

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 437**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2004 E 04707201 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 1594891**

54 Título: **Oligómeros β -(1,42) amiloides, derivados de los mismos y anticuerpos para estos, métodos para la preparación de los mismos y uso de los mismos**

30 Prioridad:

31.01.2003 DE 10303974

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

22.04.2016

73 Titular/es:

**ABBVIE DEUTSCHLAND GMBH & CO KG
(100.0%)
Max-Planck-Ring 2a
65205 Wiesbaden, DE**

72 Inventor/es:

**HILLEN, HEINZ;
STRIEBINGER, ANDREAS;
KRANTZ, CARSTEN;
MOELLER, ACHIM y
MUELLER, REINHOLD**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 567 437 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

Oligómeros β -(1,42) amiloides, derivados de los mismos y anticuerpos para estos, métodos para la preparación de los mismos y uso de los mismos

5 La presente invención se refiere a oligómeros neuromoduladores a base de formas truncadas de la proteína β (1-42) amiloide, un método de preparación específico por el cual los oligómeros son obtenibles en una manera reproducible y con rendimiento elevado, así como al uso de los oligómeros como agentes de diagnóstico y terapéuticos.

10 Los métodos para generar anticuerpos específicos del oligómero o para encontrar sustancias que puedan de interactuar con los oligómeros y con la formación de los mismos se describen de la misma manera que los anticuerpos en sí y el uso de los anticuerpos o sustancias como agentes de diagnóstico y terapéuticos.

15 La proteína β (1-42) amiloide, denominada también $A\beta$ (1-42) para abreviar, es un componente central de deposiciones extracelulares insolubles (placas seniles o neuríticas) compuestas de proteínas, lípidos, carbohidratos y sales en los cerebros de pacientes con síndrome de Alzheimer y síndrome de Down (C.L. Masters et al. PNAS 82, 4245 - 4249, 1985). Esta proteína la cual tiende a polimerizar en un ambiente acuoso puede presentarse en formas moleculares muy diferentes.

20 Una simple correlación de la deposición de la proteína insoluble con la aparición o la progresión de trastornos de demencia tales como, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, ha probado ser poco convincente (R.D. Terry et al Ann. Neurol. 30, 572-580 (1991), D.W. Dickson et al. Neurobiol. Aging 16, 285-298 (1995)). En contraste, la pérdida de sinapsis y percepción cognitiva parece correlacionarse mejor con las formas solubles de $A\beta$ (1-42) (L.F. Lue et al. Am. J. Pathol. 155, 853-862, (1999) C.A. McLean et al. Ann. Neurol. 46, 860-866 (1999)).

25 Con las formas solubles de $A\beta$ (1-42), existen esencialmente dos hipótesis diferentes con respecto a las formas moleculares que deberían ser la causa de trastornos de demencia como, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer.

30 Por una parte, se postula una acción citotóxica de las protofibrillas $A\beta$ (1-42). Estas son formas $A\beta$ (1-42) solubles fibrilares de alto nivel de agregación con pesos moleculares en el intervalo de 150-250 kDa (Arispe et al. PNAS 90, 567 (1993), Lashuel et al., Nature 418, 291 (2002)), que, debido a las propiedades que forman poro, deberían provocar un influjo de calcio no controlado a través de las membranas de las células neuronales.

35 Por otra parte, se describen derivados $A\beta$ (1-42) oligoméricos con pesos moleculares en el intervalo de 15-30 kDa (M.P. Lambert et al. PNAS 95, 6448-6453 (1998)). Estos oligómeros no fibrilares se denominan también ligandos difundibles y que contribuyen a la demencia derivados de amiloide (ADDL, del inglés *Amyloid Derived Dementing Ligands*, véanse los documentos US-A 6.218.506 y WO 01/10900, o de *Amyloid Derived Diffusible Ligands*, véase Lambert et al. *supra*) pueden encontrarse en preparaciones que muestran una influencia inhibidora en la velocidad de potencialización a largo plazo de neuronas en cortes de hipocampo.

40 Sin embargo, el estado de la investigación de oligómeros previa se caracteriza por mayor incertidumbre sobre las especies actualmente relevantes. La información en la literatura difiere en gran medida. De este modo, en el documento US-A 6.218.506 describen ADDL con 3 a 12 subunidades, mientras que los ADDL descritos en el documento WO 01/10900 pueden presentar hasta 24 subunidades.

45 Más específicamente, se discuten al menos dos formas, las cuales presentan un análisis electroforético de gel en pesos moleculares de condiciones no desnaturalizadas en el intervalo de 27 a 28 kDa y 23 a 24 kDa (documento US-A 6.218.506) o de aproximadamente 26 kDa a 28 kDa (documento WO 01/10900) o 17 kDa y 27 kDa (M.P. Lambert et al. PNAS 95, 6448-6453 (1998)) y en análisis electroforético en gel SDS en pesos moleculares de condiciones de desnaturalización de 17 kDa y 22 kDa (M.P. Lambert et al. PNAS 95, 6448-6453 (1998)) o de aproximadamente 22 kDa a aproximadamente 24 kDa y de aproximadamente 18 kDa a aproximadamente 19 kDa (documento WO 01/10900). También se han comprobado oligómeros $A\beta$ (1-42) estables de SDS con pesos moleculares en el intervalo de 8 kDa y 12 kDa por métodos de Western Blot en cerebros de pacientes de Alzheimer (C.A. McLean et al. Ann. Neurol. 46, 860-866 (1999)).

55 Las prescripciones de preparación descritas tienen la desventaja de dar lugar a preparaciones del oligómero no homogéneo.

60 De este modo, no ha sido posible todavía proporcionar de una manera reproducible, y mucho menos identificarse de manera inequívoca, las formas moleculares de $A\beta$ (1-42) responsables de la neuromodulación.

65 Sin embargo, la importancia de una preparación homogénea puede calibrarse, por ejemplo, a partir del transcurso del primer estudio clínico de inmunización activa en pacientes con Alzheimer. La vacunación con una forma pre-agregada de $A\beta$ (1-42) ha dado como resultado efectos secundarios considerables (meningoencefalitis, hemorragias) en algunos de los pacientes, ya que los anticuerpos formados reconocieron también las formas $A\beta$ (1-42)

presumiblemente necesarias para el revestimiento celular, lo cual dio como resultado reacciones inflamatorias (D. Schenk.; Nat. Rev. Neurosci. 3, 824-828 (2002)). Más sobre ADDL y la agregación de péptidos A β se encuentra, por ejemplo, en: DAHLGREN KARIE N ET AL: JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 277, N.º 35, 30 de agosto, 2002 (2002-08-30), páginas 32046-32053; DEMEESTER N ET AL: EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE, Vol. 13, N.º 11, junio de 2001 (2001-06), páginas 2015-2024; BITAN GAL ET AL: PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Vol. 100, N.º 1, 7 de enero, 2003 (2003-01-07), páginas 330-33; WURTH C ET AL: JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, Vol. 319, N.º 5, 21 de junio, 2002 (2002-06-21), páginas 1279-1290; PIKE C. ET AL.: J. OF NEUROCHEMISTRY, Vol. 64, N.º 1, 1995, páginas 253-265; KIRKITADZE, M. ET AL.: J. MOL. BIOL.; Vol. 312, 2001, páginas 1103-1119; y LAMBERT M P ET AL.; JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, WILEY INTERSCIENCE, NEW YORK, NY, US, Vol. 79, N.º 3, 1 de noviembre, 2001, páginas 595-605.

Para una terapia habitual que aspira especialmente a neutralizar la forma de proteína realmente perjudicial, el requisito indispensable es, por lo tanto, su identificación y preparación definida.

Además, se ha reportado la aparición de formas N-terminalmente truncadas de la proteína A β (1-42) junto con la enfermedad de Alzheimer. Ya en 1985 se detectaron también formas N-terminalmente truncadas junto a la A β (1-42) en las deposiciones de cerebros de pacientes de Alzheimer fallecidos (C. Masters et al., PNAS 82, 4245-4249 (1985)). De este modo, también se conoce que proteasas particulares presentes en el cerebro, tales como nepriliasina (NEP 24.11) o IDE (abreviatura de la enzima que degrada la insulina) pueden degradar A β (1-42) (D.J. Selkoe, Neuron 32, 177-180 (2001)).

Sin embargo, la importancia de formas N-terminalmente truncadas en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer no es clara (E.B. Lee et al, JBS 278, 4458-4466 (2003)). De manera interesante, algunos pacientes que sufren de enfermedad de Alzheimer o síndrome de Down esporádico o familiar acumulan preferentemente estas formas truncadas (J. Näslund et al. PNAS 91, 8378-8382 (1994), C. Russo et al., Nature 405, 531-532 (2000), T.C. Saido et al., Neuron 14, 457-466, (1995)). Un estudio más reciente (N. Sergeant et al, J. of Neurochemistry 85, 1581-1591 (2003)) se demostró que el 60 % de todos los péptidos A β insolubles en cerebros de pacientes con Alzheimer fallecidos se basan en formas N-terminalmente truncadas.

Los anticuerpos que están dirigidos contra la proteína A β (1-42) monomérica y los fragmentos particulares de los mismos ya se han descrito.

De este modo, los documentos WO 03/016466 y WO 03/016467 se refieren al anticuerpo 266 monoclonal y análogos de los mismos que carecen de un sitio de glicosilación particular en CDR2. También se conocen las versiones humanizadas de las mismas (Hu-266). En estas publicaciones también están mencionados otros anticuerpos monoclonales que, como el anticuerpo 226, reconocen los epítopes en la región de los aminoácidos 13-28 de A β (1-42). A esto pertenecen los anticuerpos 4G8 (también mencionados en Lue et al. (1999), supra) y 1C2. Además, McLean et al. (1999), supra, menciona el anticuerpo 1E8 monoclonal, el cual debería reconocer un epítopo en la región de los aminoácidos 18-22 de A β (1-42).

Además, se conoce un número de anticuerpos adicionales, los cuales reconocen epítopes de las secuencias N-terminales de A β (1-42). A esto pertenecen el anticuerpo 6E10 monoclonal comercialmente disponible (también mencionado en el documento WO 01/10900; Näslund et al. (1994), supra; Sergeant et al. (2003), supra) y los anticuerpos 3D6 y 10D5 monoclonales (véase el documento WO 03/016467) así como Ban50 y NAB228 (Lee et al (2003) supra).

Además, debe hacerse mención de los anticuerpos WO2, 21F12 y 3D6 monoclonales así como del suero ADA42 policlonal (Sergeant et al. (2003), supra).

Una visión general de anticuerpos anti-A β (1-42), que se encuentran en pruebas preclínicas, puede encontrarse en Schenk et al. (2002), supra.

El objetivo de la presente invención se basa en proporcionar las formas moleculares que provocan un aumento de la acción causal neuromoduladora y, en particular que daña la neurona de A β (1-42) y en trastornos de demencia tales como la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down, la invención lo resuelve por oligómeros A β (1-42) particulares a base de formas A β (1-42) truncadas que son conseguibles en forma de preparaciones homogéneas con un método especial de la proteína A β (1-42) monomérica. El método de preparación permite a la proteína A β (1-42) sintética de péptido, que es deficientemente soluble en medios acuosos, convertirse en oligómeros solubles definidos con rendimiento elevado.

El objeto de la presente invención son, por lo tanto, los objetos definidos en las reivindicaciones.

De este modo, la presente invención se refiere a oligómeros de la proteína β (1-42) amiloide, los oligómeros que tienen un peso molecular aparente de aproximadamente 15 kDa, 20 kDa, 38 kDa o 48 kDa en electroforesis en gel

de SDS, o a derivados de tales oligómeros que tienen un peso molecular que puede o no haber cambiado de acuerdo a la derivatización.

De esta manera, la presente invención se refiere a un oligómero de la $\beta(1-42)$ amiloide truncado N-terminalmente soluble en solución salina fisiológica y a diferencia de formas fibrilares más bien globulares que comprende fragmentos de $A\beta(X-42)$, en el cual X representa un número de 10 a 24, pudiendo conseguirse el oligómero según un método que comprende que:

(a) el detergente pueda actuar sobre una proteína $\beta(1-42)$ amiloide monomérica para formar un oligómero A de la $A\beta(1-42)$ soluble en solución salina fisiológica y más bien globular a diferencia de formas fibrilares;

(b) el efecto del detergente se reduzca y el oligómero A de la $A\beta(1-42)$ se vuelva a incubar para formar un oligómero B de la $A\beta(1-42)$ soluble en solución salina fisiológica y más bien globular a diferencia de formas fibrilares; y

(c) el oligómero B de la $A\beta(1-42)$ se trate con proteasa,

siendo el detergente un compuesto de la fórmula R-X, en el que el resto R representa opcionalmente alquilo ramificado con 6 a 20 átomos de carbono u opcionalmente alqueno ramificado con 6 a 20 átomos de carbono, y el resto X representa un grupo ácido o su sal, y presentando el oligómero B de la $A\beta(1-42)$ un peso molecular aparente en la electroforesis en gel de SDS de aproximadamente 38 kDa y/o aproximadamente 48 kDa.

La proteína $\beta(1-42)$ amiloide es un polipéptido que tiene 42 aminoácidos que se deriva de la proteína precursora amiloide (APP, por sus siglas en inglés) por procesamiento proteolítico. Esto incluye también, además de variantes humanos, las isoformas de la proteína $\beta(1-42)$ amiloide presentes en los organismos diferentes de los humanos, en particular otros mamíferos, sobre todo ratas.

Especialmente, la proteína $\beta(1-42)$ amiloide es proteína $\beta(1-42)$ amiloide humana. Las proteínas $\beta(1-42)$ amiloides humanas incluyen especialmente la proteína con la secuencia de aminoácido SEQ ID NO:1, así como muteínas y variantes alélicas de las mismas derivadas de la secuencia anteriormente mencionada, especialmente por intercambio de aminoácido. En esta conexión, deben mencionarse sobre todo las siguientes sustituciones de aminoácidos: A21G, E22K, E22Q, E22G y D23N. De este modo, las muteínas o variantes alélicas de la proteína $\beta(1-42)$ amiloide incluyen, de acuerdo con la invención, especialmente proteínas con una secuencia de aminoácido SEQ ID NO:1 en donde uno o más aminoácidos seleccionados de entre alanina 21, ácido glutámico 22 y ácido aspártico 23 han sido sustituidos por otro aminoácido, preferentemente seleccionado de entre glicina, lisina, glutamina y asparagina. Particularmente importante de acuerdo con la invención son sustituciones en la posición 22 especialmente con glutamina o glicina.

Además, la proteína $\beta(1-42)$ amiloide es proteína $\beta(1-42)$ amiloide de ratas. Las proteínas $\beta(1-42)$ amiloide de ratas incluyen especialmente la proteína con la secuencia de aminoácido SEQ ID NO:2, así como muteínas y variantes alélicas de la misma derivadas de la secuencia anteriormente mencionada, especialmente por intercambio de aminoácido. En esta conexión, deben mencionarse sobre todo aquellas sustituciones de aminoácido que corresponden a las sustituciones de aminoácido explicadas para la secuencia humana.

La proteína $\beta(1-42)$ amiloide puede prepararse por métodos sintéticos de péptido conocidos o recombinantemente. Además, un número de estas proteínas están comercialmente disponibles. Lo mismo se aplica también a muteínas y variantes alélicas.

Los oligómeros de acuerdo con la invención son obtenibles por oligomerización de la proteína $\beta(1-42)$ amiloide y tratamiento con proteasa posterior. La oligomerización comprende una agregación no covalente de la proteína amiloide monomérica, de manera que puede suponerse que los oligómeros están compuestos de una pluralidad de monómeros de proteína $\beta(1-42)$ amiloides.

Dependiendo del grado de oligomerización, los oligómeros presentan diferentes pesos moleculares. De este modo, es posible asignar pesos moleculares aparentes a los oligómeros por medio de la electroforesis en gel desnaturalizada. Estos son aproximadamente 15 kDa para el oligómero A1, aproximadamente 20 kDa para el oligómero A2, aproximadamente 38 kDa para el oligómero B1 y aproximadamente 48 kDa para el oligómero B2, cuando la electroforesis en gel se lleva a cabo en condiciones estándar desnaturalizadas (gel de Tris-glicina, 4-20 %, véase Lämmli UK, Nature 227, 680-685 (1970)), presentando las siguientes proteínas estándar los siguientes pesos moleculares aparentes en condiciones idénticas: miosina 250 kDa, albúmina de suero bovino 98 kDa, glutamina hidrogenasa 64 kDa, carboanhidrasa 36 kDa, mioglobina 30 kDa, lisozima 16 kDa, aprotinina 6 kDa, cadena B de insulina 4 kDa (véase azul estándar preteñido). De acuerdo a otro aspecto, los pesos moleculares para los oligómeros B son de aproximadamente 64 a 90 kDa, cuando la electroforesis en gel se lleva a cabo en condiciones estándar nativas (gel de Tris-glicina, 4-20 %) presentando las siguientes proteínas estándar los pesos moleculares aparentes en condiciones idénticas: miosina 250 kDa, albúmina de suero bovino 98 kDa, glutamina hidrogenasa 64 kDa, carboanhidrasa 36 kDa, mioglobina 30 kDa, lisozima 16 kDa, aprotinina 6 kDa, cadena B de insulina 4 kDa (véase azul estándar preteñido). Derivados de los oligómeros presentan un peso molecular modificado

correspondiente, en caso necesario, a la derivatización.

De acuerdo a otro aspecto, los oligómeros de acuerdo con la invención se caracterizan por una afinidad para células neuronales. Puede suponerse que los oligómeros se unen a proteínas de superficie celular particulares, especialmente receptores.

Se describe también a un método para determinar la unión de un oligómero de acuerdo con la invención a una estructura celular predefinida, cuyo método comprende

- 10 i) dejar al oligómero de acuerdo con la invención actuar sobre la estructura celular y
- ii) determinar si el oligómero de acuerdo con la invención se une a la estructura celular.

De acuerdo a otro aspecto, los oligómeros de acuerdo con la invención se caracterizan por una acción neuromoduladora. Esta acción neuromoduladora puede manifestarse en sí misma especialmente en una supervivencia reducida de células neuronales, por ejemplo, células de neuroblastoma (neurotoxicidad) cuando al menos un oligómero de acuerdo con la invención se deja actuar sobre un cultivo de estas células. A este respecto, puede evaluarse la supervivencia de las células de una manera conocida per se, por ejemplo, determinando el grado de apoptosis provocada por la acción de los oligómeros de acuerdo con la invención. Para este propósito, están disponibles métodos de ensayo adecuados, por ejemplo, métodos colorimétricos basados en bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio (MTT). Esta acción neuromoduladora puede manifestarse *in vivo* especialmente en una modulación de la velocidad de activación de las neuronas.

También se describe un método para determinar la actividad, especialmente la neurotoxicidad, de un oligómero de acuerdo con la invención, cuyo método comprende i) dejar al oligómero de acuerdo con la invención actuar sobre células y ii) determinar si se modifica el estado de las células.

