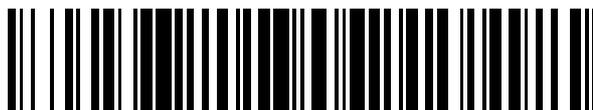


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 853**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2003 E 03798156 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 1546734**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales contra el amiloide beta truncado en N-11, composiciones, métodos y usos**

30 Prioridad:

27.09.2002 WO PCT/EP02/11062

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

23.02.2016

73 Titular/es:

**JANSSEN PHARMACEUTICA NV (100.0%)
Turnhoutseweg 30
2340 Beerse, BE**

72 Inventor/es:

**MERCKEN, MARC HUBERT y
VANDERMEEREN, MARC MARIA PIERRE
PELAGIE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 560 853 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 el amiloide beta truncado en N-11, composiciones, métodos y usos

5 La presente invención se refiere a anticuerpos, incluidas porciones o variantes especificadas, específico para al menos el sitio N-terminal de amiloide-beta_11 humano, es decir, péptidos A β 11-x. Proporciona, además, métodos para preparar y utilizar dichos anticuerpos, incluyendo formulaciones terapéuticas, la administración y dispositivos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere, en general, a métodos y composiciones para vigilar el tratamiento de la proteína precursora β -amiloide. Más particularmente, la presente invención se refiere al uso de métodos y composiciones para el diagnóstico, el pronóstico y la vigilancia de la respuesta a la terapia de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades relacionadas con beta-amiloide, así como al uso de los anticuerpos descritos en la inmunización pasiva como un método para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades relacionadas con beta-amiloide.

15 La enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno cerebral degenerativo caracterizado clínicamente por la pérdida progresiva de memoria, cognición, razonamiento, juicio y estabilidad emocional que conduce gradualmente a un deterioro mental profundo y, en última instancia, a la muerte. La AD es una causa muy común de insuficiencia mental progresiva (demencia) en seres humanos de edad y se cree que representa la cuarta causa médica más común de muerte en los Estados Unidos. La AD se ha observado en razas y grupos étnicos de todo el mundo y presenta un importante problema presente y futuro de la salud pública. Se estima que la enfermedad afecta actualmente a aproximadamente dos a tres millones de personas en los Estados Unidos solamente. La AD es actualmente incurable. No se conoce actualmente tratamiento alguno que prevenga eficazmente la AD o que revierta sus síntomas y curso.

25 Los cerebros de individuos con la AD presentan lesiones características denominadas placas seniles (o amiloides), angiopatía amiloide (depósitos amiloides en los vasos sanguíneos) y ovillos neurofibrilares. Un gran número de estas lesiones, particularmente las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares, se encuentran generalmente en varias áreas del cerebro humano importantes para la memoria y la función cognitiva en pacientes con AD. Los números más pequeños de estas lesiones en una distribución anatómica más restringida se encuentran también en los cerebros de seres humanos de más años de edad que no tienen una AD clínica. Placas amiloides y angiopatía amiloide también caracterizan los cerebros de los individuos con la trisomía 21 (síndrome de Down), enfermedad por cuerpos de Lewy difusos y hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés (HCHWA-D).

30 Un constituyente principal de las placas amiloides es una diversidad de péptidos beta-amiloide (A β) que se producen por la escisión de la proteína precursora β -amiloide (APP). Mientras que en el pasado hubo un debate científico importante sobre si las placas y ovillos son una causa o son meramente el resultado de la enfermedad de Alzheimer, descubrimientos recientes indican que la placa amiloide es un precursor o factor causante. En particular, se ha descubierto que la producción de péptidos A β puede ser el resultado de mutaciones en el gen de codifica la proteína precursora amiloide, una proteína que, cuando se procesa normalmente, no producirá los péptidos A β . La identificación de mutaciones en el gen de la proteína precursora amiloide que causan el brote temprano familiar de la enfermedad de Alzheimer es la evidencia más fuerte de que el metabolismo amiloide es el evento central en el proceso patogénico en el que subyace la enfermedad. Actualmente se cree que un procesamiento normal (no patogénico) de la proteína APP se produce a través de la escisión por una "alfa.-secretasa" que escinde entre los aminoácidos 16 y 17 de la región del péptido A β dentro de la proteína. Se cree, además, que el proceso patogénico se produce, en parte, a través de "beta.-secretasas" que escinden en el extremo amino de la región del péptido A β dentro de la proteína precursora.

45 Recientemente, se demostró que BACE-1 es la principal β -secretasa requerida para la escisión de APP en la posición +1 y que la sobre-expresión de BACE-1 da como resultado una escisión adicional en el sitio +11 de la A β , generando fragmentos A β 11-40 y A β 11-42 más cortos, a los que se alude también en esta memoria como los péptidos A β 11-x. Estos péptidos A β se han detectado en medio acondicionado de cultivos de células neuronales primarias de rata y células de ratón N2a, sugiriendo que son productos de escisión de APP normales generados en neuronas (3, 4, 5). De manera significativa, estos fragmentos A β más cortos también han sido identificados como especies principales en los cerebros de AD y cerebros de envejecimiento normal mediante análisis bioquímicos (6), así como en cerebros de síndrome de Down con patología AD mediante estudios de inmunohistoquímica (7). Este evento requiere una re-evaluación del papel de A β 11-40/42 en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer,

especialmente a la vista del hecho de que las especies A β que comienzan en Glu11 demuestran ser más insolubles que las que comienza en la posición 1 de A β .

5 A pesar del progreso que se ha hecho en la comprensión de los mecanismos subyacentes de la AD y otras enfermedades relacionadas con A β , sigue habiendo una necesidad de desarrollar métodos y composiciones para el diagnóstico y tratamiento de la o las enfermedades. Por lo tanto, la capacidad de controlar el procesamiento celular de la proteína precursora del amiloide sería de un valor importante en el diagnóstico, pronóstico y supervisión terapéutica de la enfermedad de Alzheimer. En particular, sería deseable identificar procedimientos mínimamente invasivos reproducibles para el rastreo y la evaluación de marcadores diagnósticos detectables en muestras de pacientes que se pueden obtener fácilmente tales como suero, líquido cefalorraquídeo (CSF) y similares. El documento WO02/47466 sugiere producir anticuerpos monoclonales uniendo específicamente un fragmento de BACE1 (A β 11-40/42).

15 Anticuerpos policlonales tales como los descritos por Said T.C., et al. , Neuroscience Letters 215 (1996); 173-176 son útiles para detectar los diferentes péptidos A β en muestras biológicas, pero dado el hecho de que cada uno de los lotes de anticuerpos policlonales es diferente, estos anticuerpos no proporcionan las herramientas para llevar a cabo procedimientos reproducibles para el rastreo y la evaluación de marcadores diagnósticos detectables en muestras de pacientes que se pueden obtener fácilmente. Además, la unión no específica utilizando anticuerpos policlonales es típicamente superior y la precisión en la transferencia Western es típicamente inferior.

20 Se ha propuesto un cierto número de marcadores de diagnóstico potenciales para la enfermedad de Alzheimer. De particular interés para la presente invención son los fragmentos carboxi-terminales más cortos de la proteína precursora A β obtenidos después de la escisión con beta-secretasa de la proteína APP. Estos marcadores deben ser útiles por sí mismos y/o en combinación con otros marcadores y procedimientos de diagnóstico. Preferiblemente, los marcadores diagnósticos serían detectables en fluidos corporales tales como CSF, sangre, plasma, suero, orina, tejido, y similares, de modo que se pueden utilizar procedimientos de diagnóstico mínimamente invasivos.

25 Ensayos específicos para la detección de A β 11-x deben ser capaces de detectar A β 11-x en muestras de fluido a concentraciones muy bajas de una manera reproducible y consistente, así como distinguir entre péptidos A β 11-x y otros fragmentos de APP, que pueden estar presentes en la muestra.

Estos y otros aspectos de la invención se describen en esta memoria con más detalle.

SUMARIO DE LA INVENCION

30 La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente los péptidos A β más cortos obtenidos después de la escisión de la proteína APP por parte de BACE-1 en Glu11, es decir, los fragmentos de péptidos A β A β 11-40 y A β 11-42, a los que se alude también en lo que sigue como los péptidos A β 11-x, sin una reactividad cruzada para otros fragmentos de APP. Se proporcionan, además, células de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales, así como métodos para producir los anticuerpos y las células de hibridoma; y un inmunoensayo para un péptido A β mediante un método competitivo o un método sándwich utilizando el anticuerpo.

35 En particular, los anticuerpos monoclonales de la presente invención se preparan utilizando los primeros 5 a 7 aminoácidos humanos del sitio de escisión de β -secretasa₁₁, es decir, EVHHQ-C (A β ₁₁(6 AA) humano - Seq ID N°:1) y EVHHQKI-C (A β ₁₁(8 AA) humano - Seq ID N°:2) o utilizando los primeros 5 a 7 aminoácidos de ratón del sitio de escisión de β -secretasa₁₁, es decir, EVRHQ-C (A β ₁₁(6 AA) de ratón - Seq ID N°:3) y EVRHQKL-C (A β ₁₁(8 AA) de ratón - Seq ID N°:4) como inmunógenos. Dichos anticuerpos reaccionan específicamente con los péptidos A β 11-x, sin una reactividad cruzada para otros fragmentos de APP y, por consiguiente, son útiles en un inmunoensayo para evaluar el papel de A β 11-x en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer.

45 En una realización más específica, los anticuerpos monoclonales son reactivos al inmunógeno A β ₁₁(6 AA) humano y son expresados por las células de hibridoma J&JPRD/hA β 11/1 y J&JPRD/hA β 11/2 depositadas en la Colección Belga Coordinada de Microorganismos el 19 de agosto de 2002, con los números de acceso LMBP 5896CB y LMBP 5897CB, respectivamente. Por lo tanto, es una forma de realización adicional de la presente invención proporcionar las células de hibridoma anteriormente mencionadas que expresan los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención.

50 En un aspecto adicional de la presente invención, los anticuerpos de acuerdo con la invención se utilizan en técnicas inmunológicas convencionales para la detección de péptidos A β 11-x dondequiera que puedan aparecer, incluyendo muestras biológicas para la vigilancia de enfermedades relacionadas con el amiloide β y medios acondicionados a

partir del cultivo celular para vigilar el procesamiento intracelular de APP. Técnicas inmunológicas adecuadas son bien conocidas para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ELISA, análisis de transferencia Western, inmunoensayos competitivos o de sándwich, y similares, como es por lo demás bien conocido, todas ellas dependen de la formación de un complejo inmune antígeno-anticuerpo, en donde, para el propósito del ensayo, el anticuerpo puede ser marcado de forma detectable, p. ej., con radiomarcadores, marcadores enzimáticos o fluorescentes, o puede ser inmovilizado sobre soportes insolubles.

