400 rpm), durante 30 minutos, se dializaron durante 16 horas a 6° C en un tubo de diálisis contra 500 ml de Na Pi 20 mM; NaCl 140 mM a pH 7,4. El dializado se almacenó a -20° C para su uso posterior. El 8C5 se biotiniló en consecuencia.

55 f) ELISA de tipo sándwich para muestras de A β :

g) Lista de reactivos:

- 60 1. F96 Cert. Maxisorp NUNC-Immuno Plate N° cat.: 439454
2. Anticuerpo de unión:

MAB 6G1 anti-A β de ratón resuelto en PBS; conc.: 0,4 mg/ml; almacenar a -20°C

3. Tampón de recubrimiento:

- 65 Hidrogenocarbonato de sodio 100 mM; pH 9,6

ES 2 453 941 T3

4. Reactivo de bloqueo para ELISA; Roche Diagnostics GmbH N° de cat.: 1112589

5. Tampón PBST:

NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 140 mM; 0,05 % de Tween 20; a pH 7,4

6. Fracción V de albúmina bovina sin proteínas; Serva

N° de Cat. 11926,03; almacenar a 4° C.

7. PBST + 0,5 % de tampón - BSA:

NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 140 mM; 0,05 % de Tween 20; a pH 7,4 + 0,5 % BSA

8. Madre patrón del globulómero de Aβ(1 - 42):

Solución en NaH₂PO₄ 5 mM; NaCl 35 mM a pH7,4; conc.: 10,77 mg/ml; almacenar a -20°C

9. Madre patrón del monómero Aβ(1 - 42) tratado con HFIP:

Solución en NaH₂PO₄ 3 mM; NaCl 21 mM; 0,15 % de Pluronic F68 a pH7,4; conc.: 0,45 mg/ml; almacenar a -20°C

10. Madre patrón del monómero Aβ(1 - 42) en NH₄OH; solución en 0,1% de NH₄OH conc.: 2 mg/ml; almacenar a -20°C

11. Solución madre patrón del monómero Aβ(1 - 40) tratado con HFIP en DMSO conc.: 21,7 mg/ml; almacenar a -20°C

12. Clon 8F5 de mAb 6G1 biotinilado anti-Aβ de ratón; solución en PBS; conc.: 0,24 mg/ml; almacenar a -80°C

13. Conjugado de estreptavidina-POD; Fa.Roche n° de cat. : 1089153

14. Tinción

TMB; Roche Diagnostics GmbH N° de cat.: 92817060; 42 mM en DMSO; 3 % de H₂O₂ en agua; acetato sódico 100 mM a pH 4,9

15. Tinción de detención añadiendo solución de ácido sulfónico 2M

Preparación de reactivos:

Se usó el protocolo siguiente:

1. Anticuerpo de unión

Descongelar la solución de reserva de mMAb 6G1 y diluir a 1:400 en tampón de recubrimiento.

2. Reactivo de bloqueo:

Disolver el reactivo de bloqueo en 100 ml de agua para preparar la solución madre de bloqueo y almacenar los alícuotas de 10 ml a -20°C. Diluir 3 ml de la solución madre de bloqueo con 27 ml de agua para bloquear cada placa.

3. Soluciones patrón de Aβ:

a) Globulómero Aβ(1 - 42)

- Añadir 1 µl de la solución madre patrón del globulómero Aβ(1 - 42) a 1076 µl de PBST + 0,5 % de BSA = 10 µg/ml

- Añadir 50 µl a 10 µg/ml de la solución patrón del globulómero Aβ(1 - 42) a 4950 µl de PBST + 0,5 % de BSA = 100 ng/ml

b) Monómero Aβ(1 - 42) tratado con HFIP

- Añadir 10 µl de la solución madre patrón del monómero Aβ(1 - 42) pretratado con HFIP a 440 µl de PBST + 0,5 % de BSA = 10 µg/ml

- Añadir 50 µl a 10 µg/ml de la solución patrón del monómero Aβ(1 - 42) pretratado con HFIP a 4950 µl de PBST + 0,5 % de BSA = 100 ng/ml

c) Monómero Aβ(1 - 42) en NH₄OH

ES 2 453 941 T3

- Añadir 5 µl de la solución madre patrón del monómero Aβ(1 – 42) a 995 µl de PBST + 0,5 % de BSA = 10 µg/ml
- Añadir 50 µl a 10 µg/ml de la solución patrón del monómero Aβ(1 – 42) en NH₄OH a 4950 µl de PBST + 0,5 % de BSA = 100 ng/ml

5

d) Monómero Aβ(1 - 40) pretratado con HFIP

- Añadir 1 µl de la solución madre patrón del monómero Aβ(1 – 40) pretratado con HFIP a 49 µl de PBST + 0,5 % de BSA = 430 µg/ml
- Añadir 10 µl a 430 µg/ml de la solución patrón del monómero Aβ(1 – 40) pretratado con HFIP a 420 µl de PBST + 0,5 % de BSA = 10 µg/ml
- Añadir 50 µl a 10 µg/ml de la solución patrón del monómero Aβ(1 – 40) pretratado con HFIP a 4950 µl de PBST + 0,5 % de BSA = 100 ng/ml

10

15 Curvas patrón:

Nº	Conc. final	Madre	PBST + 0,5 % de BSA
1	100 ng/ml	2 ml S	0 ml
2	31,6 ng/ml	0,633 ml (1)	1,367 ml
3	10 ng/ml	0,633 ml (2)	1,367 ml
4	3,16 ng/ml	0,633 ml (3)	1,367 ml
5	1 ng/ml	0,633 ml (4)	1,367 ml
6	0,32 ng/ml	0,633 ml (5)	1,367 ml
7	0,1 ng/ml	0,633 ml (6)	1,367 ml
8	0,0 ng/ml	0 ml	2 ml

1. Anticuerpo principal: mMAb 8F5 biotinilado:

20 El mAb 8F5 anti-Aβ biotinilado concentrado se diluyó en PBST + 0,5 % de BSA-tampón: El factor de dilución fue 1/1200 = 0,2 µg/ml. El anticuerpo se usó inmediatamente:

2. Reactivo indicador:

25 Reconstituir el conjugado de estreptavidina-POD conjugado en 0,5 ml de agua. Añadir 500 µl de glicerol y almacenar los alícuotas de 100 µl a -20° C para su uso posterior. Diluir el reactivo marcador concentrado en tampón PBST. El factor de dilución es 1/10000. Usar inmediatamente.

30 3. Solución de tinción TMB:

Mezclar 20 ml de acetato sódico 100 mM a pH 4,9 con 200 µl de la solución de TMB y 29,5 µl de solución peróxido al 3%. Usar inmediatamente.

35 Organización de una placa de muestras (Obsérvese que todos los patrones se realizan por duplicado)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
B	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6
C	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
D	3,16	3,16	3,16	3,16	3,16	3,16	3,16	3,16	3,16	3,16	3,16	3,16
E	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
G	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
H	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Procedimiento usado:

1. Aplicar 100 µl de la solución del mMAb 6G1 anti-Aβ por pocillo e incubar durante la noche a 4°C.
2. Desechar la solución del anticuerpo y lavar los pocillos con 250 µl de tampón PBST tres veces.
3. Añadir 260 µl de la solución de bloqueo por pocillo e incubar 2 horas a temperatura ambiente.
4. Desechar la solución de bloqueo y lavar los pocillos con 250 µl de tampón PBST tres veces.
5. Después de la preparación de patrones, aplicar 100 µl por pocillo de los patrones a la placa. Incubar 2 horas a temperatura ambiente y durante la noche a 4°C.
6. Desechar la solución patrón y lavar los pocillos con 250 µl de tampón PBST tres veces.
7. Añadir 200 µl de la solución del anticuerpo 8F5 biotinilado primario por pocillo e incubar 1,5 horas a temperatura ambiente.
8. Desechar la solución del anticuerpo y lavar los pocillos con 250 µl de tampón PBST tres veces.
9. Añadir 200 µl de la solución marcadora por pocillo e incubar 1 hora a temperatura ambiente.
10. Desechar la solución marcadora y lavar los pocillos con 250 µl de tampón PBST tres veces.
11. Añadir 100 µl de solución de TMB a cada pocillo e incubar a temperatura ambiente (5 - 15 min).
12. Observar la tinción y aplicar 50 µl de la solución de detención por pocillo después de comenzar una tinción básica.
13. Leer UV a 450 nm.
14. Calcular los resultados a partir de la curva estándar.
15. Evaluación

Los resultados se muestran en la Fig. 1 para el anticuerpo 8F5 y en la Fig. 8 para el anticuerpo 8C5. Los valores log de CE₅₀ son significativamente más bajos para el antígeno del globulómero Aβ(1 - 42) (1,958) en comparación con los valores reducidos para dos monómeros Aβ(1 - 42) preparados de forma diferente ((2,745 and 3,003 respectivamente) y el monómero Aβ(1 - 40) (2,825). Estos datos indican una selectividad de aproximadamente 10 veces del anticuerpo 8F5 para el globulómero Aβ(1 - 42) frente al monómero Aβ(1 - 42). Se obtuvieron resultados casi idénticos con el anticuerpo 8C5 y se muestran en la Fig. 8.

EJEMPLO 2.2: SELECTIVIDAD DE OLIGÓMERO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES 8F5 Y 8C5

- Discriminación del monómero Aβ frente al globulómero Aβ mediante el procedimiento de transferencia puntual: Comparación de 8F5 y 8C5 frente a 4G8.

Se realizaron diluciones en serie del globulómero Aβ (1 - 42), el monómero Aβ1 - 42 y el monómero Aβ1 - 40 en el intervalo de 100 pmol/µl-0,01 pmol/µl en PBS. De cada muestra se colocó 1 µl sobre una membrana de nitrocelulosa. Los anticuerpos monoclonales de ratón 4G8 and 8F5 (0,2 µg/ml) se usaron para la detección con una IgG anti-ratón acoplada a fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario y el reactivo de tinción NBT/BCIP (Roche Diagnostics, Mannheim). La señal de detección se analizó en cuanto a su intensidad (densidad de reflexión= DR) mediante un densitómetro (GS 800, Biorad, Hercules, CA, EE.UU.) a una concentración del antígeno de 10 pmol. A esta concentración para cada forma Aβ, la densidad de reflexión medida estaba en el intervalo lineal de la detección con el densitómetro. El otro anticuerpo 8C5 se usó en un protocolo análogo. Los resultados se muestran en la Tabla 1 que se expone a continuación:

Tabla 1: Discriminación de los anticuerpos anti-Aβ del monómero Aβ1 - 40 y el monómero Aβ1 - 42. La discriminación se calculó como la proporción de la señal de detección del globulómero Aβ1 - 42 y el monómero Aβ1 - 42, respectivamente monómero Aβ1 - 40.

	Densidad de reflexión (DR) [10 pmol]				
	Globulómero Aβ(1 - 42)	Monómero Aβ(1 - 42)	Monómero Aβ(1 - 40)	Proporción DR del globulómero Aβ(1-42) /DR del monómero Aβ(1-42)	Proporción DR del globulómero Aβ(1-42) /DR del monómero Aβ(1-40)
8F5	1,6	1,1	0,1	1,4	16,9
8C5	1,3	0,2	0,3	5,1	4,1
4G8	3	3,1	0,7	1	4,2

En particular, los resultados anteriores indican que 8F5 and 8C5 muestran un perfil de unión diferente comparado con el anticuerpo anti-Aβ (1 - 42) disponible comercialmente con 4G8, que mapea en Aβ (17 - 24)(es decir, una secuencia lineal). Más específicamente, 8F5 and 8C5 muestran una preferencia por la unión del globulómero frente al monómero Aβ42 (véase la columna 4; comparar 1,4 frente a 1), así como una preferencia por la unión del globulómero frente a Aβ40 (columna 5; comparar 16,9 frente a 4,2). Estas dos selectividades de unión mejoradas sobre 4G8 estándar deberán tener como resultado la producción de menos efectos secundarios tras el uso de 8F5 y/o 8C5, como se ha descrito anteriormente (p. ej., unión en placa).

EJEMPLO IIIUNIÓN DE 8F5 Y 8C5 A LAS FIBRILLAS A β (1 - 42)

- 5 Dado que el anticuerpo 8F5 se generó contra globulómeros solubles, se postuló la hipótesis de que 8F5 no debería unirse a la placa depositada o al material de fibrillas. Por tanto, la unión de 8F5 a suspensiones de fibrillas A β polimerizadas se analizó como se ha descrito en el ejemplo siguiente.