Para métodos anteriormente mencionados, el oligómero de acuerdo con la invención se puede proporcionar en la manera descrita anteriormente, por ejemplo, en forma de una de las composiciones anteriormente mencionadas. Las células o estructuras celulares se proporcionan convenientemente *in vitro*, especialmente como cultivos celulares o en estructuras celulares también como homogenatos. En la presente, las células neuronales y especialmente las células de neuroblastoma sirven para determinar la neurotoxicidad. Alternativamente, es también posible proporcionar las células *in vivo*, especialmente como parte de un organismo, por ejemplo, de un animal experimental, o *ex vivo*.

El estado de las células se determina usualmente al menos una vez antes de, y al menos una vez después de la acción del oligómero. Si la comparación entre el estado antes de y el estado después de la acción resulta en una desviación, el oligómero probado tiene actividad.

El tipo del estado que se determina depende del tipo de la actividad que se determina. Una neurotoxicidad puede determinarse determinando la supervivencia, por ejemplo. Para este propósito, la proporción de las células vivas basadas en el número total de las células antes de y después de la acción del oligómero puede determinarse y compararse entre sí.

Con base en los métodos anteriores para determinar la unión o actividad, es posible, de acuerdo con modalidades particulares, probar sustancias ya sea que inhiban la unión de oligómeros de acuerdo con la invención y/o modulen su actividad, es decir, la reduzcan especialmente o la detengan (inhiban) esencialmente de manera completa o la aumenten.

Para este propósito, el método se lleva a cabo en principio al menos dos veces, una vez en presencia de la sustancia de prueba y una vez más sin la sustancia de prueba. Para este fin, la sustancia de prueba se agrega a los oligómeros usualmente después de que han sido proporcionados.

Sin embargo, si se pretende determinar si una sustancia que se prueba afecta la formación de los oligómeros o no, la sustancia se agrega convenientemente antes de la formación de los oligómeros, es decir, antes de que hayan sido proporcionados, por ejemplo, al o los reactivos utilizados para la formación del oligómero. De este modo, es posible llevar a cabo el método de preparación de acuerdo con la invención agregando la sustancia de prueba y luego determinar si y a qué grado se forman los oligómeros. Para este propósito, puede determinarse si los productos del método obtenidos en esta forma tienen las propiedades de los oligómeros de acuerdo con la invención, es decir, por ejemplo, su peso molecular, capacidad de unión y actividad.

En el sentido de una acción neuromoduladora tan pronunciada como sea posible, cabe mencionar los oligómeros B. En relación a esto, también cabe mencionar derivados de estos oligómeros, estando realizados especialmente los oligómeros basados en una proteína A β (1-42) N-terminalmente truncada.

Por razones de diseño de proceso, los oligómeros A o los oligómeros B pueden producirse como mezcla en forma de composiciones que, además de los oligómeros, comprenden además pequeñas proporciones de otros

5 polipéptidos, especialmente la proteína $\beta(1-42)$ amiloide monomérica y, cuando sea apropiado, también formas de alto peso molecular de la proteína $\beta(1-42)$ amiloide agregada. Las composiciones de esta clase se someten asimismo material objeto de la presente invención y se distinguen especialmente por la proporción del o de los oligómeros de la invención que es al menos el 70 % en peso, preferentemente al menos el 90 % en peso y especialmente al menos el 95 % en peso, con base en la totalidad de las proteínas derivadas a partir de la proteína $\beta(1-42)$ amiloide. En una preparación de los oligómeros A, la proporción del oligómero A2 (banda de 20 kDa en el gel SDS) es al menos el 50 % en peso y preferentemente al menos el 70 % en peso y especialmente al menos el 85 % en peso. En una preparación de los oligómeros B, la proporción de los oligómeros B1 y B2 (bandas de 38 kDa y 48 kDa en el gel SDS) es al menos el 60 % en peso, preferentemente al menos el 75 % en peso y especialmente al menos el 90 % en peso.

10 Los oligómeros de acuerdo con la invención pueden también estar derivatizados. El propósito de tales derivatizaciones puede ser, por ejemplo, modular las propiedades fisicoquímicas de los oligómeros, especialmente con respecto a la biodisponibilidad, proveer los oligómeros de una marca detectable o inmovilizarlos, por ejemplo, para poder acoplarlos a los soportes. El etiquetado y la inmovilización son particularmente importantes para aplicaciones de diagnóstico.

15 Las etiquetas adecuadas familiares en el campo bioquímico de la proteína se conocen suficientemente por el experto. Estas incluyen etiquetas fluorescentes, por ejemplo, derivados de fluoresceína y de tetrametilrodamina particulares, etiquetas luminiscentes, etiquetas colorimétricas, etiquetas radioactivas y etiquetas magnéticas así como etiquetas con afinidad para parejas de unión complementarias, tales como derivados de biotina y de estreptavidina.

20 Con respecto a los pesos moleculares aparentes, se debe tomar en cuenta que los derivados de oligómero presentan pesos moleculares que pueden haberse incrementado correspondientemente, comparados con los oligómeros no derivados, pero siendo el número de agregación idéntico. De este modo, por ejemplo, un derivado de biotina basado en el oligómero B1 $A\beta(1-42)$ con un peso molecular de 38 kDa en el gel SDS presenta un peso molecular de 42 kDa.

25 De acuerdo a una modalidad de realización especial de la presente invención, los oligómeros están reticulados. Los reticuladores adecuados se conocen por el experto y representan reactivos usualmente bifuncionales tales como formaldehído, glutardialdehído, suberato de disuccinimidilo, ditiobis(propionato de succinimidilo), tartrato de disuccinimidilo, tartrato de disulfosuccinimidilo, adipimidato de dimetilo, pimelidato de dimetilo, suberimidato de dimetilo, 3,3'-ditiobispropionimidato de dimetilo, éster de N- γ -maleinimidobutiloxisuccinimida, 4-(N-maleinimidometil)ciclohexan-1-carboxilato de succinimidilo, (4-yodacetil)aminobenzoato de N-succinimidilo y 3-(2-piridiltio)-propionato de N-succinimidilo.

30 Tales oligómeros reticulados tienen la ventaja de que están estabilizados y de que su oligomerización usualmente ya no es reversible. Por lo tanto, sirven especialmente para el uso en sistemas de prueba de diagnóstico o como inmunógenos para la producción de anticuerpos específicos de los oligómeros.

35 Los oligómeros de acuerdo la invención comprenden fragmentos de la proteína $\beta(1-42)$ amiloide. Se da preferencia a aquellos fragmentos que son obtenibles por la acción de las proteasas de origen natural. Especialmente los fragmentos obtenibles por proteólisis en tampones fisiológicos en condiciones no desnaturalizadas poseen una estabilidad proteolítica incrementada en comparación con la proteína $\beta(1-42)$ amiloide. Se da preferencia a fragmentos obtenibles por la acción de las endopeptidasas. De acuerdo a una forma de realización especial de la presente invención, los fragmentos son obtenibles por la acción de tripsina, quimotripsina, termolisina, elastasa, papaína o endoproteinasa GluC. Según otro aspecto, se da preferencia a aquellos fragmentos cuyos oligómeros de acuerdo con la invención se caracterizan por una acción de neuromodulación. Para una explicación más detallada de este aspecto, se hace referencia a las realizaciones correspondientes en la acción neuromoduladora de los oligómeros de la proteína $\beta(1-42)$ amiloide.

40 Estructuralmente, los fragmentos están caracterizados especialmente por que se derivan de la proteína $\beta(1-42)$ amiloide por desdoblamiento de secuencias N-terminales. Por lo tanto, en estas secuencias N-terminales se trata de fragmentos que tienen hasta 23, preferentemente hasta 21 y especialmente hasta 19 aminoácidos de la secuencia N-terminal de la proteína $\beta(1-42)$ amiloide. Por consiguiente, se trata, de acuerdo con la invención, de fragmentos de la proteína $A\beta(1-42)$ cuya secuencia comprende los aminoácidos 24 a 42 contiguos, preferentemente 22 a 42 y especialmente 20 a 42. En las secuencias N-terminales que se desdoblan se trata de secuencias con al menos 9 y especialmente con al menos 11 aminoácidos de la secuencia N-terminal de la proteína $\beta(1-42)$ amiloide. Por consiguiente, se da preferencia, de acuerdo con la invención, especialmente a fragmentos de la proteína $\beta(1-42)$ amiloide que están truncados N-terminalmente de 9 a 21 y especialmente 11 a 19 aminoácidos. Estos fragmentos corresponden a la fórmula $A\beta(X-42)$, en donde X de 10 a 22 y especialmente 12 a 20. De acuerdo con la invención, los fragmentos $A\beta(X-42)$ están seleccionados preferentemente, por lo tanto, de entre los siguientes fragmentos: $A\beta(12-42)$, $A\beta(13-42)$, $A\beta(14-42)$, $A\beta(15-42)$, $A\beta(16-42)$, $A\beta(17-42)$, $A\beta(18-42)$, $A\beta(19-42)$, $A\beta(20-42)$. Los fragmentos especiales son el fragmento $\beta(20-42)$ amiloide obtenible por la acción de termolisina así como el fragmento $\beta(12-42)$

amiloide obtenible por la acción de endoproteinasa GluC.

El método de acuerdo con la invención para preparar los oligómeros puede incluir esencialmente tres etapas, la primera de las cuales es opcional pero ventajosa, la segunda etapa se requiere absolutamente para la preparación de los oligómeros A y B y la tercera etapa sirve para preparar los oligómeros B de acuerdo con la invención.

La etapa 1 se refiere al desdoblamiento de la proteína. Para este propósito, los agentes de ruptura de unión de hidrógeno tales como, por ejemplo, hexafluoroisopropanol (HFIP) pueden dejarse actuar sobre la proteína. Los tiempos de acción de unos pocos minutos, por ejemplo, aproximadamente 10 a 60 minutos, son suficientes cuando la temperatura de acción es de aproximadamente 20 a 50 °C y especialmente aproximadamente 35 a 40 °C. La disolución subsiguiente del residuo evaporado hasta sequedad, preferentemente en forma concentrada, en solventes orgánicos adecuados miscibles con tampones acuosos, tal como, por ejemplo, sulfóxido de dimetilo (DMSO), resulta en una suspensión de al menos la proteína parcialmente desdoblada, que puede utilizarse en la etapa 2 del método de acuerdo con la invención. Si se requiere, la suspensión madre puede almacenarse entretanto a temperatura baja, por ejemplo a aproximadamente -20 °C.

Alternativamente a la etapa 1 anterior, la proteína puede alojarse en una solución preferentemente acuosa, ligeramente ácida, por ejemplo, en aproximadamente 10 mM de solución de HCl acuosa. Después de un tiempo de incubación de usualmente unos pocos minutos, los componentes insolubles se eliminan por centrifugación. Son apropiados unos pocos minutos para 10 000 g. Estas etapas de método se llevan a cabo preferentemente a temperatura ambiente, es decir, a una temperatura en el intervalo de 20 a 30 °C. El sobrenadante obtenido después de la centrifugación contiene la proteína $\beta(1-42)$ amiloide y puede almacenarse entretanto a temperatura baja, por ejemplo a aproximadamente -20 °C.

La etapa 2 se refiere a la oligomerización de la proteína para dar los oligómeros A. Para este propósito, se deja actuar un detergente sobre la proteína opcionalmente al menos parcialmente desdoblada hasta que se ha producido el oligómero A de manera suficiente.

Se usan preferentemente detergentes iónicos, especialmente detergentes aniónicos, de la fórmula (I):



en donde

el radical R es opcionalmente alquilo ramificado con 6 a 20 y preferentemente 10 a 14 átomos de carbono u opcionalmente alqueno ramificado con 6 a 20 y preferentemente 10 a 14 átomos de carbono, el radical X es un grupo ácido o sal del mismo, estando seleccionado X preferentemente desde entre $-COO^-M^+$, $-SO_3^-M^+$ y sobre todo $-OSO_3^-M^+$ y M^+ es un catión de hidrógeno o un catión inorgánico u orgánico preferentemente seleccionado de cationes de metal alcali y metal alcalinotérreo y cationes de amonio.

Resultan ventajosos detergentes de la fórmula (I), en donde R es un alquilo no ramificado del cual los radicales alquilo deben mencionarse especialmente. Resulta especialmente preferente dodesilsulfato de sodio (SDS). El ácido láurico y el ácido oleico pueden utilizarse también ventajosamente. La sal de sodio del detergente lauroilsarcosino (también conocido como sarkosyl NL-30 o Gardol®) es también particularmente ventajosa.

El tiempo de la acción del detergente depende especialmente de si -y en caso afirmativo, a qué grado- la proteína sometida a la oligomerización está desdoblada. Si, de acuerdo con la etapa 1, la proteína se trató de antemano con un agente de ruptura de unión de hidrógeno, es decir, especialmente con hexafluoroisopropanol, los tiempos de acción en el intervalo de unas pocas horas, ventajosamente de aproximadamente 1 a 20 y especialmente de aproximadamente 2 a 10 horas, son suficientes cuando la temperatura de acción es aproximadamente de 20 a 50 °C y especialmente de aproximadamente 35 a 40 °C. Si una proteína menos desdoblada o esencialmente no desdoblada es el punto de partida, son apropiados tiempos de acción correspondientemente más prolongados. Si la proteína $\beta(1-42)$ amiloide se pretrató, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento indicado anteriormente como una alternativa a la etapa 1 o si la proteína se introduce directamente en la etapa 2, los tiempos de acción en el intervalo de aproximadamente 5 a 30 horas y especialmente de aproximadamente 10 a 20 horas son suficientes cuando la temperatura de acción es aproximadamente de 20 a 50 °C y especialmente de aproximadamente 35 a 40 °C. Después de la incubación, los componentes insolubles se eliminan por centrifugación de manera ventajosa. Son apropiados unos pocos minutos para 10 000 g.

La concentración del detergente que se elige depende del detergente utilizado. Si se utiliza SDS, es apropiada una concentración en el intervalo del 0,01 al 1 % en peso, preferentemente del 0,05 al 0,5 % en peso, por ejemplo, de aproximadamente el 0,2 % en peso. Si se utilizan ácido láurico o ácido oleico, son apropiadas concentraciones algo más elevadas, por ejemplo, en un intervalo del 0,05 al 2 % en peso, preferentemente del 0,1 al 0,5 % en peso, por ejemplo, de aproximadamente el 0,5 % en peso.

La acción del detergente debería realizarse a una concentración salina de aproximadamente en el intervalo

fisiológico. De este modo, son apropiadas concentraciones de NaCl especiales en el intervalo de 50 a 500 mM, preferentemente de 100 a 200 mM y especialmente a aproximadamente 140 mM.

5 La solución resultante que contiene los oligómeros A, es decir, especialmente los oligómeros A1 y/o A2, pueden almacenarse entretanto a temperatura baja, por ejemplo, a aproximadamente -20 °C. Puede someterse como tal a la reacción adicional para dar los oligómeros B, o pueden añadirse primero etapas de acabado o de purificación adicionales, con las cuales se logra especialmente una concentración adicional de al menos uno de los oligómeros A. Especialmente, se pueden separar los oligómeros por medio de métodos cromatográficos a partir de otros
10 componentes de proteína presentes en la solución y especialmente aquellos derivados de la proteína $\beta(1-42)$ amiloide. Particularmente adecuados para este propósito son los métodos de cromatografía de afinidad, que pueden emplear, por ejemplo, anticuerpos específicos, es decir, especialmente también los anticuerpos específicos del oligómero de acuerdo con la invención.

15 La etapa 3 se refiere a la oligomerización para dar los oligómeros B. Se elige una composición que contiene un oligómero A como reactivo para esta etapa. A este respecto, los oligómeros A son, de acuerdo con la invención, productos intermedios importantes para la preparación de los oligómeros B. Si esta composición procede de la etapa 2, contiene regularmente un detergente y una concentración salina en el intervalo fisiológico. En este caso, es apropiado reducir la acción del detergente o la concentración salina. Esto puede realizarse reduciendo la concentración del detergente o de la sal, por ejemplo, diluyendo convenientemente con agua o un tampón de la
20 concentración salina inferior, por ejemplo, Tris-HCl, pH 7,3. Los factores de dilución en el intervalo de aproximadamente 2 a 10, ventajosamente en el intervalo de aproximadamente 3 a 8 y especialmente de aproximadamente 4 han demostrado ser adecuados. La reducción de la acción del detergente también puede lograrse agregando sustancias que pueden neutralizar la acción del detergente. Ejemplos de estas incluyen sustancias capaces de complejar los detergentes, como sustancias capaces de estabilizar células en el curso de
25 medidas de purificación y de extracción, por ejemplo, copolímeros en bloque de EO/PO particulares, especialmente el copolímero en bloque con el nombre comercial Pluronic® F68. También son adecuados alquilfenoles alcoxlados y especialmente etoxilados como t-octilfenoles etoxilados de la serie Tritón® X, especialmente Tritón® X100, 3-(3-colamidopropildimetilamonio)-1-propansulfonato (CHAPS®) o ésteres grasos de sorbitán alcoxlado y especialmente etoxilados como aquellos de la serie Tween®, especialmente Tween® 20, en intervalos de concentración alrededor
30 o por encima de la respectiva concentración micelar crítica.

Subsecuentemente, la solución se incuba hasta que se ha producido suficiente oligómero B. Los tiempos de acción en el intervalo de varias horas, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 10 a 30 horas y especialmente en el intervalo de aproximadamente 15 a 25 horas son suficientes cuando la temperatura de acción es
35 aproximadamente de 20 a 50 °C y especialmente de aproximadamente 35 a 40 °C. La solución puede entonces concentrarse y pueden eliminarse por centrifugación posibles residuos. También en este caso han demostrado ser apropiados unos pocos minutos para 10 000 g. El sobrenadante obtenido después de la centrifugación contiene oligómeros B.

40 La solución resultante que contiene los oligómeros B, es decir, especialmente los oligómeros B1 y/o B2, puede almacenarse entretanto a temperatura baja, por ejemplo, a aproximadamente -80 °C. Puede seguir utilizándose como tal o pueden añadirse primero etapas de acabado o de purificación adicionales. Respecto a esto, se hace referencia a las realizaciones anteriores para medidas correspondientes relacionadas con los oligómeros A.

45 También pueden llevarse a cabo etapas de acabado o de purificación adicionales para el propósito de eliminar completamente de manera esencial el detergente utilizado para preparar los oligómeros. Por ejemplo, los oligómeros B pueden precipitarse primero a partir de la solución que contiene detergente, extraerse y volverse a disolver en un medio libre de detergente. Las medidas para precipitar las proteínas se conocen de manera suficiente por el experto. De acuerdo con la invención, la adición de ácido acético metanólico acuoso ha mostrado ser apropiada. Sin unirse a
50 un mecanismo particular, el detergente o la variación de las concentraciones de detergente y salinas parecen colocar la proteína en formas solubles definidas que se difieren claramente de la forma de partida de la proteína disuelta en tampones fisiológicos acuosos, como puede detectarse, por ejemplo, por medio de electroforesis de gel nativa o desnaturalizada o cromatografía de permeación de gel. Esto es asombroso, puesto que los detergentes son normalmente capaces de desaglomerarse, es decir, desensamblarse en subunidades, mientras que, de acuerdo con
55 la invención, los oligómeros definidos se obtienen a partir de un monómero propenso a la agregación.

