

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 001**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2005 E 05753672 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 1781703**

54 Título: **Anticuerpos específicos para protofibrillas solubles de péptido beta amiloide y usos de los mismos**

30 Prioridad:

21.06.2004 SE 0401601

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

01.06.2015

73 Titular/es:

**BIOARCTIC NEUROSCIENCE AB (100.0%)
Warfvinges väg 39
112 51 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:

**GELLERFORS, PÄR y
LANNFELT, LARS**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 537 001 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 específicos para protofibrillas solubles de péptido beta amiloide y usos de los mismos

5 **1. Campo de la invención**

La presente invención se refiere al diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, en particular la enfermedad de Alzheimer, y otras enfermedades similares. Más precisamente, a anticuerpos que se unen específicamente a la proteína beta amiloide (A β) en su conformación de protofibrillas, tal como se define en las reivindicaciones.

10 **2. Antecedentes de la invención**

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo e irreversible que causa cognitiva, alteraciones cognitivas, de la memoria y del comportamiento. Es la causa más común de demencia en la población anciana que afecta a aproximadamente el 5 % de la población mayor de 65 años y al 20 % por encima de los 80 años de edad. La EA se caracteriza por un inicio insidioso y un deterioro progresivo de múltiples funciones cognitivas. La neuropatología involucra a los depósitos proteináceos argirofílicos tanto extracelulares como intracelulares. Los depósitos extracelulares, denominados placas neuríticas, consisten principalmente en la proteína beta amiloide (A β) rodeada de neuritas distróficas (procesos neuronales inflamados distorsionados). Los A β dentro de estos depósitos extracelulares son fibrilares en su carácter con una estructura de lámina β plegada. Los A β en estos depósitos se pueden teñir con ciertos colorantes, por ejemplo, Rojo Congo, y mostrar una ultraestructura fibrilar. Estas características, adoptada por el A β en su estructura fibrilar de las placas neuríticas, son la definición de la término genérico amiloide. La lesión patológica de la EA intracelular clásica es la maraña neurofibrilar (NFT), que consiste en estructuras filamentosas llamados filamentos helicoidales emparejados (PHF) compuestas por hebras retorcidas de la proteína tau asociada a los microtúbulos hiperfosforilados. Las placas neuríticas frecuentes y los depósitos de marañas neurofibrilares en el cerebro son los criterios diagnósticos de la EA, observados en la autopsia. Los cerebros de EA también muestran atrofia macroscópica del cerebro, pérdida de células nerviosas, inflamación local (microgliosis y astrocitosis) y a menudo angiopatía amiloide congófilica (CAA) en las paredes de los vasos cerebrales.

Dos formas de péptidos A β , A β 40 y A β 42, son la especie dominante en las placas neuríticas de EA (*Masters 1985*), mientras que A β 40 es la especie prominente en el amiloide cerebrovascular asociado con la EA (*Glennner 1984*). Las actividades enzimáticas permiten al A β que se forme continuamente a partir de una proteína más grande llamada la proteína precursora de amiloide (APP) tanto en sujetos sanos como en afectados por EA en todas las células del cuerpo. Dos importantes acontecimientos de procesamiento de APP a través de las actividades β - y γ -secretasa permiten la producción de A β , mientras que las actividades de una tercera enzima llamada α -secretasa impide la generación por escisión dentro de la secuencia de A β (*Selkoe, 1994; US5604102*). El A β 42 es un péptido de cuarenta y dos aminoácidos de longitud, es decir, dos aminoácidos más largo en el extremo C-terminal, en comparación con A β 40. A β 42 es más hidrofóbico, y se agrega más fácilmente en estructuras más grandes de péptidos A β tales como dímeros A β , tetrámeros A β , oligómeros A β , protofibrillas A β o fibrillas A β . Las fibrillas A β son hidrófobas e insolubles, mientras que las otras estructuras son todo menos hidrofóbicas y solubles. Todas estas estructuras moleculares más altas de los péptidos A β se definen individualmente en función de su aspecto biofísico y estructural, por ejemplo en microscopia electrónica, y sus características bioquímicas, por ejemplo, mediante el análisis de cromatografía de exclusión por tamaño / de transferencia de tipo western. Estos péptidos A β , particularmente A β 42, se ensamblarán poco a poco en diversas estructuras moleculares más altas de A β durante el período de vida. La EA, que es un trastorno fuertemente dependiente de la edad, se producirá antes en la vida si este proceso de ensamblaje se produce más rápidamente. Este es el núcleo de la "hipótesis de la cascada amiloide" de la EA que afirma que el procesamiento de APP, los niveles de A β 42 y su ensamblaje en estructuras moleculares más altas es una causa central de la EA. El resto de la neuropatología del cerebro con EA y los síntomas de la EA, como la demencia, se deben de alguna manera al A β o a las formas ensambladas del mismo.

A β puede existir en diferentes longitudes, es decir, 1-39, 1-40, 1-42 y 1-43 y tamaños de fragmentos, es decir, 1-28, 3-40 / 42, 11-40 / 42, 17-40 / 42 y 25- 35. Todos estos péptidos pueden agregarse y formar intermedios solubles y fibrillas insolubles, teniendo cada forma molecular una conformación estructural única y la propiedad biofísica. Por ejemplo, el A β 1-42 monomérico, es un péptido soluble y no tóxico de 42 aminoácidos, que se sugerido que participa en las funciones normales de la sinapsis. Bajo ciertas condiciones, el A β 1-42 puede agregarse en dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros hasta 12 unidades y formas oligoméricas superiores, todos con su propiedad fisicoquímica distinta tales como el tamaño molecular, la estructura EM y la forma molecular en AFM (microscopia de fuerza atómica). Un ejemplo de una forma de A β oligomérica soluble de peso molecular más alto es el de las protofibrillas (*Hartley 1999, waals 1999*), que tiene un peso molecular aparente > 100 kDa kDa y una estructura curvilínea de 4-11 nm de diámetro y <200 nm de longitud. Recientemente se ha demostrado que los péptidos A β solubles oligoméricos tales como las protofibrillas A β perjudican a la potenciación a largo plazo (LTP) (*Hartley, 1999*), medida de la plasticidad sináptica que se cree que refleja la formación de la memoria en el hipocampo (*Walsh 2001*). Además, oligómeros péptidos A β Arctic muestran mucho un efecto inhibitor de wtA β sobre LTP en el cerebro mucho más profundo, probablemente debido a su fuerte propensión a formar protofibrillas A β (*Klyubin 2003*).

También hay otras formas oligoméricas solubles descritas en la literatura que son claramente diferentes de las protofibrillas. Un de estas formas oligoméricas es ADDL (ligando difundible derivado de amiloide) (*Lambert 1998*). El análisis AFM de ADDL reveló especies globulares predominantemente pequeñas de 4,7 a 6,2 nm a lo largo del eje z con pesos moleculares de 17-42 kDa. (*Stine 1996*). Otra forma se denomina ASPD (amiloidesferoides). Los ASPD son oligómeros esféricos de A β 1-40. Los estudios de toxicidad mostraron que los ASPD esféricos > 10 nm eran más tóxicos que las formas moleculares inferiores (*Hoshi 2003*). Las fibrillas A β como la principal especie neurotóxica es incompatible con la pobre correlación entre la densidad de la placa neurítica y la puntuación de la demencia por EA y también con los modestos signos de neurodegeneración en ratones transgénicos APP actuales. Especies intermedias de A β solubles neurotóxicas y su sitio subcelular apropiado de formación y distribución podría ser el eslabón perdido que mejor explique la hipótesis del amiloide. Esta idea ha ganado apoyo por el reciente descubrimiento de la mutación Arctic (E693) de APP, que provoca EA de aparición temprana (US 2002/0162129 A1; Nilsberth y col., 2001). La mutación se encuentra dentro de la secuencia de péptidos A β . De este modo, los portadores de la mutación generarán variantes de los péptidos A β por ejemplo, Arctic A β 40 y Arctic A β 42. Tanto Arctic A β 40 como Arctic A β 42 se ensambalarán con mucha mayor facilidad en estructuras moleculares más altas (protofibrillas) que son solubles y no fibrilares. Por tanto, el mecanismo patogénico de la mutación Arctic sugiere que las protofibrillas solubles moleculares más altas producen EA.

2. 1 Diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer

2.1.1 Diagnóstico clínico

El diagnóstico clínico de la enfermedad de Alzheimer (e) es difícil de hacer, especialmente en las primeras etapas de la enfermedad. Hoy en día, el diagnóstico se basa en la historia clínica típica combinada con la exclusión de otras causas de demencia. Los centros clínicos con alta especialización pueden tener una precisión diagnóstica del 85-90 % en comparación con el diagnóstico neuropatológico. En las primeras etapas de la enfermedad, el cuadro clínico es vago y todavía no se han identificado marcadores de diagnósticos definitivos (*McKhann 1984*). El desarrollo de marcadores diagnósticos bioquímicos es importante por varias razones: para apoyar el diagnóstico clínico, para permitir a los médicos dar información adecuada a los pacientes y a sus familiares, para iniciar el tratamiento farmacológico y los cuidados, y en diversos aspectos de la investigación clínica.