- Preparación de las fibrillas A β (1 - 42):

- 10 1 mg de A β (1 - 42) (Bachem Inc., N° Cat. H-1368) se disolvió en 500 μ l de NH₄OH al 0,1% acuoso (tubo Eppendorff) y la muestra se agitó durante 1 minuto a temperatura ambiente, seguido de 5 minutos de centrifugación a 10000 g. El sobrenadante se pipeteó en un nuevo tubo Eppendorff y se midió la concentración de A β (1 - 42) de acuerdo con el ensayo de concentración proteica de Bradford (procedimiento de ensayo BIO-RAD Inc.).

- 15 100 μ l de esta solución de A β (1 - 42) recién preparada se neutralizaron con 300 μ l de NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 140 mM a pH 7,4, seguido de 2 % de HCl para ajustar el pH a 7,4. La muestra se incubó durante otras 20 horas a 37° C y se centrifugó (10 min, 10000 g). El sobrenadante se desechó y el sedimento de fibrillas se resuspendió con 400 μ l de NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 140 mM a pH 7,4 en 1 minuto de agitación en un mezclador de tipo Vortex, seguido de centrifugación (10 min, 10000 g). Después de desechar el sobrenadante, este procedimiento de resuspensión se repitió y la suspensión de fibrillas final se precipitó mediante otra centrifugación (10 min, 10000 g). El sobrenadante se desechó de nuevo y el sedimento de fibrillas se resuspendió con 380 μ l de NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 140 mM a pH 7,4 en 1 minuto de agitación en un mezclador de tipo Vortex. Los alícuotas de la muestra se almacenaron a -20°C en un congelador.

- 25 80 μ l de la suspensión de fibrillas se mezclaron con 320 μ l de NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 140 mM; 0,05 % de Tween 20 a pH 7,4, tampón y se agitaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, seguido de sonicación (20 segundos). Después de la centrifugación (10 min, 10.000 g), el sedimento se resuspendió con 190 μ l de NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 140 mM; 0,05 % de Tween 20 a pH 7,4 en agitación en un mezclador de tipo Vortex.

- Unión de los anticuerpos a las fibrillas A β (1 - 42)

Alícuotas de 10 μ l de esta suspensión de fibrillas se incubaron con:

- 35 a) 10 μ l de Na Pi 20 mM; NaCl 140 mM; pH 7,4
 b) 10 μ l de 0,1 μ g/ μ l de mMAb 6E10 Signet Inc. N° de cat. 9320 en 20 mM
 c) NaH₂PO₄; NaCl 140 mM; pH 7,4
 d) 10 μ l de 0,1 μ g/ μ l de mMAb 4G8 SignetInc. N° de Cat. 9220 en Na Pi 20 mM; NaCl 140 mM; pH 7,4
 e) 10 μ l de 0,1 μ g/ μ l de mMAb 8F5 (8C5) en Na Pi 20 mM; NaCl 140 mM; pH 7,4

- 40 Las muestras se incubaron durante 20 horas a 37°C. Por último, las muestras se centrifugaron (10 minutos a 10.000 g). Los sobrenadantes que contienen la fracción del anticuerpo no unido se recogieron y mezclaron con 20 μ l de tampón de muestra de SDS-PAGE. Las fracciones del sedimento se lavaron con 50 μ l de NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 140 mM a pH 7,4 tampón en 1 minuto en agitación en un mezclador de tipo Vortex, seguido de centrifugación (10 min, 10000 g). Los sedimentos finales se resuspendieron en 20 μ l de Na Pi 20 mM, NaCl 140 mM, 0,025 % de Tween 20; pH 7,4 tampón y se resolvieron en 20 μ l de tampón SDS PAGE.

- ANÁLISIS SDS-PAGE

- 50 Los sobrenadantes y las muestras de sedimentos resuspendidas se calentaron durante 5 minutos a 98°C y se cargaron sobre un gel de Tris/Glicina 4 - 20 % en las condiciones siguientes:

- 55 Tampón de muestra SDS: 0,3 g de SDS; 0,77 g de DTT; 4 ml de Tris/HCl 1M a pH 6,8; 8 ml de glicerol; 1 ml de 1 % de azul de bromofenol en etanol; añadir agua hasta 50 ml de 4 - 20 % de Tris/Glicina Gel:Invitrogen Inc., N° EC6025BOX

Tampón de carrera: 7,5 g de Tris; 36 g de Glicina; 2,5 g de SDS; añadir agua hasta 2,5l

- 60 El PAGE se efectuó a 20 mA. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R250.

Resultados:

- 65 La tinción con azul de Coomassie del SDS-PAGE indicó la presencia de cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos, predominantemente en el sobrenadante de la suspensión de fibrillas (Calle 7, figura 2), la suspensión de fibrillas restantes mostró muy poco material de anticuerpos al mismo tiempo que mostraba una Abeta parcialmente despolimerizado a 4,5 kDa. En contraste con 8F5 and 8C5, otros anticuerpos anti-A β no aparecieron en la fracción

soluble (6E10, calle 3, Figura 2) o solo parcialmente (4G8, Calle 5, Figura 2) en comparación con la fracción unidad de fibrillas (Calle 6, Figura 2).

- 5 La unión relativa del Abeta de tipo fibrillas se evaluó a partir del análisis SDS-PAGE midiendo los valores de la densidad de reflexión de la cadena pesada de los anticuerpos en la fibrilla unida y las fracciones del sobrenadante y se calcularon de acuerdo con la fórmula siguiente.

$$\text{Fracción de Ab unidos a fibrillas} = \frac{DR_{\text{fracción de fibrillas}} \times 100\%}{(DR_{\text{fracción de fibrillas}} + DR_{\text{fracción sobrenadante}})}$$

- 10 Se obtuvieron los valores siguientes:

Anticuerpo	Fracción de Ab unidos a fibrillas
6E10	98 %
8F5	16 %
8C5	21 %

Estos datos indican una reducción significativa de 8F5 y 8C5 unidos en comparación con el anticuerpo estándar 6E10.

15 EJEMPLO IV

20 UNIÓN PREFERENCIAL DE LOS GLOBULÓMEROS A β (1 - 42) ENDÓGENOS EN COMPARACIÓN CON A β (1 - 40)

- En base al concepto de oligómero de A β , es importante que los anticuerpos del oligómero anti-A β también pueden demostrar una unión preferencial para los oligómeros A β (1 - 42) in vivo, en particular sobre A β (1 - 40) en pacientes con deterioro cognitivo leve y EA. E concepto de disminución de las especies de A β (1 - 42) sobre A β (1 - 40) se usa en un abordaje terapéutico para el tratamiento de la EA mediante AINE (Weggen et al., Nature 414, 212 - 216 (2001)). Se supone que dichos AINE que disminuyen A β (1 - 42) en relación con A β (1 - 40) muestran la mejor eficacia en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. La proporción A β (1 - 42)/A β (1 - 40) es importante para una terapia selectiva, así como para fines diagnósticos.

- 30 Se realizó un análisis con muestras de LCR de pacientes con enfermedad de Alzheimer y pacientes con ICL. A partir de los resultados mostrados en la Figura 3 y descritos más adelante, se puede concluir que 8F5 tiene una ventaja principal sobre los anticuerpos A β como 6E10 porque 8F5 detecta una proporción más alta de A β (1 - 42) sobre A β (1 - 40) menos agregante. Esta ventaja permitirá diagnosticar más selectivamente y neutralizar los oligómeros de tipo A β (1 - 42) en pacientes con ICL y EA.

35 A) NIVELES DE AMILOIDE β (1 - 42) Y AMILOIDE β (1 - 40) ENDÓGENOS EN LCR DE PACIENTES CON ICL Y EA TRAS INMUNOPRECIPITACIÓN CON MAB 8F5 ANTI-A β MURINO:

Inmovilización de mMAB anti-A β frente a Sefarosa 4B activada por CNBr:

- 40 a) mMAB 6E10 Signet Inc., N° de cat. 9320
b) mMAB 8F5

- 0,4 g de Sefarosa 4B activada con CNBr (Amersham Pharmacia Bio-tech AB, Uppsala, Suecia, Inc., N° 17 - 0430 - 01) se añadieron a 10 ml de HCl acuoso 1 mM y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. La Sefarosa 4B activada con CNBr se lavó tres veces con 10 ml de HCl 1 mM y dos veces con 10 ml de NaHCO₃ 100 mM; NaCl 500 mM a pH 8,3. Para cada uno de los anticuerpos inmovilizados, se añadieron 100 μ l de la matriz de Sefarosa 4B activada con CNBr a 950 μ l de ,5 mg/ml de solución de mMAB anti-A β en NaHCO₃ 100 mM, NaCl 500 mM a pH 8,3. Tras 2 horas de agitación a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 10.000 g. Después se añadieron 500 μ l de etanolamina 100 mM, NaHCO₃ 100 mM, NaCl 500 mM a pH 8,3, se añadió tampón a las esferas y las muestras se agitaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras de mMAB anti-A β - Sefarosa se centrifugaron durante 5 minutos a 10.000 g y se lavaron 5 veces con 500 μ l de NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 140 mM a pH 7,4. Antes de almacenar a 6°C, las muestras se estabilizaron añadiendo azida sódica hasta una concentración final del 0,02 %.

55 Inmunoprecipitación:

- a) mMAB 6E10-Sefarosa
b) mMAB 8F5 -Sefarosa

60

200 µl de muestras de líquido cefalorraquídeo se diluyeron con 2,00 µl de NaH₂PO₄NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 140 mM; 0,05 % de Tween 20 a pH 7,4. Estas muestras se añadieron a 2 µl de la matriz de sefarosa-mMAb anti-Aβ y se agitaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 10.000 g. Los sobrenadantes se desecharon y mMAb anti-Aβ –Sefarosa se lavaron dos veces con 50 µl de PBS, se agitaron durante 1 minuto y se centrifugaron (5 minutos a 10.000 g). Los sobrenadantes se desecharon y las esferas de sefarosa se suspendieron en 50 µl de NaH₂PO₄NaH₂PO₄ 2 mM, NaCl 14 mM a pH7,4, seguido de 1 minuto de agitación a temperatura ambiente y 5 minutos de centrifugación a 10.000 g. En la siguiente etapa, las esferas de mMAb anti-Aβ – sefarosa se trataron con 50 µl de 50 % de CH₃CN, 0,2 % de TFA en agua. Tras 10 minutos de agitación a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron 5 minutos a 10.000 g. Los sobrenadantes se recogieron y transfirieron a tubos Eppendorf de 1,5 ml. Las muestras se mezclaron con 50 µl de agua y se evaporaron en un concentrador Speed Vac.

El sedimento se redisolvió en 4 µl de 70 % de HCOOH, se agitó durante 10 min a temperatura ambiente y se neutralizaron con 76 µl de solución Tris 1M y 720 µl de NaH₂PO₄NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 140 mM y 0,05 % de Tween 20 a pH 7,4.

Muestras para la determinación de las formas monoméricas Aβ(1 - 40); (1 - 42) en LCR:

- a) contenido de Aβ en muestras de LCR sin inmunoprecipitación:
- 158 µl de LCR se diluyeron con 342 µl de NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 140 mM; 0,05 % de Tween 20 a pH 7,4. Esta dilución a 1:3,16 se cogió para el ELISA de tipo sándwich y se tuvo en cuenta durante la evaluación.
- b) contenido de Aβ en muestras de LCR después de la inmunoprecipitación:
- Las muestras del procedimiento mencionado anteriormente se cogieron para el análisis.