Los oligómeros de acuerdo con la invención de fragmentos de la proteína $\beta(1-42)$ amiloide se preparan a partir de oligómeros de la proteína $\beta(1-42)$ amiloide por proteólisis. De esta manera, se trata con proteasa una solución resultante de la etapa de método 3 de acuerdo con la invención. Si se alcanza el grado de proteólisis deseado, se desactiva la proteasa de manera conocida en general. Los oligómeros resultantes pueden extraerse entonces apoyándose en este caso en maneras de proceder ya descritas así como procesarse, en caso necesario, por etapas de acabado o de purificación adicionales.

65 Para la preparación de derivados de oligómeros de acuerdo con la invención, se lleva a cabo convenientemente el método descrito anteriormente de acuerdo con la invención en una proteína $\beta(1-42)$ amiloide derivada ya apropiadamente. Alternativamente, es también posible derivar el oligómero, pero la estructura del oligómero no

debería modificarse. Las medidas químicas de proteína adecuadas se conocen por el experto.

La reticulación de los oligómeros de acuerdo con la invención o derivados de los mismos puede llevarse a cabo de una manera conocida per se. Si, por ejemplo, se utiliza glutaraldehído como agente de reticulación, una solución
5 resultante a partir de la etapa de método 2 o 3 de acuerdo con la invención puede tratarse con una solución de glutaraldehído. Después de unas pocas horas a temperatura ambiente, los oligómeros habrán reaccionado con el glutaraldehído. La reacción puede entonces detenerse de una manera conocida per se haciendo reaccionar el exceso de glutaraldehído con reactivos generalmente conocidos para este propósito, tales como etanolamina. Dependiendo de si los oligómeros A o B de la invención se reticulan, se obtiene una solución de oligómeros
10 reticulados de acuerdo con la invención que se denominan A-CL o B-CL.

Es posible, en particular para los oligómeros B opcionalmente reticulados o derivados de los mismos, siguiendo la síntesis de los mismos, incrementar de nuevo la concentración salina, sin deteriorar la estabilidad de los oligómeros. Esto es importante con respecto al uso de los oligómeros, por ejemplo, en el caso de que sean apropiados para
15 condiciones fisiológicas de uso (aplicaciones celulares, aplicaciones *in vivo*).

Los oligómeros de acuerdo con la invención y las composiciones que los contienen se distinguen por su homogeneidad y estabilidad. Estos son solubles en medios fisiológicos, por ejemplo, solución salina fisiológica, y difieren de formas fibrilares por su apariencia más bien globular. Estos tienen la ventaja de presentar una estructura
20 espacial que es claramente diferente de otras formas de A β (1-42), en particular el monómero, oligómeros no tóxicos, la molécula precursora APP que comprende A β (1-42), protofibrillas y fibrillas. Estos son particularmente por lo tanto adecuados para generar anticuerpos específicos tanto *in vivo* como *in vitro* y hacen posible, por ejemplo, una inmunización activa específica. A este respecto, puede ser crucial utilizar para la inmunización únicamente aquellos oligómeros que provocan la enfermedad. Otras formas de A β (1-42), tal como la molécula monomérica u oligómeros
25 más pequeños, pueden ser necesarios para funciones de señal importantes en el organismo. Del mismo modo, la eliminación de las deposiciones fibrilares que son presumiblemente importantes para el revestimiento celular puede dañar al organismo.

De la misma manera, es posible implementar posibilidades de terapia utilizando los oligómeros homogéneos de acuerdo con la invención y las composiciones que contienen los oligómeros, tales como inmunización pasiva, el uso
30 de estabilizadores de las formas oligoméricas y el uso de agonistas o antagonistas receptores (parciales). De este modo, una preparación del oligómero homogénea hace también posible una producción específica de anticuerpos policlonales o monoclonales para la inmunización pasiva. Es también posible encontrar moléculas receptoras o moléculas de señal que son relevantes para la enfermedad, que están influenciadas por la forma oligomérica, con
35 los oligómeros de acuerdo con la invención y las composiciones que contienen estos.

Debido a su participación en los procesos fisiológicos asociados con la proteína β amiloide, los oligómeros de acuerdo con la invención poseen un valor diagnóstico y terapéutico. De este modo, es objeto de la presente invención el uso de oligómeros de acuerdo con la invención y derivados de los mismos, opcionalmente en forma de
40 una composición correspondiente, en métodos de detección diagnósticos *in vitro* e *in vivo*.

Los procesos fisiológicos asociados con la proteína β amiloide incluyen aquellos asociados con las deposiciones de las proteínas amiloides (amiloidosis). Estas incluyen tanto aquellos procesos que resultan en las modificaciones
45 estructurales del tejido nervioso y son importantes, por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down, como aquellos procesos que afectan otros tejidos, tales como microangiopatías amiloides, por ejemplo, angiopatía amiloide congófilica (CAA, por sus siglas en inglés).

Otro aspecto de la presente invención es el uso de oligómeros de acuerdo con la invención y derivados de los mismos, opcionalmente en forma de una composición correspondiente, para generar anticuerpos específicos de los
50 oligómeros.

Aquí, los oligómeros de acuerdo con la invención basados en formas truncadas de la proteína A β (1-42) son de importancia particular: debido al término N faltante, se puede generar una respuesta inmune claramente más selectiva que con la proteína A β (1-42). Aunque el término N altamente inmunogénico en la proteína A β (1-42) clásica produce predominantemente anticuerpos que son específicos para esta región de la molécula, por ejemplo, los anticuerpos 6E10 (F. Signet) y BAM-10 (empresa Sigma, St. Louis), que, conforme a la información del fabricante, están dirigidos contra el término N (6E10: A β (1-17) y BAM-10 A β (1-12)), los anticuerpos obtenibles con los oligómeros de acuerdo con la invención basados en formas A β (1-42) truncadas reconocen regiones específicas de oligómeros, por lo que se logra una selectividad comparada a otras formas A β (1-42). Esta ventaja puede utilizarse
60 en particular para la vacunación activa, ya que la respuesta inmune más selectiva que resulta después de la inoculación (contra APP, formas monoméricas, protofibrillas, fibrillas, placas) también implica pocos efectos secundarios (por ejemplo, hemorragias cerebrales, deterioro de actividad neurotrófica fisiológica de la forma monomérica *in situ*). También se pueden preparar y seleccionar mejor anticuerpos especialmente monoclonales para una inmunización pasiva, es decir, una terapia de anticuerpo.

65

Un aspecto de este uso es la generación de anticuerpos específicos de oligómeros en el contexto de una terapia.

Por lo tanto, otro objeto de la presente invención es el uso de un oligómero de acuerdo con la invención o derivados del mismo en el campo terapéutico, en particular como vacuna.

5 Tal vacuna representa usualmente una composición farmacéutica que contiene al menos un oligómero de acuerdo con la invención y/o al menos un derivado del mismo de acuerdo con la invención. Para este propósito, es posible utilizar en particular una de las composiciones de acuerdo con la invención, que incluyen dos o más oligómeros, o una combinación de diferentes composiciones. La composición puede además contener un portador fisiológicamente digerible y, opcionalmente, excipientes adicionales, por ejemplo, inmunoestimuladores.

10 Aunque en principio pueden elegirse cualesquiera portadores adecuados, el tipo del portador usualmente depende de la ruta de administración. De este modo, las vacunas de acuerdo con la invención pueden formularse en una forma adecuada particular para administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intramuscular y subcutánea. En estos casos, el portador incluye preferentemente agua, solución salina, alcohol, una grasa, una cera y/o un tampón.

15 Es posible utilizar cualquiera de una multiplicidad de inmunoestimulantes en las vacunas de acuerdo con la invención. Por ejemplo, puede incluirse un adyuvante. La mayoría de los adyuvantes contienen una sustancia que debería proteger el antígeno del catabolismo rápido, tal como hidróxido de aluminio o un aceite mineral, así como una proteína derivada del lípido A, *Bordetella pertussis* o *Mycobacterium tuberculosis*. Los adyuvantes adecuados están comercialmente disponibles de manera usual, por ejemplo, adyuvantes de Freund completos o incompletos; AS-2; sales de aluminio tales como hidróxido de aluminio (como un gel, donde sea apropiado) o fosfato de aluminio; sales de calcio, sales de hierro o sales de zinc; una suspensión insoluble de tirosina acilada; azúcares acilados; polisacáridos catiónica o aniónicamente derivados; polifosfacenos; microesferas biológicamente degradables; monofosforil lípido A. Las citocinas tales como GM-CSF o interleucina-2, -7 o -12 pueden utilizarse asimismo como adyuvantes.

La presente invención incluye además un método para producir anticuerpos, el cual comprende

- 30 i) inmunizar un huésped con al menos un oligómero de acuerdo con la invención, derivado del mismo o una composición; y
ii) obtener un suero del huésped que contiene un anticuerpo producido como una respuesta a la inmunización.

35 De acuerdo con una forma de realización particular para producir los anticuerpos, la inmunización se lleva a cabo administrando cócteles de inmunización que contienen las mezclas de varios oligómeros o derivados de oligómeros de acuerdo con la invención. En particular, puede ser apropiado administrar en el curso de tal método varios cócteles de inmunización cuya composición oligomérica difiere.

40 Si los oligómeros o derivados de oligómeros que se utilizan no son, o son solo débilmente inmunogénicos, su inmunogenicidad puede incrementarse acoplándolos a los portadores, preferentemente a una proteína portadora tal como hemocianina de lapa californiana (KLH, por sus siglas en inglés), hemocianina de cangrejo herradura (LPH), albúmina de suero de bovino (BSA) u ovalbúmina (OVA). Para este propósito, existe un número de posibilidades de acoplamiento comúnmente disponibles conocidos por el experto. Un ejemplo conveniente posible es la reacción con glutaraldehído, por ejemplo, incubando el oligómero o mezcla oligomérica con un péptido adecuado o mezcla peptídica en agua o un solvente acuoso. Esta reacción puede llevarse a cabo convenientemente a temperatura del entorno, es decir, usualmente a temperatura ambiente. Sin embargo, puede también ser conveniente reducir o incrementar ligeramente la temperatura. La reacción produce usualmente el resultado deseado dentro de pocas horas, un tiempo de reacción de, por ejemplo, 2 horas está dentro del intervalo usual. La concentración del glutaraldehído está usualmente en ppm a un intervalo en %, convenientemente de 10 ppm hasta el 1 %, preferentemente de 10 ppm al 0,5 %. La optimización de los parámetros de reacción están dentro de las experiencias del experto y debe tenerse en cuenta que los oligómeros A y B o derivados oligoméricos sean estables en las condiciones de reacción elegidas.

45 Los cócteles de inmunización se preparan combinando primero los componentes que se utilizan. Resulta ventajoso incubar inicialmente la mezcla de componentes resultante. Esto se realiza convenientemente a temperatura del entorno, es decir, usualmente a temperatura ambiente. Sin embargo, puede ser conveniente enfriar o calentar ligeramente tal mezcla. El periodo de incubación es usualmente de pocos minutos a unas pocas horas, un tiempo de incubación de una hora que ha demostrado ser ventajoso.

50 Los cócteles de inmunización contienen, además del antígeno, excipientes usualmente adicionales, en particular adyuvantes comúnmente utilizados para la inmunización, por ejemplo adyuvante de Freund. Especialmente, el adyuvante de Freund completo se utiliza para la primera inmunización, mientras cualesquiera inmunizaciones adicionales se llevan a cabo con adyuvante de Freund incompleto. El cóctel de inmunización se prepara agregando el antígeno (inmunógeno), preferentemente en la forma de la mezcla del componentes anteriormente descrita, al o a los excipientes. A este respecto, por regla general, se emulsiona el antígeno.

65

Como huéspedes sirven particularmente roedores o también conejos. Estos u otros huéspedes adecuados se inyectan con los cócteles de inmunización, preferentemente subcutáneamente. Los niveles de anticuerpos pueden determinarse utilizando un inmunoensayo, por ejemplo, utilizando competitivamente un antisuero de oveja dirigido contra el huésped IgG y un oligómero etiquetado. De este modo, puede decidirse hacia el fin de la inmunización si el huésped determinado es adecuado para producir anticuerpos. Si, por ejemplo, se llevan a cabo cuatro inmunizaciones, es posible determinar el nivel de anticuerpos después de la tercera inmunización y luego obtener anticuerpos a partir de animales que presentan un nivel de anticuerpos suficiente.

Los anticuerpos producidos se obtienen preferentemente tomando sangre de los huéspedes durante un periodo de varias semanas o meses. Finalmente, puede desangrarse el huésped. El suero que contiene los anticuerpos deseados puede obtenerse a partir de la sangre obtenida en una manera conocida per se. El suero completo así obtenido puede, si se requiere, purificarse adicionalmente por el experto para concentrar la fracción de anticuerpo presente en el mismo y en particular los anticuerpos que reconocen el oligómero.

De acuerdo con una modalidad particular de este método, se selecciona al menos un anticuerpo del suero, cuyo anticuerpo reconoce específicamente el oligómero utilizado como inmunógeno, un derivado del mismo o al menos un oligómero o derivado del mismo presente en la composición utilizada como inmunógeno. En este contexto, la especificidad significa una afinidad de unión más elevada del anticuerpo para el inmunógeno que para otro, en particular proteínas relacionadas, específicamente en comparación con la proteína $\beta(1-42)$ amiloide monomérica así como con los agregados de proteína $\beta(1-42)$ amiloide oligomérica o multimerica que presentan un peso molecular más elevado que los oligómeros de acuerdo con la invención. Es también posible obtener de esta manera anticuerpos específicos de oligómeros monoclonales. Para este fin, sin embargo, se da preferencia a la eliminación a partir del tejido del bazo de los huéspedes e, iniciando a partir de los linfocitos del bazo así obtenidos, establecerse en los hibridomas de manera usual que producen los anticuerpos monoclonales.

Descripción detallada de la producción del anticuerpo

Los linfocitos B que, en su totalidad, contienen un repertorio de anticuerpos compuesto de cientos de millones de diferentes especificidades del anticuerpo son parte del sistema inmune de un mamífero. Una respuesta inmune normal a un antígeno determinado significa la selección de uno o más anticuerpos de tal repertorio, el cual se une específicamente al antígeno, y el éxito de una respuesta inmune se basa al menos parcialmente en la capacidad de tales anticuerpos para reconocer específicamente (y finalmente eliminar) el antígeno estimulante y e ignorar, a este respecto, otras moléculas en el ambiente de tales anticuerpos.

La utilidad de los anticuerpos que reconocen específicamente un antígeno objetivo particular ha conducido al desarrollo de la tecnología de anticuerpos monoclonal. La tecnología de hibridoma estandarizada permite ahora la producción de anticuerpos con una especificidad sencilla para un antígeno de interés. Más recientemente, se han desarrollado técnicas de anticuerpo recombinantes tales como el cribado *in vitro* de bancos de anticuerpo. Estas técnicas permiten producir asimismo anticuerpos con una única especificidad para un antígeno de interés.

En el método de acuerdo con la invención, el antígeno de interés puede dejarse actuar en el repertorio del anticuerpo ya sea *in vivo* o *in vitro*.

Según una forma de realización, el antígeno se deja actuar sobre el repertorio inmunizando un animal *in vivo* con el antígeno. Este enfoque *in vivo* puede comprender además establecer a partir de los linfocitos de un animal un número de hibridomas y seleccionar un hibridoma que secreta una unión específicamente del anticuerpo al antígeno. El animal que se inmuniza puede ser, por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo, un pollo, un camello o una oveja, o puede ser una versión transgénica de cualquiera de los animales mencionados anteriormente, por ejemplo, un ratón transgénico con genes de inmunoglobulina humanos, que produce anticuerpos humanos después de un estímulo inmunogénico. Otros tipos de animales que pueden inmunizarse incluyen ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID, por sus siglas en inglés) que han sido reconstituidos con células sanguíneas mononucleares periféricas humanas (ratones hu-PBMC SCID quiméricos) o con células linfoides o precursores de las mismas, así como ratones que han sido tratados con irradiación corporal total letal, luego protegidos contra radiación con células de médula espinal a partir de un ratón con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) y subsecuentemente trasplantados con linfocitos humanos funcionales (el denominado sistema "Trimera"). Otro tipo de un animal que se inmuniza es un animal (por ejemplo, un ratón) en cuyo genoma un gen endógeno que codifica el antígeno de interés ha sido desviado ("anulado"), por ejemplo, por recombinación homóloga, de manera que, después de la inmunización con el antígeno, el animal reconoce el antígeno como extraño. Es obvio para el experto que los anticuerpos policlonales o monoclonales producidos por este método se caracterizan y seleccionan utilizando métodos de cribado conocidos que incluyen pero no se limitan a técnicas de ELISA.

Según otra forma de realización, el antígeno se deja actuar sobre el repertorio del anticuerpo *in vitro* cribando una biblioteca de anticuerpo recombinante con el antígeno. La biblioteca de anticuerpo recombinante puede expresarse, por ejemplo, en la superficie de los bacteriófagos o en la superficie de células de levadura o en la superficie de células bacteriales. En una variedad de formas de realización, la biblioteca de anticuerpo recombinante es una biblioteca scFv o una biblioteca Fab, por ejemplo. De acuerdo con otra modalidad, las bibliotecas del anticuerpo se

expresan como fusiones de proteína de ARN.

Otro enfoque para producir tales anticuerpos comprende una combinación de enfoques *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, el antígeno puede dejarse actuar sobre el repertorio del anticuerpo inmunizando un animal *in vivo* con el antígeno y luego cribando *in vitro* con el antígeno una biblioteca de anticuerpo recombinante preparada a partir de las células linfoides de tal animal o una biblioteca de anticuerpo de dominio único (por ejemplo, con cadenas pesadas y/o ligeras). Según otro enfoque, el antígeno se deja actuar sobre el repertorio del anticuerpo inmunizando un animal *in vivo* con el antígeno y luego sometiendo una biblioteca de anticuerpo recombinante o biblioteca de dominio único producida a partir de células linfoides de tal animal para maduración de la afinidad. Según otro enfoque, el antígeno se deja actuar sobre el repertorio del anticuerpo inmunizando un animal *in vivo* con tal antígeno, luego seleccionando las células que producen anticuerpos individuales que secretan un anticuerpo de interés y obteniendo ADNcs de estas células seleccionadas para la región variable de las cadenas pesadas y ligeras (por ejemplo, por medio de PCR) y expresando tales regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras en células huésped de mamífero *in vitro* (lo cual se denomina método de anticuerpo de linfocitos seleccionado o SLAM, por sus siglas en inglés), por lo que se deja seleccionar y manipular además las secuencias genéticas de anticuerpos seleccionados. Además, los anticuerpos monoclonales pueden seleccionarse por clonación de expresión expresando los genes del anticuerpo para las cadenas pesadas y ligeras en células de mamífero y seleccionando aquellas células de mamífero que secretan un anticuerpo con la afinidad de unión deseada.

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención es proporcionar antígenos definidos para tamización y tamización opuesta. De esta manera, pueden seleccionarse aquellos anticuerpos policlonales y monoclonales que se unen a un oligómero de acuerdo con la invención o derivado del mismo, pero no otras formas de la proteína A β (1-42), APP, fibrillas amiloides o placas amiloides y un número de otros antígenos y tejidos no relacionados.