2.1.2 Péptido β amiloide

Se han descubierto mutaciones patogénicas en los genes de la presenilina (PS) y de APP en familias con EA de inicio precoz heredada como un rasgo dominante (*Hardy 1992*). Los efectos de algunas de estas mutaciones ahora están bastante bien comprendidos. La mutación sueca de la EA (*Mullan 1992; Axelman 1994; Lannfelt 1994*) ha revelado un mecanismo patogénico para el desarrollo de la EA. Cuando una construcción de ADNc con esta mutación se transfectó en líneas celulares humanas, dio lugar a una liberación de A β soluble aproximadamente seis veces mayor (*Citron 1992, Cai 1993*). Además, los fibroblastos de individuos con la mutación sueca secretaron tres veces más A β en los medios en comparación con los fibroblastos de los no portadores (*Johnston 1994*). La sobreproducción de A β por lo tanto, parecía ser un factor importante en la patogenia de la enfermedad en esta familia sueca. Por lo tanto, se esperaba que los niveles de A β medidos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de miembros de la familia podrían diferenciar a los portadores de los no portadores de la mutación. Sin embargo, no se encontraron diferencias en los niveles de A β totales entre los grupos (14,5 \pm 3,3 ng / ml frente a 14,9 \pm 2,3 ng / ml) (*Lannfelt 1995*). Una explicación de este resultado puede ser que A β se elimina del LCR mediante la agregación de amiloide en el cerebro. Sin embargo, hubo una fuerte correlación entre la duración de la demencia y la disminución de los niveles de A β . Estas mediciones se realizaron con anticuerpos que reconocen el A β soluble monomérico. Con anticuerpos monoclonales específicos de protofibrillas será posible realizar mediciones más precisas de las especies tóxicas.

2.1.3 A β en plasma

A β se encuentra en una forma soluble en el plasma y en otros tejidos (*Seubert 1992*), y no como se ha presumido anteriormente, sólo en los cerebros de los casos de EA. Los niveles plasmáticos de A β en miembros de la familia con la mutación sueca revelaron que tanto A β 40 como A β 42 eran 2-3 veces mayores en los portadores de mutación (*Scheuner 1996*). La proporción de A β 42 del A β total fue de aproximadamente 10 % en ambos grupos, lo que está de acuerdo con experimentos realizados en cultivos de células con la mutación sueca. Los portadores de la mutación por debajo de la edad de inicio esperado de la enfermedad tenían los mismos niveles de A β que casos ya afectados. Esto indica que el metabolismo erróneo de APP puede desempeñar un papel importante en la patogenia precoz de la enfermedad.

2.1.4 A β 42 en el LCR en la enfermedad de Alzheimer

Ensayos ELISA que miden específicamente A β 40 y A β 42 en el LCR en casos de EA han dado resultados diferentes. Algunos investigadores (*Pirttilä 1994; Motter 1995*) han encontrado disminución de A β 42 en la EA, mientras que en un grupo se han encontrado niveles elevados en los casos tempranos en la progresión de la enfermedad. Los casos más dementes en un estudio tenían todos niveles muy bajos de A β 42. En conclusión, es muy probable que A β 42

esté aumentado temprano en el proceso de la enfermedad y que los niveles de A β 42 y A β 40 disminuyan durante la progresión de la enfermedad. El desarrollo de marcadores bioquímicos exactos de EA temprana es importante, especialmente cuando los tratamientos farmacológicos eficaces estén disponibles en el futuro. Probablemente, la terapia farmacológica debería iniciarse en una etapa temprana de la enfermedad, antes de que se produzcan daños graves en el cerebro. Por tanto, sería muy deseable una terapia que haga posible prevenir la progresión de la enfermedad a sus etapas posteriores.

2 Prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

También se han descrito anticuerpos que son específicos de las diferentes conformaciones de A β , tales como fibrillas de A β (O'Nuallain 2002), A β micelar (Kayed 2003), LDDA (M93, M94) (Lambert 2001).

Varios estudios preclínicos en modelos animales transgénicos han demostrado disminución de la carga de placas y las mejoras en la función de la memoria después de la inmunización activa o pasiva con anticuerpos producidos contra fibrillas (Shenk 1999, Janus 2000, Morgan 2000, Weiner 2000, Sigurdson 2001). Dado que las fibrillas están presentes en los depósitos patológicos que se producen tarde en el proceso de la enfermedad de Alzheimer, los anticuerpos Shenk solo pueden usarse para ralentizar la progresión de la enfermedad de Alzheimer cuando ya ha alcanzado sus etapas posteriores.

Recientemente ELAN Pharmaceuticals ha realizado un ensayo clínico de fase II en pacientes de Alzheimer con demencia leve a moderada con su vacuna AN 1792, que es una preparación agregada de wtA β 42 humano. El estudio tuvo que ser detenido debido a efectos secundarios en 5 % de los pacientes. El efecto secundario se consideró que se debía a meningioencefalitis inducida por linfocitos T (Nicholl 2003). Los objetivos de los medicamentos de la vacuna de ELAN eran fibrillas insolubles que se encuentran en las placas internas del cerebro y los depósitos en las paredes de los vasos sanguíneos del cerebro (angiopatía amiloide congoufílica, CAA), que son características comunes de la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, una respuesta inmune hacia las fibrillas insolubles podría ser responsable de la inflamación invasiva en las paredes de los vasos sanguíneos del cerebro que produce meningioencefalitis.

El documento WO02/203911 divulga el descubrimiento de la mutación Arctic en una familia sueca que conduce a la aparición temprana de la enfermedad de Alzheimer (55,6 años). La mutación Arctic (Glu > Gly), que se encuentra en la posición 22 en el péptido beta amiloide (A β), en combinación con diversos experimentos condujo a la idea de que el péptido A β era mucho más propenso a oligomerizar y formar protofibrillas en comparación con el A β 40 de tipo silvestre (wt). El descubrimiento indica por primera vez que la protofibrillas es un componente central en el proceso de la enfermedad, y que la EA podría tratarse mediante la reducción de la cantidad de protofibrillas en el cerebro. Esta propiedad única de la mutación Arctic podría usarse después para generar protofibrillas. Después, el documento WO02/203911 sugirió que dichas protofibrillas podrían utilizarse para inmunizar un ratón u otro animal, a fin de generar anticuerpos, después de lo cual cualquier anticuerpo monoclonal específico de protofibrillas podría identificarse mediante detección selectiva. Dichos anticuerpos deben ser específicos de un péptido A β de SEC ID N° 1 (página 7, párrafo tercero), es decir, un péptido portador de la mutación Arctic y que tiene una conformación de protofibrillas.

Por lo tanto, en vista de las técnicas de la técnica anterior para la prevención y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, hay una necesidad de una técnica que permita la detección temprana de los marcadores de la enfermedad de Alzheimer. Si dichos marcadores pudieran prevenirse sin causar efectos secundarios negativos, esto sería un medio para prevenir y tratar la enfermedad de Alzheimer en una etapa temprana. Cualquier tratamiento de la enfermedad de Alzheimer que reduciría la cantidad de protofibrillas en el cerebro de pacientes con AD, sería de valor terapéutico significativo.

3. Descripción de la invención

Las protofibrillas se producen temprano en la enfermedad de Alzheimer, cuando se ha producido poco daño cerebral. Un tratamiento con anticuerpos que reduzca los niveles de protofibrillas en el cerebro salvará al cerebro de la destrucción neuronal y, por tanto, será más ventajoso para los pacientes de Alzheimer. La presente invención describe el desarrollo de este tipo de anticuerpos específicos de protofibrillas terapéuticos.

Según un aspecto, la presente invención se refiere a anticuerpos que tienen la propiedad de unirse tanto a A β 42 de tipo silvestre como a A β 42 son protofibrillas (anticuerpos específicos de conformación) y que son adecuados para el desarrollo de productos farmacéuticos para la enfermedad de Alzheimer, dirigidos contra las protofibrillas A β 42 de tipo silvestre. Las ideas actuales en el campo de la investigación de la enfermedad de Alzheimer es que las fibrillas A β son la principal causa de la enfermedad. Por lo tanto, el enfoque de la presente invención contradice la opinión general en el campo.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere también a una composición que comprende dicho anticuerpo y, opcionalmente, un vehículo o excipiente.

Para inmunizar y detectar los anticuerpos anti-protofibrillas específicos de conformación, es necesario para producir protofibrillas puras A β 42arc y A β 42 (> 95 % de grado de pureza). A fin de obtener dicha preparación de protofibrillas puro, también es necesario poder estabilizar las protofibrillas, de tal manera que se las protofibrillas permanecen y no se separan en monómeros ni se agregan en fibrillas. También es necesario encontrar un solvente que hiciera posible separar las protofibrillas mediante cromatografía en columna. Otra necesidad es la capacidad para analizar dicha pureza antes de la inmunización. Las capacidades antes mencionadas son esenciales, ya que el grado de pureza del antígeno (protofibrillas) decidir la posibilidad de producir anticuerpos anti-protofibrillas específicos de conformación, que a su vez deciden la posibilidad de detección de anticuerpos con especificidad útil. Si la preparación, por ejemplo, contiene 50 % de A β monómero y 50 % de A β protofibrilla, solo es posible afirmar que la unión del anticuerpo a dicha preparación se puede unir ambas formas o solo una. Todas dichas características necesarias se proporcionan por la presente invención.

Las características mencionadas anteriormente no eran posibles cuando se presentó el documento WO02/203911. El método de análisis de HPLC reveló que la presente solicitud o cualquier otro método de análisis no se había desarrollado, por lo cual no era posible determinar si el péptido A β 42arc en realidad formada protofibrillas, probablemente debido a la falta de unión a protofibrillas. Solo era una hipótesis en el momento. Las principales razones por las que el documento WO02/203911 no pudo analizar y purificar la preparación de protofibrillas a un grado de pureza de > 95 %. Además, el hecho de que ellos no sabían cómo estabilizar las protofibrillas. A este respecto, también debe mencionarse que las protofibrillas son muy difíciles de manejar en comparación con, por ejemplo, los péptidos A β 40. A β 42, pero en particular el péptido A β 42Arc, es extremadamente difícil de manejar, ya que se adhieren a tubos de ensayo y columnas y se agregan en fibrillas. Los últimos problemas se han resuelto por la presente invención mediante la provisión de métodos para estabilizar las protofibrillas que implican bajas temperaturas y disolventes seleccionados. El documento WO02/203911 203911 tampoco tenía medios para probar la pureza de las protofibrillas antes de la inmunización. Esto es posible con la presente invención mediante la provisión de un método nuevo de HPLC (exclusión por tamaño). Además de esto, el documento WO02/203911 no proporcionó ningún medio para comprobar la especificidad por las protofibrillas de los anticuerpos seleccionados. La presente invención hace esto posible por la provisión de un nuevo método de Elisa. El documento WO02/203911 solo podía producir protofibrillas A β 40arc impuras y transitorias, no útiles para el desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos de protofibrillas (el documento WO02/203911 solo describe el análisis de los péptidos A β 40 y A β 40Arc, véase el Ejemplo 3).