La invención también incluye el uso de un anticuerpo humanizado de la invención para la fabricación de un medicamento, para tratar, prevenir o invertir la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, HCHWA-D, angiopatía amiloide cerebral u otras enfermedades relacionadas con el amiloide β ; para tratar, prevenir o invertir el deterioro cognitivo en la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, HCHWA-D o angiopatía amiloide cerebral clínico o pre-clínico; o para inhibir la formación de placas amiloides o los efectos de las especies $A\beta$ solubles tóxicas en seres humanos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1 A: Titulaciones de suero de ratones a los que se han inyectado los primeros 5 a 7 aminoácidos humanos del sitio de escisión de β -secretasa₁₁, es decir, EVHHQ-C ($A\beta_{11}(5\text{ AA})$ humano - Seq ID N°:1) y EVHHQKI-C ($A\beta_{11}(7\text{ AA})$ humano - Seq ID N°:2) o utilizando los primeros 5 a 7 aminoácidos de ratón del sitio de escisión de β -secretasa₁₁, es decir, EVRHQ-C ($A\beta_{11}(5\text{ AA})$ de ratón - Seq ID N°:3) y EVRHQKL-C ($A\beta_{11}(7\text{ AA})$ de ratón - Seq ID N°:4) como inmunógenos. El antígeno de revestimiento utilizado fue $hA\beta(11-40)$ (American Peptide Company) a 2,0 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 1 Procedimiento de inmunización y cronologías para la recogida y fusión del bazo para ratones a los que se inyectó EVHHQ-C ($A\beta_{11}(5\text{ AA})$ humano - Seq ID N°:1).

Tabla 3 Resultados de transferencia Western que muestran la detección específica de péptidos $A\beta_{11-x}$ en rodajas de cerebro de pacientes con AD.

Fig 2 ELISA tipo sándwich utilizando anticuerpos monoclonales purificados JRF/ $A\beta_{N/25}$, J&JPRD/ $hA\beta_{11/1}$ y J&JPRD/ $hA\beta_{11/2}$ como anticuerpos de captura y JRF/ $cA\beta_{40/10}$ -HRPO como anticuerpo de detección. Se evalúan combinaciones de anticuerpos en cuanto a la reactividad con $A\beta_{1-40}$ humano y $A\beta_{11-40}$ humano (American Peptide Company).

A: Combinación de JRF/ $A\beta_{N/25}$ con JRF/ $cA\beta_{40/10}$ -HRPO reacciona específicamente con $A\beta_{1-40}$ humano sin reacción cruzada a $hA\beta_{11-40}$ (control positivo para la detección de $A\beta_{1-40}$).

B: Combinación J&JPRD/ $hA\beta_{11/1}$ con JRF/ $cA\beta_{40/10}$ -HRPO reacciona específicamente con $hA\beta_{11-40}$ y sin reacción cruzada con $A\beta_{1-40}$ humano.

C: Combinación J&JPRD/ $hA\beta_{11/2}$ con JRF/ $cA\beta_{40/10}$ -HRPO reacciona específicamente con $hA\beta_{11-40}$ y sin reacción cruzada con $A\beta_{1-40}$ humano.

Fig 3 Transferencia Western que muestra reacción específica de J&JPRD/ $hA\beta_{11/1}$ con fragmentos de CTF escindido con β_{11} de APP en extractos de membranas de células HEK transfectadas establemente con APPwe humana y BACE1 humana. C6/6.1 está dirigido al extremo C de APP y reacciona con fragmentos CTF de APP escindidos con β_1 y β_{11} .

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente los péptidos $A\beta$ más cortos obtenidos después de la escisión de la proteína APP por parte de BACE-1 en Glu11 sin reactividad cruzada para otros fragmentos de APP. Los anticuerpos de la invención tienen especificidad para uno o más epítomos presentes en los primeros 5 a 7 aminoácidos del sitio de escisión β -secretasa₁₁ de $A\beta$ humano o en los primeros 5 a 7 aminoácidos del sitio de escisión β -secretasa₁₁ de $A\beta$ de ratón.

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales preparados utilizando péptidos que consisten en los primeros 5 a 7 aminoácidos humanos del sitio de escisión de β -secretasa₁₁, es decir, EVHHQ-C ($A\beta_{11}(6\text{ AA})$ humano - Seq ID N°:1) y EVHHQKI-C ($A\beta_{11}(8\text{ AA})$ humano - Seq ID N°:2) o utilizando los primeros 5 a 7 aminoácidos de ratón del sitio de escisión de β -secretasa₁₁, es decir, EVRHQ-C ($A\beta_{11}(6\text{ AA})$ de ratón - Seq ID N°:3) y EVRHQKL-C ($A\beta_{11}(8\text{ AA})$ de ratón - Seq ID N°:4) como inmunógenos.

Los péptidos antes mencionados se pueden preparar por métodos conocidos en la técnica tales como la técnica de síntesis en fase sólida de Merrifield bien conocida, en que los aminoácidos se añaden secuencialmente a una cadena en crecimiento (Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 a 2156). Las secuencias de aminoácidos pueden estar basadas en la secuencia de los fragmentos A β arriba recogidos o pueden utilizar secuencias mutantes de origen natural o tratadas. Para su uso como inmunógeno, los péptidos así obtenidos se pueden utilizar por sí mismos o se pueden conjugar a un soporte inmuoactivador natural o sintético adecuado tal como albúmina de suero activada con maleimida de mamíferos tales como bovinos, conejos y seres humanos, tiroglobulina de mamíferos tales como bovinos, conejos, seres humanos y ovejas y hemocianina de lapa bocallave (KLH) u otros soportes de proteínas adecuados tales como los soportes de polímeros sintéticos que incluyen polímeros de estireno, polímeros acrílicos, polímeros de vinilo y polímeros de propileno. Descripciones detalladas adicionales de inmunización se pueden encontrar en los ejemplos.

Una vez que se ha obtenido una cantidad suficiente del inmunógeno, se pueden producir de diversas maneras anticuerpos policlonales específicos para los péptidos A β 11-x utilizando técnicas que incluyen técnicas in vitro o in vivo. Las técnicas in vitro implican la exposición de linfocitos a los inmunógenos, mientras que las técnicas in vivo requieren la inyección de los inmunógenos en un huésped vertebrado adecuado. Huéspedes vertebrados adecuados son no humanos, incluyendo ratones, ratas, conejos, ovejas, cabras y similares. Los inmunógenos se inyectan en el animal de acuerdo con un programa predeterminado, y los animales se sangran periódicamente con sangrados sucesivos que tienen un título y una especificidad mejorados. Las inyecciones se pueden realizar por vía intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, o similar, y se puede administrar un adyuvante tal como adyuvante completo de Freund o adyuvante incompleto de Freund para potenciar la capacidad productora de anticuerpos. Métodos para el rastreo de los niveles de título del suero incluyen típicamente ensayos estándar ELISA o RIA. Por ejemplo en un formato de rastreo ELISA se añade el suero a una fase sólida (por ejemplo, la parte inferior de una microplaca) que está recubierta con el péptido A β 11-x o el péptido A β 11-x está acoplado a un soporte (tal como BSA) y, a continuación, añadiendo un anticuerpo anti-inmunoglobulina (por ejemplo, cuando la inmunización se realiza en ratones, se utiliza un anticuerpo de inmunoglobulina anti-ratón, p. ej. inmunoglobulina (Ig) anti-ratón de oveja) conjugado con un marcador detectable tal como una enzima, preferiblemente peroxidasa de rábano picante, o un isótopo radiactivo tal como ¹²⁵I.

Si se desea, los anticuerpos monoclonales se pueden preparar a partir de huéspedes vertebrados tales como un ratón, hiperinmunizado con el inmunógeno deseado por el método recién descrito, utilizando técnicas bien conocidas por los expertos ordinarios en la técnica. Convenientemente, un huésped vertebrado que muestra un alto título de anticuerpos se selecciona de los animales inmunizados con el inmunógeno deseado. Típicamente de 2 a 5 días, preferiblemente 4 días después de la inmunización final, se recogen del mismo el bazo o los nódulos linfáticos, y se immortalizan células productoras de anticuerpos contenidas en los mismos. La forma de immortalización no es crítica. Actualmente, la técnica más común es la fusión con un participante en la fusión de células de mieloma. El procedimiento de fusión puede llevarse a cabo de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo el método de Kohler y Milstein (Nature, 256,495-497 (1975)). Otras técnicas incluyen la transformación de EBV, la transformación con ADN desnudo, p. ej., oncogenes, retrovirus, etc., o cualquier otro método que proporcione un mantenimiento de la línea celular y una producción de anticuerpos monoclonales, estables. Se pueden utilizar aceleradores de fusión, incluido polietilenglicol (PEG) y el virus Sendai. En particular, se utiliza preferiblemente PEG. Ejemplos de células de mieloma incluyen NS-1, P3U1, SP2/0 y AP-1, se utilizan preferiblemente células SP2/0.

Hibridomas que producen anticuerpos monoclonales específicos para epítopos que se encuentran en los primeros 5 a 7 aminoácidos del sitio de escisión β -secretasa₁₁ de A β humano o en los primeros 5 a 7 aminoácidos del sitio de escisión β -secretasa₁₁ de A β de ratón se producen más eficazmente inmunizando primero un animal del que se pueden producir hibridomas tal como, por ejemplo, un ratón Balb/c, con inyecciones iniciales por vía intraperitoneal de los inmunógenos deseados en adyuvante de Freund, seguido de inyecciones de refuerzo cada dos semanas. La fusión subsiguiente del bazo aislado puede llevarse a cabo utilizando cualquiera de las técnicas comúnmente conocidas por los expertos ordinarios en la técnica, preferiblemente utilizando células SP2/0 mediante un procedimiento modificado de Kohler y Milstein (Eur. J. Immunol., 6, 292-295 (1976)). El rastreo de los hibridomas para determinar cuáles están produciendo anticuerpos específicos para los péptidos A β 11-x se puede hacer ya sea en un ensayo estándar ELISA o RIA tal como se describe antes en esta memoria. La selección y el cultivo de los hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales deseados se realiza habitualmente en un medio para los animales (por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) o medio esencial mínimo (MEM) de Eagle) suplementado con suero de ternero fetal al 10-20% y otros componentes tales como, por ejemplo, HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina), o suplemento de hibridoma ESG. Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona las células de hibridoma J&JPRD/hA β 11/1 y J&JPRD/hA β 11/2 depositadas en la Colección Belga Coordinada de Microorganismos el 19 de agosto de 2002, con los números de acceso LMBP 5896CB y LMBP 5897CB, respectivamente.

La separación y purificación de los anticuerpos monoclonales anti-A β 11-x se llevan a cabo de manera similar a la separación y purificación usuales de anticuerpos policlonales tales como la precipitación con sales, precipitación con alcohol, precipitación isoeléctrica, electroforesis, adsorción y desorción con materiales de intercambio de iones (por ejemplo DEAE), ultracentrifugación, filtración en gel y técnicas específicas de separación por inmunofinidad, incluyendo fases sólidas de unión a antígeno y cromatografía de afinidad en proteína A o proteína G. Técnicas de purificación de proteínas adecuadas se describen en *Methods in Enzymology*, Vol. 182, Deutcher, comp., Academic Press. Inc., San Diego, 1990, cuya descripción se incorpora en esta memoria como referencia.