Es suficientemente conocido por el experto que las selecciones del anticuerpo se basan en antígenos bien definidos. Si, por el contrario, se utilizan menos antígenos bien definidos, no son suficientemente selectivos. En breve, la actuación y selección *in vitro* es similar a la cromatografía por afinidad, con "ligandos" para el antígeno deseado que se separa a partir de aquellos que no se unen al antígeno con suficiente afinidad. El grado de concentración de los anticuerpos deseados a partir del enorme agrupamiento de otros anticuerpos es por lo tanto una consecuencia directa de la calidad del antígeno. Sorprendentemente, los oligómeros de acuerdo con la invención y derivados de los mismos representan antígenos que pueden utilizarse para anticuerpos relevantes y selectivos, adecuados, concentrados y se pueden separar eficientemente de anticuerpos que reconocen otras formas asociadas con la proteína A β (1-42) así como otros antígenos no relacionados.

Los métodos de la invención para producir anticuerpos pueden utilizarse para producir distintos tipos de anticuerpos. Estos incluyen esencialmente anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos de injerto de CDR así como porciones de unión de antígeno de los mismos.

A continuación se describen métodos para producir tales anticuerpos. A este respecto, se diferencia entre enfoques *in vivo*, enfoques *in vitro* o una combinación de ambos.

Enfoques *in vivo*

A partir de las células que producen anticuerpos generados *in vivo*, los anticuerpos monoclonales pueden producirse por medio de técnicas estandarizadas, tales como la técnica de hibridoma originalmente descrita por Kohler y Milstein (1975, *Nature* 256:495-497) (véase también Brown *et al.* (1981) *J. Immunol* 127:539-46; Brown *et al.* (1980) *J Biol Chem* 255:4980-83; Yeh *et al.* (1976) *PNAS* 76:2927-31; y Yeh *et al.* (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75). La tecnología para producir hibridomas de anticuerpo monoclonales es suficientemente conocida (véase generalmente R. H. Kenned, en *Monoclonal Antibodies: A New Dimension in Biological Analices*, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); E. A. Lerner (1981) *Yale J. Biol. Med.*, 54:387-402; M.L. Gefter *et al.* (1977) *Somatic Cell Genet.*, 3:231-35). Brevemente, una línea celular inmortalizada (normalmente un mieloma) se combina con linfocitos (normalmente esplenocitos o células de nódulo linfático o linfocitos de sangre periférica) de un mamífero inmunizado con el oligómero de acuerdo con la invención o derivado del mismo, y los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma resultantes se criban para identificar un hibridoma el cual produce un anticuerpo monoclonal con especificidad para el oligómero de acuerdo con la invención o para un derivado del mismo. Cualquiera de los muchos protocolos suficientemente conocidos para la fusión de linfocitos e inmortalizar líneas celulares puede aplicarse para este propósito (véase también G. Galfre *et al.* (1977) *Nature* 266:550-52; Gefter *et al.* *Somatic Cell Genet.*, citada *supra*; Lerner, *Yale J. Biol. Med.*, citada *supra*; Kenned, *Monoclonal Antibodies*, citada *supra*). Además, el experto apreciará que existen diversas variaciones de tales métodos que son asimismo útiles. Normalmente, la línea celular inmortalizada (por ejemplo, una línea celular de mieloma) se deriva de las mismas especies de mamífero como los linfocitos. Por ejemplo, los hibridomas murinos pueden establecerse combinando linfocitos a partir de un ratón inmunizado con una preparación inmunogénica de acuerdo con la invención con una línea celular de ratón inmortalizada. Las líneas celulares inmortalizadas preferentes son líneas celulares de mieloma de ratón que son sensibles a medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (medio de HAT). Cualquier número de líneas celulares de mieloma puede utilizarse de manera estándar como un compañero de fusión, por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14. Estas líneas celulares

de mieloma están disponibles en la *American Type Culture Collection* (ATCC), Rockville, MD. Normalmente, las células de mieloma de ratón sensibles a HAT se fusionan con esplenocitos de ratón utilizando polietilenglicol (PEG). Las células de hibridoma que resultan de la fusión se seleccionan entonces utilizando medio HAT, por lo que se aniquilan células de mieloma improductivamente fusionadas y no fusionadas (los esplenocitos no fusionados mueren después de varios días, puesto que no están transformados). Las células de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente el oligómero de acuerdo con la invención o un derivado del mismo se identifican al cribar los sobrenadantes del cultivo de hibridoma para tales anticuerpos, por ejemplo, utilizando un ensayo ELISA estándar para seleccionar aquellos anticuerpos que pueden unir específicamente el oligómero de acuerdo con la invención o un derivado del mismo.

Dependiendo del tipo del anticuerpo deseado, pueden utilizarse varios animales huéspedes para inmunización *in vivo*. Puede utilizarse un huésped que expresa por sí mismo una versión endógena del antígeno de interés. Alternativamente, puede utilizarse un huésped, el cual se ha vuelto deficiente para una versión endógena del antígeno de interés. Por ejemplo, se mostró que ratones que se habían vuelto deficientes para una proteína endógena particular a través de la recombinación homóloga en el gen endógeno correspondiente (es decir, ratones inactivados) generaron una respuesta humoral a la proteína, con la cual se inmunizaron y por lo tanto pueden utilizarse para la producción de anticuerpos monoclonales de afinidad elevada a la proteína (véase, por ejemplo, Roes, J. et al. (1995) *J. Immunol. Methods* 183:231-237; Lunn, M.P. et al. (2000) *J. Neurochem.* 75:404-412).

Una multiplicidad de mamíferos no humanos son huéspedes adecuados para la producción de anticuerpos no humanos frente al oligómero de acuerdo con la invención o un derivado del mismo. Estos incluyen ratones, ratas, pollos, camellos, conejos y cabras (y versiones inactivadas de los mismos), aunque se da preferencia a ratones para la producción del hibridoma. Además, puede utilizarse un animal huésped no humano que expresa un repertorio del anticuerpo humano para producir esencialmente anticuerpos humanos frente a un antígeno humano con especificidad dual. Los animales no humanos de esta clase incluyen animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que soportan los transgenes de inmunoglobulina humana (ratones hu-PBMC SCID quiméricos) y quimeras de irradiación humanas/de ratón que se describen en mayor detalle posteriormente.

Según una forma de realización, el animal inmunizado con un oligómero de acuerdo con la invención o derivado del mismo es un mamífero no humano, preferentemente un ratón, que es transgénico debido a los genes de inmunoglobulina humana de manera que el mamífero no humano realiza anticuerpos humanos tras una estimulación antigénica. Normalmente, los transgenes de inmunoglobulina para cadenas pesadas y ligeras con configuración de línea germinal humana se introducen dentro de tales animales que han sido alterados de manera que sus lugares de cadena pesada y ligera endógenos son inactivos. Si tales animales se estimulan con antígeno (por ejemplo, con un antígeno humano), se producen anticuerpos derivados de las secuencias de inmunoglobulina humana (es decir, anticuerpos humanos). Es posible hacer a partir de los linfocitos de tales animales anticuerpos monoclonales humanos por medio de la tecnología de hibridoma estandarizada. Para una descripción adicional de los ratones transgénicos con inmunoglobulinas humanas y su uso en la producción de anticuerpos humanos, véanse, por ejemplo, los documentos US 5.939.598, WO 96/33735, WO 96/34096, WO 98/24893 y WO 99/53049 (Abgenix Inc.), y los documentos US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.661.016, US 5.770.429, US 5.814.318, US 5.877.397 y WO 99/45962 (Genpharm Inc.); véase asimismo MacQuitty, J.J. y Kay, R.M. (1992) *Science* 257:1188; Taylor, L.D. et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:6287-6295; Lonberg, N. et al. (1994) *Nature* 368:856-859; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93; Harding, F.A. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546; Fishwild, D. M. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851; Mendez, M. J. et al. (1997) *Nature Genetics* 15:146-156; Green, L.L. y Jakobovits, A. (1998) *J. Exp. Med.* 188:483495; Green, L.L. (1999) *J. Immunol. Methods* 231:11-23; Yang, X.D. et al. (1999) *J. Leukoc. Biol.* 66:401-410; Gallo, M.L. et al. (2000) *Eur. J. Immunol.* 30:534-540.

De acuerdo con otra forma de realización, el animal, que se inmuniza con un oligómero de acuerdo con la invención o un derivado del mismo, puede ser un ratón con inmunodeficiencia combinada severa (SCID), que ha sido reconstituido con células sanguíneas mononucleares periféricas humanas o células linfoides o precursores de las mismas. Tales ratones, que denominan ratones hu-PBMC SCID quiméricos, producen respuestas de inmunoglobulina humana tras una estimulación antigénica, como se ha demostrado. Para una descripción adicional de estos ratones y su uso para generar anticuerpos, véase, por ejemplo, Leader, K.A. et al. (1992) *Immunology* 76:229-234; Bombil, F. et al. (1996) *Immunobiol.* 195:360-375; Murphy, W.J. et al. (1996) *Semin. Immunol.* 8:233-241; Herz, U. et al. (1997) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113: 150-152; Albert, S.E. et al. (1997) *J. Immunol.* 159:1393-1403; Nguyen, H. et al. (1997) *Microbiol. Immunol.* 41:901-907; Arai, K. et al. (1998) *J. Immunol. Methods* 217:79-85; Yoshinari, K. y Arai, K. (1998) *Hybridoma* 17:41-45; Hutchins, W.A. et al. (1999) *Hybridoma* 18:121-129; Murphy, W.J. et al. (1999) *Clin. Immunol.* 90:22-27; Smithson, S.L. et al. (1999) *Mol. Immunol.* 36:113-124; Chamat, S. et al. (1999) *J. Infect. Diseases* 180:268-277; y Heard, C. et al. (1999) *Molec. Med.* 5:35-45.

De acuerdo con otra forma de realización, el animal, que se inmuniza con un oligómero de acuerdo con la invención o un derivado del mismo, es un ratón que ha sido tratado con una irradiación corporal total letal, luego se ha protegido de la radiación con células de médula espinal a partir de ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID, por sus siglas en inglés) y trasplantados subsecuentemente con linfocitos humanos funcionales. Este tipo de quimera, denominado sistema Trimera, se utiliza para producir anticuerpos monoclonales humanos inmunizando los

ratones con el antígeno de interés y luego produciendo anticuerpos monoclonales utilizando tecnología de hibridoma estandarizada. Para una descripción adicional de estos ratones y de su uso para generar anticuerpos, véase, por ejemplo, Eren, R. *et al.* (1998) *Immunology* 93:154-161; Reisner, Y y Dagan, S. (1998) *Trends Biotechnol.* 16:242-246; Ilan, E. *et al.* (1999) *Hepatology* 29:553-562; y Bocher, W.O. *et al.* (1999) *Immunology* 96:634-641.

5 Enfoques *in vitro*

10 Como una alternativa para producir tales anticuerpos por inmunización y selección, los anticuerpos pueden identificarse y aislarse cribando bibliotecas de inmunoglobulina combinatorias recombinantes con un oligómero de acuerdo con la invención o derivado del mismo para aislar miembros de la biblioteca de inmunoglobulina que se unen específicamente al oligómero o derivado del mismo. Están disponibles comercialmente equipos para generar y para cribar bibliotecas de expresión (por ejemplo, el sistema de anticuerpos de fagos recombinantes de Pharmacia, catálogo N.º 27-9400-01; y el kit de expresión en fagos SurfZAP® de Stratagene, catálogo N.º 240612). En muchas formas de realización, la biblioteca de expresión es una biblioteca scFv o una biblioteca Fab. La técnica de expresión en fago para cribar bibliotecas de anticuerpo recombinante ha sido descrita adecuadamente. Ejemplos de métodos y compuestos que pueden utilizarse particularmente de manera ventajosa para generar y cribar bibliotecas de expresión de anticuerpo pueden encontrarse, por ejemplo, en McCafferty *et al.* documentos WO 92/01047, US 5.969.108 y EP 589 877 (describe en particular la expresión de scFv), Ladner *et al.* documentos US 5.223.409; US 5.403.484, US 5.571.698, US 5.837.500 y EP 436 597 (describe, por ejemplo, la fusión pIII); Dower *et al.* documentos WO 91/17271, US 5.427.908, US 5.580.717 y EP 527 839 (describe en particular la expresión de Fab); Winter *et al.* solicitud internacional WO 92/20791 y documento EP 368.684 (describe en particular la clonación de secuencias para dominios de inmunoglobulina variables); Griffiths *et al.* documentos US 5.885.793 y EP 589 877 (describe en particular el aislamiento de anticuerpos humanos frente a antígenos humanos utilizando bibliotecas recombinantes); Garrard *et al.* documento WO 92/09690 (describe en particular técnicas de expresión de fago); Knappik *et al.* documento WO 97/08320 (describe la biblioteca de anticuerpo recombinante humana HuCal); Salfeld *et al.* documento WO 97/29131 (describe la producción de un anticuerpo humano recombinante frente a un antígeno humano (factor de necrosis tumoral humano alfa) así como maduración de afinidad *in vitro* del anticuerpo recombinante) y Salfeld *et al.* solicitud provisional estadounidense N.º 60/126.603 y las solicitudes de patente basadas en la misma (asimismo describe la producción de anticuerpos humanos recombinantes frente al antígeno humano (interleucina-12 humana) así como la maduración de afinidad *in vitro* del anticuerpo recombinante).

35 Descripciones adicionales para el cribado de bibliotecas del anticuerpo recombinante pueden encontrarse en publicaciones científicas tales como Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clarkson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrard *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88:7978-7982; McCafferty *et al.* *Nature* (1990) 348:552-554; y Knappik *et al.* (2000) *J. Mol. Biol.* 296:57-86.

40 Como una alternativa a utilizar los sistemas de expresión bacteriófagos, las bibliotecas de anticuerpo recombinantes pueden expresarse en la superficie de células de levadura o células bacterianas. En el documento WO 99/36569 se describen métodos para preparar y cribar bibliotecas que están expresadas en la superficie de células de levadura. En el documento WO 98/49286 se describen en mayor detalle métodos para preparar y cribar bibliotecas que están expresadas en la superficie de células bacterianas.

45 Una vez que se ha identificado un anticuerpo de interés de una biblioteca combinatorial, los ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo se aíslan por medio de técnicas biológicas moleculares estandarizadas, por ejemplo, por medio de amplificación de PCR de ADN a partir del paquete de expresión (por ejemplo, el fago) que ha sido aislado durante el cribado de la biblioteca. Las secuencias de nucleótido de genes para cadenas de anticuerpo ligeras y pesadas, que pueden utilizarse para preparar cebadores de PCR, se conocen por el experto. Una multiplicidad de tales secuencias se describen, por ejemplo, en Kabat, E.A. *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, Publicación NIH N.º 91-3242 y en la base de datos para secuencias de la línea germinal humana BVASE.

55 Un tal anticuerpo o porción de anticuerpo puede producirse expresando recombinantemente los genes para cadenas de inmunoglobulina ligeras y pesadas en una célula huésped. Para expresar recombinantemente un anticuerpo, una célula huésped se transfecta con uno o más vectores de expresión recombinantes que transportan fragmentos de ADN que codifican las cadenas de inmunoglobulina ligera y pesada del anticuerpo, por lo que se expresan las cadenas ligeras y pesadas en la célula huésped y se secretan preferentemente en el medio en el cual se cultivan las células huéspedes. Los anticuerpos pueden aislarse a partir de este medio. Los métodos de ADN recombinantes estandarizados se utilizan para obtener genes para cadenas de anticuerpos ligeras y pesadas, para insertar estos genes dentro de vectores de expresión recombinantes y para introducir los vectores en células huéspedes. Los métodos de esta clase se describen, por ejemplo, en Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds.). *Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y.*, (1989), Ausubel, F.M. *et al.* (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989) y en el documento US 4.816.397 de Boss *et al.*

- Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos de VH y VL del anticuerpo de interés, estos fragmentos de ADN pueden manipularse además con técnicas de ADN recombinantes estandarizadas, por ejemplo, para convertir los genes de regiones variables a genes para cadenas de anticuerpo de longitud total, a genes para fragmentos Fab o a un gen scFv. Estas manipulaciones comprenden unir un fragmento de ADN que
- 5 codifica VL o VH operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, por ejemplo, una región de anticuerpo constante o un enlazador flexible. El término “operativamente enlazado” significará aquí que los dos fragmentos de ADN se enlazan uno del otro de tal manera que las secuencias de aminoácido codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el cuadro.
- 10 El ADN aislado que codifica la región de VH puede convertirse a un gen para una cadena pesada de longitud total enlazando operativamente el ADN que codifica la región VH con otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de regiones constantes de cadena pesada humana son suficientemente conocidos (véase, por ejemplo, Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of*
- 15 *Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, Publicación NIH N.º 91-3242) y pueden obtenerse fragmentos de ADN que abarcan estas regiones por medio de amplificación de PCR estandarizada. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgE, IgM o IgD, siendo preferentemente una región constante de IgG1 o IgG4. Para obtener un gen de un fragmento Fab de la cadena pesada, el ADN que codifica VH puede enlazarse operativamente a otra molécula de ADN que codifica únicamente la región CH1 constante de la cadena pesada.
- 20 El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse a un gen para una cadena ligera de longitud total (así como un gen para una cadena ligera Fab) enlazando operativamente el ADN que codifica VL a otra molécula de ADN que codifica la región CL constante de la cadena ligera. Las secuencias de genes de la región constante de la cadena ligera humana son suficientemente conocidos (véase Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of*
- 25 *Immunological Interest, Fifth Edition*, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, Publicación NIH N.º 91-3242) y pueden obtenerse fragmentos de ADN que abarcan estas regiones por medio de amplificación de PCR estandarizada. La región constante de la cadena ligera puede ser una región kappa o lambda constante, siendo preferente una región kappa constante.
- 30 Para generar un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL pueden enlazarse operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, la secuencia de aminoácido (Gly₄-Ser)₃ de manera que las secuencias de VH y VL se expresan como una proteína de cadena sencilla continua, con las regiones VL y VH que se enlazan entre sí a través del enlazador flexible (véase Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-425; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348:552-554).
- 35 Los dominios sencillos VH y VL con especificidad para un oligómero de acuerdo con la invención o un derivado del mismo pueden aislarse a partir de bibliotecas de dominios sencillos por los métodos descritos anteriormente. Dos cadenas de dominios sencillos de VH (con o sin CH1) o dos cadenas de VL o un par de una cadena VH y una cadena VL con la especificidad deseada pueden utilizarse para eliminar oligómeros de acuerdo con la invención o
- 40 derivados de los mismos del cuerpo.
- Para expresar los anticuerpos o partes de anticuerpo recombinantes, los ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas de longitud parcial o total pueden insertarse dentro de vectores de expresión para enlazar operativamente los genes a secuencias de control transcripcionales y traslacionales. En este contexto, el término “operativamente
- 45 enlazado” significará que un gen de anticuerpo se liga en un vector de tal manera que las secuencias de control transcripcionales y traslacionales dentro del vector cumplen su función pretendida para la regulación de la transcripción y traslación del gen de anticuerpo.
- El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se eligen para ser compatibles con la célula huésped de expresión utilizada. El gen para la cadena de anticuerpo ligera y el gen para la cadena de anticuerpo pesada pueden insertarse en vectores separados o ambos genes se insertan dentro del mismo vector de expresión, siendo este el caso usual. Los genes de anticuerpo se insertan dentro del vector de expresión por medio de métodos estandarizados (por ejemplo, ligación de sitios de desdoblamiento de restricción complementaria en el fragmento
- 50 genético de anticuerpo y el vector, o ligación de extremos romos, si no se presenta ningún sitio de desdoblamiento de restricción). El vector de expresión puede transportar ya secuencias para regiones constantes de anticuerpo antes de la inserción de las secuencias para las cadenas ligeras y pesadas. Por ejemplo, un enfoque es convertir las secuencias de VH y VL a genes de anticuerpo de longitud total insertándolos en vectores de expresión que codifican ya las regiones constantes de cadena pesada o ligera, por lo que se enlaza operativamente el segmento de VH al o los segmentos CH dentro del vector, y también se enlaza operativamente el segmento VL al segmento CL dentro del
- 60 vector. Adicional o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal el cual facilita la secreción de la cadena de anticuerpo a partir de la célula huésped. El gen para la cadena de anticuerpo puede clonarse dentro del vector, por lo que se enlaza al péptido de señal en el marco del término N del gen para la cadena de anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo (es decir, un péptido de señal de una proteína sin inmunoglobulina). Además de los genes para la cadena
- 65 de anticuerpo, los vectores de expresión pueden presentar secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes para la cadena de anticuerpo en una célula huésped. El término “secuencia reguladora” debería incluir

promotores, potenciadores y elementos de control de expresión adicionales (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traslación de los genes para la cadena de anticuerpo. Las secuencias reguladoras de esta clase se describen, por ejemplo, en Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). El experto conoce que el diseño del vector de expresión el cual incluye la selección de secuencias reguladoras puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se transforma, la resistencia de expresión deseada de la proteína, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para una expresión en células huésped de mamífero incluyen elementos virales que resultan en una expresión de proteína fuerte en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV) (tales como el promotor/potenciador de CMV), el virus de simio 40 (SV40) (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP, por sus siglas en inglés)) y polioma. Para una descripción adicional de elementos reguladores virales y secuencias de los mismos, véanse, por ejemplo los documentos US 5.168.062 de Stinski, US 4.510.245 de Bell *et al.* y US 4.968.615 de Schaffner *et al.*

Aparte de los genes para la cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes pueden presentar secuencias adicionales tales como aquellas que regulan la replicación del vector en células huéspedes (por ejemplo, puntos de inicio de replicación) y genes marcadores seleccionables. Los genes marcadores seleccionables facilitan la selección de células huéspedes dentro de las cuales se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel *et al.*). Por ejemplo, es común que el gen marcador seleccionable haga resistente a una célula huésped dentro de la cual se ha insertado el vector frente a principios activos tales como G418, higromicina o metrotrexato. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen para la hidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huéspedes de DHFR con selección/amplificación de metrotrexato) y el gen neo (para la selección G418).

Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, el o los vectores de expresión que codifican tales cadenas ligera y pesada se transfectan en una célula huésped por medio de técnicas estandarizadas. Las diversas formas del término "transfección" deberían comprender una multiplicidad de técnicas usualmente utilizadas para introducir ADN exógeno dentro de una célula huésped procariótica o eucariótica, por ejemplo, electroporación, precipitación de fosfato de calcio, transfección de DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos ya sea en células huéspedes procarióticas o eucarióticas, se da preferencia para expresar los anticuerpos en células eucarióticas y, en particular, en células huéspedes de mamífero, ya que la probabilidad de que se componga y secrete un anticuerpo correctamente plegado e inmunológicamente activo es más elevada en tales células eucarióticas y en particular células de mamífero que en células procarióticas. Se ha informado de que la expresión procariótica de genes del anticuerpo es inefectiva para la producción de rendimientos elevados de anticuerpo activo (Boss, M.A. y Wood, C.R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

Las células huéspedes de mamífero que son preferentes para la expresión de anticuerpos recombinantes incluyen células CHO (incluyendo células CHO dhfr descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, que se utilizan con un marcador seleccionado de DHFR, como se describe, por ejemplo, en R.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. Si se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican los genes del anticuerpo dentro de células huéspedes del mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huéspedes hasta que se expresa el anticuerpo en las células huéspedes o, preferentemente, el anticuerpo se secreta dentro del medio de cultivo en donde crecen las células huésped. Los anticuerpos pueden aislarse a partir del medio de cultivo utilizando métodos para la purificación de proteína estandarizados.

Es posible asimismo utilizar células huéspedes para producir partes de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Variaciones de las maneras de proceder descritas anteriormente pertenecen evidentemente a la invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que codifica ya sea a la cadena ligera o a la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo. Si se presentan cadenas ligeras o pesadas, las cuales no son necesarias para unirse al antígeno de interés, entonces el ADN que codifica tal cadena ligera o tal cadena pesada o ambas puede eliminarse parcial o completamente por medio de la tecnología de ADN recombinante. Las moléculas que se expresan por tales moléculas de ADN truncadas se incluyen asimismo en los anticuerpos. Además, es posible producir anticuerpos bifuncionales en donde una cadena pesada y una cadena ligera son un anticuerpo y la otra cadena pesada y la otra cadena ligera tienen especificidad para un antígeno diferente del antígeno de interés, reticulando un tal anticuerpo a un segundo anticuerpo por medio de métodos químicos estandarizados.

En un sistema preferido para la expresión recombinante de un tal anticuerpo o parte que une el antígeno del mismo, un vector de expresión recombinante, que codifica tanto la cadena de anticuerpo pesada como la cadena de anticuerpo ligera, se introduce dentro de las células CHO dhfr por medio de transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes para las cadenas de anticuerpo ligeras y pesadas están en cada caso operativamente enlazadas a los elementos del promotor de AdMLP/potenciador de CMV reguladores para efectuar transcripción fuerte de los genes. El vector de expresión recombinante transporta también un gen de DHFR el cual puede utilizarse para seleccionar células CHO transfectadas con el vector utilizando la selección/amplificación de metrotrexato. Las células huéspedes transformadas seleccionadas se cultivan de manera

que se expresan las cadenas de anticuerpo pesadas y ligeras, y el anticuerpo intacto se aísla a partir del medio de cultivo. Las técnicas biológicas moleculares estandarizadas se utilizan para preparar el vector de expresión recombinante, para transfectar las células huéspedes, para seleccionar los transformantes, para cultivar las células huésped y para obtener el anticuerpo a partir del medio de cultivo. De este modo, comprende un método para sintetizar un anticuerpo recombinante cultivando una célula huésped en un medio de cultivo adecuado hasta que está sintetizado un anticuerpo recombinante. El método puede comprender además aislar el anticuerpo recombinante a partir del medio de cultivo.

Como una alternativa para cribar las bibliotecas de anticuerpos recombinantes por expresión en fago, pueden utilizarse otros métodos conocidos por el experto para cribar bibliotecas combinatoriales grandes para identificar los anticuerpos. En un tipo de un sistema de expresión alternativo, la biblioteca de anticuerpo recombinante se expresa en forma de fusiones de proteína ARN, como se describe en el documento WO98/31700 de Szostak y Roberts, y en Roberts, R.W. y Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302. En este sistema, por la traslación *in vitro* de los ARNm sintéticos que transportan en su extremo 3' puromicina, un antibiótico aceptor de peptidilo, se genera una fusión covalente entre un ARNm y el péptido o proteína codificado por este. De este modo, un ARNm específico de una mezcla compleja de ARNms (por ejemplo, una biblioteca combinatorial) puede concentrarse mediante las propiedades del péptido o proteína codificada (por ejemplo, del anticuerpo o una parte del mismo), tal como la unión del anticuerpo o parte del mismo a un oligómero de acuerdo con la invención o un derivado del mismo. Las secuencias de ácido nucleico que codifican anticuerpos o partes del mismo, las cuales se obtienen cribando tales bibliotecas, pueden expresarse por medios recombinantes en la manera descrita anteriormente (por ejemplo, en células huéspedes de mamíferos) y pueden, además, someterse a maduración de afinidad adicional ya sea cribando en rondas adicionales de fusiones de péptido de ARNm, introduciéndose mutaciones dentro en la o las secuencias originalmente seleccionadas, o utilizando otros métodos para la maduración de afinidad *in vitro* de los anticuerpos recombinantes en la manera descrita anteriormente.

Combinaciones de enfoques *in vivo* e *in vitro*

Los anticuerpos pueden asimismo producirse utilizando una combinación de enfoques *in vivo* e *in vitro* tales como métodos en donde un oligómero de acuerdo con la invención o un derivado del mismo se deja primero actuar sobre un repertorio del anticuerpo en un animal huésped *in vivo* para estimular la producción de anticuerpos o derivados de unión o de oligómero, y luego se efectúa la selección de anticuerpo adicional y/o maduración de anticuerpo (es decir, optimización) con ayuda de una o más técnicas *in vitro*. Según una forma de realización, un método combinado de esta clase puede comprender en primer lugar inmunizar un animal no humano (por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo, un pollo, un camello, una cabra o una versión transgénica de los mismos o un ratón quimérico) con el oligómero de acuerdo con la invención o derivado del mismo para estimular una respuesta del anticuerpo frente al antígeno, y luego preparar y cribar una biblioteca de anticuerpo de expresión en fago utilizando secuencias de inmunoglobulina de linfocitos que han sido estimulados *in vivo* por la acción del oligómero o el derivado. La primera etapa de este modo de proceder combinado puede llevarse a cabo en la manera descrita anteriormente junto con los enfoques *in vivo*, mientras la segunda etapa de este modo de proceder puede llevarse a cabo en la manera descrita anteriormente junto con los enfoques *in vitro*. Los métodos preferidos para hiperinmunizar animales no humanos con cribado *in vitro* subsecuente de las bibliotecas de expresión en fago preparadas a partir de linfocitos estimulados incluyen aquellos descritos por BioSite Inc., véanse, por ejemplo, los documentos WO 98/47343, WO 91/17271, US 5.427.908 y US 5.580.717.

Según otra forma de realización, un método combinado comprende en primer lugar inmunizar un animal no humano (por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo, un pollo, un camello, una cabra o una versión transgénica y/o inactivada de los mismos, o un ratón quimérico) con un oligómero de acuerdo con la invención o derivado del mismo para estimular una respuesta de anticuerpo frente al oligómero o derivado del mismo, y seleccionar los linfocitos que producen los anticuerpos con la especificidad deseada cribando hibridomas (preparados, por ejemplo, de los animales inmunizados). Los genes para los anticuerpos o anticuerpos de dominios único se aíslan a partir de los clones seleccionados (por medio de métodos de clonación estandarizados tales como la reacción de cadena de polimerasa de transcriptasa inversa) y se someten a maduración de afinidad *in vitro* para mejorar por consiguiente las propiedades de unión del anticuerpo seleccionado o los anticuerpos seleccionados. La primera etapa de este modo de proceder puede llevarse a cabo en la manera descrita anteriormente junto con los enfoques *in vivo*, mientras que la segunda etapa de este modo de proceder puede llevarse a cabo en la manera descrita anteriormente junto con los enfoques *in vitro*, en particular utilizando métodos de maduración de afinidad *in vitro*, tales como aquellos que están descritos en los documentos WO 97/29131 y WO 00/56772.

En un método combinado adicional, los anticuerpos recombinantes se generan a partir de linfocitos aislados individuales utilizando un modo de proceder que se conoce por el experto como método de anticuerpo de linfocitos seleccionados (SLAM) y el cual se describe en los documentos US 5.627.052, WO 92/02551 y Babcock, J.S. *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7884. En este método, un animal no humano (por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo, un pollo, un camello, una cabra o una versión transgénica de los mismos, o un ratón quimérico) se inmuniza en primer lugar *in vivo* con un oligómero de acuerdo con la invención o un derivado del mismo para estimular una respuesta inmune frente al oligómero o derivado, y luego se seleccionan células individuales que secretan anticuerpos de interés utilizando un ensayo de placa hemolítica específica de antígenos. Con este fin, el

oligómero o derivado del mismo, o moléculas relacionadas estructuralmente de interés, pueden acoplarse a eritrocitos de oveja, utilizando un enlazador tal como biotina, por lo que se puede identificar células individuales que secretan anticuerpos con especificidad adecuada utilizando el ensayo de placa hemolítico. Siguiendo la identificación de las células que secretan anticuerpos de interés, los ADNc para las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas se obtienen a partir de las células por PCR de transcriptasa inversa, y estas regiones variables pueden expresarse entonces en asociación con las regiones de inmunoglobulina constantes adecuadas (por ejemplo, regiones constantes humanas) en células huéspedes de mamífero tales como células COS o CHO. Las células huéspedes transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas derivadas a partir de los linfocitos seleccionados *in vivo* pueden entonces someterse a análisis *in vitro* adicional y a selección *in vitro* separando, por ejemplo, las células transfectadas para aislar células que expresan anticuerpos con la especificidad deseada. Las secuencias de inmunoglobulina amplificadas pueden además manipularse *in vitro*.

Análogamente a los modos de proceder descritos anteriormente, es también posible preparar anticuerpos que presenten especificidad para un oligómero de acuerdo con la invención o derivado del mismo y para moléculas sintéticas estructuralmente relacionadas. Estos comprenden

- i) proporcionar un antígeno que comprende una característica estructural compartida por el oligómero de acuerdo con la invención o derivado del mismo y las moléculas sintéticas estructuralmente relacionadas;
- ii) dejar actuar el antígeno sobre un repertorio del anticuerpo; y
- iii) seleccionar a partir del repertorio un anticuerpo que se une a dos moléculas estructuralmente relacionadas, mediante lo cual se obtiene el anticuerpo con la especificidad deseada.

Los anticuerpos específicos de oligómeros obtenibles por los métodos anteriores forman un aspecto de la presente invención igual que el uso de los mismos para preparar un medicamento para el tratamiento de trastornos de demencia asociados a β -amiloides o para preparar una composición para diagnosticar trastornos de demencia asociados a β -amiloides.

Los anticuerpos se obtienen de acuerdo a la invención incluyen en particular antisueros que pueden obtenerse por los métodos anteriores. Estos pueden ser sueros completos, es decir, sangre obtenida a partir del huésped después de separar los componentes celulares y coagulables, o fracciones de este suero en las que en particular la fracción de inmunoglobulina concentrada y preferentemente la fracción de inmunoglobulina que reconoce el oligómero está enriquecida. Las fracciones de esta clase pueden obtenerse con los métodos descritos anteriormente junto con la purificación del anticuerpo.

Los antisueros son policlonales, es decir, contienen anticuerpos de diferente especificidad, usualmente de diferentes clases y subclases, normalmente están sustituidos todos los isótopos de cadena L y se reconocen varios epítopes de proteína.

Si se utilizan distintos oligómeros de acuerdo con la invención como inmunógenos, los antisueros son usualmente de reacción cruzada.

Según otro aspecto, los anticuerpos obtenibles de acuerdo con la invención incluyen también anticuerpos monoclonales, en particular anticuerpos quiméricos y humanizados, así como fragmentos de unión de oligómero de los mismos.

La presente invención se relaciona a proteínas y en particular a anticuerpos que se unen específicamente a un oligómero de acuerdo con la invención o derivado del mismo, es decir, anticuerpos con especificidad para un oligómero de acuerdo con la invención o derivado del mismo. La presente invención se relaciona también a partes de estas proteínas o anticuerpos, en particular a partes de unión de antígeno del mismo, es decir, partes de proteína o de anticuerpo que se unen a un oligómero de acuerdo con la invención o derivado del mismo.

El anticuerpo se elige preferentemente de manera que presenta cinéticas de unión determinadas (por ejemplo, afinidad elevada, disociación baja, velocidad completamente baja, actividad de neutralización fuerte) para la unión específica a un oligómero de acuerdo con la invención o derivado del mismo.

De este modo, se da preferencia a proteínas y, en particular, a anticuerpos con una afinidad para el oligómero de acuerdo con la invención o derivado del mismo en el intervalo de $K_D=10^{-6}$ - 10^{-12} M. Se da preferencia particular a proteínas de afinidad elevada y, en particular, a anticuerpos que se unen con una afinidad mayor que $K_d=10^{-8}$ M, con una afinidad mayor que $K_d=10^{-9}$ M, con una afinidad mayor que $K_d=10^{-10}$ M o con una afinidad mayor que $K_d=10^{-11}$ M.

Según otro aspecto, se da preferencia a aquellas proteínas y, en particular, a anticuerpos que unen otras formas $A\beta(1-42)$, en particular la proteína $A\beta(1-42)$ monomérica y/o la proteína $A\beta(1-40)$ monomérica con afinidad comparativamente inferior, en particular con afinidad más baja que $K_d=10^{-8}$ M.

Por consiguiente, se da preferencia sobre todo a aquellas proteínas y, en particular, a anticuerpos que unen el oligómero o derivado del mismo con afinidad más elevada que la proteína $A\beta(1-42)$ monomérica y/o la proteína

A β (1-40) monomérica. Se da preferencia particular a las relaciones de afinidad de 10, 100 o 1000.

Según otro aspecto, los anticuerpos pueden elegirse de manera que unen el oligómero o derivado del mismo con una constante de velocidad K_{off} de $0,1 \text{ s}^{-1}$ o menor. Se da preferencia incrementada a las constantes de velocidad K_{off} de 1×10^{-2} o menor, $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menor, $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menor, o $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o menor, en el orden indicado.

Además, los anticuerpos pueden elegirse de manera que inhiban la actividad, en particular la actividad neurotóxica, de oligómeros de acuerdo con la invención o derivados de los mismos con un IC_{50} de $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ o menor. Se da preferencia incrementada a las constantes de inhibición IC_{50} de $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ o menor, $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ o menor, $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ o menor, $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ o menor, o $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ o menor, en el orden indicado.

Los anticuerpos son preferentemente anticuerpos aislados. Según otro aspecto, los anticuerpos son anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales y recombinantes. Según una multiplicidad de formas de realización, el anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácido derivada completamente de una especie sencilla, tal como un anticuerpo humano o un anticuerpo de ratón. Según otras formas de realización, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o un anticuerpo de injerto de CDR u otra forma de un anticuerpo humanizado.

El término "anticuerpo" debería referirse a moléculas de inmunoglobulina que están formadas por 4 cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L). Las cadenas se enlazan usualmente una a la otra a través de uniones de disulfuro. Cada cadena se compone de una región variable de la cadena pesada (abreviada aquí como HCVR o VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada se forma por tres dominios CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera se compone de una región variable de la cadena ligera (abreviada aquí como LCVR o VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera se forma por un dominio CL. Las regiones VH y VL pueden dividirse además en regiones hipervariables que se denominan regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) y se intercalan con regiones conservadas que se denominan regiones estructurales (FR, por sus siglas en inglés). Cada región VH y VL se forma por tres CDR y cuatro FR que se disponen desde el término N al término C en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

El término "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "parte de anticuerpo") se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo con especificidad para un oligómero de acuerdo con la invención o derivado del mismo, teniendo el o los fragmentos la capacidad, al igual que antes, de unir específicamente el oligómero o derivado del mismo. Los fragmentos de un anticuerpo completo han demostrado ser capaces de llevar a cabo la función de unión a antígeno de un anticuerpo. Ejemplos de fragmentos de unión en el sentido del término "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, es decir, un fragmento monovalente compuesto de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, es decir, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados uno al otro en la región bisagra por un puente de disulfuro; (iii) un fragmento Fd compuesto de los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv compuesto de los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546) que consta de un dominio VH o de VH, CH1, CH2, DH3 o VH, CH2, CH3; y (vi) una región que determinante de la complementariedad aislada (CDR). Aunque los dos dominios del fragmento Fv, a saber, VL y VH, se codifican por genes separados, estos pueden además enlazarse uno al otro utilizando un enlazador sintético y métodos recombinantes, haciendo posible prepararlos como una cadena de proteína sencilla en donde las regiones VL y VH se combinan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (ScFv); véanse, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). El término "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo debería comprender también tales anticuerpos de cadena sencilla. Otras formas de anticuerpos de cadena sencilla tales como "diacuerpos" se incluyen asimismo aquí. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos en donde los dominios de VH y VL están expresados en una cadena del polipéptido sencilla, pero que utiliza un enlazador el cual es demasiado corto para que los dos dominios puedan combinarse en la misma cadena, mediante lo cual se obliga a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de diferente cadena y a formar dos sitios de unión a antígeno (véanse, por ejemplo, Holliger, P., *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R.M., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123).