Protocolo de ELISA de tipo sándwich usado para la determinación de Aβ(1 - 40) en LCR

Lista de reactivos:

1. F96 Cert. Maxisorp NUNC-Immuno Plate N° cat.: 439454
2. Anticuerpo de unión
Clon 6E10 de MAb anti-Aβ; Signet N° de cat. 9320; conc.: 0,4 mg/ml de Bradford (BioRad); almacenar a -20° C
3. Tampón de acoplamiento
Hidrogenocarbonato de sodio 100 mM; pH 9,6
4. Reactivo de bloqueo para ELISA; Roche Diagnostics GmbH N° de cat.: 1112589
5. tampón PBST
NaH₂PO₄NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 140 mM; 0,05 % de Tween 20; pH7,4
6. Patrón de Aβ(1 - 40):
Polvo sólido Aβ(1 - 40); Bachem N° de cat.: H-1194; almacenar a - 20° C
7. Anticuerpo principal:
pAb anti-Aβ(1 - 40) de conejo; purificado por afinidad; solución en PBS conc.: 0,039 mg/ml; Signet N° de cat. 9130 - 005; almacenar a -20° C
8. Reactivo indicador:
Conjugado POD-anti-conejo; Fa.Jackson ImmunoResearch N° de cat. 111 - 036 - 045;
9. Tinción:
TMB; Roche Diagnostics GmbH N° de cat.: 92817060; 42 mM en DMSO; 3 % de H₂O₂ en agua; acetato sódico 100 mM a pH 4,9
10. Solución de detención ácido sulfónico 2M

Protocolos usados para la preparación de reactivos:

1. Anticuerpo de unión:
El mAb 6E10 anti-Aβ (Signet Inc, N° de catálogo 9320) se diluye hasta una concentración final de 0,7 microg/ml.

2. Reactivo de bloqueo:

5 Para la preparación de la solución madre de bloqueo, el reactivo de bloqueo se disuelve en 100 ml de H₂O y se almacena a -20° C en alícuotas de 10 ml cada una. 3 ml de la solución madre de bloqueo se diluyen con 27 ml de H₂O para bloquear una placa de ELISA.

3. Monómero Aβ(1 - 40) para dilución patrón:

10 A) Madre patrón del monómero Aβ(1 - 40): Disolver 0,5 mg de Aβ(1 - 40) en 250 µl de NH₄OH conc. al 0,1%: 2 mg/ml ; recién preparados; usar inmediatamente.
 B) Añadir 5 µl de la solución madre patrón del monómero Aβ(1 - 40) a 995 µl de PBST = 10 µg/ml
 C) Añadir 5 µl de la solución patrón del monómero Aβ(1 - 40) a 4995 µl de PBST = 10 ng/ml

Curva patrón:		
Nº	Conc. final	Madre PBST
1	10000 pg/ml	2 ml B 0 ml
2	3160 pg/ml	0,633 ml (1) 1,367 ml
3	1000 pg/ml	0,633 ml (2) 1,367 ml
4	316 pg/ml	0,633 ml (3) 1,367 ml
5	100 pg/ml	0,633 ml (4) 1,367 ml
6	31,6 pg/ml	0,633 ml (5) 1:367 ml
7	10 pg/ml	0,633 ml (6) 1,367 ml
8	0,0 pg/ml	0 ml 2 ml

15 Muestras:

IP : Muestras inmunoprecipitadas		
Nº de factor de dilución	Muestra	PBST
1 directamente	0,4 ml IP	0 ml
2 1:5	0.ml (1)	0,4 ml
3 1:25	0,1 ml (2)	0,4 ml
4 1:125	0,1 ml (3)	0,4 ml

4. Anticuerpo principal:

20 Diluir el pAb anti-Aβ(1 - 40) concentrado en tampón PBST. El factor de dilución es 1/200 = 0,2 µg/ml. Usar inmediatamente.

5. Anticuerpo secundario:

25 El conjugado POD-anti-conejo liofilizado se disuelve en 0,5 ml de H₂O y se mezclan con 500 µl de glicerol. Después, el anticuerpo concentrado se almacena a -20°C en alícuotas de 100 µl. El concentrado se diluye a 1:10.000 en tampón PBST. La solución de anticuerpo se usa inmediatamente.

6. Solución TMB:

30 20 ml de acetato sódico 100 mM a pH 4,9 se mezclan con 200 µl de la solución de TMB y 29,5 µl de solución peróxido al 3 %. Esta solución se usa inmediatamente.

35

ES 2 453 941 T3

Organización de una placa de muestras (Obsérvese que todos los patrones y muestras se realizan por duplicado).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10000	10000	U1	U1								
B	3160	3160	U2	U2								
C	1000	1000	U3	U3								
D	316	316	U4	U4								
E	100	100	U5	U5								
F	31,6	31,6	U6	U6								
G	10	10	U7	U7								
H	0,0	0,0	U8	U8								

U1-U# = Muestras desconocidas

Procedimiento usado:

- 5 1. Aplicar 100 µl de la solución del anticuerpo de unión por pocillo e incubar durante la noche a 4°C.
2. Desechar la solución del anticuerpo y lavar los pocillos con 250 µl de tampón PBST tres veces.
3. Añadir 260 µl de la solución de bloqueo por pocillo e incubar 2 horas a temperatura ambiente.
4. Desechar la solución de bloqueo y lavar los pocillos con 250 µl de tampón PBST tres veces.
- 10 5. Después de la preparación de los patrones y las muestras, aplicar 100 µl por pocillo de los patrones y las muestras a la placa e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente y durante la noche a 4 °C.
6. Desechar la solución patrón/muestra y lavar los pocillos con 250 µl de tampón PBST tres veces.
7. Añadir 200 µl de la solución de anticuerpo principal por pocillo e incubar 1,5 horas a temperatura ambiente.
8. Desechar la solución del anticuerpo y lavar los pocillos con 250 µl de tampón PBST tres veces.
- 15 9. Añadir 200 µl de la solución marcadora por pocillo e incubar 1 horas a temperatura ambiente.
10. Desechar la solución marcador y lavar los pocillos con 250 µl de tampón PBST tres veces.
11. Añadir 100 de la solución de TMB a cada pocillo e incubar a temperatura ambiente (5-15 minutos).
12. Observar la tinción y aplicar 50 µl de la solución de detención por pocillo.
13. Leer a 450 nm.
14. Calcular los resultados a partir de la curva estándar.
- 20 15. Evaluación:

Si la extinción de muestras desconocidas no está en el intervalo de linealidad de la curva de calibración, repetir el ELISA con la dilución de la muestra adecuada.

25 Protocolo de ELISA de tipo sándwich usado para la determinación de la forma monomérica Aβ(1 - 42) en LCR

Lista de reactivos:

- 30 1. F96 Cert. Maxisorp NUNC-Immuno Plate N° cat.: 439454
2. Anticuerpo de unión
Clon 6E10 de MAb anti-Aβ; Signet N° de cat. 9320; conc.: 0,4 mg/ml de Bradford (BioRad); almacenar a -20° C
3. Tampón de recubrimiento Hidrogenocarbonato de sodio 100 mM; pH 9,6
4. Reactivo de bloqueo para ELISA; Roche Diagnostics GmbH N° de cat.: 1112589
- 35 5. Tampón PBST:
NaH₂PO₄/NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 140 mM; 0,05 % de Tween 20; pH7,4
6. Patrón de Aβ(1 - 42)

Polvo sólido Aβ(1 - 42); Bachem N° de cat.: H-1368; almacenar a -20° C
- 40 7. Anticuerpo principal:

pAb anti-Aβ(1 - 42) de conejo; purificado por afinidad; biotilado; solución en PBS co 50% de glicerol conc.: 0,25 mg/ml; Signet N° de cat. 9137 - 005; almacenar a -20° C
- 45 8. Reactivo indicador:

Conjugado POD-anti-conejo; Fa. Jackson ImmunoResearch N° de cat.: 111 - 036 - 045
- 50 9. Tinción:

TMB; Roche Diagnostics GmbH N° de cat.: No.: 92817060;
42 mM en DMSO
3 % de H₂O₂ en agua
Acetato sódico 100 mM, pH 4,9
Solución de terminación: Ácido sulfónico 2M
- 55

Procedimiento usado en la preparación de reactivos:

1. Anticuerpo de unión:

5 Diluir el clon 6E10 de MAb anti-A β 1:400 en tampón de recubrimiento.

2. Reactivo de bloqueo:

10 Disolver el reactivo de bloqueo en 100 ml de agua para preparar la solución madre de bloqueo y almacenar alícuotas de 10 ml a -20°C.
Diluir 3 ml de la solución madre de bloqueo con 27 ml de agua para bloquear cada placa.

3. Forma de monómero A β (1 - 42) para dilución patrón:

15 Madre patrón del monómero A β (1 - 42): disolver 0,5 mg de A β (1 - 42) en 250 μ l de NH₄OH conc. al 0,1%: 2 mg/ml ; recién preparados; usar inmediatamente.
Añadir 5 μ l de la solución madre patrón del monómero A β (1 - 42) a 995 μ l de PBST = 10 μ g/ml
Añadir 5 μ l de la solución patrón del monómero A β (1 - 42) de 10 μ g/ml a 4995 μ l de PBST = 10 μ g/ml

20

Curva patrón:		
Nº	Conc. final	PBST
1	Madre	0 ml
	2 ml B	
	10000 pg/ml	
2	0,633 ml (1)	1,367 ml
	3160 pg/ml	
3	0,633 ml (2)	1,367 ml
	1000 pg/ml	
4	0,633 ml (3)	1,367 ml
	316 pg/ml	
5	0,633 ml (4)	1,367 ml
	100 pg/ml	
6	0,633 ml (5)	1,367 ml
	31,6 pg/ml	
7	0,633 ml (6)	1,367 ml
	10 pg/ml	
8	0 ml	2 ml
	0,0 pg/ml	

Muestras:

IP : Muestras inmunoprecipitadas		
Nº de factor dilución	de Muestra	PBST
1	0,4 ml IP	0 ml
	directamente	
2	0,1 ml (1)	0,4 ml
	1:5	
3	0,1 ml (2)	0,4 ml
	1:25	
4	0,1 ml (3)	0,4 ml
	1:125	

Procedimiento usado:

25 1. Anticuerpo principal:

ES 2 453 941 T3

Diluir el pAb anti-A β (1 - 42) concentrado en tampón PBST. El factor de dilución es 1/1250 = 0,2 μ g/ml. Usar inmediatamente.

5 2. Reactivo indicador:

Reconstituir el conjugado de POD anti-conejo liofilizado en 0,5 ml de agua. Añadir 500 μ l de glicerol y almacenar los alícuotas de 100 μ l a -20° C para su uso posterior.

10 Diluir el reactivo marcador concentrado en tampón PBST. El factor de dilución es 1/5000. Usar inmediatamente.

3. Solución TMB:

15 Mezclar 20 ml de acetato sódico 100 mM a pH 4,9 con 200 μ l de la solución de TMB y 29,5 μ l de solución peróxido al 3 %. Usar inmediatamente.

Organización de una placa de muestras (Obsérvese que todos los patrones y muestras se realizan por duplicado).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10000	10000	U1	U1								
B	3160	3160	U2	U2								
C	1000	1000	U3	U3								
D	316	316	U4	U4								
E	100	100	U5	U5								
F	31,6	31,6	U6	U6								
G	10	10	U7	U7								
H	0,0	0,0	U8	U8								
U1-U# = Muestras desconocidas												

20 Procedimiento usado:

1. Aplicar 100 μ l de la solución del anticuerpo de unión por pocillo e incubar durante la noche a 4°C.
2. Desechar la solución del anticuerpo y lavar los pocillos con 250 μ l de tampón PBST tres veces.
3. Añadir 260 μ l de la solución de bloqueo por pocillo e incubar 2 horas a temperatura ambiente.
4. Desechar la solución de bloqueo y lavar los pocillos con 250 μ l de tampón PBST tres veces.
- 25 5. Después de la preparación de patrones y muestras, aplicar 100 μ l por pocillo de los patrones a la placa. Incubar 2 horas a temperatura ambiente y durante la noche a 4°C.
6. Desechar la solución patrón/muestra y lavar los pocillos con 250 μ l de tampón PBST tres veces.
7. Añadir 200 μ l de la solución de anticuerpo principal por pocillo e incubar 1,5 horas a temperatura ambiente.
8. Desechar la solución del anticuerpo y lavar los pocillos con 250 μ l de tampón PBST tres veces.
- 30 9. Añadir 200 μ l de la solución marcadora por pocillo e incubar 1 horas a temperatura ambiente.
10. Desechar la solución marcador y lavar los pocillos con 250 μ l de tampón PBST tres veces.
11. Añadir 100 μ l de la solución de TMB a cada pocillo e incubar a temperatura ambiente (5-15 minutos).
12. Observar la tinción de color y aplicar 50 μ l de la solución de detención por pocillo.
13. Leer a 450 nm.
- 35 14. Calcular los resultados a partir de la curva estándar.
15. Evaluación:

40 Si la extinción de muestras desconocidas no está en el intervalo de linealidad de la curva de calibración, repetir el ELISA con la dilución de la muestra adecuada.