Por lo tanto, es un objeto de la invención proporcionar anticuerpos monoclonales aislados, expresadas por las células de hibridoma anteriormente mencionadas, siendo dichos anticuerpos capaces de reconocer específicamente péptidos A β 11-x. Preferiblemente, estos anticuerpos monoclonales aislados son expresados por las células de hibridoma J&JPRD/hA β 11/1 y J&JPRD/hA β 11/2 depositadas en la Colección Belga Coordinada de Microorganismos el 19 de agosto de 2002, con los números de acceso LMBP 5896CB y LMBP 5897CB, respectivamente.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se utilizan en técnicas inmunológicas convencionales para la detección de péptidos A β 11-x dondequiera que pueda aparecer, incluyendo muestras biológicas para la vigilancia de enfermedades relacionadas con amiloide β y medios acondicionados a partir de cultivo celular para vigilar el procesamiento intracelular de APP. Técnicas inmunológicas adecuadas son bien conocidas para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ELISA, análisis de transferencia Western, inmunoensayos competitivos o de sándwich, y similares, como es por lo demás bien conocido todos ellos dependen de la formación de un complejo inmune antígeno-anticuerpo, en donde para el fin del ensayo, el anticuerpo puede ser **marcado de forma detectable**, p. ej., con radiomarcadores, marcadores enzimáticos o fluorescentes, o puede ser inmovilizado sobre soportes insolubles. Por lo tanto, es un objeto de la invención proporcionar **inmunoensayos** para la determinación o detección de péptidos A β 11-x en una muestra, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un anticuerpo para los péptidos A β 11-x de acuerdo con la invención y determinar si se forma un complejo inmune entre el anticuerpo y el péptido A β 11-x. Estos métodos se pueden realizar en **muestras de tejidos** o muestras de **fluido corporal** y generalmente comprenden obtener una muestra del cuerpo de un sujeto; poner en contacto dicha muestra con una cantidad eficaz de formación de imágenes de un anticuerpo marcado de forma detectable de acuerdo con la invención; y detectar el marcador para establecer la presencia de péptidos A β 11-x en la muestra.

Los métodos de medición que utilizan los anticuerpos de la presente invención no están particularmente limitados. Se puede utilizar cualquier método de medición siempre y cuando la cantidad de anticuerpos, antígenos o los complejos antígenos-anticuerpos correspondientes a la cantidad de los antígenos, en particular la cantidad de péptidos A β 11-x en disoluciones a medir sea detectada por medios químicos o físicos, y sea calculada a partir de curvas estándares preparadas mediante el uso de disoluciones estándares que contienen los antígenos en cantidades conocidas. Por ejemplo, se utilizan adecuadamente la nefelometría, métodos competitivos, métodos inmunométricos y métodos sándwich. Con respecto a la sensibilidad y especificidad, se prefiere particularmente el uso de métodos sándwich descritos más adelante.

En los métodos de medición utilizando **sustancias de marcaje**, se utilizan como agentes de marcaje radioisótopos, enzimas, sustancias fluorescentes, sustancias luminosas, etc. Ejemplos de los radioisótopos incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^3H y ^{14}C . Las enzimas se hacen generalmente detectables mediante la conjugación de un sustrato apropiado que, a su vez, cataliza una reacción detectable. Ejemplos de los mismos incluyen, por ejemplo, beta-galactosidasa, beta-glucosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa y malato deshidrogenasa, preferiblemente peroxidasa de rábano picante. Las sustancias luminosas incluyen, por ejemplo, luminol, derivados de luminol, luciferina, aequorina y luciferasa. Además, los sistemas de avidina-biotina también se pueden utilizar para marcar los anticuerpos e inmunógenos de la presente invención.

Cuando se insolubilizan los inmunógenos o anticuerpos, se puede emplear la adsorción física o la unión química, habitualmente utilizadas para la insolubilización o fijación de proteínas o enzimas. Ejemplos de los **soportes** incluyen polisacáridos insolubles tales como agarosa, dextrano y celulosa, resinas sintéticas tales como poliestireno, poliacrilamida y polímeros de silicona, y vidrio.

En los métodos sándwich, las disoluciones de ensayo se hacen reaccionar con los anticuerpos anti-péptido A β 11-x insolubilizados (la primera reacción), además, se hacen reaccionar los anticuerpos anti-péptido A β 11-x marcados (la segunda reacción), y luego, se somete a ensayo la actividad de los agentes de marcaje sobre los soportes insolubilizados, con lo que se puede determinar la cantidad de los péptidos A β 11-x en las disoluciones de ensayo. La primera reacción y la segunda reacción pueden realizarse simultánea o secuencialmente.

En una realización adicional para **diagnosticar** enfermedades relacionadas con el amiloide β , una muestra biológica que incluye tejido, fluidos corporales tales como CSF, sangre, plasma, suero, orina, y similares, está contenida y se pone en contacto con una cantidad adecuada de primer anticuerpo para producir un complejo inmune. El contacto implica típicamente añadir la muestra a una matriz sólida recubierta con el primer anticuerpo. El complejo que resulta de la puesta en contacto de la muestra con el primer anticuerpo se separa de la muestra mediante elución. Sin embargo, se pueden emplear otros métodos de recuperación. El complejo recuperado se pone en contacto con al menos un segundo anticuerpo dirigido a un determinante antigénico en el antígeno y capaz de unir el antígeno en el complejo. El determinante antigénico al que se dirige el segundo anticuerpo puede ser el mismo que al que se dirige el primer anticuerpo debido a la naturaleza multiepitópica de la entidad antigénica. El primer o el segundo anticuerpo pueden hacerse detectables utilizando cualquiera de los marcadores descritos anteriormente. En una realización preferida, el segundo anticuerpo se hace detectable. La presencia del anticuerpo detectable unido al complejo que consiste en antígeno unido al primer y segundo anticuerpo puede ser detectada fácilmente utilizando técnicas conocidas en la técnica. Mediante la comparación de los resultados obtenidos en la muestra biológica con los obtenidos en una muestra de control, se puede determinar la presencia de niveles alterados de péptidos A β 11-x.

Por consiguiente, es un objeto de la presente descripción proporcionar un ensayo de tipo sándwich en el que el primer anticuerpo recubierto a una matriz sólida, al que se alude en lo sucesivo como el anticuerpo de recubrimiento, consiste en un anticuerpo que reconoce los péptidos A β 11-x y A β 40 o A β 42 de longitud completa y el segundo anticuerpo, que se hace detectable, reconoce específicamente los péptidos A β 11-x. Preferiblemente, el anticuerpo de recubrimiento reconoce los péptidos A β 11-x humanos y A β 40 o A β 42 humano de longitud completa, en una realización más preferida, el anticuerpo de recubrimiento consiste en el anticuerpo monoclonal JRF/cA β 40/10 que reconoce específicamente A β 11-40 y A β 40 de longitud completa, estando dicho anticuerpo monoclonal caracterizado por que comprende al menos una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 5 y/o al menos una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 6 (a la que se alude en lo sucesivo como el anticuerpo monoclonal JRF/cA β 40/10) o, alternativamente, el anticuerpo de recubrimiento consiste en el anticuerpo monoclonal JRF/cA β 42/12 que reconoce específicamente A β 11-42 y A β 42 de longitud completa, estando dicho anticuerpo monoclonal caracterizado por que comprende al menos una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 7 y/o al menos una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 8 (a la que se alude en lo sucesivo como el anticuerpo monoclonal JRF/cA β 42/12). Por consiguiente, en una realización preferida, el segundo anticuerpo es uno de los anticuerpos monoclonales expresados por las células de hibridoma por las células de hibridoma J&JPRD/hA β 11/1 o J&JPRD/hA β 11/2 depositadas en la Colección Belga Coordinada de Microorganismos el 19 de agosto de 2002, con los números de acceso LMBP 5896CB y LMBP 5897CB, respectivamente. También es un objeto de la descripción proporcionar un ensayo de tipo sándwich para determinar la relación de péptidos A β 11-x a A β 40 o A β 42 de longitud completa. En esta forma de realización se utiliza asimismo un segundo anticuerpo adicional que reconoce tanto A β 40 como A β 42 de longitud completa, pero que no muestra reactividad cruzada para los péptidos A β 11-x. Preferiblemente, este segundo anticuerpo adicional consiste en JRF/A β N25, caracterizado por que comprende al menos una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 9 y/o al menos una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 10. Por consiguiente, un objeto de la presente descripción consiste en proporcionar un ensayo de tipo sándwich en el que el anticuerpo de recubrimiento consiste en un anticuerpo que reconoce específicamente los péptidos A β 11-x, pero que no muestra reactividad cruzada para los péptidos A β 40 y A β 42 de longitud completa tales como, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales expresados por las células de hibridoma J&JPRD/hA β 11/1 o J&JPRD/hA β 11/2 depositadas en la Colección Belga Coordinada de Microorganismos el 19 de agosto de 2002, con los números de acceso LMBP 5896CB y LMBP 5897CB, respectivamente, en combinación con un segundo anticuerpo que reconoce específicamente A β 11-40 o A β 11-42 tal como, por ejemplo, JRF/cA β 42/12 o JRF/cA β 40/10 tal como se caracteriza antes en esta memoria. En una realización específica, el anticuerpo de recubrimiento consiste en J&JPRD/hA β 11/1 y el segundo anticuerpo consiste en JRF/cA β 42/26 que reconoce específicamente A β 11-42 y A β 42 de longitud completa, estando dicho anticuerpo monoclonal caracterizado por que comprende al menos una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 11 y/o al menos una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 12 (a la que se alude en lo sucesivo como el anticuerpo monoclonal JRF/cA β 42/26).

En un ensayo de tipo sándwich alternativo para determinar la relación de péptidos A β 11-x a A β 40 o A β 42 de longitud completa, el anticuerpo de recubrimiento consiste en un anticuerpo que reconoce específicamente los péptidos A β 11-x, preferiblemente los péptidos A β 11-x humanos y el segundo anticuerpo, que se hace detectable, reconoce específicamente los péptidos A β 11-40 o A β 11-42, preferiblemente A β 11-40 humano o A β 11-42 humano. En este ensayo de tipo sándwich alternativo, el anticuerpo de recubrimiento consiste en uno de los anticuerpos monoclonales expresado por las células de hibridoma J&JPRD/hA β 11/1 o J&JPRD/hA β 11/2 depositada en la Colección Belga Coordinada de Microorganismos el 19 de agosto de 2002, con los números de acceso LMBP 5896CB y LMBP 5897CB, respectivamente, y el segundo anticuerpo, marcado de forma detectable, consiste en el

anticuerpo monoclonal JRF/cA β 40/10 o el anticuerpo monoclonal JRF/cA β 42/12 tal como se caracteriza antes en esta memoria.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención también pueden utilizarse en sistemas de ensayo distintos de los métodos sándwich, por ejemplo, métodos competitivos y nefelometría. En los métodos competitivos, antígenos en las disoluciones de ensayo e inmunógenos marcados se hacen reaccionar competitivamente con los anticuerpos, seguido de la separación de los inmunógenos (F) que no han reaccionado marcados de los inmunógenos (B) marcados unidos a los anticuerpos (separación B/F). A continuación, se mide la cantidad marcada de cualquiera de B o F para determinar la cantidad de inmunógeno en la disolución de ensayo. Estos métodos de reacción incluyen métodos en fase líquida, en los que los anticuerpos solubles se utilizan como los anticuerpos y polietilenglicol y los segundos anticuerpos frente a los anticuerpos arriba mencionados se utilizan para la separación B/F, y los métodos de solidificación en los que se utilizan anticuerpos solidificados como los primeros anticuerpos, o anticuerpos solubles se utilizan como los primeros anticuerpos y anticuerpos solidificados se utilizan como los segundos anticuerpos.