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención son particularmente adecuados para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, ya que: i) se dirigirán y eliminará la forma A β más tóxica (protofibrilla), ii) proporcionará una oportunidad para tratar la enfermedad temprano ya que las protofibrillas se desarrollan temprano en el proceso de la enfermedad, iii) evitarán los efectos secundarios ya que no habrá reacción cruzada significativa con las fibrillas A β presentes en la pared del vaso sanguíneo del cerebro (CAA = Angiopatía amiloidogénica congoufílica).

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden ser humanos o humanizados, monoclonales o policlonales. La presente invención también se refiere a fragmentos biológicamente activos de dichos anticuerpos, con la condición de que todavía tengan las propiedades reivindicadas.

Los anticuerpos frente a protofibrillas A β específicos de acuerdo con la presente invención también se pueden usar para cuantificar las protofibrillas A β 42 de tipo silvestre en fluidos biológicos, por tanto, los anticuerpos serán adecuados para el diagnóstico clínico en una etapa temprana de la enfermedad y adecuado como un biomarcador para supervisar la eficacia en clínica estudios.

Además, la invención describe procedimientos para generar protofibrillas A β 42 tipo silvestre y A β 42arc como antígenos para la inmunización y para los reactivos para la detección de anticuerpos que se unen a las protofibrillas A β 42arc y A β 42 de tipo silvestre. Es muy importante determinar la pureza del antígeno (protofibrillas) es muy importante en experimentos de cribado de anticuerpos, ya que afecta a las determinaciones de la especificidad del anticuerpo por ELISA.

Para evaluar la pureza de una preparación antigénica (protofibrillas A β 42arc y A β 42 de tipo silvestre) se ha desarrollado un método de HPLC de exclusión por tamaño. El método HPLC inventado utiliza un detergente, con baja interferencia óptica en la cromatografía. El detergente tiene la ventaja de que elimina interacciones de las protofibrillas A β 42arc y A β 42 de tipo silvestre con la matriz de la columna, evitando la pérdida de material y que el material se adhiera a la columna, y estimaciones erróneas de la pureza de las protofibrillas. Además, el detergente es compatible con protofibrillas A β y no solubiliza en los monómeros A β ni altera su perfil biológico. Se ha encontrado que el polisorbato (Tween) es un detergente adecuado, en particular, Polisorbato-80 (Tween-80). Otros detergentes con propiedades similares son también útiles.

El anticuerpo según la presente reacciona de forma cruzada de menos de 50 % con fibrillas A β . Dicho anticuerpo puede detectar las protofibrillas A β de tipo silvestre y Arctic A β en un ELISA en un intervalo de concentración de 1.000 a 10 ng / ml (véase el Ejemplo 5 y las Figuras 4A-C). En un ELISA optimizado o por otros sistemas de detección con mayor sensibilidad, por ejemplo, unión por proximidad, dicho nivel de detección probablemente podría bajarse hasta un nivel de detección de 1 a 0,1 ng / ml.

La presente invención proporciona un método para generar anticuerpos que son específicos de las protofibrillas de β amiloide (A β) (oligómeros de A β no fibrilares solubles de alto peso molecular no fibrilares). Los anticuerpos se producen contra A β en su conformación de protofibrilla. Estos anticuerpos se pueden administrar a pacientes con EA para reducir los niveles de protofibrillas en el cerebro, lo que será de valor terapéutico significativo.

La disminución de los niveles de protofibrillas podría ocurrir a través de la eliminación del antígeno cuando se une a un anticuerpo a través de fagocitosis mediada por microglia. Este es un proceso biológico bien documentado, que se produce a través de la unión de la región constante de anticuerpo (Fc) a un receptor de Fc en las células microgliales. La unión induce la fagocitosis (internalización y destrucción) del anticuerpo y su antígeno unido (protofibrillas) que conduce a niveles reducidos de protofibrillas en el cerebro. Otros procesos mediados por receptores no-Fc también pueden eliminar el antígeno (protofibrillas).

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para sintetizar protofibrillas A β que se van a usar como antígeno para la inmunización. La síntesis se puede hacer a partir de A β (wtA β) de tipo silvestre o, alternativamente, de tipo no silvestre, formas de A β mutadas o modificadas. En una realización preferida de la invención, pero no limitado a dicha forma de realización, la síntesis se inicia disolviendo wtA β 1-42 en un agente de disociación, por ejemplo NaOH, para lograr una solución homogénea A β , de aproximadamente 50-500 μ M en la concentración de péptido, pero no limitado a esta concentración. Agentes alternativos con la disociar para disociar son, por ejemplo, dimetilsulfóxido, DMSO; hexafluoroisopropanol, HFIP; ácido trifluoroacético, TFA. El truncamiento puede ser de 1-10 aminoácidos, dando formas de wtA β tales como: wtA β 2-42, wtA β -42, wtA β 4-42, wtA β 5-42 y así sucesivamente. El péptido wtA β 1-42 disuelto se neutraliza posteriormente con PBS o tampón fisiológico similar y se incuba a temperatura más alta, preferiblemente a 37 °C, durante un período de tiempo suficiente para que se produzca la formación de protofibrillas-a, por ejemplo durante la noche. Esto dará lugar protofibrillas A β de tipo silvestre. La invención también proporciona un determinación del tamaño molecular (peso molecular) para evaluar la formación y la pureza de las protofibrillas, preferiblemente, pero no limitado a, un método cromatográfico de exclusión por tamaño (SEC).

El método de síntesis del antígeno de las protofibrillas tipo silvestre (wtA β 42) puro comprende las etapas de disolver un wtA β 42 mediante el uso de un agente de disociación, tal como NaOH (pH > 10), dimetilsulfóxido, DMSO; hexafluoroisopropanol, HFIP; ácido trifluoroacético y TFA, para lograr una solución monodispersa, neutralizar la solución por PBS (pH 7-8) o tampones biocompatibles similares, para lograr una solución fisiológica, incubar la solución de péptido wtA β 42 neutralizado a una concentración de proteína elevada entre 1-1000 μ M, preferiblemente 440 μ M, durante 6 horas o más a 20-40 °C, preferiblemente 37 °C, para formar protofibrillas A β 42wt, diluir las protofibrillas a aproximadamente 1-500 μ M, preferiblemente a 50 μ M centrifugando a velocidad y tiempo suficientes para sedimentar las fibrillas wtA β 42, lo que normalmente tarda 5 minutos a 17.000 g a + 4 C, evaluar la pureza de la preparación de protofibrillas mediante HPLC para controlar que la pureza sea > 95 %, usando, por ejemplo, HPLC de exclusión por tamaño, utilizando un tampón fisiológico tal como PBS a pH neutro como tampón de carrera, incluyendo un detergente, tal como polisorbato (Tween), o detergente similar, para evitar que las protofibrillas se peguen a la matriz de la columna y la disociación.

Otro aspecto de la invención se refiere a la síntesis de protofibrillas A β de tipo no silvestre usando A β 1-42, o formas truncadas en N-terminal (1-10 truncamientos), ya sea con la mutación Arctic G22E (documento US 2002-0162129 A1), la mutación holandesa EP22Q, la mutación flamenca, la mutación italiana E22K, la mutación de Iowa D23N y combinaciones de los mismos. En una realización preferida de la invención se usa el péptido A β 42arc (es decir, que comprende la mutación arc tic). El método para hacer protofibrillas A β 42arc es similar al de las protofibrillas wtA β 42 excepto que las protofibrillas A β 42arc no se incuban a 37 °C durante la noche ya que se forman espontáneamente después de la etapa de neutralización.

El método de síntesis del antígeno de las protofibrillas A β 42arc puro comprende las etapas de disolver un péptido A β 42arc mediante el uso de un agente de disociación, tal como NaOH (pH > 10), dimetilsulfóxido, DMSO; hexafluoroisopropanol, HFIP; ácido trifluoroacético y TFA, para lograr una solución monodispersa, neutralizar la solución por PBS (pH 7-8) o tampones biocompatibles similares, para lograr una solución fisiológica, estabilizar las protofibrillas formadas de forma espontánea manteniéndolas a menos de 20 °C, preferentemente a 0 – 5 °C, centrifugar las protofibrillas a la misma temperatura que en la etapa de estabilización a una velocidad y tiempo suficientes para sedimentar las fibrillas de A β 42arc, lo que normalmente tarda 5 minutos a 17.000 g a + 4 C, evaluar la pureza de la preparación de protofibrillas mediante HPLC para controlar que la pureza sea > 95 %, usando, por ejemplo, HPLC de exclusión por tamaño, utilizando un tampón fisiológico tal como PBS a pH neutro como tampón de carrera, incluyendo un detergente, tal como polisorbato (Tween), o detergente similar, para evitar que las protofibrillas se peguen a la matriz de la columna y la disociación.