RESULTADOS:

	ELISA de A β 40 (Signet)		ELISA de A β 42 (Signet)		A β A2/40
	A β (1 - 40)	SEM	A β (1 - 42)	SEM	
Muestras de ICL (n= 4)					
Sin IP	11678,9	2879,4	1242,0	353,5	7,84 %
6E10 IP	8282,4	2185,7	2035,1	280,9	17,35 %
8F5 IP	8586,1	2396,8	2654,6	411,4	20,95 %
Muestras de EA (n=2)					
Sin IP	7297,5	1464,5	843,0	157,5	10,95 %
6E10 IP	5610,2	28,3	1453,0	14,5	20,57 %
8F5 IP	4133,9	86,9	1670,2	12,3	28,78 %

Los resultados anteriores indican lo siguiente:

- 5 a. Un anticuerpo preferencial de globulómero como 8F5 (o 8C5), en comparación con un anticuerpo no selectivo de globulómero como 6E10, se une preferentemente a A β 42 en comparación con A β 40 independiente del estado de la enfermedad. Este resultado es indicativo del éxito del tratamiento para la enfermedad de Alzheimer porque eliminar preferentemente A β 42 por encima de A β 40 es seguido como concepto en el tratamiento de la EA, por ejemplo mediante el uso de R-flubiprofeno, Flurizanm que ha demostrado eficacia en el tratamiento de la EA en un ensayo clínico publicado por Myriad Inc. Este concepto lo publicó S. Weggen et al. (J Biol Chem. (2003) 278(34):31831 - 7). Los resultados se muestran en la Figura 3.
- 10 b. Un anticuerpo preferencial de globulómero como 8F5 (o 8C5) se une todavía más a A β 42 que a A β 40 en pacientes comparados con controles sanos. Este resultado es todavía más indicativo del éxito de un tratamiento para la enfermedad de Alzheimer porque, como se ha indicado anteriormente, eliminar preferentemente A β 42 sobre A β 40 es seguido como concepto en el tratamiento de la EA (p. ej., mediante el uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, como R-flubiprofeno). (Véase la Figura 3)

15 B) Niveles de amiloide β (1 - 42) y amiloide β (1 - 40) endógenos en LCR humano tras inmunoprecipitación con mab 8F5 o 8C5 anti-a β murino selectivo de globulómero en comparación con el anticuerpo 6E10 no selectivo de globulómero:

20 b1) Inmunoprecipitación (IP) con IgG anti-ratón de oveja Dynabeads M-280

Soluciones Abeta-anticuerpo

25 Los siguientes anticuerpos puros se obtuvieron de hibridomas de acuerdo con procedimientos de purificación estándar:

- mAb 6E10; Fa.Signet Nr.: 9320; 1 mg/ml en tampón PBS
- mAb 8F5; 1,65 mg/ml en tampón PBS
- mAb 8C5; 1,44 mg/ml en tampón PBS

30 IgG anti-ratón de oveja Dynabeads M-280

IgG anti-ratón de oveja (Invitrogen Inc., N° de cat.: 112,02) está unido covalentemente a esferas magnéticas (Dynabeads).

35 Activación de Dynabeads con anticuerpos monoclonales de ratón

- La suspensión madre de dynabeads (IgG anti-ratón de oveja Dynabeads M-280, Invitrogen; N° prod. 112,02) se agitó cuidadosamente para prevenir la formación de espuma.
- 40 - Se extrajo 1 ml asépticamente y se transfirió a un vial de reacción de 1,5 ml.
- Las dynabeads se lavaron 3 veces 5 minutos con 1 ml de tampón de lavado-inmunoprecipitación (IP) (IP-lavado-tampón: PBS (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 140 mM a pH 7,4), 0,1 % (p/v) de BSA). Durante el procedimiento de lavado, el sobrenadante se eliminó cuidadosamente mientras que las dynabeads se inmovilizaron en el lateral del vial de reacción con un soporte separador magnético (SSM).
- 45 - Las dynabeads lavadas se incubaron con 40 μ g de anticuerpo abeta en 1 ml de PBS, 0,1 % (p/v) de BSA.
- La activación se llevó a cabo mediante incubación durante la noche en agitación a 4°C.
- Las dynabeads activadas se lavaron 4 veces 30 minutos (de nuevo usando el SSM) con 1 ml de tampón IP-lavado (PBS (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 140 mM a pH 7,4), 0,1 % (p/v) de BSA).
- 50 - Las dynabeads activadas se resuspendieron con 1 ml de PBS, , 0,1 % (p/v) de BSA, 0,02 (p/v) % de Na-Azida; se agitaron en vórtex y se centrifugaron brevemente.
- Las dynabeads activadas por anticuerpo se almacenaron a 4°C hasta su uso futuro.

Preparación de la muestra de LCR:

55 400 μ l de LCR de un paciente de enfermedad de Alzheimer se añadieron a 4 μ l de cóctel inhibidor de la proteasa completo (Roche Inc. N° de cat.: 1697498, 1 pastilla disuelta en 1 ml de agua) y 0,8 μ l de PMSF 500 mM disuelto en metanol. Tras 10 minutos se añadieron 1,6 ml de NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 10 mM; 0,05 % de Tween 20; a pH 7,4 (PBST).

60 Inmunoprecipitación de especies Abeta de LCR de EA humano:

Un alícuota de 250 μ l de la muestra de LCR preparada se añadió a 25 μ l de la suspensión de anti-A β -Dynabeads.

- La inmunoprecipitación se produjo en agitación a 6°C durante 16 horas. El posterior lavado de las esferas se realizó 3 veces 5 minutos con 1 ml de PBS/0,1 % (p/v) de BSA y, por último, una vez 3 minutos, con 1 ml de tampón Tris/HCL 10 mM a pH 7,5. Durante el procedimiento de lavado, el sobrenadante se eliminó cuidadosamente mientras que las dynabeads se inmovilizaron en el lateral del vial de reacción con un

soporte separador magnético (SSM).

El sobrenadante residual se eliminó completamente después de la etapa final de lavado. Los péptidos Abeta y el correspondiente anticuerpo se retiraron de las Dynabeads añadiendo 25 µl del tampón de muestra sin β-Mercaptoetanol (0,36 M Bistris, 0,16 M Vician, 1 % de SDS (p/v), 15 % (p/v) de sacarosa, 0,004 % (p/v) de azul de bromofenol) al tubo Eppendorff y se calentó durante 5 min a 95° C en un bloqueo de calentamiento. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente, las dynabeads se inmovilizaron en el lateral del vial de reacción con un soporte separador magnético (SSM) y el sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorff (eluito IP).

10 Análisis de los inmunoprecipitados Abeta mediante urea-PAGE seguido de procedimiento de transferencia de tipo Western

15 La cuantificación de las especies Aβ1 - 40 y Aβ1 - 42 se realizó mediante un sistema de electroforesis en gel de urea 8M poli-acrilamida y el posterior análisis de transferencia de tipo Western de acuerdo con el procedimiento descrito por primera vez por H.W. Klafki et al., Analytical Biochemistry 237, 24 - 29 (1996) y usado después por . Wiltfang et al., J. of Neurochemistry 81, 481 - 496, 2002. Solo se produjeron cambios minoritarios en el procedimiento experimental.

20 1) La concentración de SDS en el gel de apilamiento se ajustó hasta 0,25 % (p/v) en lugar de 0,1 % (p/v).
2) Para la transferencia de tipo Western, el anticuerpo 1E8 (Senetek Drug Delivery Technologies Inc. St.Louis, MO, USA) se reemplazó por amiloide β antihumano (N) (82E1) mAb IgG de ratón (IBL, N° de cat. 10323)

25 Alícuotas de 15 µl IP de las muestras inmunoprecipitadas se cargaron en el gel de Urea 8M PAGE. La electroforesis se realizó a 100 V (15 min) y continuó a 60 V. La electroforesis se detuvo cuando el frente de la carrera del pigmento de carga de la muestra azul estaba todavía a 0,5 cm del final del gel.

Procedimiento de transferencia de tipo Western:

30 El análisis de transferencia de tipo Western se realizó en una cámara de transferencia semiseca (BioRad Inc., 45 min a 75 mA) en una nicrocelulosa de 7,5 cm x 9 cm a 0,45 µm (BioRad Inc.).

Tampón de transferencia: 6 g de Tris; 28,1 g de Glicina; 500 ml de metanol, ajustar a 2,5 l con agua.

35 La transferencia en nitrocelulosa se llevó a ebullición durante 10 minutos en PBS a 100°C. La transferencia se saturó mediante tratamiento con 50 ml de 5% (p/v) de BSA en PBST durante 1 hora a TA. Después de eliminar la fase de fluido, se realizó la siguiente etapa de lavado dos veces con: 50 ml de TTBS (tampón Tris / HCl 25 mM; NaCl 150 mM; 0,05 % de Tween 20; pH 7,5) durante 10 min a TA y después con 50 ml de TBS (tampón Tris / HCl 25 mM; NaCl 150 mM; pH 7,5) durante 10 min a TA.

40 Para desarrollo adicional, el tampón de lavado final se desechó de la transferencia y se añadieron 15 ml de la solución del anticuerpo I (0,2 µg/ml 82E1 = 1:500 en 3 % (p/v) de polvo de leche desgrasada (Lasana Inc.'), en 15 ml de TBS) durante 20 horas a 6°C. Tras la eliminación del tampón se realizaron tres etapas de lavado como se ha descrito anteriormente. La transferencia se incubó con la solución de anticuerpo II (dilución (1:10000 de POD anti-ratón en 15 ml de 3% (p/v) de polvo de leche desgrasada en 15 ml de TBS) durante 1 hora a TA. Tras la eliminación del tampón se produjeron tres etapas de lavado como se ha descrito anteriormente.

50 Después de la eliminación del último tampón de lavado se mezclaron 2 ml de potenciador del sustrato de sensibilidad máxima Super Signal West Femto y 2 ml de solución de peróxido. La solución recién preparada se vertió sobre la transferencia, que se preincubó en oscuridad durante 5 minutos. La quimioluminiscencia se registró usando un sistema de obtención de imágenes VersaDoc (BioRad).

Parámetros de obtención de imágenes:

55 - Tiempo de exposición 180 segundos.
Registros de imagen tras 30 s, 60 s, 120 s y 180 s.

Los resultados se obtuvieron de la imagen con un tiempo de exposición de 180 segundos

	Aβ40 urea-PAGE [pg/ml]	Aβ42 urea-PAGE [pg/ml]	Proporción Aβ42/Aβ40+42 x 100 %
6E10 IP	4389	202	4,4 %
8F5 IP	1260	112	8,1 %
8C5 IP	1202	211	14,9 %

60 Los resultados anteriores indican que un anticuerpo preferencial de globulómero como 8F5 o 8C5 en comparación con un anticuerpo no selectivo de globulómero como 6E10, se une más a Aβ42 que a Aβ40 en el LCR humano. Este

resultado es indicativo del éxito de un tratamiento para la enfermedad de Alzheimer porque, como se ha indicado anteriormente, eliminar preferentemente A β 42 sobre A β 40 es seguido como concepto en el tratamiento de la EA (p. ej., mediante el uso de R-flubiprofeno (véase anteriormente)).

5 EJEMPLO V

8F5 MEJORA EL RECONOCIMIENTO DE OBJETOS NUEVOS EN RATONES APP TRANSGÉNICOS

10 Con el fin de analizar un efecto positivo sobre la cognición neutralizando el epítipo interno del globulímero A β (1 - 42) con el anticuerpo 8F5 se realizó un experimento de inmunización pasiva con ratones transgénicos APP en los que se analizaron los ratones según su capacidad para recordar objetos que han investigado antes. Después de algún tiempo, un retraso entre el primero y el segundo encuentro con los objetos, los ratones transgénicos APP no pueden reconocer el objeto ya investigado. Este experimento se basa en la curiosidad natural de los animales y una falta significativa de interés en el objeto ya investigado demuestra reconocimiento del objeto.