En nefelometría, se mide la cantidad de los precipitados insolubles producidos como resultado de la reacción antígeno-anticuerpo en geles o disoluciones. Incluso cuando la cantidad de antígenos es escasa, y los precipitados se obtienen sólo en pequeñas cantidades, se usa adecuadamente nefelometría láser utilizando dispersión de láser.

En un aspecto adicional, la invención está dirigida a un método para tratar y prevenir afecciones caracterizadas por la formación de placas que contienen proteína beta-amiloide en seres humanos, método que comprende administrar, preferiblemente de manera periférica, a un ser humano en necesidad de dicho tratamiento una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal humanizado de acuerdo con la invención o un fragmento inmunológicamente reactivo del mismo, anticuerpo que se une específicamente a uno o más epítopos presentes en los primeros 5 a 7 aminoácidos de la sitio de escisión β -secretasa₁₁ del péptido A β humano o de ratón. En otro aspecto, la invención está dirigida a un método para inhibir la formación de placas amiloides y para borrar las placas amiloides en los seres humanos, método que comprende administrar a un sujeto humano en necesidad de esa inhibición una cantidad eficaz de un anticuerpo humanizado que secuestra el péptido A β a partir de su forma circulante en la sangre e induce un eflujo del cerebro, así como un aclaramiento de A β alterado en el plasma y el cerebro. En aspectos adicionales, la invención se dirige a anticuerpos humanizados de este tipo, incluyendo porciones inmunológicamente eficaces de los mismos, y a métodos para su preparación.

Por "anticuerpo humanizado" se quiere dar a entender un anticuerpo que está compuesto parcial o totalmente de secuencias de aminoácidos derivadas de una línea germinal de un anticuerpo humano alterando la secuencia de un anticuerpo que tiene regiones determinantes de la complementariedad (CDR) no humanas. Las "CDRs" se definen como las secuencias de aminoácidos de la región determinante de complementariedad de un anticuerpo que son las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina. Véase, p. ej., Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 4^a Ed., Departamento de Salud y Servicios Humanos, Institutos Nacionales de Salud (1987) de Estados Unidos. Existen tres CDRs (o regiones CDR) de cadena pesada y de cadena ligera en la parte variable de una inmunoglobulina. Así, "CDRs", tal como se utilizan en esta memoria, se refieren a las tres CDRs de cadena pesada o a las tres CDRs de cadena ligera (o CDRs tanto de cadena ligera como de cadena pesada, si es apropiado).

La alteración más simple puede consistir simplemente en sustituir la región constante de un anticuerpo humano por la región constante murina, dando así como resultado una quimera humana/murina que puede tener una inmunogenicidad suficientemente baja como para que sea aceptable para uso farmacéutico.

Preferiblemente, sin embargo, la región variable del anticuerpo e incluso la CDR se humaniza también por técnicas que son ahora bien conocidas en la técnica. Las regiones marco de las regiones variables son sustituidas por las regiones marco humanas correspondientes, dejando la CDR no humana sustancialmente intacta, o incluso reemplazando la CDR por secuencias derivadas de un genoma humano. Anticuerpos totalmente humanos se producen en ratones modificados genéticamente, cuyos sistemas inmunes han sido alterados para que correspondan a sistemas inmunes humanos. Como se mencionó anteriormente, es suficiente para uso en los métodos de la invención, emplear un fragmento inmunológicamente específico del anticuerpo, incluyendo los fragmentos que representan formas de cadena sencilla.

Un anticuerpo humanizado se refiere nuevamente a un anticuerpo que comprende un marco humano, al menos una CDR de un anticuerpo no humano, y en el que cualquier región constante presente es sustancialmente idéntica a una región constante de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente 85-90%, preferiblemente al menos 95% idéntica. Por lo tanto, todas las partes de un anticuerpo humanizado, excepto posiblemente las CDRs, son sustancialmente idénticas a partes correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulina humana

nativas. Por ejemplo, una inmunoglobulina humanizada no abarcaría típicamente un anticuerpo quimérico de región variable de ratón/región constante humana.

Los anticuerpos humanizados tienen al menos tres ventajas potenciales frente a los anticuerpos no humanos y quiméricos para su uso en terapia humana:

- 5 1) debido a que la porción efectora es humana, puede interactuar mejor con las otras partes del sistema inmune humano (p. ej., destruye las células diana más eficientemente por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC)).
- 10 2) El sistema inmune humano no debería reconocer la región de marco o C del anticuerpo humanizado como extraño y, por lo tanto, la respuesta del anticuerpo contra un anticuerpo inyectado de este tipo debería ser menor que contra un anticuerpo no humano totalmente extraño o un anticuerpo quimérico parcialmente extraño.
- 3) Se ha reseñado que anticuerpos no humanos inyectados tienen una semivida en la circulación humana mucho más corta que la semivida de los anticuerpos humanos. Anticuerpos humanizados inyectados tendrán una semivida esencialmente idéntica a los anticuerpos naturales humanos, permitiendo administrar dosis más pequeñas y menos frecuentes.

15 En un método para tratar y prevenir afecciones caracterizadas por la formación de placas que contienen proteína beta-amiloide, los anticuerpos (incluyendo fragmentos inmunológicamente reactivos) se administran a un sujeto en riesgo de o que exhibe síntomas o patología relacionados con el A β , tales como la enfermedad de Alzheimer clínica o pre-clínica, el síndrome de Down o angiopatía amiloide clínica o pre-clínica, utilizando técnicas de administración estándares, de preferencia periféricamente (es decir, no mediante la administración en el sistema nervioso central)

20 por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual o mediante supositorios. Aunque los anticuerpos pueden administrarse directamente en el sistema ventricular, el fluido espinal o el parénquima cerebral, y las técnicas para abordar estas ubicaciones son bien conocidas en la técnica, no es necesario utilizar estos procedimientos más difíciles. Los anticuerpos de la invención son eficaces cuando se administran mediante técnicas más simples que se basan en el sistema de circulación periférica. Las

25 ventajas de la presente invención incluyen la capacidad del anticuerpo de ejercer sus efectos beneficiosos incluso aunque no se proporcionen directamente al sistema nervioso central propiamente dicho. De hecho, se ha demostrado en esta memoria que la cantidad de anticuerpo que cruza la barrera hematoencefálica es < 0,1 % de los niveles plasmáticos y que los anticuerpos de la invención ejercen su capacidad de secuestrar A β en la circulación periférica, así como de alterar el SNC y el aclaramiento de A β soluble en plasma.

30 Las composiciones farmacéuticas para administración se diseñan para que sean apropiadas para el modo de administración seleccionado, y se utilizan excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes dispersantes, tampones, tensioactivos, conservantes, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidad, agentes estabilizantes y similares, según sea apropiado. Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton PA, última edición, incorporada en esta memoria como referencia, proporciona un compendio de técnicas de formulación tal como son conocidas generalmente por los médicos.

35

Puede ser particularmente útil para alterar las características de solubilidad de los anticuerpos de la invención, haciéndolos más lipófilos, por ejemplo mediante encapsulación de los mismos en liposomas o mediante grupos polares de bloqueo.

40 Se prefiere el suministro sistémico periférico mediante inyección intravenosa o intraperitoneal o subcutánea. Vehículos adecuados para tales inyecciones son sencillos. Además, sin embargo, la administración puede efectuarse también a través de las membranas de la mucosa por medio de aerosoles nasales o supositorios. Formulaciones adecuadas para modos de administración de este tipo son bien conocidas y típicamente incluyen tensioactivos que facilitan la transferencia de membrana cruzada. Tensioactivos de este tipo se derivan a menudo de esteroides o son lípidos catiónicos, tales como cloruro de N-[1-(2,3-dioleoil)propil-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) o

45 diversos compuestos tales como hemisuccinato de colesterol, fosfatidil glicerol y similares.

La concentración del anticuerpo humanizado en formulaciones tan bajas como aproximadamente 0,1% a tan altas como 15 ó 20% en peso se seleccionará principalmente basándose en volúmenes de fluido, viscosidades, etcétera, de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado. Por lo tanto, se podría constituir una composición farmacéutica típica para inyección para que contuviera 1 mL de agua estéril tamponada de solución salina tamponada con fosfato y 1-100 mg del anticuerpo humanizado de la presente invención. La formulación podría filtrarse en condiciones estériles después de hacer la formulación, o se podría hacer microbiológicamente aceptable de otro modo. Una composición típica para la infusión intravenosa podría tener un volumen tan alto como 250 mL de fluido tal como solución de Ringer estéril, y 1-100 mg por mL, o más en la concentración de anticuerpos.

50

Agentes terapéuticos de la invención pueden congelarse o liofilizarse para el almacenamiento y pueden reconstituirse en un soporte estéril adecuado antes de su uso. La liofilización y reconstitución pueden conducir a

55

grados variables de pérdida de actividad del anticuerpo (p. ej., con inmunoglobulinas convencionales, los anticuerpos IgM tienden a tener una mayor pérdida de actividad que los anticuerpos IgG). Las dosificaciones pueden tener que ajustarse para compensar. El pH de la formulación se seleccionará para equilibrar la estabilidad (química y física) del anticuerpo y la comodidad para el paciente cuando se administra.

5 Generalmente, se tolera un pH entre 4 y 8.

Aunque los métodos anteriores parecen ser los más convenientes y más apropiados para la administración de proteínas tales como anticuerpos humanizados, mediante una adaptación adecuada, se pueden emplear otras técnicas para la administración tales como la administración transdérmica y la administración oral, con la condición de que se diseñe una formulación apropiada.

10 Además, puede ser deseable emplear formulaciones de liberación controlada utilizando películas y matrices biodegradables, o minibombas osmóticas, o sistemas de suministro basados en perlas de dextrano, alginato o colágeno.

15 En resumen, están disponibles formulaciones para administrar los anticuerpos de la invención y son bien conocidas en la técnica y pueden elegirse entre una diversidad de opciones. Niveles de dosificación típicos pueden optimizarse utilizando técnicas clínicas estándares y dependerán del modo de administración y del estado del paciente.