Otro aspecto de la invención se refiere al desarrollo de anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con las protofibrillas A β 42 de tipo silvestre después de la inmunización con protofibrillas A β 42arc.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para estabilizar las protofibrillas A β y donde la estabilización puede evaluarse mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Las protofibrillas A β eluyen después de 12-13 minutos en un pico uniforme sobre una columna Superdex 75 o de exclusión por tamaño similar. La

estabilidad de la conformación también se puede evaluar mediante tinción con Rojo Congo y (microscopia electrónica, donde las protofibrillas alcanzan una estructura curva lineal de 6-10 nm de diámetro y < 200 nm de longitud. La disminución de la temperatura tiene un efecto significativo en la estabilidad conformacional de las protofibrillas A β . Las muestras deben mantenerse preferentemente por debajo de 20 °C, preferiblemente por debajo de 5 °C, y lo más entre 0 °C y 5 °C. Adicionalmente, los agentes que disminuyen la polaridad o la tensión superficial o aumentan la viscosidad tienen efectos estabilizantes sobre la conformación de las protofibrillas A β . Por ejemplo, 10 a 50 % de glicerol o 0,6-5 % de polisorbato (Tween) tienen efectos estabilizadores en las protofibrillas A β . Estos agentes y tratamientos pueden añadirse a la preparación de protofibrillas A β preferiblemente después de la etapa de neutralización en el método para sintetizar protofibrillas A β descrito anteriormente. La adición de estos agentes antes de esta etapa también es posible. El aumento de la estabilidad de las protofibrillas es ventajoso al desarrollar anticuerpos monoclonales y cuando se usan protofibrillas A β como reactivos en inmunoensayos, tales como ELISA, radioinmunoensayo (RIA), transferencia Western o transferencia de puntos.

El método de estabilización de las protofibrillas A β incluye mezclarlas con un agente que disminuya la polaridad del disolvente o uno que disminuya la tensión superficial, tal como glicerol o polisorbato (Tween), o una combinación de dichos agentes. La estabilización también se puede lograr manteniendo las protofibrillas a una temperatura por debajo de 20 °C, preferiblemente 0-5 °C. Dichos métodos también se pueden combinar.

La invención se refiere además a al uso de anticuerpos específicos de las protofibrillas anti-A β para las determinaciones de protofibrillas A β en tejidos humanos y animales, por ejemplo, en líquido cefalorraquídeo, sangre, suero, orina y tejido cerebral, pero no se limita a estos tejidos, proporcionando un posible método de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer. Los métodos adecuados para el ensayo de las protofibrillas A β en estos tejidos así como en cultivos de células utilizando un anticuerpo anti- protofibrillas A β son inmunoensayos tales como ELISA, RIA, transferencia western o, transferencia puntual o unión por proximidad. El método sería adecuado para seguir la eficacia del tratamiento (reducción de protofibrillas) en los ensayos clínicos y adecuados como prueba de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer o el síndrome de Down.

El método de diagnóstico o monitorización de la enfermedad de Alzheimer (EA) o el síndrome de Down comprende las etapas de marcar el anticuerpo de acuerdo con la presente invención con un agente que puede generar una señal medible, administrar dicho anticuerpo de acuerdo con un sujeto que tiene o se sospecha que tiene EA o síndrome de Down, medir la cantidad de protofibrillas unidas al anticuerpo mediante la medición de la señal generada por el agente.

La invención además se refiere al uso de un anticuerpo anti- protofibrillas A β en formación de imágenes para la detección, localización y cuantificación de protofibrillas A β en tejidos humanos y animales. El anticuerpo anti- protofibrillas A β podría marcarse con un ligando radiactivo tal como I¹³¹, C¹⁴, H³ o Galio⁶⁸, pero no se limitan a estos radioisótopos, para fines de detección. Además del marcaje con marcadores radiactivos, también se podían usar ADN, moléculas fluorescentes, enzimas que convierten un sustrato de tal manera que su absorbancia se pueda medir. El método será adecuado como una herramienta de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer o el síndrome de Down, la demencia por cuerpos de Lewy, la demencia vascular, y otros trastornos neurodegenerativos.

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de un anticuerpo anti- protofibrillas A β para la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Los estudios preclínicos en modelos animales transgénicos han demostrado efectos sobre la carga de la placa (*Bard 2000*), inversión del déficit de memoria (*Dodard 2002*) y drenaje de A β del SNC después de tratamiento con anticuerpos anti-A β . Sin embargo, los anticuerpos utilizados en estos estudios no han sido específicos de las protofibrillas A β . La administración de un anticuerpo anti- protofibrillas A β , con poca o ninguna reactividad cruzada con los monómeros y fibrillas A β sería especialmente adecuada para el tratamiento y la prevención de la enfermedad de Alzheimer. En primer lugar, no se uniría significativamente a las formas fibrilares de A β y evitaría la interacción con los depósitos fibrilares que son frecuentes en las paredes de los vasos sanguíneos, evitando cortar inmunorreacciones con inflamación grave del cerebro y encefalitis, que se encontró en el estudio de vacunación de ELAN (véase al final de los Antecedentes) con la vacuna AN-1792 (*Nicol 2004*). En segundo lugar, un anticuerpo anti- protofibrillas A β con baja reactividad cruzada con el monómero A β 1-40 y A β 1-42 no se uniría e interferiría con sus funciones biológicas normales, evitando así los efectos secundarios.

En dicho método de prevención o tratamiento de un sujeto con enfermedad de Alzheimer o con síndrome de Down que tiene o se sospecha que tiene enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, demencia con cuerpos de Lewy, demencia vascular, y otros trastornos neurodegenerativos, se administra el anticuerpo o composición de acuerdo con la presente invención.

La invención también proporciona una técnica mediante la cual los anticuerpos anti- protofibrillas A β se pueden utilizar para identificar y seleccionar epítomos presentes en protofibrillas A β pero menos en los monómeros A β y fibrillas A β u otras formas conformacionales A β . El método es general y es aplicable a otros amiloides que forman protofibrillas tales como, entre otros, el péptido de la proteína amiloide de los islotes (IAPP, amilina) asociado con la diabetes tipo 2, la proteína prión (PrP), alfa-sinucleína (Parkinson). Teniendo en cuenta el papel central de las protofibrillas de beta amiloide (A β) en la enfermedad de Alzheimer, estos anticuerpos pueden utilizarse para diagnosticar o tratar la enfermedad de Alzheimer. Hay una necesidad de un método que específicamente pueda

determinar las protofibrillas en diferentes tejidos humanos y animales tales el líquido cefalorraquídeo (LCR), plasma, sangre, orina y tejido cerebral, pero no se limita a estos tejidos. Tal método podría ser utilizado como un método de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer, aunque también para enfermedades similares que formen protofibrillas amiloides, incluyendo Parkinson (alfa-sinucleína) (Sthilerman 2002), diabetes de tipo 2 (polipéptido de amiloide de los islotes IAPP) (documento WO03/092619 A2), y la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob y la correspondiente enfermedad animal denominada enfermedad de las vacas locas (proteína prión) (DeMarco 2004), pero no se limita a estas enfermedades.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de anticuerpos anti-protofibrillas A β para detección selectiva *in vitro* o *in vivo* de sustancias que inhiben o modulan los niveles de protofibrillas A β y / o actividad en cultivos celulares o modelos animales, siendo posibles fármacos para el Alzheimer. Los sistemas de detección adecuados serían, entre otros, cultivos celulares (HEC o células de neuroblastoma) o, por ejemplo el modelo de ratón transgénico Thy-1 APPSweArc, (Nilsson y col., Solicitud de patente sueca 0400707-6, 2004) que expresa la proteína humana precursora de amiloide (APP) con la mutación Arctic (E693G) que proporciona una mayor producción de protofibrillas A β . Los fármacos candidatos para el Alzheimer se pueden administrar a estos cultivos celulares o modelos animales transgénicos y sus efectos sobre los niveles de protofibrillas A β se pueden medir mediante un inmunoensayo, usando un anticuerpo anti-protofibrillas A β como reactivo. Tal método sería idealmente adecuado para la identificación de potentes candidatos a fármacos frente al Alzheimer.

Dicho método para *detección vitro* o *en vivo* de sustancias que inhiben o modulan los niveles de protofibrillas A β y / o su actividad en cultivos celulares o modelos animales, comprende las etapas de administrar posibles fármacos candidatos a un cultivo celular o un modelo animal, administrar el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de la presente invención, marcado con un agente que puede generar una señal medible, a dicho cultivo celular o modelo animal, evaluar el efecto de dichos fármacos candidatos mediante la medición de la cantidad de protofibrillas unidas al anticuerpo mediante la medición de la señal generada por el agente.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de detección de protofibrillas A β *in vitro*, que comprende marcar de acuerdo con la presente invención con un agente que puede generar una señal medible, poner en contacto dicho anticuerpo o la composición que comprende el anticuerpo con una muestra biológica que se sospecha que contiene protofibrillas solubles, medir la cantidad de protofibrillas unidas al anticuerpo mediante la medición de la señal generada por el agente. Dicho método puede ser un inmunoensayo. Las muestras biológicas analizadas pueden seleccionarse a partir de plasma, LCR, cerebro y otros tejidos de origen animal o humano. El marcaje incluye marcar con marcadores radiactivos, también se podían usar ADN, moléculas fluorescentes, enzimas que convierten un sustrato de tal manera que su absorbancia se pueda medir. Todos los porcentajes en la descripción se refieren al porcentaje en volumen, a menos que se indique lo contrario.

4. Descripción de los dibujos

Figura 1. Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) del monómero A β 40 humano, protofibrilla A β 42Arc, protofibrilla wtA β 42 y preparaciones de fibrillas wtA β 42

Los monómeros A β Humanos y las protofibrillas A β eluyen en 19-20 minutos y a 12-13 minutos, respectivamente. Las preparaciones de protofibrillas (B y C) están esencialmente libres (< 3 %) de contaminación de otras formas de A β conformacionales. El análisis de la preparación de fibrillas (D) se hizo después de centrifugación a 17.900 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se analizó el sobrenadante que demuestra la ausencia casi completa de cualquier forma A β solubles en la preparación de fibrillas.

Figura 2. Estudio de estabilidad de las protofibrillas

La estabilidad de las protofibrillas A β 42Arc y las preparaciones de protofibrillas wt42 se mediante SEC. Una conversión de protofibrillas en fibrillas se evaluó mediante una disminución en el área del pico de las protofibrillas (disminución de la absorbancia (AU) a 214 nm, tiempo de elución 12-13 minutos). La adición de 10-50 % de glicerol, 0,6 % de Tween-20 o el almacenamiento a 0-5 °C, todo aumentó la estabilidad de las protofibrillas de manera significativa.