15 EJEMPLO V.I: INCREMENTO DEL ÍNDICE DE RECONOCIMIENTO POR EL ANTICUERPO MONOCLONAL 8F5 :

Animales:

20 Se usaron ratones hembra de un modelo de ratón transgénico sencillo de enfermedad de Alzheimer en fondo de FVB x C57B1 (APP/L, ReMYND, Leuven, Bélgica) y hermanos negativos como controles silvestres en fondo de FVB x C57Bl con una edad de 3 meses. Todos los ratones se sometieron a genotipado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a la edad de 3 semanas y recibieron un número de identidad único, una vez conocidos los resultados de la PCR y comprobados doblemente mediante una segunda PCR antes del inicio del estudio. Todos los ratones se aleatorizaron y agruparon por la misma edad, es decir se les dio un número aleatorio mediante ordenador y se les asignó aleatoriamente a un tratamiento. Los animales se enjaularon por grupo de tratamiento 18 días antes del inicio del estudio con el fin de permitirles que se familiaricen con el contexto de la nueva jaula. Los ratones tenían acceso a agua estéril y prefiltrada (lámpara UV) y pienso estándar para ratón. El alimento se almacenó en condiciones secas y frescas en una habitación bien ventilada. La cantidad de agua y alimento se comprobó diariamente, se suministró cuando era necesario y se refrescó dos veces a la semana. Los ratones se estabularon con un ritmo de día-noche invertido: 14 horas de luz/10 horas de oscuridad comenzando a las 7 de la tarde en jaulas metálicas convencionales RVS T2 (área de 540 cm²). Las jaulas estaban provistas con suelos sólidos y una capa de lecho y arena. El número de ratones por jaula estaba limitado de acuerdo con la legislación sobre bienestar de los animales. Cinco días antes del inicio de la prueba de comportamiento, se pasó a los ratones a jaulas de macrolón de tipo 2 y se les transportó al laboratorio con el fin de adaptarles al ambiente del laboratorio en la preparación de una prueba de conducta.

Tratamiento (inmunización pasiva):

40 Se realizaron tres experimentos individuales en los que los ratones (al menos 9 por grupo) recibieron inyecciones intraperitoneales (500 μ g en 240 μ l / ratón) los días 1, 8 y 15. Se trató a los ratones con anticuerpos monoclonales 6G1, 8F5 y otros anticuerpos no divulgados, todos disueltos en solución salina tamponada con fosfato o con 320 μ l de solución salina tamponada con fosfato.

45 Prueba de reconocimiento de objetos nuevos

La prueba de reconocimiento de objetos nuevos se realizó el día del tercer tratamiento. El protocolo usado siguió el procedimiento como describen Dewachter y col., (Journal of Neuroscience, 2002, 22(9):3445 - 3453). Los ratones se familiarizaron durante una hora con una caja abierta de Plexiglas (52 x 52 x 40 cm) con paredes verticales negras y un suelo translúcido, tenuemente iluminado con una lámpara colocada debajo de la caja. Al día siguiente, los animales se introdujeron en la misma caja y se sometieron a un ensayo de adquisición de 10 minutos. Durante este ensayo, los ratones se introdujeron individualmente en el campo abierto en presencia de 2 objetos idénticos (barril naranja o cubo verde, de tamaño similar \pm 4 cm) y el tiempo de duración (tiempo_{AA}) y la frecuencia (Frec_{AA}) en la exploración del objeto A (cuando el hocico de los animales se dirigía hacia el objeto de una distancia de < 1 y los ratones olfateaban activamente en la dirección del objeto) se registró mediante un sistema computerizado (Ethovision, Noldus information Technology, Wageningen, Países Bajos). Durante un ensayo de retención de 10 minutos (segundo ensayo) realizado 2,5 horas después, un objeto nuevo (objeto B, cubo verde o barril naranja) se introdujo con el objeto familiar (objeto A) en el campo abierto (Frec_A y Frec_B y Tiempo_A y Tiempo_B, respectivamente). El índice de reconocimiento (IR), definido como la proporción de la duración en la que se exploró el nuevo objeto sobre la duración en la que se exploraron ambos objetos [$\text{Tiempo}_B / (\text{Tiempo}_A + \text{Tiempo}_B) \times 100$], se usó para medir la memoria no espacial. La duración y la frecuencia que exploró el objeto A durante el ensayo de adquisición (Tiempo_{AA} y Frec_{AA}) se usaron para medir la curiosidad.

65 El análisis de los datos se realizó combinando ratones APP transgénicos que recibieron anticuerpos monoclonales 6G1 o 8F5 o solución salina tamponada con fosfato y hermanos no transgénicos que recibieron solución salina tamponada con fosfato, de los tres estudios (Fig. 4). Los ratones que no distinguen entre un objeto viejo y un objeto

nuevo tienen un índice de reconocimiento de 50. Los ratones que reconocen el objeto viejo explorarán, preferentemente, el objeto nuevo y, por tanto, el índice de reconocimiento pasa a ser > 50. Los ratones que exploran exclusivamente el objeto nuevo tienen un índice de reconocimiento de 100. El índice de reconocimiento medio por grupo se comparó con el nivel de probabilidad, es decir 50, mediante prueba t. El índice de reconocimiento medio de todos los grupos también se comparó mediante ANOVA, seguido de una prueba t post-hoc. La diferencia entre los grupos de PBS y silvestre indicó un déficit cognitivo de los ratones APP transgénicos en este paradigma. Los ratones a los que se inyectó PBS realizaron un nivel de azar (es decir, no significativamente diferente de 50) mientras que todos los demás ratones mostraron reconocimiento del objeto (Fig. 4: estrellas). Cuando el funcionamiento de los ratones transgénicos APP tratados con anticuerpos se comparó con los grupos control se halló una diferencia significativa frente a los tratados con PBS pero no frente a los ratones silvestres (Fig. 4: círculos), lo que indica que el tratamiento con el anticuerpo 8F5 invertía el déficit cognitivo en estos ratones transgénicos APP.

EJEMPLO VI

ANÁLISIS IN SITU DE LA REACCIÓN ESPECÍFICA DE LOS ANTICUERPOS 8F5 Y 8C5 AL PÉPTIDO BETA AMILOIDE FIBRILAR EN FORMA DE PLACAS DE AMILOIDE Y AMILOIDE EN VASOS MENÍNGEOS EN RATONES APP TRANSGÉNICOS VIEJOS Y EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Los anticuerpos 8F5 and 8C5 muestran una tinción reducida de los depósitos de péptido A β fibrilar, lo que sugiere que su efecto terapéutico está mediado por la unión a formas globuloméricas solubles en lugar de formas de péptido A β depositadas en las fibrillas. Dado que la unión del anticuerpo al péptido A β fibrilar puede conducir a una disolución rápida de agregados y un posterior incremento de la concentración de A β soluble, que, a su vez, se piensa que es neurotóxico y podría conducir a microhemorragias, se prefiere una terapia de anticuerpos que afecta al globulómero soluble en lugar de al monómero.

Procedimientos:

Para estos experimentos se usaron varias muestras de material cerebral. tejido cortical de 2 pacientes de EA (RZ16 and RZ 55) y tejido cortical de ratones Tg2576 de 19 meses de edad (APPSWE # 001349, Taconic, Hudson, NY, EE.UU.) o ratones APP/L de 1e meses de edad (ReMYND, Leuven, Bélgica).

Los ratones sobreexpresan APP humana con una mutación familiar en la enfermedad de Alzheimer y forman depósitos de β -amiloide en el parénquima cerebral aproximadamente a los 11 meses de edad y los depósitos de β -amiloide en vasos cerebrales grandes a aproximadamente 18 meses de edad. Los animales se anestesiaron profundamente y se perfundieron transcardialmente con solución salina tamponada con fosfato 0,1M (PBS) para lavar a sangre. Después, se extrajo el cerebro del cráneo y se dividió longitudinalmente. Un hemisferio del cerebro se congeló y el otro se fijó mediante inmersión en 4% de paraformaldehído. El hemisferio fijado por inmersión se crioprotegió empapando en 30% de sacarosa en PBS y se montó en un microtomo de congelación. Todo el prosencéfalo se cortó en secciones transversales de 40 μ m, que se recogieron en PBS y se usaron para el siguiente procedimiento de tinción. Las muestras de la neocorteza de pacientes de enfermedad de Alzheimer se obtuvieron en n-Net, Munich, Alemania, como tejido congelado, se fijó por inmersión en 4% de paraformaldehído durante la descongelación y después se trataron como al tejido de ratón.

Secciones individuales se tiñeron con rojo congo usando el protocolo siguiente:

Materiales:

- Pigmento rojo congo del amiloide (Sigma-Aldrich; HT-60), que consiste en una solución de NaCl alcohólica, solución de NaOH y solución de rojo Congo.
- Cubetas de tinción
- Portaobjetos para microscopio SuperfrostPlus y cubreobjetos
- Etanol, xilol, medio de inmersión

Reactivos:

- NaOH diluido a 1:100 con solución de NaCl da solución salina alcalina
- la solución saina alcalina diluida a 1:100 con solución rojo congo da solución de rojo congo alcalina (preparar no más de 15 minutos antes de usar, filtrar)
- montar las secciones sobre el portaobjetos y dejarlas secar
- Incubar los portaobjetos en la cubeta de tinción, primero durante 30 -40 minutos en solución salina alcalina, después durante 30 - 40 minutos en solución de rojo congo alcalina
- Lavar tres veces con etanol fresco y se incluyeron en xilol

La tinción se fotografió primero usando un microscopio Zeiss Axioplan (Zeiss, Jena, Alemania) y se evaluó cualitativamente. El color rojo indicó depósitos de amiloide tanto en forma de placas como en vasos meníngicos más

grandes. Después, la evaluación de la función del anticuerpo se centró en estas estructuras.

La tinción se realizó incubando las secciones con una solución que contiene 0,07 - 0,7 µg/ml del respectivo anticuerpo de acuerdo con el protocolo siguiente:

- 5 Materiales:
- Solución de lavado TBST (solución salina tamponada con Tris con Tween 20; 10x concentrado; DakoCytomation S3306, DAKO, Hamburgo, Alemania) 1:10 en agua bidest.)
 - 10 - 0,3 % de H₂O₂ en metanol
 - Suero de burro (Serotec, Düsseldorf, Alemania), 5% en BST, como suero de bloque
 - Anticuerpos monoclonales anti-globulímero de ratón diluidos a concentraciones dadas en TBST
 - anticuerpo secundario: Anticuerpo biotinilado de burro anti-ratón (Jackson Immuno / Dianova, Hamburgo, Alemania, 715 - 065 - 150; diluido a 1:500 en TBST)
 - 15 - StreptABComplex (DakoCytomation K 0377, DAKO, Hamburg, Alemania)
 - Kit sustrato de peroxidasa diamonobencidina (=DAB; SK-4100; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.)
 - Portaobjetos para microscopio SuperfrostPlus y cubreobjetos
 - Medio de inclusión sin xilol (Medite, Burgdorf, Alemania; X-tra Kitt)

- 20 Procedimiento:
- Transferir secciones de flotación a 0,3 % H₂O₂ helada e incubar durante 30 minutos
 - Lavar durante 5 minutos en tampón TBST
 - Incubar con suero de burro/TBST durante 20 minutos
 - 25 - Incubar con el anticuerpo primario durante 24 horas a temperatura ambiente.
 - Lavar en tampón TBST durante 5 minutos
 - Incubar con suero de bloqueo durante 20 minutos
 - Lavar en tampón TBST durante 5 minutos
 - Incubar con el anticuerpo secundario durante 60 horas a temperatura ambiente.
 - 30 - Lavar en tampón TBST durante 5 minutos
 - Incubar con LStreptABComplex durante 60 minutos a temperatura ambiente
 - Lavar en tampón TBST durante 5 minutos
 - Incubar con DAB durante 20 minutos.
 - Montar la sección sobre los portaobjetos, secar a aire los portaobjetos, deshidratar los portaobjetos con alcohol y
 - 35 sumergir los portaobjetos.

Además de la inspección visual de las secciones bajo el microscopio, la tinción del amiloide se cuantificó adicionalmente mediante escisión óptima de 10 placas seleccionadas al azar de las imágenes histológicas usando el sistema de análisis de imágenes ImagePro 5,0 y determinando su valor promedio en la escala de los grises. Los valores de densidad óptica (se calcularon a partir de los valores en la escala de los grises restando la densidad básica media del material teñido de la densidad de las placas de amiloide (0%, ausencia de tinción de placas por encima de la básica de alrededor, 100%, ausencia de transmisión/tinción máxima). Las diferencias entre los anticuerpos 6E10 / 4G8 y 6G1, 8C5 y 8F5, respectivamente, se analizaron para determinar la significación estadística con un ANOVA.