La presente invención proporciona, además, kits que se pueden utilizar en los métodos mencionados anteriormente. En una realización, un kit comprende un anticuerpo de la invención, preferiblemente un anticuerpo purificado, más preferiblemente un anticuerpo monoclonal, incluso más preferiblemente los anticuerpos monoclonales aislados, expresados por las células de hibridoma J&JPRD/hA β 11/1 y J&JPRD/hA β 11/2 depositadas en la Colección Belga Coordinada de Microorganismos el 19 de agosto de 2002, con los números de acceso LMBP 5896CB y LMBP 5897CB, respectivamente, en uno o más recipientes. En una realización específica, los kits de la presente invención contienen un polipéptido sustancialmente aislado **que comprende** un epítipo que es específicamente inmunorreactivo con un anticuerpo incluido en el **kit**. En una forma de realización adicional, este epítipo se selecciona del grupo que consiste de los primeros 5 a 7 aminoácidos humanos del sitio de escisión β -secretasa₁₁, es decir, EVHHQ-C (A β ₁₁(6 AA) humano - Seq ID N°:1) y EVHHQKI-C (A β ₁₁(8 AA) humano - Seq ID N°:2) o utilizando los primeros 5 a 7 aminoácidos de ratón del sitio de escisión de β -secretasa₁₁, es decir, EVRHQ-C (A β ₁₁(6 AA) de ratón - Seq ID N°:3) y EVRHQKL-C (A β ₁₁(8 AA) de ratón - Seq ID N°:4) como inmunógenos. Preferiblemente, los kits se utilizan en un ensayo tipo sándwich y, además, comprenden un anticuerpo de recubrimiento que no reacciona específicamente con el polipéptido de interés, en una forma de realización específica, este anticuerpo de recubrimiento reconoce los péptidos A β 11-x y A β 40 o A β 42 de longitud completa, preferiblemente este anticuerpo de recubrimiento reconoce los péptidos A β 11-x humanos y A β 40 o A β 42 humano de longitud completa, en una forma de realización más preferida el anticuerpo de recubrimiento consiste en el anticuerpo monoclonal JRF/cA β 40/10 (tal como se caracteriza antes en esta memoria) que reconoce específicamente A β 11-40 y A β 40 de longitud completa o el anticuerpo de recubrimiento consiste en el anticuerpo monoclonal JRF/cA β 42/12 (tal como se caracteriza antes en esta memoria) que reconoce específicamente A β 11-42 y A β 42 de longitud completa. En un ensayo tipo sándwich alternativo de acuerdo con la invención, los kits comprenderán un anticuerpo de recubrimiento que reconoce específicamente los péptidos A β 11-x, preferiblemente los péptidos A β 11-x humanos, y anticuerpos adicionales específicos para el extremo C de A β 40 o A β 42, preferentemente para el extremo C de A β 40 o A β 42 humano. En una forma de realización más preferida, el kit comprenderá los anticuerpos monoclonales aislados expresadas por las células de hibridoma J&JPRD/hA β 11/1 y J&JPRD/hA β 11/2 depositadas en la Colección Belga Coordinada de Microorganismos el 19 de agosto de 2002, con los números de acceso LMBP 5896CB y LMBP 5897CB, respectivamente, como los anticuerpos de recubrimiento, y los anticuerpos monoclonales JRF/cA β 40/10 (tal como se caracteriza antes en esta memoria) y el anticuerpo monoclonal JRF/cA β 42/12 (tal como se caracteriza antes en esta memoria) como anticuerpos adicionales, estando este último conjugado con un marcador detectable, el sustrato.

En otra forma de realización específica, los kits de la presente invención contienen medios para detectar la unión de un anticuerpo a un polipéptido de interés (p. ej., el anticuerpo puede conjugarse con un sustrato detectable tal como un compuesto fluorescente, un sustrato enzimático, un compuesto radiactivo o un compuesto luminiscente, o un segundo anticuerpo que reconoce el primer anticuerpo puede conjugarse con un sustrato detectable). En particular, el kit contiene medios para detectar la unión de un anticuerpo a péptidos A β 11-x, preferiblemente para detectar la unión con un epítipo que se selecciona del grupo que consiste en los primeros 5 a 7 aminoácidos humanos del sitio de escisión β -secretasa₁₁, es decir, EVHHQ-C (A β ₁₁(6 AA) humano - Seq ID N°:1) y EVHHQKI-C (A β ₁₁(8 AA) humano - Seq ID N°:2) o utilizando los primeros 5 a 7 aminoácidos de ratón del sitio de escisión de β -secretasa₁₁, es decir, EVRHQ-C (A β ₁₁(6 AA) de ratón - Seq ID N°:3) y EVRHQKL-C (A β ₁₁(8 AA) de ratón - Seq ID N°:4). En

los ensayos de tipo sándwich antes mencionados, el anticuerpo conjugado con un sustrato detectable no será el anticuerpo de recubrimiento.

5 En una realización adicional, la descripción incluye un kit de diagnóstico para su uso en el rastreo de muestras biológicas incluyendo tejido, fluidos corporales tales como CSF, sangre, plasma, suero, orina, y similares. Dicha muestra biológica contiene péptidos A β 11-x. El kit de diagnóstico incluye un anticuerpo sustancialmente aislado, específicamente inmunorreactivo con péptidos A β 11-x, en particular con un epítipo que se selecciona del grupo que consiste en los primeros 5 a 7 aminoácidos humanos del sitio de escisión β -secretasa₁₁, es decir, EVHHQ-C (A β ₁₁(6 AA) humano - Seq ID N°:1) y EVHHQKI-C (A β ₁₁(8 AA) humano - Seq ID N°:2) o utilizando los primeros 5 a 7 aminoácidos de ratón del sitio de escisión de β -secretasa₁₁, es decir, EVRHQ-C (A β ₁₁(6 AA) de ratón - Seq ID N°:3) y EVRHQKL-C (A β ₁₁(8 AA) de ratón - Seq ID N°:4), y medios para detectar la unión del anticuerpo al inmunógeno. En una realización, el anticuerpo está fijado a un soporte sólido. En una realización específica, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, en particular, los anticuerpos monoclonales expresados por las células de hibridoma J&JPRD/hA β 11/1 y J&JPRD/hA β 11/2 depositadas en la Colección Belga Coordinada de Microorganismos el 19 de agosto de 2002, con los números de acceso LMBP 5896CB y LMBP 5897CB, respectivamente.

Los medios de detección del kit pueden incluir un segundo anticuerpo monoclonal, marcado, preferiblemente este segundo anticuerpo marcado consiste en JRF/cA β 40/10 o JRF/cA β 42/12, en donde la combinación de los anticuerpos monoclonales inmovilizados arriba mencionados con JRF/cA β 40/10 reconoce específicamente A β 11-40 sin reacción cruzada con A β 1-40, y en donde la combinación de los anticuerpos monoclonales inmovilizados arriba mencionados con JRF/cA β 42/12 reconoce específicamente A β 11-42 sin reacción cruzada con A β 1-42. Alternativa, o adicionalmente, los medios de detección pueden incluir un antígeno competidor marcado.

El reactivo de superficie sólida en el ensayo anterior se prepara mediante técnicas conocidas para fijar material proteico a material de soporte sólido tal como perlas poliméricas, tiras reactivas, placa de 96 pocillos o material de filtro. Estos métodos de fijación incluyen generalmente la adsorción no específica de la proteína al soporte o la fijación covalente de la proteína, típicamente a través de un grupo amina libre, a un grupo químicamente reactivo sobre el soporte sólido tal como un grupo carboxilo, hidroxilo o aldehído activado. Alternativamente, se pueden utilizar placas recubiertas con estreptavidina en unión con antígeno o antígenos biotinilados.

Por lo tanto, la invención proporciona un sistema de ensayo o **kit** para llevar a cabo este método de **diagnóstico**. El kit generalmente incluye un soporte con anticuerpos unidos a la superficie de acuerdo con la invención, y un anticuerpo marcado con informador para detectar la unión del anticuerpo al inmunógeno.

Esta invención se entenderá mejor por referencia a los Detalles Experimentales que siguen, pero los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que éstos son sólo ilustrativos de la invención tal como se describe más completamente en las reivindicaciones que siguen después de ello.

EXPERIMENTAL

35 MATERIAL Y MÉTODOS

Generación de anticuerpos monoclonales

Ratones Balb/c fueron cebados con cuatro péptidos diferentes en adyuvante completo de Freund. Los dos primeros péptidos sintéticos comprendían los primeros 5 a 7 aminoácidos (AA) humanos en el sitio de escisión β -secretasa₁₁: EVHHQ(KI)-C (A β -11 (6 u 8 AA) humano). Los otros dos péptidos para la inmunización contenían una secuencia A β ₁₁ AA de ratón; EVRHQ(KL)-C. Todos los péptidos se prepararon mediante acoplado los péptidos a través de un residuo de cisteína COOH-terminal a KLH mc (*Megathura crenulata*) activado con maleimida, o a Albúmina de Suero Bovino Activado con Maleimida, utilizando kits comercialmente disponibles tales como el kit mcKLH/BSA Activado con Maleimida Imject de Pierce, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pierce, Rockford, IL). Los ratones fueron reforzados cada dos semanas con 100 μ g de péptido acoplado a KLH, primero en adyuvante de Freund Completo y subsiguientemente en adyuvante Incompleto de Freund.

Los bazo de todos los ratones se aislaron y congelaron en nitrógeno líquido, a excepción de un bazo de un ratón inmunizado con péptido A β ₁₁ (6AA) humano. Los ratones seleccionados mostraron el más alto título del suero y, por lo tanto, fueron seleccionados para la fusión. El día 4 antes de la fusión o de la extracción del bazo, todos los ratones fueron reforzados por vía intraperitoneal con 100 μ g de péptidos A β ₁₁ acoplados a mcKLH en solución salina. Células de bazo de ratón se fusionaron con células SP2/0 mediante un procedimiento modificado de Kohler y

Milstein (8). Los hibridomas se sembraron en placas de 30 x 96 pocillos y se rastrearon después de 10 días en un ELISA directo en cuanto a péptido hA β _11 de 6 AA acoplado a BSA y se confirmaron en péptido A β 11-40 no acoplado. Células positivas en A β _11-40 libre se subclonaron inmediatamente y clones positivos se congelaron en nitrógeno líquido.

- 5 Todos los hibridomas se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero de ternera fetal al 10% (Hyclone, Europa), suplemento de hibridoma ESG al 2,5% (Elscolab, Kruibeke, Bélgica), HT al 2% (Sigma, EE.UU.), piruvato de sodio 1 mM, L-glutamina 2 mM y penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (50 mg/ml). Todos los productos estaban comercialmente disponibles y se adquirieron de Life-Technologies (Paisley, Reino Unido). Las células se incubaron en una incubadora de aire humidificado con 8% de CO₂.

10 Selección de anticuerpos mediante ELISA

El rastreo ELISA utilizado para la detección de anticuerpos anti-A β _11 era un ELISA directo con 1 μ g/ml de A β 11-40 humano/de ratón libre o péptido A β _11 humano/de ratón acoplado a BSA recubierto durante una noche a 4°C en placas de microtitulación de 96 pocillos de alta unión y de fondo en U NUNC (Life Technologies) en 50 μ l/pocillo de tampón de recubrimiento (Tris 10 mM, NaCl 10 mM y Na₃ 10 mM, pH 8,5). Al día siguiente, las placas se recubrieron con 85 μ l/pocillo de caseína al 0,1% en PBS durante 60 min a 37 °C para reducir la unión no específica. A continuación, se añadieron 50 μ l de sobrenadante de hibridoma y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Después del lavado, los anticuerpos monoclonales unidos se detectaron con 50 μ l/pocillo de Ig anti-ratón de oveja conjugada con peroxidasa de rábano picante durante 1 h a 37 °C (Amersham Pharmacia-Biotech). Los dos reactivos se diluyeron en caseína/PBS al 0,1%. Las placas se lavaron y se añadieron como sustrato 50 μ l de una disolución de 3,5,3',5'-tetrametil-bencidina 0,42 mM, H₂O₂ al 0,003% (vol./vol.) en ácido cítrico 100 mM e hidrógeno-fosfato disódico 100 mM (pH 4,3). La reacción se dejó que prosiguiera durante un máximo de 15 min en un agitador de placas a temperatura ambiente, después de lo cual el desarrollo de color se detuvo con H₂SO₄ 2 N, 50 μ l/pocillo y las placas se leyeron en un lector de placas de microtitulación a 450 nm (Thermomax, Molecular Devices). La reactividad cruzada de los anticuerpos monoclonales seleccionados con péptido A β 1-40 libre humano de tamaño completo se sometió a ensayo en un ELISA directo, idéntico al ensayo de rastreo, excepto que se utilizó péptido A β 1-40 libre humano de tamaño completo en lugar de hA β _11 (6AA) acoplado a BSA. En una segunda confirmación de ELISA, los cultivos positivos seleccionados se volvieron a someter a ensayo en péptido A β 11-40 libre humano.