Figura 3. Titulación de suero de ratón después de la inmunización con protofibrillas wtA β 42

Se inmunizó a ratones con una preparación de protofibrillas wtA β 42 en adyuvante completo de Freund (primera inyección) y adyuvante incompleto de Freund (5-6 refuerzos). Se recogió sangre y se determinaron los títulos de anticuerpos contra protofibrillas A β . Ratón n° 2 y n° 4 mostraron los títulos más altos.

Figura 4. Método de ELISA de tipo sándwich usando anti-AcMo 258 para la determinación de protofibrillas A. Se recubrió una placa de microtitulación durante la noche con el AcMo 258. Se añadieron preparaciones de protofibrillas wtA β 42, protofibrillas A β 42Arc, monómeros wtA β 40 y fibrillas wtA β 42 en concentraciones decrecientes y se incubaron durante 1 hora a + 4 °C. Se añadió anticuerpo anti-A β secundario (6E10). Finalmente, a cada pocillo se añadió un anticuerpo de detección conjugado con ALP (fosfatasa alcalina) anticuerpo conjugado (anti-IgG). La detección se logró mediante la adición de sustrato de ALP. La formación de color se midió a 405 nm y a 492 nm.

El AcMo 258 se unió a las protofibrillas wtA β 42 y un poco menos a las protofibrillas A β 42Arc. No se observó unión a monómeros de wtA β 40. La ligera de unión a fibrillas wtA β 42 se debe probablemente a una ligera contaminación con protofibrillas wtA β 42 (véase la Figura 1 D).

5. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustración y no están destinados a limitar la invención a los ejemplos específicos proporcionados.

10 **Ejemplo: 1 Síntesis de péptido beta amiloide humano (A β) de diferentes conformaciones**

15 Las formas silvestre o mutante sintéticas humanas de los péptidos A β 1-42 o A β 1-40 se adquirieron en Polypeptide Laboratories GmbH. Los péptidos fueron sintetizados mediante un procedimiento de síntesis de péptidos en fase sólida estándar. Los péptidos se purificaron posteriormente con RP-HPLC hasta una pureza en el intervalo de 90-95 %.

Síntesis de monómeros A β 1-40 humanos de tipo silvestre

20 Un péptido sintético wtA β 1-40 se disolvió en 1 volumen de NaOH 10 mM pH > 10, y 1 volumen de 2 x PBS frío (pH 7-8) hasta una concentración de 50 μ M. La preparación del monómero wtA β 1-40 se centrifugó a 17. 900 g a + 4 °C durante 5 minutos antes del análisis (Figura 1).

Síntesis de protofibrillas A β 1-42 humanas de tipo silvestre

25 Un péptido sintético wtA β 1-42 se disolvió en 9 volúmenes de NaOH 10 mM pH > 10, se agitó en vórtex durante 2 minutos y se diluyó con 1 volumen de 10 x PBS (pH 7-8). La concentración final del péptido era, en este punto, 443 μ M. El péptido se incubó adicionalmente durante la noche a 37 °C. Después de la incubación durante la noche, el péptido se diluyó adicionalmente con PBS a 50 μ M. La muestra se centrifugó durante 17. 900 x g durante 5 minutos antes del análisis y la inmunización.

Síntesis de protofibrillas A β 1-42Arc humanas

35 Un péptido sintético A β 1-42Arc (E22G) se disolvió en 1 volumen de NaOH 10 mM pH > 10, y 1 volumen de 2 x PBS frío (pH 7-8) hasta una concentración final del péptido de 50 μ M. Las protofibrillas A β 1-42Arc se formaron inmediatamente y las protofibrillas A β 1-42Arc se estabilizaron manteniendo la solución a 0-4 °C antes del análisis o la inmunización. La muestra se centrifugó a 17. 000 xg durante 5 minutos a + 4 °C antes del análisis. Formas alternativas para estabilizar las protofibrillas A β 1-42Arc eran añadir glicerol hasta una concentración final de 5-50 % o agregar Tween-20 a una concentración final de 0,6 %.

Síntesis de protofibrillas A β 1-42 humanas de tipo silvestre

45 Un péptido sintético wtA β 1-42 se disolvió en 1 volumen de agua destilada doble, se agitó en vórtex durante 2 minutos y se diluyó con 1 volumen de 10 x PBS (pH 7-8) y de nuevo se agitó en vórtex durante 2 minutos. La concentración final del péptido era, en este punto, 50 μ M. La preparación de protofibrillas wtA β 1-42 se incubó a 37 °C, durante 48 horas antes del análisis. La muestra se centrifugó a 17.900 x g durante 5 minutos a antes del análisis SEC. Se analizó el sobrenadante después de la centrifugación. No se realizó centrifugación cuando se analizaron 1-42 preparaciones de fibrillas mediante ELISA o transferencia de puntos.

50 *Análisis de la preparación de A β mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)*

Se usó un sistema Merck Hitachi D-7000 HPLC LaChrom, que tiene un detector de diodos de matriz (DAD) modelo L-7455 y una bomba modelo L-7100, para el análisis cromatográfico de preparaciones de protofibrillas en combinación con una columna Superdex 75 PC3. 2 / 30 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). El sistema cromatográfico separa los monómeros A β de las protofibrillas, que se eluyen en el volumen vacío de la columna. La columna se equilibró con Na₂HPO₄·50 mM NaH₂PO₄(PH 7,4) con NaCl 0,15 M (PBS) y 0,6 % de Tween 20 y se eluyó con el mismo tampón a un caudal de 0,08 ml / min (la presión fue 5-6 bares) a temperatura ambiente (22 °C). Diez (10 μ l) de una muestra de 50 μ M-100 μ M de A β se sometió análisis utilizando un barrido de longitud de onda entre 200-400 nm. Se añadió Tween-20 a la muestra para dar una concentración final de 0,6 % antes de la cromatografía. Los datos se extrajeron a partir de mediciones a 214 y 280 nm. Áreas de los picos se integraron utilizando el modelo de Merck Hitachi D-7000 Chromatography Data Station Software. La figura 1 muestra cromatogramas del monómero wtA β 1-40, wtA β 1-42 protofibrilla, A β 1-42Arc protofibrilla y preparaciones de fibrillas wtA β 1-42.

65 Cada preparación fue esencialmente libre (< 3 %) de otras formas conformacionales contaminantes de A β excepto la preparación monómero wtA β 1-40 que contenía 6,4 % de protofibrillas (tiempo de elución 12-13 minutos).

Ejemplo 2: Desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos de protofibrillas

Se usó un procedimiento estándar para el desarrollo monoclonal. Se inyectó a los ratones con la preparación de protofibrillas wtA β 1-42. Como alternativa podrían usarse protofibrillas A β 1-42Arc. Cada lote de protofibrilla wtA β 1-42 se analizó mediante SEC y Rojo Congo (se une estructuras en lámina β en las proteínas) antes de la inmunización para determinar la pureza de las protofibrillas y que la preparación contenía estructura en lámina β). El procedimiento utilizado para inmunizar ratones era un protocolo estándar que implica inyecciones s.c. en presencia de adyuvante de Freund. Cada uno de seis ratones fue inmunizado con 10 ug de protofibrillas wtA β 1-42 y posteriormente se administraron refuerzos con 30 ug. La muestra se mezcló 1: 1 con adyuvante de Freund completo antes de la primera inyección. Para las sucesivas 5 inyecciones de refuerzo se utilizó adyuvante incompleto de Freund. El ratón no fue inmunizado (control). Los ratones se sangraron y la sangre se recogió para las determinaciones de títulos de anticuerpos (Figura 3). Se administró a los ratones una más de refuerzo (30 ug) y después se sacrificó y se extrajo el bazo para determinar el desarrollo de hibridoma. El método de preparación hibridoma utilizado fue de acuerdo con el procedimiento estándar (*Harlow 1988*).

Ejemplo 3: Detección de anticuerpos específicos de las protofibrillas wtA β 1-42

Se desarrolló un método de ELISA donde los sobrenadantes de hibridoma se seleccionaron para los anticuerpos que se unen a las protofibrillas A β 1-42. El sobrenadante n° 258 del hibridoma mostró una alta especificidad de las protofibrillas (Figura 3). El hibridoma n° 258 se volvió a sembrar y se volvió a someter a detección selectiva para determinar una línea celular homogénea. El anticuerpo monoclonal que se produce a partir de del hibridoma n° 258 se definió como anticuerpo monoclonal 258 (AcMo 258). Alternativamente, la detección selectiva (la unión a protofibrillas A β pero no a los monómeros A β o fibrillas) puede llevarse a cabo contra una biblioteca de presentación de fagos de anticuerpos, donde la biblioteca se ha hecho a partir de ARN aislado de animales inmunizados con protofibrillas.

Ejemplo 4. Caracterización del AMO n° 258 mediante análisis de transferencia Western.

El objetivo del experimento era determinar si el AcMo 258 reacciona de forma cruzada con la proteína precursora amiloide humana de tipo silvestre (wtAPP) o la APP humana, APPswe, APP SWE-arco (*Nilsberth 2001, Mullan 1992*), todos los cuales contiene A β 1-42 no escindido. Las células fueron transfectadas con plásmidos que expresan wtAPP APPswe y APPswe- arco humanos. Las células se recogieron después y se solubilizaron y las proteínas celulares se separaron mediante SDS-PAGE y de transfirieron a papeles de filtro de nitrocelulosa y posteriormente se incubaron con AcMo298 o AcMo 6E10. La unión específica de estos anticuerpos a proteínas celulares separadas se detectó incubando los papeles de filtro en una solución de anticuerpo IgG/IgM secundario y después se desarrolló mediante incubación con señal súper de Pierce (art nr 34080-P) y una ligera película sensible. El AcMo 258 no mostró unión a wtAPP, APPswe o APPswe arco ni monómero wtA β 40. El AcMo 6E10 comercial se unió a todas estas formas.