45 Resultados:

Se demostró que todo el material teñido con anticuerpo descrito eran depósitos de amiloide sensibles al pigmento congo (Fig. 7(A)). Los anticuerpos de preferencia por globulímeros 8F5 and 8C5 tiñeron los depósitos sensibles al pigmento congo parenquimatosos y meníngicos del péptido Aβ significativamente menos que los anticuerpos 6G1 y 6E10 (Fig. 7(B)-(C),(H)). El análisis cuantitativo de la tinción de las placas amiloides parenquimatosas reveló unión de todos los anticuerpos a las placas (densidad por encima del control estadísticamente significativa), pero la unión de los anticuerpos 8F5 and 8C5 fue significativamente menor que la unión del anticuerpo de referencia 6E10 (producidos frente a la secuencia en N-terminal de Aβ) e igual o menor que el anticuerpo de referencia (4G8 (producidos frente a la secuencia en N-terminal de Aβ) (Fig. 7(D)-Fig. (G)).

55 Los anticuerpos 8F5 and 8C5 se unen menos a los depósitos de amiloide que los anticuerpos que reconocen el monómero Aβ o parte de la secuencia Aβ. El tratamiento con los anticuerpos que se unen al péptido Aβ fibrilar puede conducir a una disolución rápida de las placas de amiloide en el tejido cerebral y un posterior incremento de la concentración de Aβ soluble, que, a su vez, se piensa que es neurotóxico y podría conducir a microhemorragias, y/o

60 una rápida disolución del amiloide vascular, que también podría producir microhemorragias. Por tanto, se prefiere una terapia de anticuerpos que afecte al globulímero soluble en lugar de al monómero.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada y ligera variable, donde:
- 5 las tres CDR de dicha cadena pesada variable son las SEC ID N° 5, SEC ID N° 6 y SEC ID N° 7, y las tres CDR de dicha cadena ligera variable son las SEC ID N° 8, SEC ID N° 9 y SEC ID N° 10. donde el anticuerpo se une con mayor especificidad a un globulómero proteico beta amiloide que a un monómero proteico beta amiloide.
- 10 2. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, que es un anticuerpo humanizado.
3. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, donde la cadena pesada variable comprende la SEC ID N° 3 y la cadena ligera variable comprende la SEC ID N° 4.
- 15 4. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 2, donde todas o sustancialmente todas las regiones de estructura corresponden a las de una secuencia consenso de la inmunoglobulina humana.
5. Un hibridoma que tiene el número de designación en la Colección Americana de Cultivos Tipo PTA-7238.
- 20 6. Un anticuerpo monoclonal (8F5) producido por dicho hibridoma de la reivindicación 5.
7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 6 para usar en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer.
- 25 8. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1- 4 o 6.
9. Una vacuna que comprende un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1- 4 o 6 y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 30 10. El uso de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 6 en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer.
11. Un procedimiento de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un paciente que se sospecha que tiene esta enfermedad, que comprende las etapas de:
- 35 a) poner en contacto una muestra biológica de dicho paciente con un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1- 4 o 6 durante un tiempo en condiciones suficientes para la formación de complejos antígeno/anticuerpo; y
- 40 b) detectar la presencia de dichos complejos antígeno/anticuerpo en dicha muestra, indicando la presencia de dichos complejos un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer en dicho paciente.
12. Un procedimiento de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un paciente que se sospecha que tiene esta enfermedad, que comprende las etapas de:
- 45 a) poner en contacto una muestra biológica de dicho paciente con un antígeno que es un globulómero proteico beta amiloide (A β) durante un tiempo en condiciones suficientes para la formación de complejos antígeno/anticuerpo;
- 50 b) añadir un conjugado a los complejos antígeno/anticuerpo resultantes durante un tiempo en condiciones suficientes para permitir que dicho conjugado se una al anticuerpo unido, donde dicho conjugado comprende un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, o 6,
- c) detectar la presencia de dichos complejos antígeno/anticuerpo en dicha muestra, indicando la presencia de dichos complejos un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer en dicho paciente.
13. Un procedimiento de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un paciente que se sospecha que tiene esta enfermedad, que comprende las etapas de:
- 55 a) poner en contacto una muestra biológica de dicho paciente con un anti-anticuerpo, donde dicho anti-anticuerpo es específico de dicho anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1- 4 o 6 durante un tiempo en condiciones suficientes para permitir la formación de complejos antígeno/anticuerpo, conteniendo dichos complejos anticuerpo presente en dicha muestra biológica;
- 60 b) añadir un conjugado a los complejos antígeno/anticuerpo resultantes durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que dicho conjugado se una al anticuerpo unido, donde dicho conjugado comprende un antígeno, que se une a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; y
- 65 c) detectar una señal generada por dicho compuesto generador de señal, indicando dicha señal un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer en dicho paciente.

14. Un procedimiento de identificación de compuestos adecuados para inmunización activa de un paciente que se ha predicho que va a desarrollar la enfermedad de Alzheimer, que comprende las etapas de:

- 5 a) exponer uno o más compuestos de interés a un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1- 4 o 6 durante un tiempo en condiciones suficientes para que dichos uno o más compuestos se unan a dicho anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1- 4 o 6; e
- b) identificar dichos compuestos que se unen a dicho anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 6, dichos compuestos identificados para uso en inmunización activa en un paciente predicho para desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

10 15. Un kit que comprende: a) un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1- 4 o 6, y b) un conjugado que comprende un segundo anticuerpo específico del globulómero de la proteína A β unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable, donde dicho segundo anticuerpo de dicho conjugado es diferente de dicho anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1- 4 o 6.

15 16. Un kit que comprende: a) un anti-anticuerpo frente a un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1- 4 o 6 y b) un conjugado que comprende un globulómero de la proteína A β unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable.

ELISA de tipo sándwich de varia formas de $A\beta$
 con clon 8F5 biotinilado recubierto con clon 6G1

Clon 6G1 anti- $A\beta$ recubierto --> Formas $A\beta$ --> clon biotinilado
 8F5 --> Estreptavidina-POD --> desarrollo

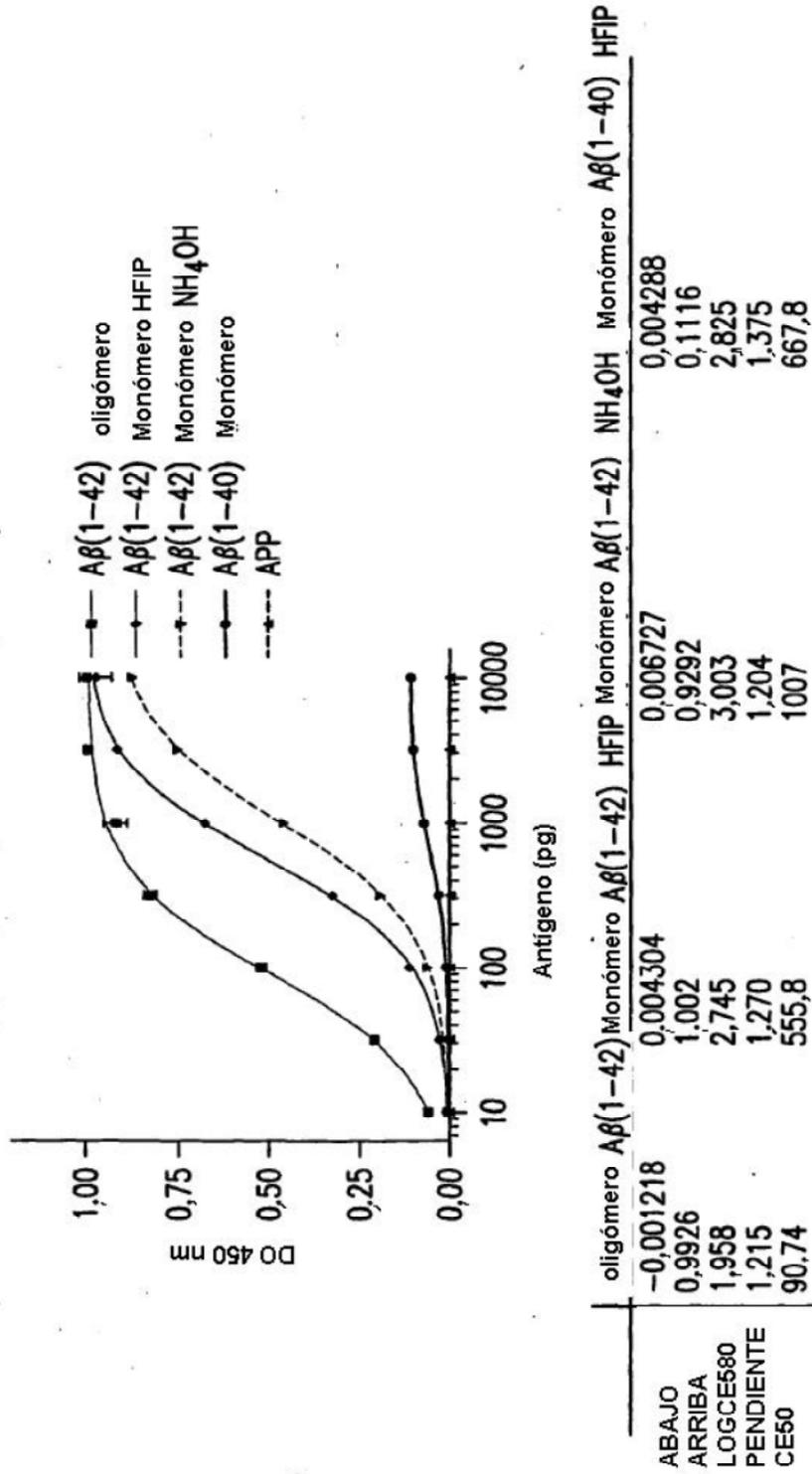
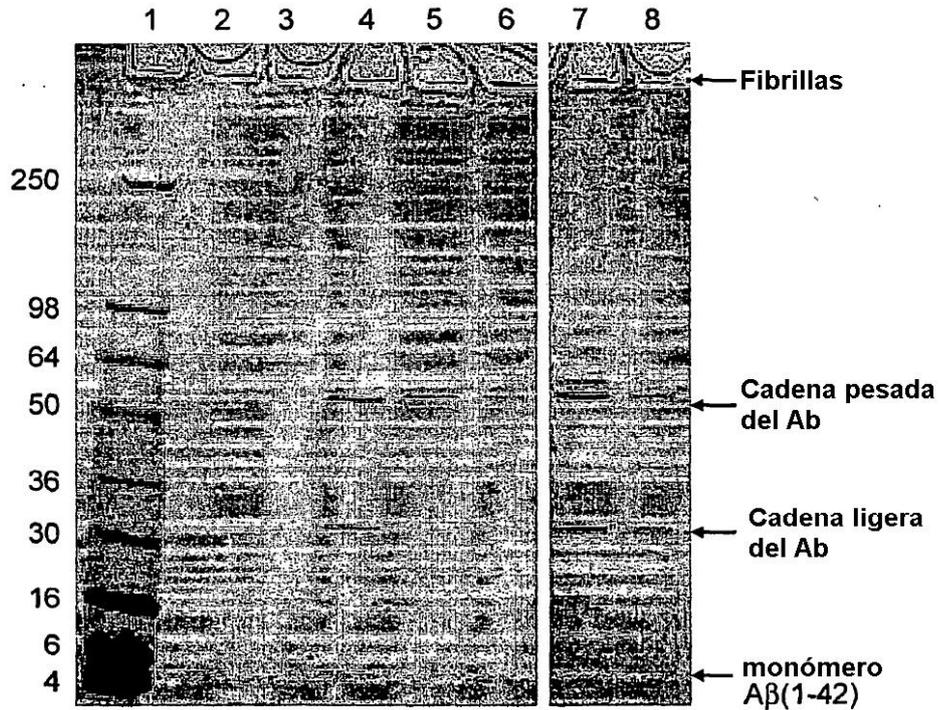


FIG.1



1. Marcador
2. Preparación de fibrillas control
3. Preparación de fibrillas ; + mMAb 6E10 ; 20h 37°C ; sobrenadante
4. Preparación de fibrillas ; + mMAb 6E10 ; 20h 37°C ; sedimento
5. Preparación de fibrillas ; + mMAb 4G8 ; 20h 37°C ; sobrenadante
6. Preparación de fibrillas ; + mMAb 4G8 ; 20h 37°C ; sedimento
7. Preparación de fibrillas ; + mMAb 8F5 ; 20h 37°C ; sobrenadante
8. Preparación de fibrillas ; + mMAb 8F5 ; 20h 37°C ; sedimento