ELISA de sándwich para la detección de amiloide β

El ELISA para la medición de diluciones estándares de hA β (1-40) o hA β (11-40) (American Peptide Company) se realizó como sigue: En síntesis, anticuerpos monoclonales JRF/A β N/25, J&JPRD/hA β 11/1 y J&JPRD/hA β 11/2 se recubrieron a razón de 5 μ g/ml durante una noche a 4 °C en placas de microtitulación de 96 pocillos de alta unión y de fondo plano NUNC en 100 μ l/pocillo de tampón de recubrimiento. Al día siguiente, las placas se recubrieron con 125 μ l/pocillo de caseína al 0,1% en PBS durante 30 min a 37 °C para reducir la unión no específica y se incubaron con 100 μ l/pocillo de muestras de dilución de péptido hA β (1-40) o hA β (11-40) durante 90 min a 37 °C. Las placas se lavaron, seguido por una incubación con 100 μ l/pocillo de JRF/cA β 40/10-HRPO marcado con HRP. Las placas se lavaron y se añadieron como sustrato 100 μ l de una disolución de 3,5,3',5'-tetrametil-bencidina 0,42 mM, H₂O₂ al 0,003% (vol./vol.) en ácido cítrico 100 mM e hidrógeno-fosfato disódico 100 mM (pH 4,3). La reacción se dejó que prosiguiera durante un máximo de 15 min en un agitador de placas a TA, después de lo cual el desarrollo de color se detuvo con H₂SO₄ 2 N, 50 μ l/pocillo y las placas se leyeron en un lector de placas de microtitulación a 450 nm (Thermomax, Molecular Dynamics).

Inmunodetección de APP CTF

Para la inmunodetección de fragmentos CTF (RESTOS), células HEK, transfectadas establemente con APPsw humano y BACE1 humano, fueron cultivadas en matraces de 75 cm² (Life Technologies, Paisley, Reino Unido) hasta confluencia y las células fueron posteriormente lisadas y se tratadas mediante ultrasonidos en Tris 50 mM: pH = 7,0, NaCl 0,15 M, Triton X-100 al 1% y un cóctel inhibidor de proteasa comercialmente disponible (Roche, Boehringer Mannheim, Alemania). Lisados brutos se centrifugaron a 10.000 g a 4 °C durante 10 min para separar los núcleos y desechos. Lisados celulares aclarados se normalizaron en cuanto al contenido de proteínas y las muestras se desnaturalizaron a 95 °C en tampón 2x Tricine Laemmli durante 5 min y se cargaron en geles de gradiente de Tris Tricina SDS al 10-20% precolados (NOVEX, Invitrogen, Groningen, Países Bajos) y se transfirieron semi-secos a membranas de nilón Hybond-ECL de 0,22 μ m (APB) durante 45 min a 1,5 mA por cm². Se utilizó una escalera de proteínas de bajo peso molecular como patrón de peso molecular (patrón MagicMark Western, Invitrogen). Las membranas fueron bloqueadas con leche desnatada en polvo al 10% (p/v) (BioRad) en PBS durante 1 hora. Seguidamente se incubaron con el anticuerpo monoclonal apropiado a razón de 5 μ g/ml durante una noche a 4 °C

(anticuerpo monoclonal C1/6.1 dirigido contra un epítipo C-terminal en APP, fue una donación generosa del Dr. Mathews, Nathan S. Kline Institute, Orangeburg). Las membranas se lavaron a continuación en PBS-Tween 20 al 0,1% durante 5 min con cinco cambios de tampón, se incubaron durante 1 h con un anti-ratón de cabra conjugado con HRP (Sigma) dilución 1:2000 durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Después del lavado, las bandas de interés se visualizaron mediante quimioluminiscencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche, Boehringer Mannheim, Alemania). Escaneos fueron tomados con un aparato Lumi-Imager (Roche, Boehringer Mannheim, Alemania).

Inmunodetección de APP en rodajas de cerebro de pacientes con AD.

Las rodajas de cerebro fueron bloqueadas con leche desnatada en polvo al 10% (p/v) (BioRad) en PBS durante 1 hora. Seguidamente se incubaron con el anticuerpo monoclonal apropiado a razón de 5 µg/ml durante una noche a 4 °C. Las membranas se lavaron a continuación en PBS-Tween 20 al 0,1% durante 5 min con cinco cambios de tampón, se incubaron durante 1 h con un anti-ratón de cabra conjugado con HRP (Sigma) dilución 1:2000 durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Después del lavado, las bandas de interés se visualizaron mediante quimioluminiscencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche, Boehringer Mannheim, Alemania). Escaneos fueron tomados con un aparato Lumi-Imager (Roche, Boehringer Mannheim, Alemania).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección del "ratón de fusión"

Un panel de 4 diferentes péptidos acoplados mK₁KLH se inyectó en ratones. Para cada uno de los péptidos se inmunizaron 3 ratones diferentes. Después de la primera inmunización de refuerzo, se sangró a cada uno de los ratones y el suero se aisló y se sometió a ensayo en ELISAs BSA-Aβ(6AA) humano directamente revestidos. El protocolo de inmunización de ratones inmunizados con hAβ₁₁(6AA) era idéntico para todos los ratones inyectados y se muestra en la **tabla 1**. En la **figura 1.a**, se demuestra claramente que el ratón 1 inmunizado con KLH_hAβ₁₁(6AA) (SEQ ID N°: 1) muestra un título muy alto de suero para el péptido Aβ₁₁₋₄₀ humano libre. Por esta razón, el ratón 1 inmunizado con hAβ₁₁(6AA) fue seleccionado para la fusión.

Fusión de hAβ₁₁(6aa), bazo 1

Debido al gran número de células de bazo de este ratón hiper-inmunizado (un total de 6,5 x 10⁸ células de bazo), el procedimiento de fusión se realizó dos veces con la mitad del número de células de bazo. Todas las células se sembraron en medio suplementado con ESG y 30 x 96 placas de hibridoma se rastrearon después de 10 días. De estos hibridomas, 65 pocillos de cultivo mostraron inicialmente una señal positiva clara en el rastreo del ensayo ELISA en péptido acoplado a BSA. Todos estos sobrenadantes positivos fueron sometidos a ensayo en péptido libre en un ELISA específico para IgG. Sólo 5 cultivos fueron confirmados positivos o menos de 10% de los pocillos positivos iniciales. Todos estos cultivos fueron negativos en Aβ₁₋₄₀ humano de longitud completa, lo que indica la reactividad en el AA a de posición extrema de hAβ_{11-40/42}. Los cultivos se clonaron inmediatamente y los cultivos madre se congelaron. De éstos 5, 2 hibridomas denominados 29B5 (J&JPRD/hAβ_{11/1}) y 5C4 (J&JPRD/hAβ_{11/2}), se clonaron con éxito y se congelaron en nitrógeno líquido. De estos dos hibridomas se cultivaron en cada caso y congelaron 4 subclones diferentes. En la tabla 2, se resumen los subclones positivos.

Tabla 2

J&JPRD/hAβ_{11/1} (29B5cl1F3)	J&JPRD/hAβ_{11/2} (5C4cl3D6)
J&JPRD/hAβ_{11/1} (29B5cl2F5)	J&JPRD/hAβ_{11/2} (5C4cl3F5)
J&JPRD/hAβ_{11/1} (29B5cl4C1)	J&JPRD/hAβ_{11/2} (5C4cl5B4)
J&JPRD/hAβ_{11/1} (29B5cl4D11)	

Determinación de Aβ_{1-40/42} y el Aβ₁₁₋₄₀ truncado en muestras de CSF de controles humanos no AD, perros Beagle y cobayas

5 El ELISA para la medición de A β 1-40/42 y el A β 11-40 truncado en muestras de CSF se realizó como sigue: En síntesis, anticuerpos monoclonales J&JPRD/hA β 11/1 o los anticuerpos monoclonales A β x-40 y A β x-42 específicos (Vandermeeren M., et al. 2001; Pype S., et al. 2003) JRF/cA β 40/10 y J&JPRD/hA β 42/26 se recubrieron a razón de 5 μ g/ml durante una noche a 4 °C en placas de microtitulación de 96 pocillos de alta unión y de fondo plano NUNC en 100 μ l/pocillo de tampón de recubrimiento. Al día siguiente, las placas se recubrieron con 150 μ l/pocillo de caseína al 0,1% en PBS durante 30 min a 37 °C para reducir la unión no específica y se incubaron con 100 μ l/pocillo de muestras de CSF diluidas en tampón PBS durante 90 min a 37 °C. Las placas se lavaron, seguido por una incubación con 100 μ l/pocillo de JRF/A β N/25-HRPO o JRF/cA β 40/28-HRPO marcado con HRP. Las placas se lavaron y se añadieron como sustrato 100 μ l de una disolución de 3,5,3',5'-tetrametil-bencidina 0,42 mM, H₂O₂ al 0,003% (vol./vol.) en ácido cítrico 100 mM e hidrógeno-fosfato disódico 100 mM (pH 4,3). La reacción se dejó que prosiguiera durante un máximo de 15 min en un agitador de placas a TA, después de lo cual el desarrollo de color se detuvo con H₂SO₄ 2 N, 50 μ l/pocillo y las placas se leyeron en un lector de placas de microtitulación a 450 nm (Thermomax, Molecular Dynamics).

15 Utilizando los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención, la isoforma 11-40 beta-amiloide truncada se pudo detectar cuantitativamente (ng/ml \pm ET) en muestras de CSF (n = 6) de controles humanos n- AD, perros Beagle y cobayas.

	ser humano ng/ml	perro ng/ml	cobaya ng/ml
Abeta 1-40	5.70 \pm 0.63	5.61 \pm 0.35	5.94 \pm 0.42
Abeta 11-40	0.20 \pm 0.04	0.30 \pm 0.34	0.36 \pm 0.05
Abeta 1-42	0.92 \pm 0.31	1.25 \pm 0.05	1.17 \pm 0.16

Conclusión

20 De un total de más de 30.000 hibridomas, los autores de la invención seleccionaron dos clones de hibridoma diferentes que reconocen específicamente el extremo N libre del péptido A β 11-40 humano. Estos anticuerpos monoclonales son negativos en A β 1-40 humano de tamaño completo.

25 Para evaluar la especificidad de los anticuerpos, éstos se purificaron en cromatografía de afinidad de proteína G y se utilizaron en un ELISA tipo sándwich con los mAbs (anticuerpos monoclonales) cA β 40 y cA β 42 anti-humanos específicos. JRF/A β N/25 se utilizó como un anticuerpo monoclonal específico para A β 1-40 en combinación con JRF/cA β 40/10-HRPO como anticuerpo de detección. Este último reconoce específicamente la parte C-terminal de A β y, por consiguiente, puede ser utilizado como anticuerpo de detección tanto con JRF/A β N/25 como con los anticuerpos J&JPRD/hA β 11/1 y J&JPRD/hA β 11/2 específicos para los péptidos A β 11-x. La Figura 2A confirma que JRF/A β N/25 reacciona específicamente con A β 1-40 sin reactividad cruzada con A β 11-40. A partir de las Figuras 2B y 2C se puede ver que los anticuerpos J&JPRD/hA β 11/1 y J&JPRD/hA β 11/2 reconocen específicamente hA β 11-40 sin reacción cruzada con A β 1-40 humano.