Ejemplo 5: ELISA de tipo sándwich para la caracterización y determinaciones de protofibrillas. La especificidad del AcMo 258 se determinó mediante un ELISA de tipo sándwich

Una placa de 96 pocillos ELISA se recubrió con el AcMo 258 durante la noche a + 4 °C. Después del recubrimiento, los pocillos se bloquearon con BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras de A β , es decir, los monómeros wtA β 40, protofibrillas wtA β 42, protofibrillas wtA β 42-Arc, fibrillas wtA β 42, se añadieron a la placa de microtitulación en 5 x diluciones comenzando con 10 ug / ml. Las muestras se incubaron durante 1 hora a + 4 °C, después de lo cual se añadió 10 ng / pocillo de un anticuerpo secundario comercial, 6E10 (Signet) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La detección se consigue mediante la incubación con un anticuerpo anti-IgG conjugado con ALP-conjugado durante 1 hora a temperatura ambiente, y la posterior incubación con el sustrato a temperatura ambiente, durante una hora de acuerdo con el procedimiento del fabricante. Las muestras se leyeron en un lector de placa de microtitulación (Spectra max 190 Molecular Devices, Sunyvale, EE.UU.) a 405 nm y 492 nm. Figura 4^a. Figura 4A.

AcMo 258 mostró poca o ninguna reactividad cruzada hacia monómeros wtA β 40 o fibrillas wtA β 42. Las concentraciones de las protofibrillas wtA β 42 inferiores a 10 ng/ml eran medibles.

La unión de un anticuerpo anti-A β 42arc específico de protofibrillas (7E4) (A β 42arc en la conformación de protofibrillas se utilizó como antígeno durante la inmunización) se midió en el -ELISA de tipo sándwich recubierto con concentraciones crecientes de protofibrillas wtA β 42. La detección se logra mediante un Acmo específico de A β (1C3) como anticuerpo de detección secundario (figura 4B) o por AcMo 6E10 comercial, como anticuerpo secundario (Figura 4C). Se consiguió una fuerte unión del AcMo 7E4 a las protofibrillas wtA β 42. Los niveles de concentración tan bajos como de 2-5 ng / ml de protofibrillas wtA β 42 eran mensurables. Los anticuerpos monoclonales 4E11 y 10F7 muestran una unión menos fuerte a las protofibrillas wtA β 42 (Figura 4B y 4C).

REFERENCIAS:

- Axelman K., et.al., *Neurol.*, 51, 1193-1197, 1994
 Bard F. et.al., *Nature medicine*, 6, 916-919, 2000
 5 Cai, X-D. et.al., *Science*, 259, 514-516, 1993
 Citron, M. et.al., *Nature*, 360, 672-674, 1992
 DeMarco et.al., *Proc. Natl.Acad.Sci.*, 101, 2293-2298, 2004
 Dodard J-C. et.al. *Nature medicine*, 5 452-457, 2002
 10 Glenner et.al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 885-890, 1984
 Hardy, J. et.al., *Nature Genet.*, 1, 233-234, 1992
 Hartley D.M. et.al., *J. Neuroscience* 19, 8876-8884, 1999
 Harlow E. et.al., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor) Lab. Press, Plainview, NY, 1988
 Hoshi M. et.al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, 6370-6375, 2003
 Janus C.V. et.al., *Nature*, 408, 979-982, 2000
 15 Johnston, J. et.al., *FEBS Lett.*, 354, 274-278, 1994
 Kaye R. et.al., *Science* 300, 486-489, 2003
 Klyubin y col., *J. Physiol* 551P, C32, commun., 2003
 Lambert M.P. et.al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 6448-6453, 1998
 Lambert M.P. et.al., *J.Neurochemistry*, 79,595-605, 2001
 20 Lannfelt, L., et.al., *Neurosci. Lett.*, 168, 254-256, 1994
 Lannfelt L. et.al., *Neurosci Lett.*, 199, 203-206, 1995
 Masters et.al., *Proc. Natl.Acad.Sci.*, 82, 4245-4249, 1985
 McKhann, G., et.al., *Neurology*, 34, 939-944, 1984
 Morgan D. et.al., *Nature*, 408, 982-985, 2000
 25 Motter R. Et. al., *Ann. Neurol.*, 38, 643-648, 1995
 Mullan M. et.al., *Nature Genet.* 1, 345-347, 1992
 Nicoll J.A.R. et.al., *Nature medicine*, 1-5, on line publ. 17 mars, 2003
 Nilsberth C. et.al., *Nat. Neurosci.* 4, 887-893, 2001
 Nilsson L. et. al., Swedish patent application 0400707-6, 2004
 30 O'Nuallain B. et.al., *PNAS* 99,1485-1490, 2002
 Pirttilä et.al., *J. Neurol. Sci.*, 127, 90-95, 1994
 Scheuner D. et.al., *Nature Med.*, 2, 864-869, 1996
 Selkoe D. J., *Ann. Rev. Cell Biol.* 10,373-403, 1994
 Selkoe D. J., *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 489-517, 1994
 35 Seubert P. et.al., *Nature*, 359, 325-327, 1992
 Sigurdson E.M. et.al., *Am.J.Pathol.*,105, 439-447, 2001
 Sthilerman M. et.al., *Biochemistry* 41, 3855-3860, 2002
 Stine et.al., *J. Protein Chem.* 15, 193-203, 1996
 Walsh D.M. et.al., *J.Biol.Chem.* 274, 25945-25952, 1999
 40 Walsh D.M. et.al., *Nature* 416, 535-539, 2001
 Weiner H.L. et.al., *Ann.Neurol.* 48, 567-579, 2000

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a protofibrillas de A β 42 de tipo silvestre y a protofibrillas de A β 42 con baja reactividad cruzada del monómero A β 42 donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo se puede obtener mediante el uso de protofibrillas de A β 42Arc o A β 42wt con una pureza superior al 95 % para inmunización y detección selectiva.
- 10 2. El anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo puede detectar tanto protofibrillas de A β 42 de tipo silvestre como protofibrillas de Arctic A β en un ELISA en el intervalo de concentración de 1000-10 ng/ml.
- 15 3. El anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo puede detectar tanto protofibrillas de A β 42 de tipo silvestre como protofibrillas de Arctic A β en un ELISA en el intervalo de concentración de 1000-0,1 ng/ml.
- 20 4. El anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde dicho anticuerpo es policlonal.
- 25 5. El anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde dicho anticuerpo es monoclonal (AcMo).
- 30 6. El anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo se ha producido contra protofibrillas que comprenden dichos péptidos A β que contienen una o varias mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en la mutación Arctic G22E, la mutación holandesa E22Q, la mutación flamenca A21G, la mutación italiana E22K, la mutación de Iowa D23N y combinaciones de las mismas.
- 35 7. El anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo es humano o ha sido humanizado.
- 40 8. El anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el anticuerpo o fragmento del mismo está marcado.
- 45 9. Una composición que comprende uno o más anticuerpos o fragmentos de los mismos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 50 10. La composición de la reivindicación 9 que comprende además un vehículo o excipiente.
- 55 11. Un método de detección de protofibrillas A β *in vitro*, que comprende las etapas de:
 - 40 - marcar el anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o la composición de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10 con un agente que puede generar una señal medible;
 - 45 - añadir dicho anticuerpo marcado o composición que comprende un anticuerpo a una muestra biológica que comprende o se sospecha que comprende protofibrillas A β ;
 - 50 - medir la concentración del complejo formado entre dicha protofibrilla A β y dicho anticuerpo o fragmento del mismo.
- 55 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, donde dicho método de detección es un inmunoensayo.
- 60 13. El método de acuerdo con la reivindicación 11, donde dicho ensayo de unión de proximidad.
- 65 14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-13, donde dicha muestra biológica se selecciona de plasma, LCR, cerebro y otros tejidos de origen animal o humano.
15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-13, donde el anticuerpo o fragmento del mismo está marcado con marcadores radiactivos, ADN, moléculas fluorescentes, o enzimas que convierte un sustrato de tal manera que su absorbancia se puede medir.
16. El anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o la composición de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10 para su uso en la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o el síndrome de Down en un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Alzheimer o el síndrome de Down.
17. Un método para la detección selectiva *in vitro* de sustancias que inhiben o modulan los niveles de protofibrillas A β y / o la actividad en cultivos de células, que comprende las etapas de:

- administrar posibles fármacos candidatos a un cultivo celular,
 - administrar un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o la composición de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10 marcado con un agente que puede generar una señal medible, a dicho cultivo celular,
- 5 - evaluar el efecto de dichos fármacos candidatos mediante la medición de la cantidad de protofibrillas unidas al anticuerpo o fragmento del mismo mediante la medición de la señal generada por el agente.
18. Un método de diagnóstico o monitorización de la enfermedad de Alzheimer (EA) o el síndrome de Down, que comprende las etapas de:
- 10 - añadir el anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 a una muestra biológica de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene EA o síndrome de Down,
- medir la cantidad de protofibrillas unidas al anticuerpo o fragmento del mismo utilizando ELISA, RIA, transferencia de Western, transferencia de mancha o unión por proximidad.
- 15 19. Un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en un método de diagnosticar la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo el método:
- 20 - marcar el anticuerpo o fragmento del mismo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 con un agente que puede generar una señal medible;
- añadir dicho anticuerpo marcado a una muestra tomada de un sujeto; y
- medir la concentración del complejo formado entre dicho anticuerpo o fragmento del mismo y cualquier protofibrilla A β en dicha muestra.
- 25 20. Un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en un método de diagnosticar el síndrome de Down, la demencia con cuerpos de Lewy o demencia vascular, comprendiendo el método:
- 30 - marcar el anticuerpo o fragmento del mismo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 con un agente que puede generar una señal medible;
- añadir dicho anticuerpo marcado a una muestra tomada de un sujeto; y
- medir la concentración del complejo formado entre dicho anticuerpo o fragmento del mismo y cualquier protofibrilla A β en dicha muestra.