Además, un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión más grande que se forma por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o parte del anticuerpo con una o más proteínas o péptidos adicionales. Relevantes a tales moléculas de inmunoadhesión son el uso de la región de núcleo de la estreptavidina para preparar una molécula scFv tetramérica (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para producir moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Las partes del anticuerpo tales como fragmentos Fab y $F(ab')_2$ pueden producirse a partir de anticuerpos completos utilizando técnicas convencionales tales como la digestión con papaína o pepsina. Además, los anticuerpos, partes del anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión pueden obtenerse utilizando técnicas de ADN recombinantes estandarizadas. Un "anticuerpo aislado con especificidad para un oligómero de acuerdo con la invención o derivado del mismo" significa un anticuerpo con especificidad para un oligómero de acuerdo con la invención o derivado del mismo, que está esencialmente libre de otros anticuerpos con diferentes

especificidades de antígeno, es decir, en particular un anticuerpo que está libre de anticuerpos que se unen específicamente a otras formas de la proteína A β (1-42), como se ha descrito anteriormente.

5 El término “anticuerpo neutralizante” significa un anticuerpo cuya unión a un antígeno determinado resulta en la inhibición de la actividad biológica del antígeno. Esta inhibición de la actividad biológica del antígeno puede evaluarse midiendo uno o más indicadores para la actividad biológica del antígeno, utilizando un ensayo *in vitro* o *in vivo* adecuado.

10 El término “anticuerpo monoclonal” significa un anticuerpo derivado de un hibridoma (por ejemplo, un anticuerpo secretado por un hibridoma preparado por medio de tecnología de hibridoma tal como los métodos de hibridoma estandarizados según Kohler y Milstein). Un anticuerpo, el cual se deriva a partir de un hibridoma con especificidad para un oligómero de acuerdo con la invención o derivado del mismo se denomina, por lo tanto, anticuerpo monoclonal.

15 El término “anticuerpo recombinante” se refiere a anticuerpos que se producen, expresan, generan o aíslan con medios recombinantes, tales como anticuerpos que se expresan utilizando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped; anticuerpos que están aislados a partir de una biblioteca de anticuerpos combinatorial recombinante; anticuerpos que están aislados a partir de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico por genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor, LD., *et al.* (1992) *Nucl. Acids Res.* 29:6287-6295); o anticuerpos que se producen, expresan, generan o aíslan de cualquier otra manera en donde las secuencias genéticas de inmunoglobulina determinadas (tales como secuencias genéticas de inmunoglobulina humana) se ensamblan con otras secuencias de ADN. Los anticuerpos recombinantes incluyen, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, de injerto de CDR y humanizados.

25 El término “anticuerpo humano” se refiere a anticuerpos cuyas regiones variables y constantes corresponden o se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana, como se describe, por ejemplo, por Kabat *et al.* (véase Kabat, *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest. Fifth Edition*, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, Publicación NIH N.º 91-3242). Sin embargo, los anticuerpos humanos pueden contener residuos de aminoácido que no están codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones que han sido introducidas por mutagénesis sitio-específicas o aleatorias *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en los CDR y en particular en CDR3. Los anticuerpos recombinantes humanos tienen regiones variables y pueden también contener regiones constantes derivadas de las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (véase Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, Publicación NIH No. 91-3242). Según formas de realización determinadas, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes se someten a una mutagénesis *in vitro* (o a una mutagénesis *in vivo* somática, si se utiliza un animal transgénico por secuencias Ig humanas) de manera que las secuencias de aminoácido de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que aunque se relacionan a, o se derivan de las secuencias de VH y VL de la línea germinal humana, no existen de manera natural *in vivo* dentro del repertorio de la línea germinal del anticuerpo humano. Según formas de realización determinadas, los anticuerpos recombinantes de esta clase son el resultado de una mutagénesis selectiva o retromutación, o de ambas.

45 El término “retromutación” se refiere a un método el cual comprende reemplazar algunos o todos los aminoácidos somáticamente mutados de un anticuerpo humano con los residuos de línea germinal correspondientes de una secuencia del anticuerpo de línea germinal. Las secuencias para las cadenas ligeras y pesadas de un tal anticuerpo humano se comparan de manera separada con las secuencias de línea germinal en la base de datos VBASE para identificar las secuencias con la homología más elevada. Las impresiones en los anticuerpos humanos se revierten a la secuencia de línea germinal mutando a las posiciones de nucleótido definidas que codifican tales aminoácidos de desviación. Debería investigarse la importancia directa o indirecta de cada aminoácido identificado de esta manera como candidato para una retromutación para la unión de antígeno, y no debería incorporarse un aminoácido que imparte una propiedad deseada del anticuerpo deseado después de la mutación en el anticuerpo humano final. Para mantener el número de aminoácidos para una retromutación tan bajo como sea posible, aquellas posiciones de aminoácido, que aunque se desvían de la secuencia de línea germinal más cercana, son idénticos a la secuencia de aminoácido correspondiente de una segunda secuencia de línea germinal pueden permanecer sin cambio, siempre que la segunda secuencia de línea germinal sea idéntica y co-lineal con la secuencia del anticuerpo humano en al menos 10 y preferentemente en 12 aminoácidos en ambos lados del aminoácido en cuestión. Las retromutaciones pueden llevarse a cabo en cualquier etapa de la optimización de anticuerpo.

60 El término “anticuerpo quimérico” se refiere a anticuerpos que contienen secuencias para la región variable de las cadenas ligeras y pesadas a partir de una especie, pero en donde las secuencias de una o más regiones de CDR de VH y/o VL han sido reemplazadas con secuencias CDR de otra especie, tales como anticuerpos que presentan regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de ratón, en donde uno más de las CDR del ratón (por ejemplo, CDR3) han sido reemplazadas con secuencias de CDR humanas.

65 El término “anticuerpo humanizado” se refiere a anticuerpos que contienen secuencias de la región variable de las cadenas pesadas y ligeras a partir de una especie no humana (por ejemplo, de ratón, rata, conejo, pollo, camello,

cabra), pero en donde al menos una parte de la secuencia VH y/o VL ha sido modificada para ser más “similar a la humana”, es decir, ser más similar a secuencias variables de la línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo de injerto CDR en donde las secuencias de CDR humanas han sido insertadas dentro de secuencias VH y VL no humanas para reemplazar las secuencias CDR no humanas correspondientes.

5 Un modo de medir la cinética de unión de un anticuerpo es por medio de resonancia de plasmón superficial. El término “resonancia de plasmón superficial” se refiere a un fenómeno óptico por el cual las interacciones bioespecíficas pueden analizarse detectando cambios en las concentraciones de proteína con una matriz biosensora, utilizando, por ejemplo, el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para descripciones adicionales, véase Jönsson, U., *et al.* (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U., *et al.* (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Jonson, B., *et al.* (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; y Jonson, B., *et al.* (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

15 El término “ K_{off} ” se refiere a la constante de velocidad desacelerada para la disociación de un anticuerpo a partir del complejo de anticuerpo/antígeno.

El término “ K_d ” se refiere a la constante de disociación de una interacción de anticuerpo-antígeno determinada.

20 La afinidad de unión de los anticuerpos puede evaluarse utilizando inmunoensayos *in vitro* estandarizados tales como análisis ELISA o BIAcore.

Aparte de los anticuerpos, la proteína puede ser una molécula derivada del receptor de célula T o un dominio de receptor derivado del receptor de célula T o una proteína de fusión del dominio de receptor con una parte Fc de una inmunoglobulina.

25 La presente invención se relaciona también a agentes farmacéuticos (composiciones) que contienen una tal proteína y en particular un tal anticuerpo así como, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden además contener al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de una enfermedad para cuyo alivio son útiles los anticuerpos. Si, por ejemplo, el anticuerpo se une a un oligómero de acuerdo con la invención, la composición farmacéutica puede contener además uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para el tratamiento de enfermedades en donde la actividad del oligómero es importante.

35 Los portadores farmacéuticamente adecuados incluyen todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacteriales y antifúngicos, agentes de retraso de absorción e isotónicos y similares, siempre y cuando sean fisiológicamente compatibles. Los portadores farmacéuticamente aceptables, incluyen, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina regulada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, se da preferencia a utilizar con agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, o cloruro de sodio. Los portadores farmacéuticamente adecuados pueden contener además cantidades pequeñas de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservadores o tampones, que incrementan la durabilidad o eficacia de los anticuerpos.

45 Las composiciones farmacéuticas pueden ser adecuadas, por ejemplo, para la administración parenteral. Aquí, los anticuerpos se preparan preferentemente como soluciones inyectables con un contenido de anticuerpo de 0,1 - 250 mg/ml. Las soluciones inyectables pueden prepararse en forma líquida o liofilizada como forma de dosificación en un vidrio flint o vial, una ampolla o una jeringa llena. El tampón puede contener L-histidina (1-50 mM, preferentemente 5-10 mM) y presenta un pH de 5,0 - 7,0, preferentemente de 6,0. Los tampones adecuados adicionales, incluyen, sin limitarse a, tampones de succinato de sodio, de citrato de sodio, de fosfato de sodio o de fosfato de potasio. Puede utilizarse cloruro de sodio para ajustar la tonicidad de la solución a una concentración de 0 - 300 mM (preferentemente 150 mM para una forma de dosificación líquida). Los crioprotectores para una forma de dosificación liofilizada pueden incluir, por ejemplo, sacarosa (por ejemplo, del 0 - 10 %, preferentemente del 0,5 - 10 %). Otros crioprotectores adecuados son trehalosa y lactosa. Los materiales de relleno para una forma de dosificación liofilizada pueden incluir, por ejemplo, manitol (por ejemplo, del 1 - 10 %, preferentemente del 2 - 4 %). Los estabilizadores, por ejemplo, L-metionina (por ejemplo, 51 - 50 mM, preferentemente 5 - 10 mM) pueden utilizarse tanto en formas de dosificación líquidas como liofilizadas. Otros materiales de relleno adecuados adicionales son glicina y arginina. Pueden utilizarse asimismo tensioactivos, por ejemplo, polisorbato 80 (por ejemplo, del 0 - 0,05 %, preferentemente del 0,005 - 0,01 %). Otros agentes tensioactivos adecuados son polisorbato 20 y tensioactivos BRIJ.

60 Las composiciones pueden tener una multiplicidad de formas. Estas incluyen formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del tipo de administración pretendido y de la aplicación terapéutica. Normalmente, se da preferencia a composiciones en forma de soluciones inyectables o infusibles, por ejemplo, composiciones que son similares a otros anticuerpos para la inmunización pasiva de seres humanos. La ruta de administración preferida es parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). De acuerdo con una forma de realización preferida, el anticuerpo se

administra por infusión o inyección intravenosa. De acuerdo con otra forma de realización preferida, el anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

5 Las composiciones terapéuticas deben normalmente ser estériles y estables bajo las condiciones de preparación y almacenamiento. Las composiciones pueden formularse como solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para concentraciones de principio activo elevadas. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse introduciendo el principio activo (es decir, el anticuerpo) en la cantidad requerida dentro de un disolvente adecuado, cuando sea apropiado con uno o una combinación de los ingredientes anteriormente mencionados, como se requiere, y luego filtrando de manera estéril. Las dispersiones se preparan usualmente introduciendo el compuesto activo dentro de un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y, cuando sea apropiado, otros ingredientes requeridos. En el caso de un polvo liofilizado estéril para preparar soluciones inyectables estériles, el secado al vacío y secado por pulverización representan métodos de preparación preferidos, con los que se obtiene un polvo del ingrediente activo y, cuando sea apropiado, de ingredientes deseados adicionales a partir de una solución filtrada previamente estéril. La propiedad de flujo correcta de una solución puede mantenerse utilizando, por ejemplo, un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo, en el caso de las dispersiones, el tamaño de partícula requerida o utilizando agentes tensioactivos. Una absorción prolongada de composiciones inyectables puede lograrse adicionalmente introduciendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

20 Los anticuerpos pueden administrarse por una multiplicidad de métodos conocidos por el experto, aunque el tipo preferido de administración para muchas administraciones terapéuticas es la inyección subcutánea, inyección intravenosa o infusión. El experto apreciará que la ruta y/o tipo de administración dependen del resultado deseado. Según formas de realización determinadas, el compuesto activo puede prepararse con un portador que protege el compuesto contra la liberación rápida, tal como, por ejemplo, una formulación con liberación controlada, que incluye implantes, apósitos transdérmicos y sistemas de liberación microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biocompatibles biológicamente degradables tales como vinilacetato de etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para formar tales formulaciones se conocen bien por el experto, véase, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

30 Según formas de realización determinadas, un anticuerpo puede administrarse oralmente, por ejemplo, en un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. El anticuerpo (e ingredientes adicionales, si se desean) puede también incluirse en una cápsula de gelatina dura o blanda, comprimirse en comprimidos o añadirse directamente al alimento. Para la administración terapéutica oral, los anticuerpos pueden mezclarse con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos deglutibles, comprimidos bucales, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes y similares. Si se pretende administrar un anticuerpo a través de una ruta diferente de la parenteral, puede ser necesario elegir un recubrimiento a partir de un material que evite su inactivación.

40 Los anticuerpos son capaces, preferentemente, de neutralizar, tanto *in vitro* como *in vivo* la actividad de los oligómeros de acuerdo con la invención o derivados de los mismos. Los anticuerpos pueden utilizarse, por eso, para la inhibición de la actividad de los oligómeros de acuerdo con la invención o derivados de los mismos, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene los oligómeros o derivados de los mismos o en individuos humanos u otros mamíferos en los cuales se presentan los oligómeros o derivados de los mismos. Por eso, otro aspecto de la invención se relaciona con un método para inhibir la actividad de los oligómeros de acuerdo con la invención o derivados de los mismos, cuyo método comprende dejar a un tal anticuerpo actuar sobre un oligómero o derivado del mismo. A este respecto, la actividad puede inhibirse, por ejemplo, *in vitro*. Por ejemplo, el anticuerpo puede añadirse a un cultivo celular que contiene o se sospecha que contiene el oligómero de acuerdo con la invención o derivado del mismo, para inhibir la actividad del oligómero o derivado del mismo en el cultivo. Alternativamente, la actividad del oligómero o derivado del mismo puede inhibirse en un individuo *in vivo*.

50 De este modo, otro aspecto de la presente invención incluye un método para inhibir la actividad de oligómeros de acuerdo con la invención o derivados de los mismos en un individuo que sufre de una enfermedad en la cual está implicada la proteína β -amiloides y es importante en particular la actividad del oligómero de acuerdo con la invención o derivado del mismo. El método comprende la administración de al menos un tal anticuerpo al individuo con la finalidad de inhibir la actividad del oligómero o derivado del mismo al cual se une el anticuerpo. El individuo es preferentemente un ser humano. Un anticuerpo puede administrarse a un individuo humano para propósitos terapéuticos. Además, un tal anticuerpo puede administrarse a un mamífero no humano para propósitos veterinarios o en el contexto de un modelo animal para una enfermedad determinada. Tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos (por ejemplo, probar dosificaciones y transcursores temporales de administración).

65 Las enfermedades en las cuales los oligómeros de acuerdo con la invención o derivados de los mismos desempeñan un papel incluyen en particular enfermedades en cuyo origen y/o desarrollo está implicado un oligómero de acuerdo con la invención o derivado del mismo. Estos son en particular aquellas enfermedades en las cuales oligómeros de acuerdo con la invención o derivados de los mismos son evidentes o presumiblemente responsables de la patofisiología de la enfermedad o representan un factor que contribuye al origen y/o desarrollo de

la enfermedad. Por consiguiente, se incluyen aquí tales enfermedades en donde la inhibición de la actividad de los oligómeros de acuerdo con la invención o derivados de los mismos puede aliviar síntomas y/o progresión de la enfermedad. Tales enfermedades pueden verificarse, por ejemplo, por una concentración incrementada de oligómeros de acuerdo con la invención o derivados de los mismos en un fluido biológico de un individuo que sufre de una enfermedad determinada (por ejemplo, una concentración incrementada en suero, plasma, CSF, orina, etc). Esto puede detectarse, por ejemplo, utilizando un tal anticuerpo. Los oligómeros de acuerdo con la invención y derivados de los mismos desempeñan un papel determinante en la patología asociada con una multiplicidad de enfermedades en donde están implicados elementos neurodegenerativos, deficiencias cognitivas, elementos neurotóxicos y elementos inflamatorios.

Los anticuerpos pueden administrarse junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles en el tratamiento de las enfermedades descritas anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención contienen usualmente una cantidad terapéuticamente activa o una cantidad profilácticamente activa de al menos un tal anticuerpo. Dependiendo del tratamiento deseado, por ejemplo, si se desea un tratamiento terapéutico o profiláctico, pueden elegirse y adaptarse programas de dosificación. Por ejemplo, puede administrarse una dosis única, varias dosis separadas distribuidas en el tiempo o una dosificación incrementada o disminuida, según los requerimientos de la situación terapéutica. Es particularmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosis única para facilitar la administración y para asegurar la uniformidad de la dosificación.

Una cantidad terapéutica o profilácticamente activa de un tal anticuerpo puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 - 20 mg/kg y preferentemente 1 - 10 mg/kg, sin limitarse a esto. Estas cantidades pueden variar, por supuesto, dependiendo del tipo y severidad del estado que se mitiga.

En el contexto del uso diagnóstico de los anticuerpos, la determinación oligomérica específica cualitativa o cuantitativa sirve en particular para diagnosticar formas $\beta(1-42)$ amiloides relevantes de enfermedad. En este contexto, la especificidad significa la posibilidad de poder detectar un oligómero determinado o mezcla oligomérica con suficiente sensibilidad. Los anticuerpos presentan ventajosamente sensibilidades de menos de 10 ng/ml por muestra, preferentemente de menos de 1 ng/ml por muestra y más preferentemente de menos de 100 pg/ml por muestra. Por eso, se entiende que al menos la concentración respectivamente indicada de oligómero por ml de muestra puede detectarse ventajosamente también concentraciones inferiores con los anticuerpos.