35 La capacidad de los anticuerpos de acuerdo con la invención para marcar específicamente a los péptidos A β 11-x en una muestra biológica se demostró en una transferencia Western en un extracto de membrana de células HEK transfectadas establemente con APP humana y BACE1 humana (Fig. 3) así como en rodajas de cerebro de placas amiloides de pacientes con AD (Tabla 3).

Por consiguiente, el uso de estos anticuerpos en combinación con anticuerpos monoclonales cA β 40 anti-humano y cA β 42 anti-humano específicos en ELISAs tipo sándwich proporcionó ensayos sensibles para detectar específicamente péptidos A β 11-x humanos en diferentes muestras biológicas, incluyendo fluidos biológicos y homogeneizados de cerebro.

Referencias

40 1. Jarrett, J.T., Berger, E.P., Lansbury, P.T., The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochem.* 32 (1993) 4693-4697.

2. Selkoe, DJ., Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81 (2001):741-766
3. Gouras, G.K., Xu, H., Jovanovic, J.N., Buxbaum, J.D., Wang, R., Relkin, N.R., Gandy, S., Generation and regulation of beta-amyloid peptide variants by neurons, *J. Neurochem.*, 71 (1998) 1920-1925.
4. Wang, R., Sweeney, D., Gandy, S.E., Sisodia, S.S., The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 31894-31902.
5. Vandermeeren, M., Geraerts, M., Pype, S., Dillen, L., Van Hove, C., Mercken, M., The functional inhibitor DAPT prevents production of amyloid β 1-34 in human and murine cell lines. *Neurosci. Lett.* 315 (2001) 145-148.
6. Naslund, J., Schierhorn, A., Hellman, U., Lannfelt, L., Roses A.D, Tjernberg, L.O., Silberring, J., Gandy, S.E., Winblad, B., Greengard, P., Nordstedt, C., Terenius, L., Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91 (1994) 8378-8382.
7. Iwatsubo, T., Saido, T.C., Mann D.M., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q. Full-length amyloid-beta (1-42(43)) and amino-terminally modified and truncated amyloid-beta 42(43) deposit in diffuse plaques. *Am. J. Pathol.* 149 (1996) 1823-1830.
8. Kohler, G., Howe, S.C., Milstein, C., Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines. *Eur J Immunol* 6 (1976) 292-295.
9. Pype, S., Moechars, D., Dillen, L., Mercken, M., Characterization of amyloid beta peptides from brain extracts of transgenic mice overexpressing the London mutant of human amyloid precursor protein, *J. Neurochem.* 84(3) 602-609.

20 **Tabla 1**

Inmunización/sangrado	Fecha	Ratón	Inyectado	
<i>Cebado</i>	<u>23/01/2002</u>	1	100 μ g	
	<u>23/01/2002</u>	2	100 μ g	
	<u>23/01/2002</u>	3	100 μ g	
<i>Refuerzo 1</i>	<u>06/02/2002</u>	1	100 μ g	
	<u>06/02/2002</u>	2	100 μ g	
	<u>06/02/2002</u>	3	100 μ g	
<i>Sangrado 1</i>	<u>20/02/2002</u>	1		
	<u>20/02/2002</u>	2		
	<u>20/02/2002</u>	3		
<i>Refuerzo 2</i>	<u>27/02/2002</u>	1	100 μ g	
	<u>27/02/2002</u>	2	100 μ g	
	<u>27/02/2002</u>	3	100 μ g	
<i>Sangrado 2</i>	<u>08/03/2002</u>	1		
	<u>08/03/2002</u>	2		
	<u>08/03/2002</u>	3		
<i>Refuerzo final</i>	<u>11/03/2002</u>	1	100 μ g	<i>Ratón con ascites 1</i>
	<u>11/03/2002</u>	2	100 μ g	<i>Ratón con ascites 1</i> <i>Sin ascites, sin título 1</i>
Bazo congelado	Ratón	FECHA		Células de bazo
<i>hAβ_11(6aa)10⁶ células</i>	2	14/03/2002		105.10 ⁶ /vial (4 viales)
FUSIÓN	Ratón	FECHA		Células de bazo
<i>hAβ_11(6aa) 30 pl.</i>	1	15/03/2002		655.10 ⁶
				2 fusiones, cada una con 325*10 ⁶ células de bazo

Tabla 3

tipo de anticuerpo	dilución	Hipocampo				Plexo coroide
		neuronas	placas	vasos sanguíneos	otros	
J&JPRD/hAβ11/1	1 µg	-	+	-	-fisura ++ -materia blanca ++ con patrón irregular y tinción difusa	+++
J&JPRD/hAβ11/1	5 µg	+	+	-	-fisura ++ -materia blanca ++ con patrón irregular y tinción difusa	+++
J&JPRD/hAβ11/2	1 µg	-	-	-	-fisura ++ -materia blanca ++ con patrón irregular y tinción difusa	+++
J&JPRD/hAβ11/2	5 µg	-	+	-	-fisura ++ + patrón irregular en materia blanca	+++
Cortex (entorrinal o en giro fusiforme)						
tipo de anticuerpo	dilución	neuronas	n placas	intensidad	materia blanca	
J&JPRD/hAβ11/1	1 µg	-	++	+	++ (irregular)	
J&JPRD/hAβ11/1	5 µg	+	+++	++	++ (irregular)	
J&JPRD/hAβ11/2	1 µg	-	++	+	+++ (irregular)	
J&JPRD/hAβ11/2	5 µg	-	+++	++	+++ (irregular)	

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Janssen Pharmaceutica N.V.

<120> Anticuerpos monoclonales contra el amiloide beta, composiciones, métodos y usos

5 <130> PRD 32

<150> PCT/EP02/11062
< 151> 27-09-2002

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

10 <210> 1
< 211> 5
< 212> PRT
< 213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Inmunógeno que consiste en los primeros 5 aminoácidos del sitio de escisión BACE1 de amiloide beta humano

<400> 1

Glu Val His His Gln
1 5

ES 2 560 853 T3

<210> 2
< 211> 7
< 212> PRT
< 213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Inmunógeno que consiste en los primeros 7 aminoácidos del sitio de escisión BACE1 de amiloide beta humano

<400> 2

Glu Val His His Gln Lys Ile
1 5

10 <210> 3
< 211> 5
< 212> PRT
< 213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Inmunógeno que consiste en los primeros 5 aminoácidos del sitio de escisión BACE1 de amiloide beta de ratón

<400> 3

Glu Val Arg His Gln
1 5

20 <210> 4
< 211> 7
< 212> PRT
< 213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Inmunógeno que consiste en los primeros 7 aminoácidos del sitio de escisión BACE1 de amiloide beta de ratón

<400> 4

Glu Val Arg His Gln Lys Leu
1 5

30 <210> 5
< 211> 136
< 212> PRT
< 213> Mus sp.

35 <220>
< 221> CDR1
< 222> (50) .. (54)
< 223> .

<220>
< 221> CDR2
< 222> (69) .. (85)
< 223> .

ES 2 560 853 T3

<220>
 < 221> CDR3
 < 222> (118).. (125)
 < 223> .

5 <400> 5

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Ile Gly
 1 5 10 15
 Ile Asn Ser Glu Gly Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30
 Ser Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 35 40 45
 Lys Asp His Tyr Val His Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
 50 55 60
 Asp Trp Ile Gly Trp Ile Ala Pro Lys Asn Gly Tyr Ser Glu Ser Ala
 65 70 75 80
 Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 85 90 95
 Thr Val Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Phe Ala Gly Phe Tyr Asp Ser Ser Leu Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130 135

10 <210> 6
 < 211> 133
 < 212> PRT
 < 213> Mus sp.

15 <220>
 < 221> CDR1
 < 222> (44).. (59)
 < 223> .

20 <220>
 < 221> CDR2
 < 222> (75).. (81)
 < 223> .

<220>
 < 221> CDR3
 < 222> (114).. (122)
 < 223> .

25 <400> 6

ES 2 560 853 T3

Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg
 1 5 10 15

Glu Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ala
 20 25 30

Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Gly Gln Ser
 35 40 45

Leu Leu Ala Arg Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Leu Gln Arg
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

Thr Leu Lys Ile Asn Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn
 115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg
 130

5 <210> 7
 < 211> 133
 < 212> PRT
 < 213> Mus sp.

10 <220>
 < 221> CDR1
 < 222> (50) .. (54)
 < 223> .

15 <220>
 < 221> CDR2
 < 222> (69) .. (85)
 < 223> .

<220>
 < 221> CDR3
 < 222> (118) .. (122)
 < 223> .

20 <400> 7

ES 2 560 853 T3

Met Arg Phe Ser Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro
 20 25 30

Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Asn
 35 40 45

Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Arg
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Ser Arg Val Ser Asn Leu Ala
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asn Arg Phe Ser Gly Ser Glu Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Ala Gln Leu Leu Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
 115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg
 130

<210> 9
 < 211> 138
 < 212> PRT
 5 < 213> Mus sp.

<220>
 < 221> CDR1
 < 222> (50) .. (54)
 < 223> .

10 <220>
 < 221> CDR2
 < 222> (69) .. (85)
 < 223> .

15 <220>
 < 221> CDR3
 < 222> (118) .. (127)
 < 223> .

<400> 9

ES 2 560 853 T3

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Ser Thr Ser Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Val Leu Pro Gly Ser Gly Lys Ser Asn His Asn
 65 70 75 80

Ala Asn Phe Lys Gly Arg Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ala Ser Asn
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Ser Asn Asn Asn Ala Leu Ala Tyr Trp
 115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

130

135

5 <210> 10
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

10 <220>
 <221> CDR1
 <222> (46)..(55)
 <223> .

15 <220>
 <221> CDR2
 <222> (60)..(67)
 <223> .

<220>
 <221> CDR3
 <222> (110)..(117)
 <223> .

20 <400> 10

ES 2 560 853 T3

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val Ile Ile Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
 50 55 60

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Ser Ser Arg Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Pro Thr Ile
 85 90 95

Ser Asn Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Asn Trp
 100 105 110

Arg Ser Ser Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 115 120 125

5 <210> 11
 < 211> 133
 < 212> PRT
 < 213> Mus musculus

10 <220>
 < 221> CDR1
 < 222> (50)..(54)
 < 223> .

15 <220>
 < 221> CDR2
 < 222> (69)..(85)
 < 223> .

<220>
 < 221> CDR3
 < 222> (118)..(122)
 < 223> .

20 <400> 11

ES 2 560 853 T3

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Thr Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

Thr Glu Tyr Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ser Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Phe Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 115 120 125

Leu Thr Val Ser Ser
 130

5 <210> 12
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <221> CDR1
 <222> (44)..(59)
 <223> .

15 <220>
 <221> CDR2
 <222> (75)..(81)
 <223> .

<220>
 <221> CDR3
 <222> (114)..(122)
 <223> .