FIG. 1

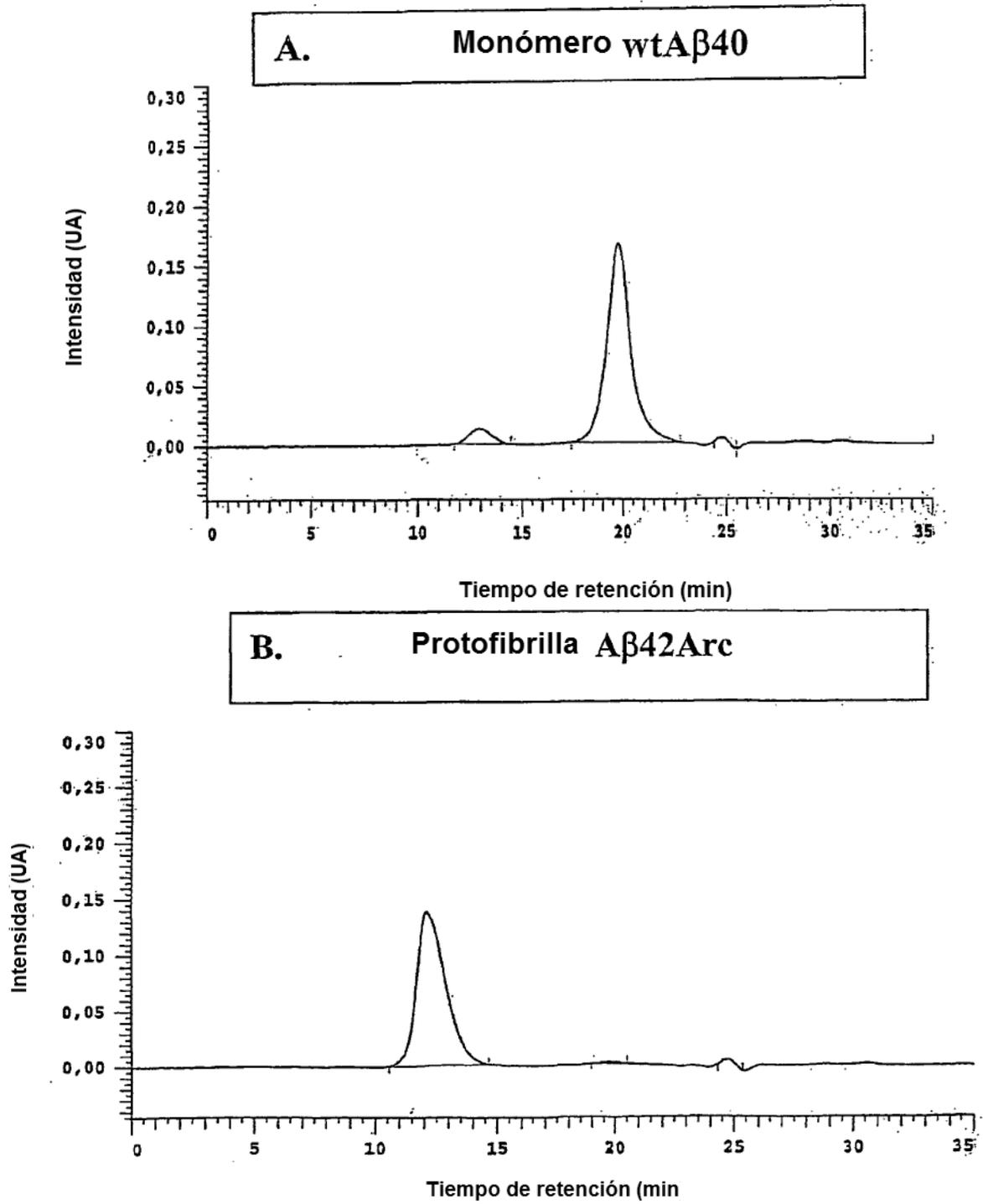


FIG. 1 (cont.)

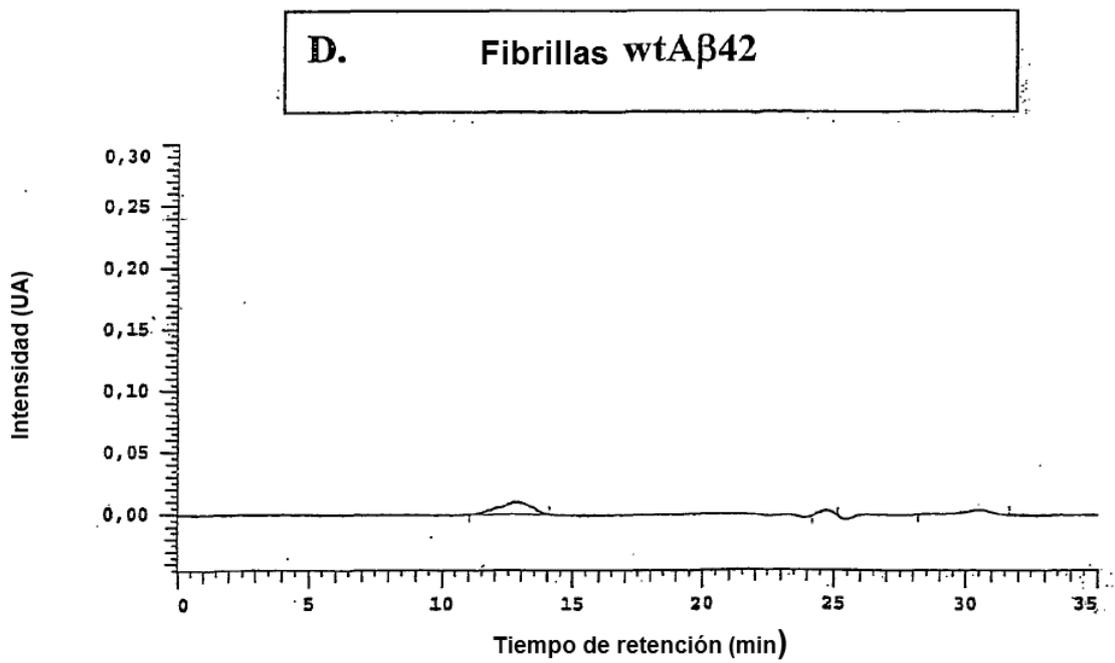
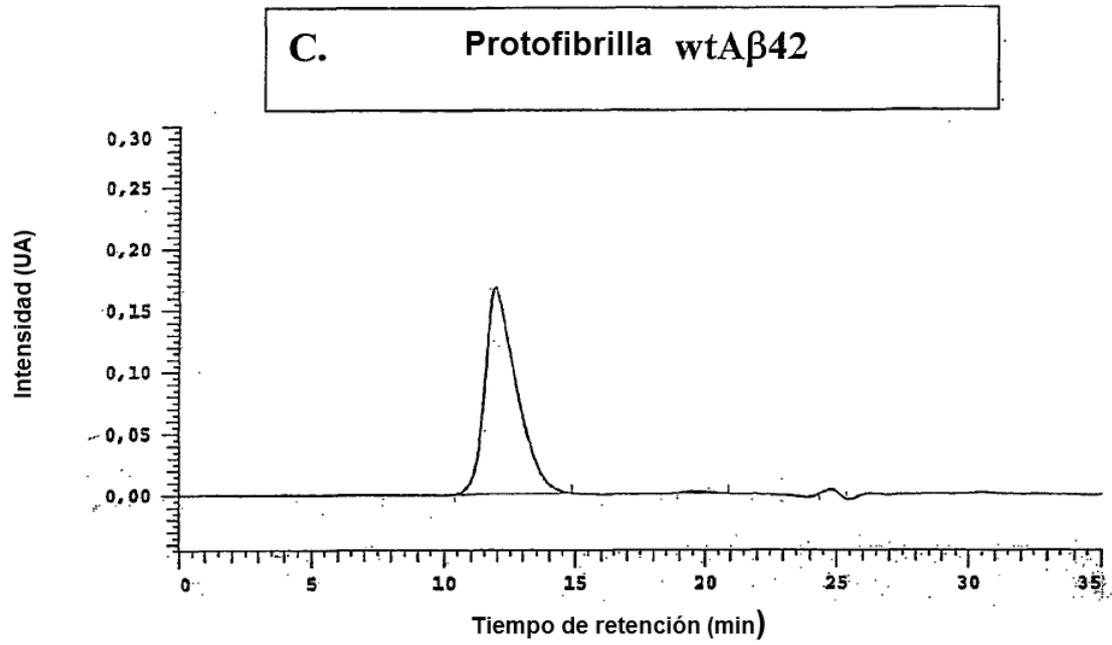


FIG. 2

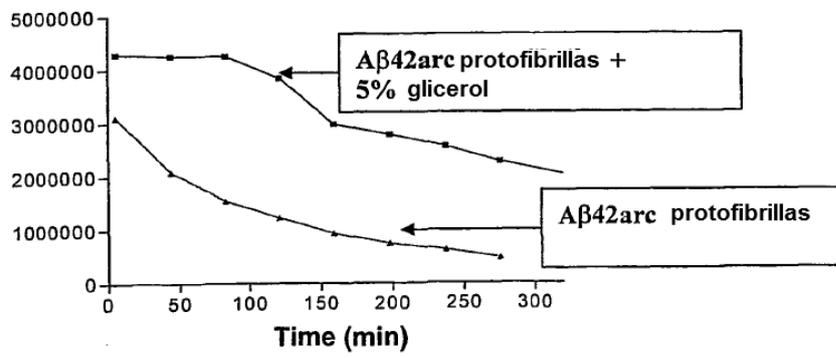
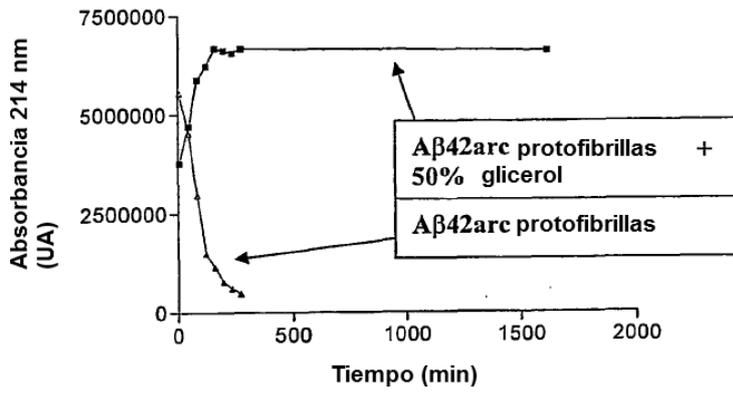


FIG. 2 (cont.)