FIG.2

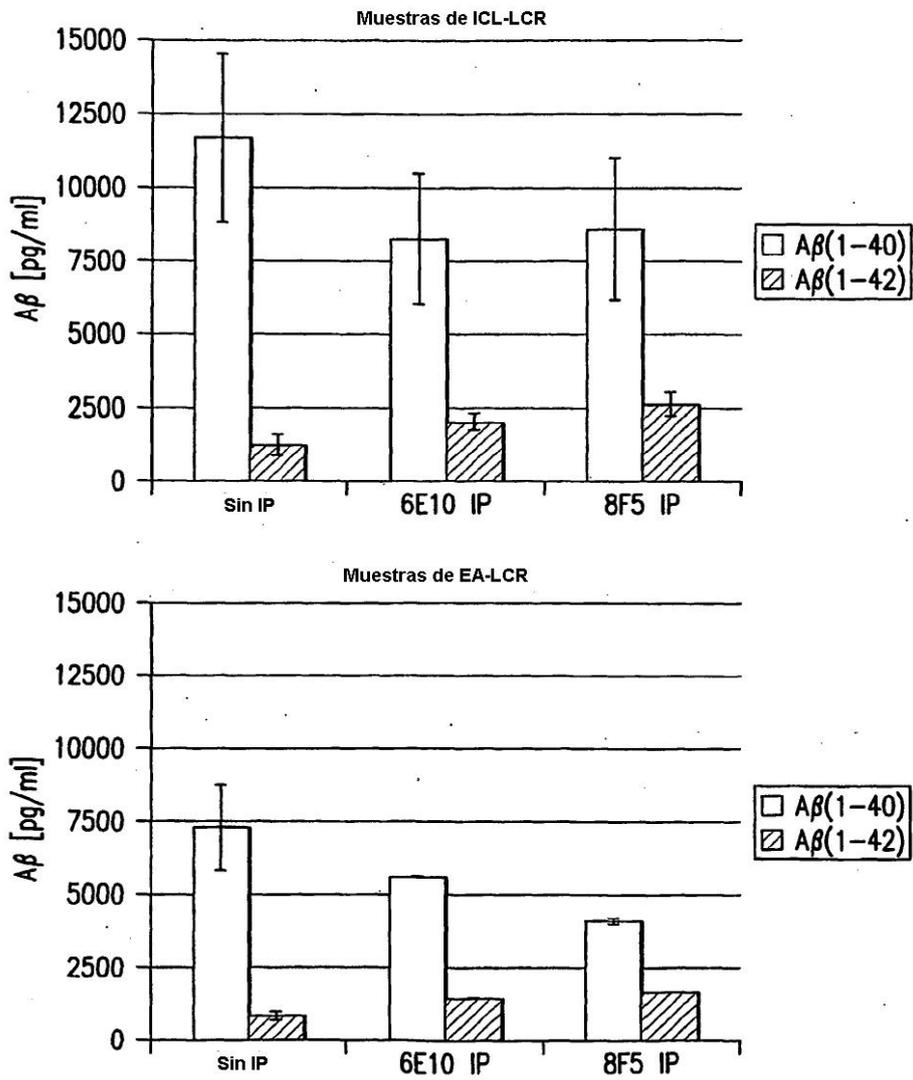


FIG.3

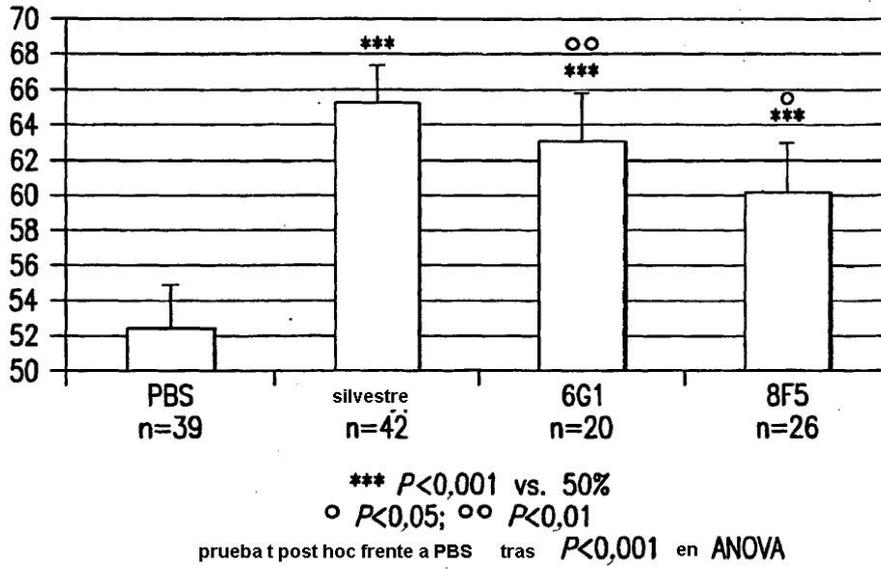


FIG.4

VH_8F5

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGCCC
TGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACITTCAGTAGCTATGGCATGTCT
TGGGTTCCGACACTCCAGACAAGAGGCTGGAATTGGTCGCAAGCATCAATA
GTAATGGTGGTAGCACCTATTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTCACCAT
CTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAG
TCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGTGGTACTACTGGGGCCAAG
GCTCCACTCTCACAGTCTCCTCA (SEC ID N° 1)

FIG.5A

VL_8F5

GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA
AGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTATATAGTAATGGAGACA
CCTATTTACATGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATC
TACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTG
GATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCT
GGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCTTGGACGTTCCGGTGGAG
GCACCAAGCTAGAAATCAAACGG (SEC ID N° 2)

FIG.5B

VH 8F5

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLELVASINSN
GGSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCASGDYWGQGST
LTVSS (SEC ID N° 3)

CDR1 (VH) = SYGMS (SEC ID N° 5)
CDR2 (VH) = SINSNGGSTYYPDSVKG (SEC ID N° 6)
CDR3 (VH) = SGDY (SEC ID N° 7)

FIG.6A

VL 8F5

DVVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVYSNGDTYLHWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLE
IKR (SEC ID N° 4)

CDR1(VL) = RSSQSLVYSNGDTYLH (SEC ID N° 8)
CDR2(VL) = KVSNRFS (SEC ID N° 9)
CDR3(VL) = SQSTHVPWT (SEC ID N° 0)