20 <400> 12

ES 2 560 853 T3

Met Arg Phe Ser Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro
20 25 30

Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Asn
35 40 45

Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Arg
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Ser Arg Val Ser Asn Leu Ala
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asn Arg Phe Ser Gly Ser Glu Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Ala Gln Leu Leu Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg
130

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente los péptidos A β 11-x obtenidos tras la escisión de la proteína APP por parte de BACE-1 en Glu11 sin reactividad cruzada para otros fragmentos de APP, en donde el anticuerpo monoclonal reconoce específicamente los primeros 5 a 7 aminoácidos del sitio de escisión de la β -secretasa_11, es decir, Seq ID N°:1 y Seq ID N°:2 o los primeros 5 a 7 aminoácidos de ratón del sitio de escisión de la β -secretasa_11, es decir, Seq ID N°:3 y Seq ID N°:4 como inmunógenos.
2. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el péptido A β 11-x es A β 11-40 humano.
3. Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que está marcado de forma detectable.
- 10 4. Un anticuerpo según la reivindicación 3, en donde el marcador detectable es un radiomarcador, un marcador enzimático, un marcador luminiscente o un marcador fluorescente.
5. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que está inmovilizado sobre un soporte.
- 15 6. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, expresado por las células de hibridoma J&JPRD/hA β 11/1 y J&JPRD/hA β 11/2 depositadas en la Colección Belga Coordinada de Microorganismos el 19 de agosto de 2002, con los números de acceso LMBP 5896CB y LMBP 5897CB, respectivamente.
7. Las células de hibridoma J&JPRD/hA β 11/1 y J&JPRD/hA β 11/2 depositadas en la Colección Belga Coordinada de Microorganismos el 19 de agosto de 2002, con los números de acceso LMBP 5896CB y LMBP 5897CB, respectivamente.
- 20 8. Un método de inmunoensayo para la determinación o detección de péptidos A β 11-x obtenidos tras la escisión de la proteína APP por parte de BACE-1 en Glu11 en una muestra, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un anticuerpo contra los péptidos A β 11-x según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y determinar si se forma un complejo inmune entre el anticuerpo y los péptidos A β 11-x.
- 25 9. Un método de inmunoensayo para la detección de la presencia de péptidos A β 11-x obtenidos tras la escisión de la proteína APP por parte de BACE-1 en Glu11 en una muestra de tejido, comprendiendo el método:
 - poner en contacto una muestra de tejido obtenida del cuerpo de un sujeto con una cantidad eficaz para la formación de imágenes de un anticuerpo marcado de forma detectable según las reivindicaciones 3 ó 4; y
 - detectar el marcador para establecer la presencia de péptidos A β 11-x en la muestra de tejido.
- 30 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el anticuerpo que está marcado de forma detectable es expresado por al menos una de las células de hibridoma según la reivindicación 6.
- 35 11. Un método para la detección de la presencia de péptidos A β 11-x obtenidos tras la escisión de la proteína APP por parte de BACE-1 en Glu11 en una muestra de fluido corporal, comprendiendo el método:
 - poner en contacto una muestra de fluido corporal obtenida del cuerpo de un sujeto con una cantidad eficaz para la formación de imágenes de un anticuerpo marcado de forma detectable según la reivindicación 3 ó 4; y
 - detectar el marcador para establecer la presencia de péptidos A β 11-x en la muestra de fluido corporal.
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el anticuerpo que está marcado de forma detectable es expresado por al menos una de las células de hibridoma según la reivindicación 7.
13. El uso de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para el diagnóstico in vitro de enfermedades relacionadas con el amiloide β .
- 40 14. Una composición de diagnóstico que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un soporte farmacéuticamente aceptable.
15. Un kit de inmunoensayo para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con el amiloide β , que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 y medios de soporte para el anticuerpo.

Fig.1.A.

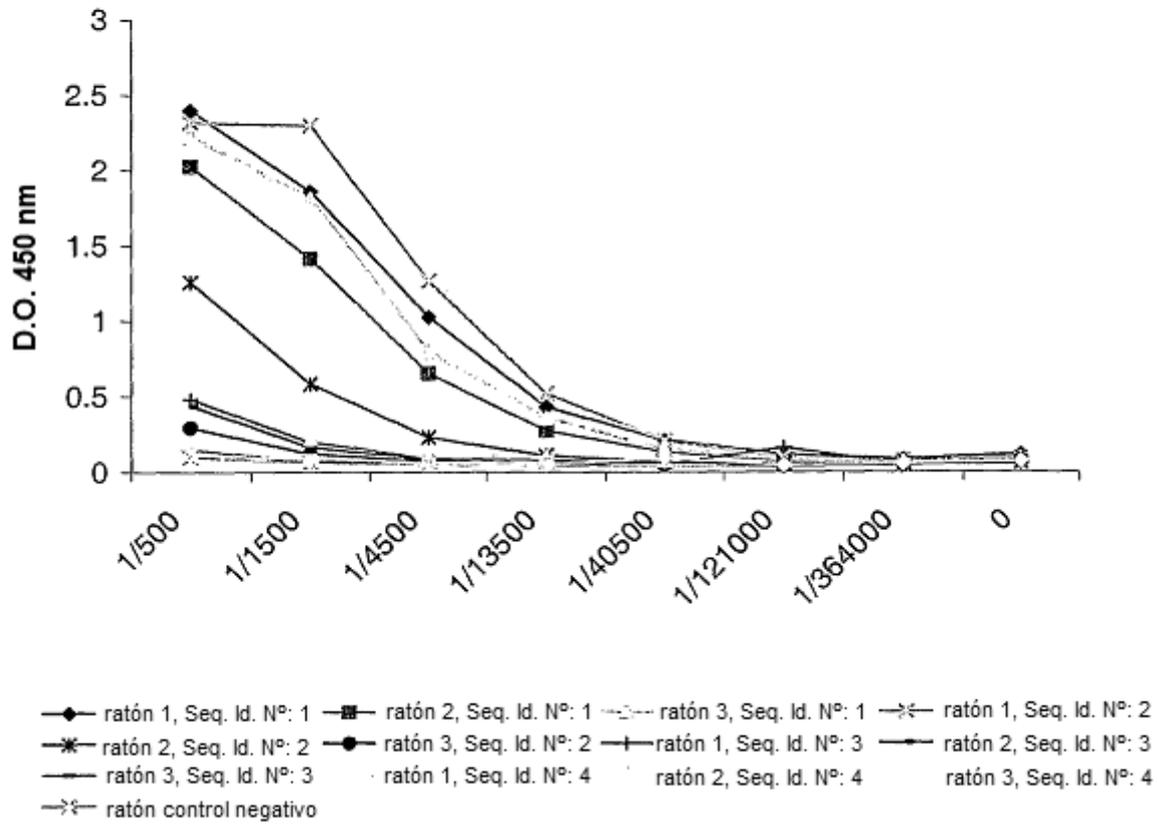


Fig2A

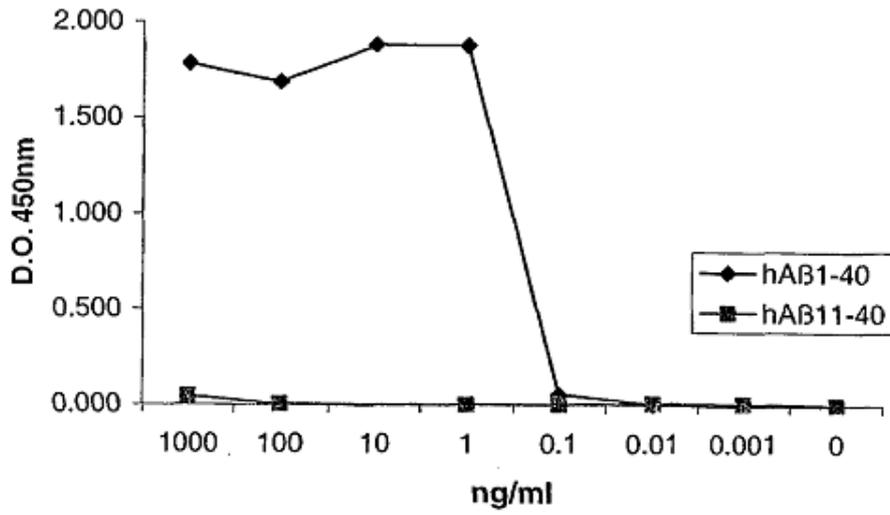


Fig2B

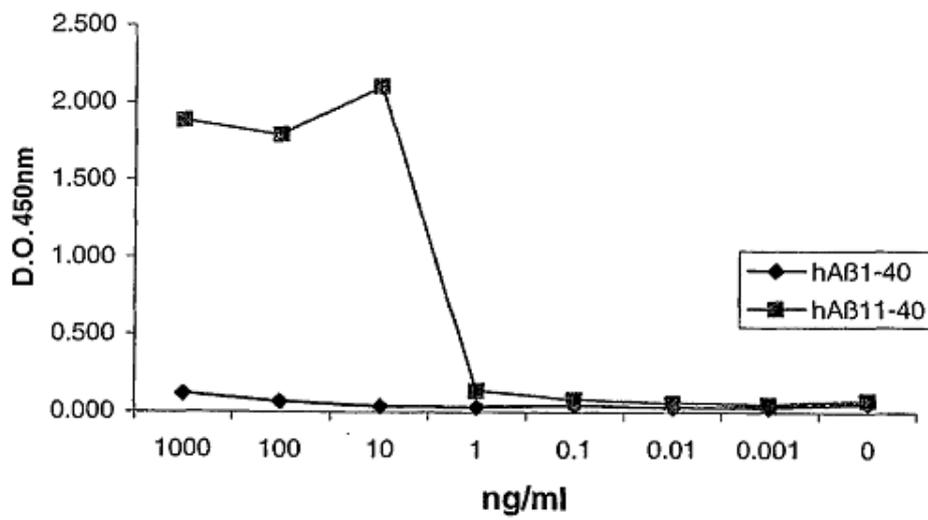


Fig2C

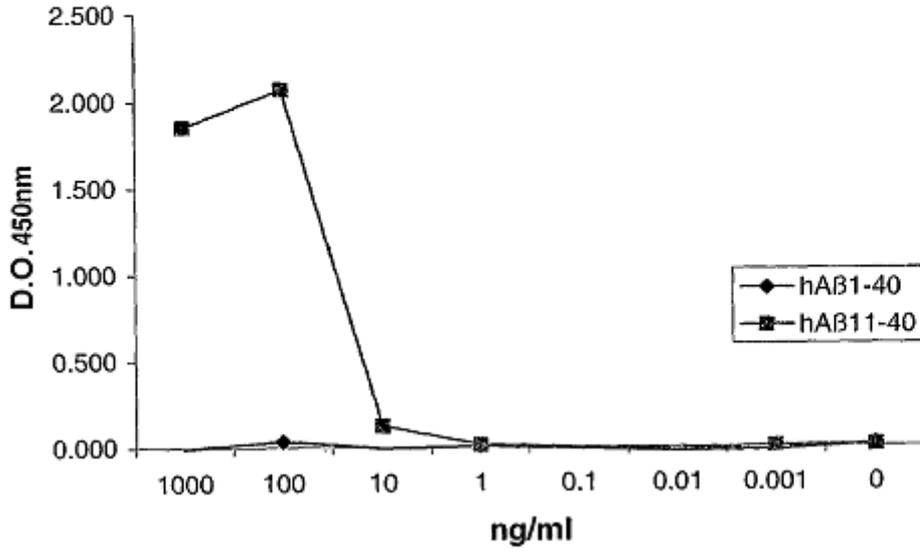


Fig 3