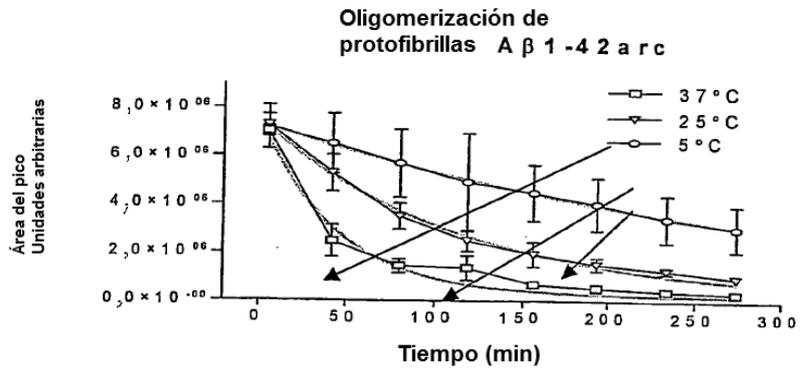
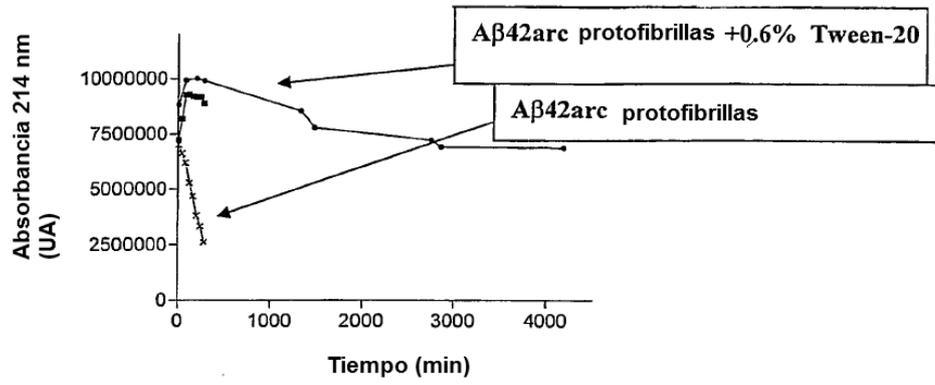
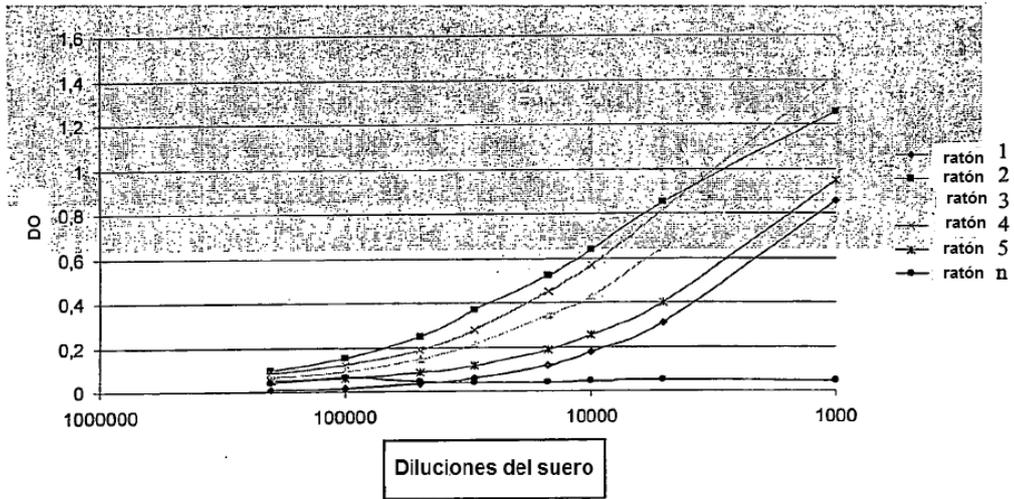


FIG. 3



Ratón n, ratón no inmunizado (control)

FIG. 4, A

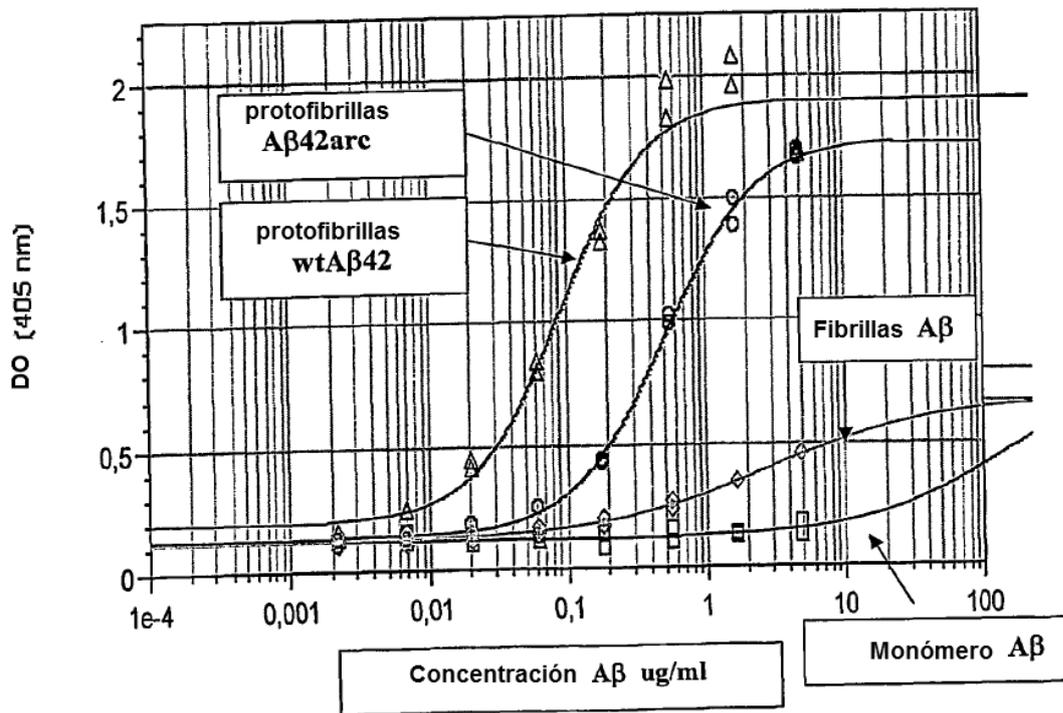


FIG. 4 B

Titulación mediante en ELISA de tipo sándwich de 4 anticuerpos monoclonales (258, 7E4, 4E11 y 10F7) contra concentración de protofibrillas $\text{wtA}\beta 42$

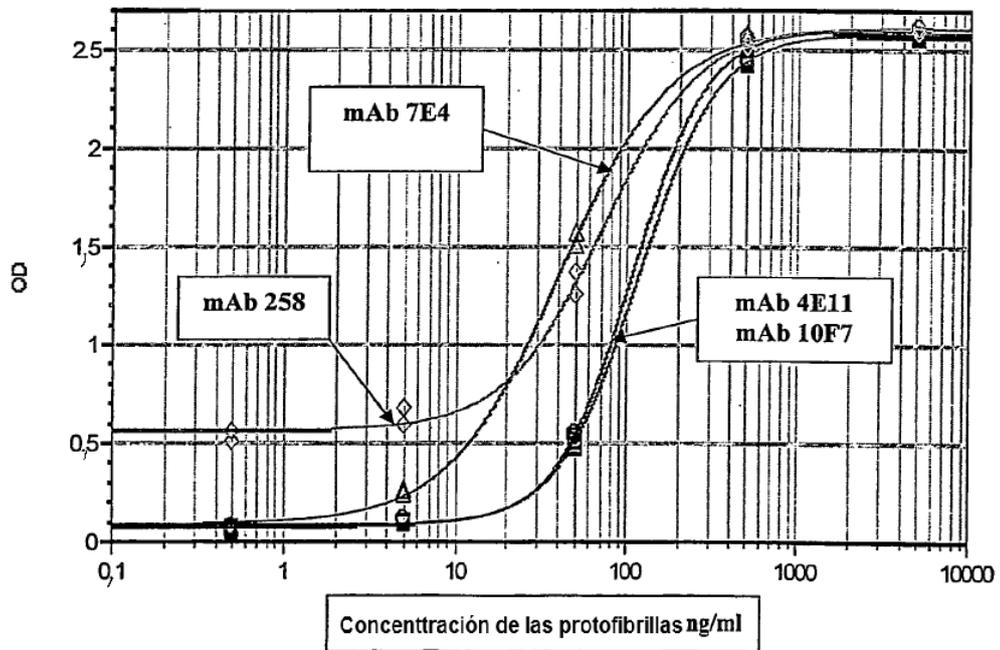


FIG. 4 C

Titulación mediante ELISA de tipo sándwich de 4 anticuerpos monoclonales (258, 7E4, 4E11 y 10F7) contra la concentración de protofibrillas **wtA β 42**