FIG.6B

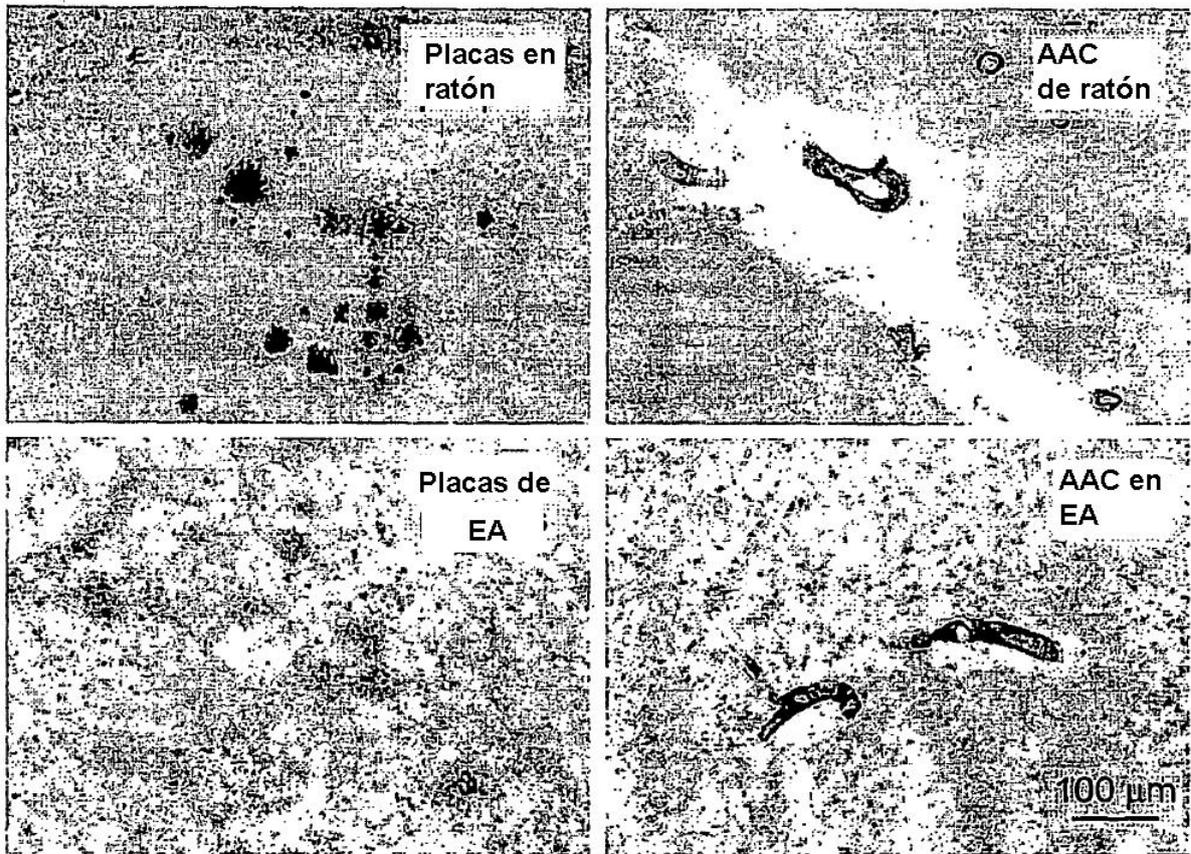


FIG.7A

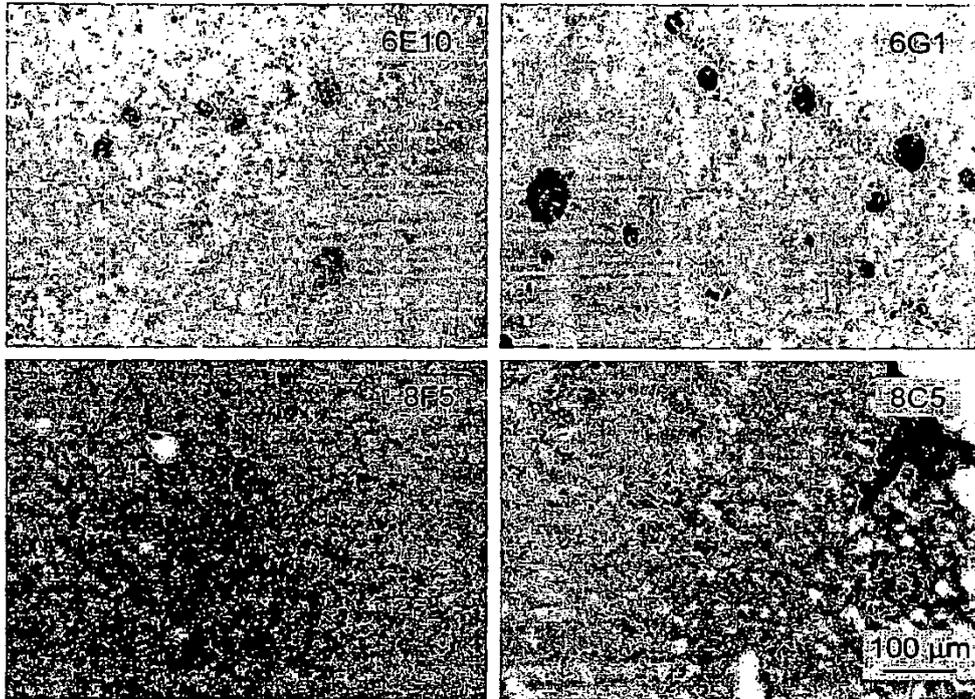


FIG.7B

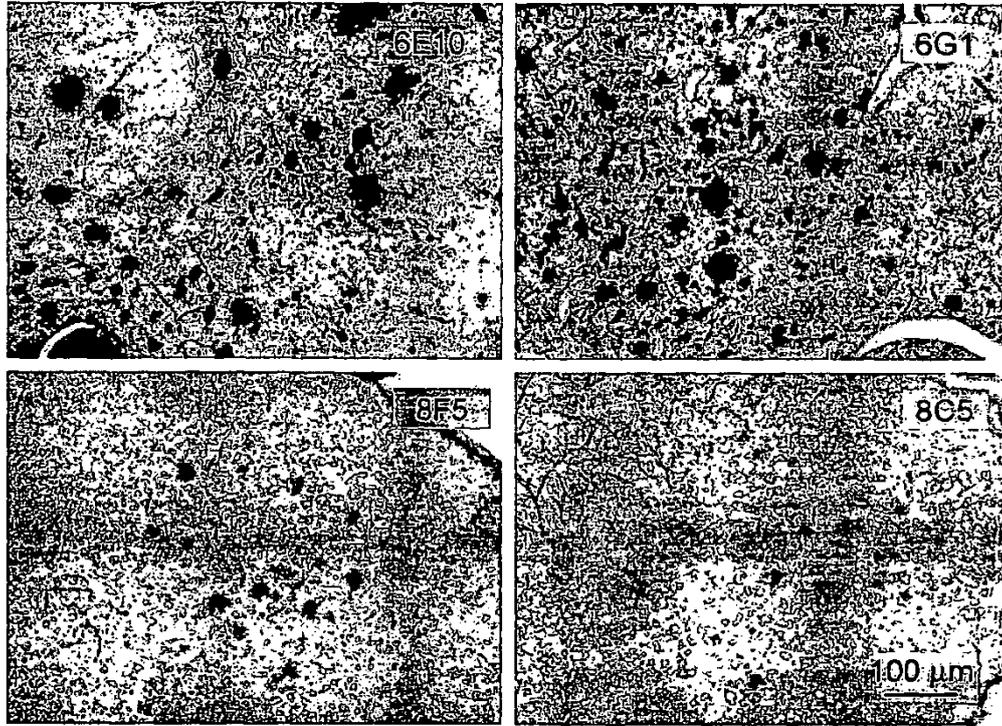


FIG.7C

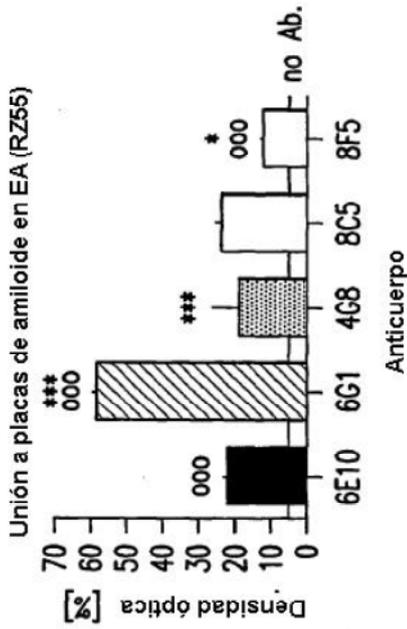


FIG.7F

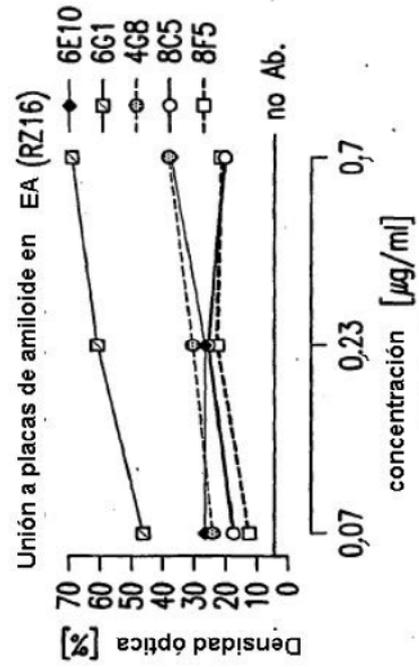


FIG.7G

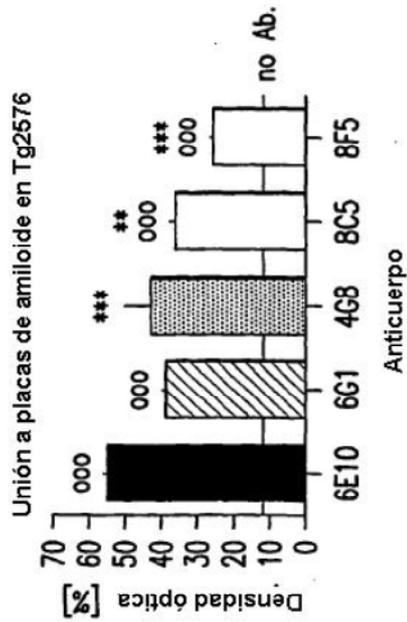


FIG.7D

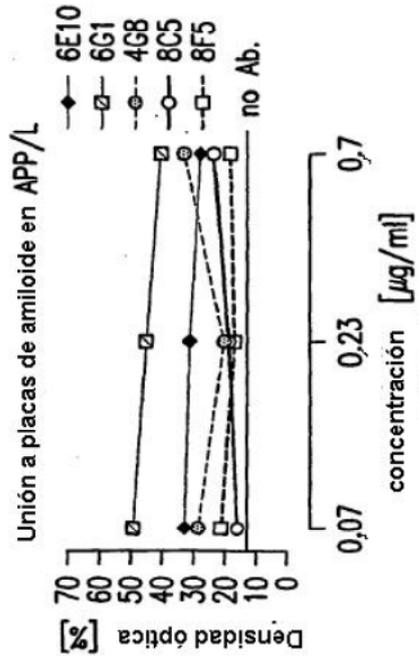


FIG.7E

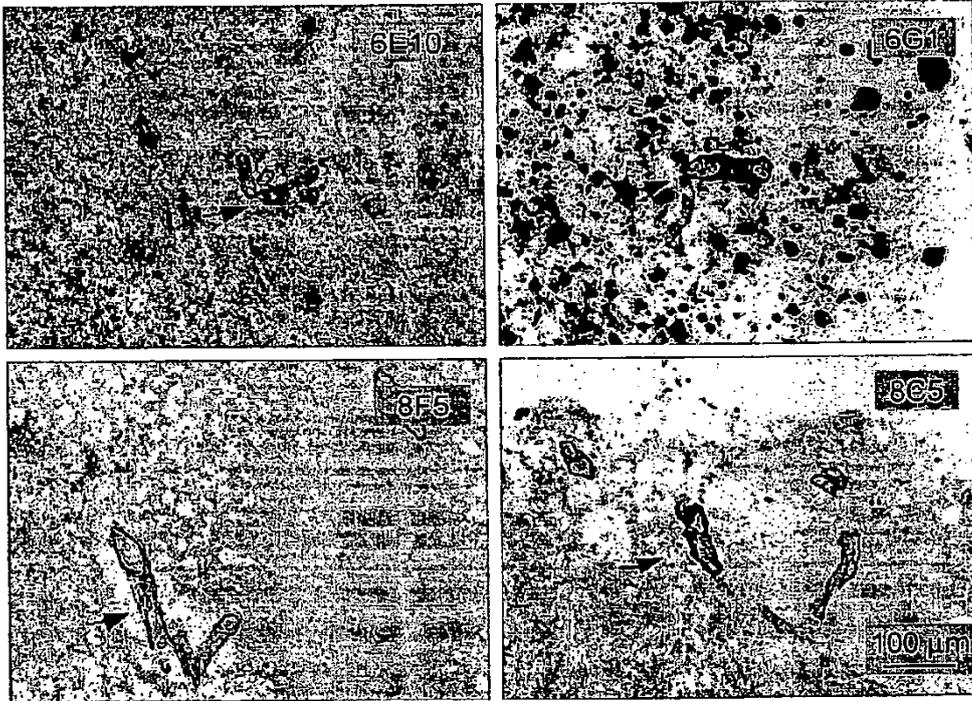


FIG.7H

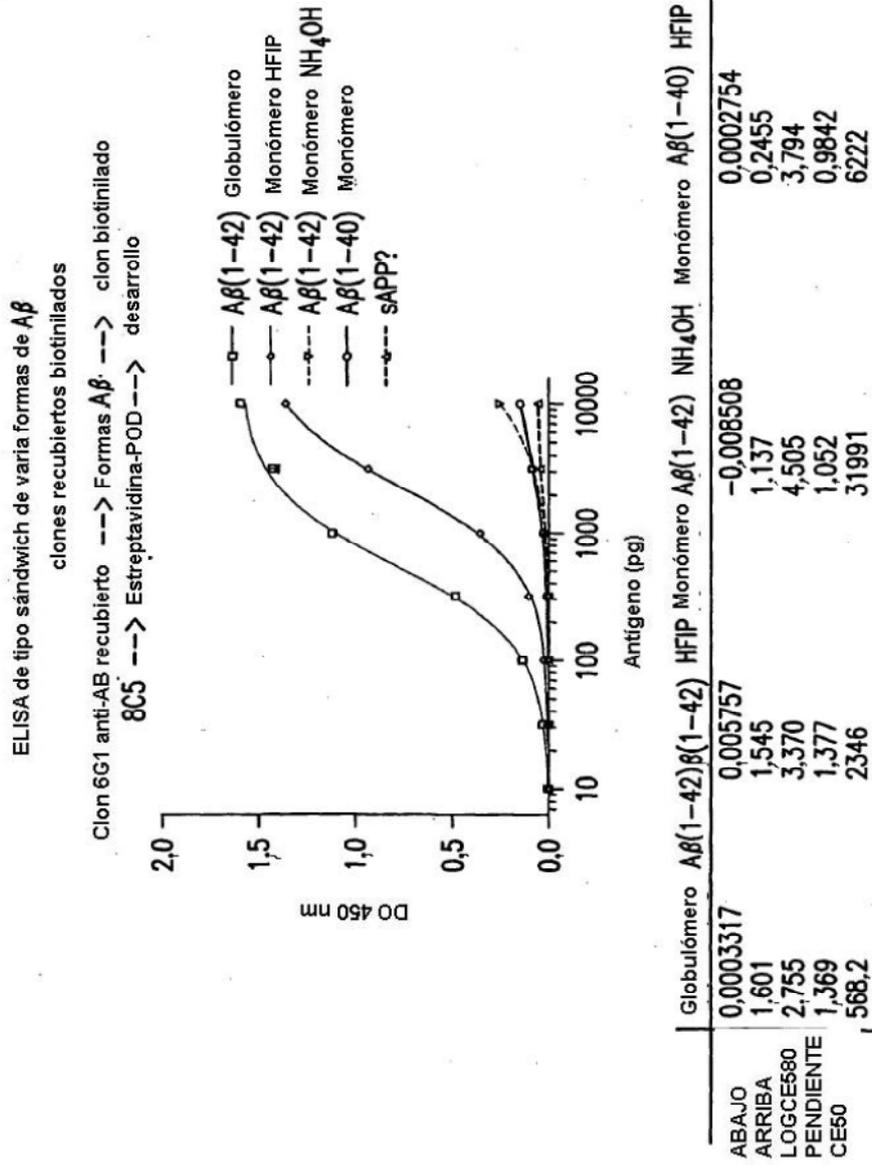


FIG.8

VH 8C5

GAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCC
TGAAACTCTCCTGTACAGCCTCTGGATTCACITTCAGTAGCTATGGCATGTCT
TGGGTTCCGACACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTTGGTCGCAAGTATTA
ATAATGGTGGTAGCACCTATTATCCAGACAGTTTGAAGGGCCGATTCACCAT
CTCCAGAGACAATGCCAAGAACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAG
TCTGAGGACACAGCCATGTATTATTGTGCAAGTGGGGATTACTGGGGCCAAG
GCACCACTCTCACAGTCTCCTCA (SEC ID N° 11)

FIG.9A

VL 8C5

GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA
AGCCTCCATCTCTTGACAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAGAC
ACCTTTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGAT
CTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTG
GATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCT
GGGAATTTATTTCTGCTCTCAGAGTATACATGTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAG
GCACCAAGCTGGAAATCAAACGG (SEC ID N° 12)

FIG.9B

VH 8C5

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLELVASIKNN
GGSTYYPDLSLKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCASGDYWGQGT
LTVSS (SEC ID N° 19)

CDR1 (VH) = SYGMS (SEC ID N° 13)

CDR2 (VH) = SIKNNGGSTYYPDSLKG (SEC ID N° 14)

CDR3 (VH) = SGDY (SEC ID N° 15)

FIG.10A

VL 8C5

DVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGDTFLHWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSIHVPWTFGGGTKLEI
KR (SEC ID N° 20)

CDR1 (VL) = RSSQSLVHSNGDTFLH (SEC ID N° 16)

CDR2 (VL) = KVSNRFS (SEC ID N° 17)

CDR3 (VL) = SQSIHVPWT (SEC ID N° 18)

FIG.10B