La determinación se lleva a cabo inmunológicamente. Esta puede llevarse a cabo en principio utilizando cualquier método de ensayo analítico o diagnóstico en donde se utilizan los anticuerpos., Se incluyen técnicas de aglutinación y de precipitación, inmunoensayos, métodos inmunohistoquímicos y técnicas de inmunotransferencia, por ejemplo, transferencia Western Blot o métodos de dot blot. También se incluyen aquí métodos *in vivo*, por ejemplo, métodos de formación de imágenes.

Resulta ventajoso el uso en inmunoensayos. Son adecuados tanto inmunoensayos competitivos, es decir, antígeno y antígeno etiquetado (trazador) compiten por la unión del anticuerpo, como inmunoensayos tipo sándwich, es decir, la unión de anticuerpos específicos al antígeno se detecta por un segundo anticuerpo usualmente etiquetado. Estos ensayos pueden ser tanto homogéneos, es decir, sin una separación en fase sólida y líquida, como heterogéneos, es decir, las etiquetas unidas se separan a partir de las no unidas, por ejemplo, a través de anticuerpos de unión de fase sólida. Los diversos formatos de inmunoensayo heterogéneos y homogéneos pueden asignarse a clases determinadas según etiquetado y método de medición, por ejemplo, RIA (radioinmunoensayos), ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas), FIA (inmunoensayo de fluorescencia), LIA (inmunoensayo de luminiscencia), TRFIA (FIA de resolución temporal), IMAC (inmunoactivación), EMIT (prueba inmune de enzima multiplicada), TIA (inmunoensayo turbidimétrico), I-PCR (inmuno-PCR).

Para la determinación del oligómero, se da preferencia a inmunoensayos competitivos. A este respecto, el oligómero etiquetado (trazador) compite con el oligómero que se cuantifica de la muestra para la unión al anticuerpo utilizado., A partir de la cantidad del trazador desplazado puede determinarse con ayuda de una curva estándar la cantidad de antígeno, es decir, la cantidad de oligómero, en la muestra.

De las etiquetas disponibles para estos propósitos, las enzimas han demostrado ser ventajosas. Por ejemplo, pueden utilizarse sistemas basados en peroxidasa, en particular la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina y la galactosidasa-D- β . Para estas enzimas están disponibles sustratos específicos cuya conversión puede verificarse, por ejemplo, fotométricamente. Sistemas de sustrato adecuados se basan en fosfato de p-nitrofenilo (p-NPP), fosfato/tetrazolio de nitroazul de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP/NPT), fosfato rojo rápido/naftol-AS-TS para la fosfatasa alcalina, ácido 2,2-azinobis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), o-fenilendiamina (OFT), 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), o-dianisidina, ácido 5-aminosalicílico, ácido 3-dimetilamino-benzoico (DMAB) y 3-metil-2-benzotiazolinhidrazona (MBTH) para peroxidasa; o-nitrofenil- β -D-galactosida (o-NPG), p-nitrofenil- β -D-galactosida y 4-metilumbelifenil- β -D-galactosida (MUG) para las β -D-galactosidas. En muchos casos, estos sistemas de sustrato están comercialmente disponibles en forma lista para utilizarse, por ejemplo, en forma de comprimidos que pueden contener además reactivos tales como tampones apropiados y similares.

Los trazadores utilizados son oligómeros etiquetados. En este sentido, para la determinación de un oligómero determinado puede etiquetarse el oligómero que se determina y utilizarse como trazador.

5 El acoplamiento de etiquetas a los oligómeros para preparar trazadores puede llevarse a cabo de una manera conocida per se. Las realizaciones anteriores para la derivatización de oligómeros de acuerdo con la invención se refieren por analogía. Además, está disponible un número de etiquetas apropiadamente modificadas para la conjugación a proteínas, por ejemplo, enzimas conjugadas con biotina, avidina, extravidina o estreptavidina, enzimas activadas con maleimida y similares. Estas etiquetas pueden hacerse reaccionar directamente con el oligómero o, si se requiere, con el oligómero derivado apropiadamente para dar el trazador. Si, por ejemplo, se utiliza un conjugado de peroxidasa de estreptavidina, entonces este requiere en primer lugar la biotinilación del oligómero. Esto se aplica correspondientemente al orden inverso. Para este propósito también son conocidos métodos adecuados por el experto.

15 Si se elige un formato de inmunoensayo heterogéneo, el complejo de anticuerpo-antígeno puede separarse uniéndolo al soporte, a través de un anticuerpo anti-idiotípico acoplado a tal soporte, por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra el IgG de conejo. Los soportes, especialmente placas de microtitulación que están recubiertas con anticuerpos apropiados, se conocen y están en parte comercialmente disponibles.

20 Otro aspecto de la presente invención son conjuntos de inmunoensayo con al menos un anticuerpo descrito anteriormente y componentes adicionales. En este caso, se trata de una combinación, usualmente como unidad de envasado, de medios para llevar a cabo una determinación oligomérica de acuerdo con la invención. Para el propósito de manejo tan fácil como sea posible, se proporcionan preferiblemente estos medios en una forma esencialmente lista para usarse. Una disposición ventajosa ofrece el inmunoensayo en forma de un kit. Un kit comprende usualmente varios recipientes para la disposición separada de componentes. Todos los componentes pueden proporcionarse en dilución lista para usarse, como concentrado para dilución o como sustancia seca o liofilizado para disolver o suspender; algunos o todos los componentes pueden estar congelados o almacenarse a temperatura ambiente hasta su uso. Los sueros están preferentemente congelados ultrarrápidamente, por ejemplo, a -20 °C, de manera que en estos casos un inmunoensayo tiene que mantenerse preferentemente a temperaturas de congelación antes del uso.

30 Componentes adicionales suministrados con el inmunoensayo dependen del tipo del inmunoensayo. Usualmente, la proteína estándar, el trazador que puede o no puede requerirse y el suero control se suministran junto con el antisuero. Además, pueden estar incluidos incluso placas de microtitulación, preferentemente recubiertas con anticuerpo, tampones, por ejemplo para probar, para lavar o para la conversión del sustrato, y el sustrato de enzima.

35 Los principios generales de inmunoensayos y la generación y uso de anticuerpos como auxiliares en el laboratorio y el hospital pueden encontrarse, por ejemplo, en *Antibodies, A Laboratory Manual* (Harlow, E., Lane, D., Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988).

40 Además, son también de interés sustancias que inhiben la agregación de los oligómeros de acuerdo con la invención o aceleran la desagregación de los mismos. Tales sustancias representan particularmente posibles agentes terapéuticos para el tratamiento de las enfermedades de demencia asociadas a β amiloide anteriormente tales como, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer.

45 La presente invención por lo tanto se relaciona también a un método para caracterizar una sustancia o una mezcla de sustancia, cuyo método comprende

- 50
- i) proporcionar la sustancia o la mezcla de sustancia de una manera adecuada;
 - ii) dejar a la sustancia o la mezcla de sustancia actuar sobre al menos un oligómero de acuerdo con la invención, derivado del mismo o una composición; y
 - iii) determinar si la sustancia o partes determinadas de la mezcla de sustancia se unen al oligómero, o derivado del mismo o al menos un oligómero o derivado del mismo presente en la composición.

55 Este método puede también llevarse a cabo en mezclas de origen biológico, por ejemplo, preparación celular y extractos celulares, para identificar compañeros de unión naturales con afinidad de los oligómeros de acuerdo con la invención, por ejemplo, antígenos superficiales celulares, en particular receptores, y ligandos solubles, por ejemplo, proteínas y mediadores determinados.

60 Además de la unión simple de las sustancias, interacciones adicionales con e influencias sobre los oligómeros de acuerdo con la invención pueden también ser objeto del método. De este modo, es posible determinar en particular si

- 65
- la sustancia es capaz de modular, en particular inhibir, la agregación de la proteína β -amiloide a los oligómeros de acuerdo con la invención;
 - la sustancia es capaz de modular, en particular promover, la desagregación de los oligómeros de acuerdo con la invención;

- los oligómeros de acuerdo con la invención provocan modificaciones funcionales en un compañero de unión, por ejemplo, poseen un efecto agonístico, parcialmente agonístico, antagonístico o agonístico inverso en un receptor.

Estos métodos son usualmente métodos de cribado *in vitro* que pueden utilizarse para seleccionar de una multiplicidad de diversas sustancias aquellas que parecen ser más prometedoras con respecto a una aplicación futura. Es posible, por ejemplo, establecer bibliotecas de sustancias extensas mediante química combinatoria que comprenden una gran cantidad de principios activos potenciales. Puede automatizarse la selección de bibliotecas de sustancia combinatorias para con actividad deseada. Los robots de cribado sirven para analizar eficientemente los ensayos individuales que se disponen preferentemente en placas de microtitulación. De este modo, la presente invención se refiere también a métodos de cribado, es decir, tanto métodos de cribado primarios como secundarios, en donde se aplica preferentemente al menos uno de los métodos descritos posteriormente. Si se aplican varios métodos, estos pueden aplicarse a una y la misma muestra con un desfase de tiempo o simultáneamente, o a diferentes muestras de una sustancia que se prueba.

Una tecnología particularmente efectiva para llevar a cabo tales métodos es el ensayo de proximidad por centelleo, abreviado SPA, por sus siglas en inglés, que se conoce en el campo del cribado de principios activos. Los kits y componentes para llevar a cabo este ensayo pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo, en Amersham Pharmacia Biotech. En principio, los receptores de unión de membrana o solubilizados se inmovilizan en pequeñas fluoromicroesferas que contienen una sustancia de centelleo. Si, por ejemplo, un radioligando se une a los receptores inmovilizados, la sustancia de centelleo se estimula para la emisión de luz, debido a la proximidad espacial entre la sustancia de centelleo y el radioligando.

Otra tecnología particularmente efectiva para llevar a cabo los métodos de esta clase es la tecnología de FlashPlateR conocida en el campo del cribado de principios activos. Los kits y componentes para llevar a cabo este ensayo pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo, en NENR Life Science Products. Este principio se basa asimismo en placas de microtitulación (de 96 o 384 pocillos) recubiertas con sustancia de centelleo.

La presente invención se refiere a sustancias o parte de las mezclas de sustancias que son identificables según este método como una unión de ligando al oligómero, o derivado del mismo o al menos un oligómero o derivado del mismo presente en una composición correspondiente así como al uso del mismo para preparar un medicamento para el tratamiento de enfermedades asociadas a amiloide β , en particular demencia o para preparar una composición para diagnosticar enfermedades asociadas a amiloide β , en particular demencia.

Los ejemplos siguientes deberían ilustrar la invención, sin limitar su alcance.

En los dibujos muestra:

- La Figura 1 una SDS PAGE de una preparación de oligómero A de la $A\beta(1-42)$ (senda A); preparación del oligómero B de la $A\beta(1-42)$ (senda B); de proteínas estándares (proteínas marcadoras moleculares, senda C);
- La Figura 2 una SDS PAGE de una preparación del oligómero A de la $A\beta(1-42)$ (senda A); preparación del oligómero A-CL de la $A\beta(1-42)$ (senda A'); preparación del oligómero B de la $A\beta(1-42)$ (senda B); preparación del oligómero B-CL de la $A\beta(1-42)$ (senda B'); de proteínas estándares (proteínas marcadoras moleculares, senda C);
- La Figura 3 una SDS PAGE de una preparación del oligómero B de la $A\beta(1-42)$ de biotina (senda A); de proteínas estándares (proteínas marcadoras moleculares, senda B);
- La Figura 4 una SDS PAGE de una preparación del oligómero B de la $A\beta(1-42)$ de fluoresceína (senda A); de proteínas estándares (proteínas marcadoras moleculares, senda B);
- La Figura 5 una cromatografía de permeación de gel de una solución que contiene liofilizado de la $A\beta(1-42)$ en comparación con una preparación que contiene los oligómeros B de la $A\beta(1-42)$;
- La Figura 6 una NATIVA PAGE de una preparación del oligómero B de la $A\beta(1-42)$ (senda A), de proteínas estándares (proteínas marcadoras moleculares, senda B);
- La Figura 7 la unión de (A) proteína de la $A\beta(1-42)$ monomérica y (B) los oligómeros A de la $A\beta(1-42)$ así como (C) oligómeros B de la $A\beta(1-42)$ a la superficie de la línea celular de neuroblastoma humano IMR-32;
- La Figura 8 el efecto neurotóxico en % después del tratamiento de neuronas corticales de ratón con oligómeros B de la $A\beta(1-42)$, correspondiendo la barra de error al 95 % del intervalo de confianza;
- La Figura 9 una SDS PAGE de una preparación de la $A\beta(1-42)$ tratada con tripsina (senda 2), quimiotripsina (senda 3), termolisina (senda 4); elastasa (senda 5), papaína (línea 6) o no tratada (senda 7); así como de proteínas estándares (proteínas marcadoras moleculares, senda 1);
- La Figura 10 dot blot para la reactividad de 100 pmoles (fila A); 10 pmoles (fila B); 1 pmol (fila C); 0,1 pmoles (fila D) o 0,01 pmoles (fila E); de la preparación del oligómero B de la $A\beta(1-42)$ del ejemplo 6b (columna 1); del monómero de la $A\beta(1-42)$ tratado con HFIP del ejemplo 1a (columna 2); de la preparación del oligómero B de la $A\beta(1-42)$ desdoblado con termolisina del ejemplo 15a (columna 3); de la preparación del oligómero B de la $A\beta(1-42)$ reticulado con glutaraldehído del ejemplo 14a (columna

- 4); de ADDL preparado de acuerdo con M.P. Lambert et al., J. Neurochem. 79, 595-605 (2001) a 4 °C o a temperatura ambiente o a 37 °C (columnas 5, 6 o 7); de la A β (1-42) disuelta en el 0,1 % de NH₄OH (columna 8); de una preparación de fibrillas de la A β (1-42) del ejemplo 27 (columna 9); y de APP diluido en PBS de la empresa Sigma (columna 10) con a) el anticuerpo 6E10 monoclonal; b) el antisuero policlonal (d1) del ejemplo 25d; c) el antisuero policlonal (c1) del ejemplo 25c; d) el antisuero policlonal (a1) del ejemplo 25a; y e) el antisuero policlonal (a2) del ejemplo 25a;
- 5 La Figura 11 una SDS PAGE de una preparación del oligómero B de la A β (20-42) del ejemplo 15a (senda B), de una preparación del oligómero B de la A β (12-42) del ejemplo 15b (senda C), de una preparación del oligómero B de la A β (1-42) del ejemplo 6b (senda A); así como de proteínas estándares (proteínas
- 10 La Figura 12 una cromatografía de permeación de gel de la preparación del oligómero B A β (1-42) del ejemplo 6b en comparación con la preparación del oligómero A β (1-42) B-CL del ejemplo 14a;
- La Figura 13 una representación esquemática de la proteína A β (1-42) monomérica (izquierda); del oligómero de la A β (1-42) (12-meros, A); y del oligómero A β (12-42) (12-meros, C) y el oligómero de la A β (20-42) (12-meros, B) obtenibles por desdoblamiento proteolítico;
- 15 La Figura 14 el potencial post-sináptico excitatorio (fEPSP) dependiendo del tiempo de acción de oligómeros B de la A β (1-42) sobre cortes de hipocampo;
- La Figura 15 una imagen inmunofluorescente que muestra la unión de oligómeros B de la A β (1-42) a neuronas de ratas hipocampales (a) en comparación con la fluorescencia no unida específicamente (b).

20 A menos que se establezca de otra manera, las concentraciones de los oligómeros de acuerdo con la invención se expresan en moles del polipéptido de la A β (1-42) monomérico. El término proteína β -amiloide(1-42) corresponde al término proteína β (1-42) amiloide. A menos que se establezca de otra manera, las proteínas (polipéptidos) utilizados son de origen humano.

25 Ejemplo 1

a) Preparación de una suspensión madre de la A β (1-42) humana

30 Se disuelven 2 mg de la proteína β -amiloide (1-42) humana (abreviado: A β (1-42); material péptido-sintético, liofilizado, empresa Bachem, Alemania) en 800 μ l de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol y se incuban en un tubo Eppendorf a 37 °C durante 30 minutos. Después se evapora hasta sequedad en un concentrador al vacío (Speed Vac). El residuo se recoge con 88 μ l de DMSO, resultando en 5 mM de suspensión madre de A β (1-42). Esto puede conservarse a -20 °C.

35 b) Preparación de una suspensión madre de la A β (1-42) de rata

Se disuelven 2 mg de la proteína β -amiloide(1-42) de rata (abreviado: A β (1-42) de rata); material péptido-sintético, liofilizado, empresa Bachem, Alemania) en 800 μ l de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol y se incubaron en un tubo Eppendorf a 37 °C durante 30 minutos. Después se evapora hasta sequedad en un concentrador al vacío (Speed Vac). El residuo se recoge con 88 μ l de DMSO, resultando en una suspensión madre de A β (1-42) 5 mM. Esto puede conservarse a -20 °C.

45 Ejemplo 2

a) Preparación de los oligómeros de la A β (1-42) con pesos moleculares de 15 kDa y 20 kDa [Oligómeros A de la A β (1-42)]; uso de SDS

50 Se mezclan 60 μ l de la solución madre del ejemplo 1^a con 690 μ l del tampón de PBS (20 mM de fosfato de sodio, 140 mM de NaCl, pH 7,4) y se ajustan con 75 μ l de solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2 % a un contenido de SDS del 0,2 %. Después se incuba durante 5 horas a 37 °C y se centrifuga durante 10 minutos a 10 000 g. Esta preparación del oligómero A de la A β (1-42) (aproximadamente 400 μ M de la A β (1-42)) puede conservarse a -20 °C.

55 b) Preparación de los oligómeros de la A β (1-42) de rata con pesos moleculares de 15 kDa y 20 kDa [oligómeros A de la A β (1-42) de rata]; uso de SDS

60 Se mezclan 60 μ l de la solución madre del ejemplo 1b con 690 μ l del tampón de PBS (20 mM de fosfato de sodio, 140 mM de NaCl, pH 7,4) y se ajustan con 75 μ l de solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2 % a un contenido de SDS del 0,2 %. Después se incuba durante 5 horas a 37 °C y se centrifuga durante 10 minutos a 10 000 g. Esta preparación del oligómero A de la A β (1-42) de rata (aproximadamente 400 μ M de la A β (1-42) de rata) puede conservarse a -20 °C.

c) Preparación de los oligómeros de la A β (1-42) con pesos moleculares de 15 kDa y 20 kDa [oligómeros A de la A β (1-42)]; uso de ácido láurico

Se mezclan 60 µl de la solución madre del ejemplo 1a con 690 µl del tampón de PBS (20 mM de fosfato de sodio, 140 mM de NaCl, pH 7,4) y se ajustan con 75 µl de solución de ácido láurico al 5 % a un contenido de ácido láurico del 0,5 %. Después se incuba durante 5 horas a 37 °C y se centrifuga durante 10 minutos a 10 000 g. Esta preparación del oligómero A de la Aβ(1-42) (aproximadamente 400 µM de la Aβ(1-42)) puede conservarse a -20 °C.

5 d) Preparación de los oligómeros de Aβ(1-42) con pesos moleculares de 15 kDa y 20 kDa [oligómeros A de Aβ(1-42)]; uso de ácido oleico

10 Se mezclan 60 µl de la solución madre del ejemplo 1a con 690 µl del tampón de PBS (20 mM de fosfato de sodio, 140 mM de NaCl, pH 7,4) y se ajustan a un contenido de 0.5% con 75 µl de solución de ácido oleico al 5 % a un contenido de ácido oleico del 0,5 %. Después se incuba durante 5 horas a 37 °C y se centrifuga durante 10 minutos a 10 000 g. Esta preparación del oligómero A de la Aβ(1-42) (aproximadamente 400 µM de la Aβ(1-42)) puede conservarse a -20 °C.

15 e) Preparación de oligómeros de la Aβ(1-42) con pesos moleculares de 15 kDa y 20 kDa [oligómeros A de la Aβ(1-42)]; uso de lauroilsarcosina

20 Se mezclan 60 µl de la solución madre del ejemplo 1a con 690 µl del tampón de PBS (20 mM de fosfato de sodio, 140 mM de NaCl, pH 7,4) y se ajustan al contenido de lauroilsarcosina de 0.5% con 75 µl de solución de lauroilsarcosina al 5 % a un contenido de lauroilsarcosina del 0,5 %. Después se incuba durante 5 horas a 37 °C y se centrifuga durante 10 minutos a 10 000 g. Este oligómero A de la Aβ(1-42) (aproximadamente 400 µM de la Aβ(1-42)) puede conservarse a -20 °C.

Ejemplo 3

25 a) Método alternativo para preparar los oligómeros de la Aβ(1-42) con pesos moleculares de 15 kDa y 20 kDa [oligómeros A de la Aβ(1-42)]

30 Se toma 1 mg de la proteína β-amiloide(1-42) humana (abreviado: Aβ(1-42); material de péptido sintético, liofilizado, empresa Bachem, Alemania) en 220 µl de 10 mM de solución HCl acuosa y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos. Los componentes insolubles se eliminan por centrifugación a 10 000 g durante 5 minutos. El sobrenadante (1 mM de la Aβ(1-42)) contiene la proteína Aβ(1-42) y se procesa posteriormente como sigue:

35 Se mezcla 1 µl del sobrenadante con 9 µl del tampón de PBS y 1 µl de solución SDS al 2 % y se incuba a 37 °C durante 16 horas. La preparación del oligómero A de la hAβ(1-42) (100 µM) puede conservarse a -20 °C.

b) Método alternativo para preparar oligómeros de rata de la Aβ(1-42) con pesos moleculares de 15 kDa y 20 kDa [oligómeros A de la Aβ(1-42) de rata]

40 Se toma 1 mg de la proteína β-amiloide(1-42) de rata (abreviado: Aβ(1-42) de rata; material del péptido sintético, liofilizado, empresa Bachem, Alemania) en 220 µl de 10 mM de solución HCl acuosa y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos. Los componentes insolubles se eliminan por centrifugación a 10 000 g durante 5 minutos. El sobrenadante (1 mM de Aβ(1-42) de rata)) contiene la proteína β(1-42) amiloide de rata y se procesa posteriormente como sigue:

45 Se mezcla 1 µl del sobrenadante con 9 µl del tampón de PBS y 1 µl de solución SDS al 2 % y se incuba a 37 °C durante 16 horas. La preparación del oligómero A de Aβ(1-42) de rata (100 µM) puede conservarse a -20 °C.

Ejemplo 4

50 a) Método alternativo para preparar oligómeros de la Aβ(1-42) con pesos moleculares de 15 kDa y 20 kDa [oligómeros A de Aβ(1-42)]

55 Se disuelve 1 mg de la proteína β-amiloide(1-42) (abreviado: Aβ(1-42); material del péptido sintético, liofilizado, empresa Bachem, Alemania) en 44 µl del 1 % de SDS/H₂O (5 mM de Aβ(1-42)). Se mezclan 5 µl de la solución con 40 µl de PBS y 5 µl del 2 % de SDS y se incuban a 37 °C durante 16 horas. Los componentes insolubles se eliminan por centrifugación a 10 000 g durante 5 minutos. La preparación del oligómero A de la Aβ(1-42) así obtenida (500 µM de la Aβ(1-42)) puede conservarse a -20 °C.

60 b) Método alternativo para preparar oligómeros de Aβ(1-42) de rata con pesos moleculares de 15 kDa y 20 kDa [oligómeros A de Aβ(1-42) de rata]

Se disuelve 1 mg de la proteína β-amiloide de rata (abreviado: Aβ(1-42) de rata); material de péptido sintético, liofilizado, empresa Bachem, Alemania) en 44 µl del 1 % de SDS/H₂O (5 mM de Aβ(1-42) de rata). Se mezclan 5 µl

de la solución con 40 µl de PBS y 5 µl del 2 % de SDS y se incuban a 37 °C durante 16 horas. Los componentes insolubles se eliminan por centrifugación a 10 000 g durante 5 minutos. La preparación del oligómero A de la Aβ(1-42) de rata (500 µM de la Aβ(1-42) de rata) así obtenido puede conservarse a -20 °C

5 Ejemplo 5

a) Preparación de los oligómeros de la Aβ(1-42) con pesos moleculares de 38 kDa y 48 kDa [oligómeros B de la Aβ(1-42)]

10 Una solución del oligómero A de la Aβ(1-42) obtenida de acuerdo con el ejemplo 2a se diluye con 2,475 ml de agua (el 0,05 % de contenido de SDS, 0,1 mM de la Aβ(1-42)) y se incuba a 37 °C durante 20 horas. Las alícuotas de esta preparación del oligómero B de la Aβ(1-42) pueden congelarse a -80 °C y almacenarse para estudios adicionales.

15 b) Preparación de los oligómeros de la Aβ(1-42) de rata con pesos moleculares de 38 kDa y 48 kDa [oligómeros B de la Aβ(1-42) de rata]

Una solución del oligómero A de la Aβ(1-42) de rata obtenida de acuerdo con el ejemplo 2b se diluye con 2,475 ml de agua (el 0,05 % de contenido de SDS, 0,1 mM de la Aβ(1-42) de rata) y se incuba a 37 °C durante 20 horas. Las alícuotas de esta preparación del oligómero B de la Aβ(1-42) de rata pueden congelarse a -80 °C y almacenarse para estudios adicionales.

20 c) Preparación alternativa de los oligómeros de la Aβ(1-42) con pesos moleculares de 38 kDa y 48 kDa [oligómeros B de la Aβ(1-42)]

25 Una solución del oligómero A de la Aβ(1-42) obtenida de acuerdo con el ejemplo 2c se diluye con 2,475 ml de agua (el 0,125 % de contenido de ácido láurico, 0,1 mM de la Aβ(1-42)) y se incuba a 37 °C durante 20 horas. Las alícuotas de esta preparación del oligómero B de la Aβ(1-42) pueden congelarse a -80 °C y almacenarse para estudios adicionales.

30 d) Preparación alternativa de los oligómeros de la Aβ(1-42) con pesos moleculares de 38 kDa y 48 kDa [oligómeros B de la Aβ(1-42)]

Una solución del oligómero A de la Aβ(1-42) obtenido de acuerdo con el ejemplo 2d se diluye con 2,475 ml de agua (el 0,125 % de contenido de ácido oleico, 0,1 mM de la Aβ(1-42)) y se incuba a 37 °C durante 20 horas. Las alícuotas de esta preparación del oligómero B de la Aβ(1-42) pueden congelarse a -80 °C y almacenarse para estudios adicionales.

35 e) Preparación alternativa de los oligómeros B de la Aβ(1-42) con pesos moleculares de 38 kDa y 48 kDa [oligómeros B de la Aβ(1-42)]

40 Una solución del oligómero A de la Aβ(1-42) obtenido de acuerdo con el ejemplo 2e se diluye con 2,475 ml de agua (el 0,125 % de contenido de laurilsarcosina, 0,1 mM de la Aβ(1-42)) y se incuba a 37 °C durante 20 horas. Las alícuotas de esta preparación del oligómero B de la Aβ(1-42) pueden congelarse a -80 °C y almacenarse para estudios adicionales.

45 f) Preparación de los oligómeros B de la Aβ(1-42) libres de SDS con pesos moleculares de 38 kDa y 48 kDa [oligómeros B de la Aβ(1-42)]

50 Se mezclan 10 µl de una preparación del oligómero B de la Aβ(1-42) preparado según el ejemplo 6b con 250 µl de una mezcla de ácido acético/metanol/agua en la relación del 4 %/33 %/63 % y se incuban a 0 °C en hielo durante 30 minutos. Después de la centrifugación (10 000 g durante 10 minutos), el sobrenadante se elimina y el residuo de proteína precipitado se toma en 200 µl de tampón (20 mM de fosfato de sodio, 140 mM de NaCl, pH 7,4). La preparación obtenida en esta manera contiene los oligómeros B de la Aβ(1-42) disuelta en forma libre de y puede almacenarse a -20 °C.

55 Ejemplo 6

a) Diálisis y concentración de los oligómeros de Aβ(1-42) con pesos moleculares de 38 kDa y 48 kDa [oligómeros B de la Aβ(1-42)]

60 Una preparación del oligómero B de la Aβ(1-42) de acuerdo con el ejemplo 5a se mezcla con 30 ml de tampón de PBS que contiene el 0,1 % de Pluronic® F68 (empresa BASF) y se concentra a 3 ml en el Centriprep YM, 30 kD, de la empresa Amicon Los residuos que pueden presentarse se eliminan por centrifugación (10 000 g durante 5 minutos). Se elimina el sobrenadante. Las alícuotas de esta preparación del oligómero B de la Aβ(1-42) pueden

congelarse a -80 °C y almacenarse para estudios adicionales.

b) Preparación de un concentrado de los oligómeros B de la A β (1-42) con pesos moleculares de 38 kDa y 48 kDa [oligómeros B de la A β (1-42)]

5 Se concentran 72,6 ml de una preparación del oligómero B de la A β (1-42) obtenida de acuerdo con el ejemplo 5a en 2 ml por un tubo Centriprep YM (Amicon). El concentrado se elimina por centrifugación a 10 000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se elimina y se dializa a 6 °C en un tubo de diálisis contra 1 l de tampón (5 mM de fosfato de sodio, 35 mM de cloruro de sodio, pH 7,4) durante 16 horas. El dialisato se elimina por centrifugación a 10 000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se elimina y puede almacenarse a -80 °C para estudios adicionales.

Ejemplo 7

Preparación de la suspensión madre de biotina-A β (1-42)

15 Se disuelven 0,5 mg de la proteína de biotina- β -amiloide(1-42) (abreviado: biotina-A β (1-42); material del péptido sintético; liofilizado, AnaSpec) en 200 μ l de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol y se incuban en un tubo de Eppendorf a 37 °C durante 30 minutos. Después se evapora hasta sequedad en un concentrador de vacío (Speed Vac). El residuo se toma con 20,5 μ l de DMSO, produciendo una suspensión madre de 5 mM de biotina-A β (1-42). Esta puede conservarse a -20 °C.

Ejemplo 8

25 Preparación de los oligómeros de biotina-A β (1-42) con pesos moleculares de 17 kDa y 22 kDa [oligómeros A de biotina-A β (1-42)]

Se mezclan 2 μ l de la suspensión madre del ejemplo 7 con 23 μ l de tampón de PBS (20 mM de fosfato de sodio, 140 mM de NaCl, pH 7,4) y se ajusta a un contenido del 0,2 % de SDS con 2,4 μ l de solución de SDS al 2 %. Después se incuba durante 6 horas a 37 °C. Los componentes insolubles se eliminan por centrifugación a 10 000 g durante 5 minutos. La preparación del oligómero A de biotina-A β (1-42) obtenida de esta manera puede conservarse a -20 °C.

Ejemplo 9

35 Preparación de los oligómeros de la biotina-A β (1-42) con pesos moleculares de 42 kDa y 52 kDa [oligómeros B de biotina-A β (1-42)]

Se diluye una solución del oligómero A de biotina-A β (1-42) obtenida de acuerdo con el ejemplo 8 con 82 μ l de agua (el 0,05 % de contenido de SDS, 0,1 mM de A β) y se incuba a 37 °C durante 16 horas. Los componentes insolubles se eliminan por centrifugación a 10 000 g durante 5 minutos. La preparación del oligómero B de la biotina-A β (1-42) puede congelarse a -20 °C y almacenarse para estudios adicionales (Figura 3).

Ejemplo 10

Preparación de la suspensión madre de fluoresceína-A β (1-42)

45 Se disuelven 0,5 mg de fluoresceína- β -amiloide(1-42) (abreviado: fluoresceína-A β (1-42); material del péptido sintético, liofilizado, AnaSpec) en 200 μ l de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol y se incuban en un tubo de Eppendorf a 37 °C durante 30 minutos. Después se evapora hasta sequedad en un concentrador de vacío (Speed Vac). El residuo se toma con 20,5 μ l de DMSO, produciendo 5 mM de suspensión madre de fluoresceína-A β (1-42). Esta puede almacenarse a -20 °C.

Ejemplo 11

55 Preparación de los oligómeros de fluoresceína-A β (1-42) con pesos moleculares de 17 kDa y 22 kDa [oligómero A de la fluoresceína-A β (1-42)]

Se mezclan 2 μ l de la suspensión madre del ejemplo 10 con 23 μ l de tampón de PBS (20 mM de fosfato de sodio, 140 mM de NaCl, pH 7,4) y se ajusta a un contenido del 0,2 % de SDS con 2,4 μ l de solución SDS al 2 %. Después se incuba durante 6 horas a 37 °C. Los componentes insolubles se eliminan por centrifugación a 10 000 g durante 5 minutos. La preparación del oligómero A de la fluoresceína-A β (1-42) obtenida de esta forma puede conservarse a -20 °C.

Ejemplo 12

Preparación de los oligómeros de fluoresceína-A β (1-42) con pesos moleculares de 42 kDa y 52 kDa (oligómeros B de la fluoresceína-A β (1-42))

- 5 Se diluye una solución del oligómero A de la fluoresceína-A β (1-42) obtenida de acuerdo con el ejemplo 11 con 82 μ l de agua (el 0,05 % de contenido de SDS, 0,1 mM de A β) y se incuba a 37 °C durante 16 horas. La preparación del oligómero B de la fluoresceína A β (1-42) puede congelarse a -80 °C y almacenarse para estudios adicionales (Figura 4).

Ejemplo 13

- 10 Reticulación de los oligómeros A de la A β (1-42) del ejemplo 2a [oligómeros A-CL de la A β (1-42)]

- 15 Se diluyen 10 μ l de una solución del oligómero A de la A β (1-42) preparada de acuerdo con el ejemplo 2a a 100 μ l del contenido de A β (1-42) con 7,5 μ l de PBS, 0,2% de SDS. A esta solución se añade 1 μ l de solución de 10 mM de glutardialdehído recientemente preparado en agua, y se agita a TA durante 3 horas. El glutardialdehído en exceso se satura agregando 1 μ l de 10 mM de solución de etanolamina en agua, pH 7,4, a la muestra y se agita durante 1 hora. La preparación obtenida en esta forma contiene oligómeros A de la A β (1-42) reticulados y se denomina preparación de los oligómeros A-CL de la A β (1-42).

20 Ejemplo 14

a) Reticulación de los oligómeros B de la A β (1-42) del ejemplo 5a [oligómeros B-CL de la A β (1-42)]

- 25 Se mezclan 10 μ l de una solución del oligómero B de la A β (1-42) preparada de acuerdo con el ejemplo 5a con 1 μ l de 10 mM de la solución de glutardialdehído recientemente preparada en agua y se agita a TM durante 3 horas. El exceso de glutardialdehído se satura agregando 1 μ l de 10 mM de solución de etanolamina en agua, pH 7,4, a la muestra y se agita durante 1 hora. La preparación obtenida de esta manera contiene oligómeros B de la A β (1-42) reticulada y se denomina preparación de los oligómeros B-CL de A β (1-42).

30 b) Procedimiento alternativo para reticular los oligómeros de la A β (1-42) [oligómeros B-CL de la A β (1-42)]

- 35 Se mezclan 72,6 ml de una solución del oligómero B de la A β (1-42) preparada de acuerdo con el ejemplo 5a con 7,26 ml de una solución de 10 mM de glutardialdehído recientemente preparada en agua y se agitan a TA durante 2 horas. El exceso de glutardialdehído se satura agregando 726 μ l de tampón (20 mM de fosfato de sodio, 140 mM de NaCl, 500 mM de etanolamina, pH 7,4) a la muestra y se agita a TA durante 30 minutos. La mezcla de reacción se concentra a 3 ml por un tubo Centriprep de 15 ml 30 kDa. El concentrado se elimina por centrifugación a 10 000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se elimina y se dializa a 6 °C en tubo de diálisis contra 1 l de 5 mM de fosfato de sodio, 35 mM de NaCl, pH 7,4, durante 16 horas. El dialisato se elimina subsecuentemente y puede almacenarse a -80 °C para estudios adicionales. La preparación obtenida de esta manera contiene oligómeros B de la A β (1-42) reticulada y se denomina preparación del oligómero B-CL de A β (1-42).

Ejemplo 15

45 a) Preparación de los oligómeros de la A β (20-42) truncados a partir de los oligómeros B de la A β (1-42) por desdoblamiento con termolisina:

- 50 Se mezclan 1,59 ml de una preparación del oligómero B de la A β (1-42) preparada de acuerdo con el ejemplo 6b con 38 ml de tampón (50 mM de MES/NaOH, pH 7,4) y 200 μ l de 1 mg/ml de solución de termolisina (empresa Roche) en agua. La mezcla de reacción se agita a TA durante 20 horas. Luego se añaden 80 μ l de una solución de 100 mM de EDTA, pH 7,4, en agua y se ajusta adicionalmente a un contenido de SDS del 0,01 % con 400 μ l de la solución SDS al 1 %. La mezcla de reacción se concentra en aproximadamente 1 ml por un tubo de Centriprep de 15 ml 30 kDa. El concentrado se mezcla con 9 ml de tampón (50 mM de MES/NaOH, el 0,02 % de SDS, pH 7,4) y de nuevo se concentra a 1 ml. El concentrado se dializa a 6 °C contra 1 l de tampón (5 mM de fosfato de sodio, 35 mM de NaCl) en un tubo de diálisis durante 16 horas. El dialisato se ajusta a un contenido de SDS del 0,1 % con una solución de SDS al 2 % en agua. La muestra se elimina por centrifugación a 10 000 g durante 10 minutos y el sobrenadante se elimina.

60 El material así obtenido se analiza además (electroforesis de gel de poliacrilamida SDS; véase Figura 11); el análisis espectral de masa de los oligómeros truncados producidos revela que el oligómero se compone de la A β (1-42) truncada.

b) Preparación de los oligómeros de la A β (12-42) truncados a partir de los oligómeros B de la A β (1-42), por desdoblamiento con endoproteinasa GluC:

Se mezclan 2 ml de la preparación del oligómero B de la A β (1-42) preparada de acuerdo con el ejemplo 6b con 38 ml de tampón (5 mM de fosfato de sodio, 35 mM de cloruro de sodio, pH 7,4) y 150 μ l de una endoproteinasa GluC 1 mg/ml (empresa Roche) en agua. La mezcla de reacción se agita durante 6 horas a TA. A continuación se añaden 150 μ l adicionales de una endoproteinasa GluC 1 mg/ml (empresa Roche) en agua. La mezcla de reacción se agita a TA durante otras 16 horas. Después se añaden 8 μ l de una solución de 5 M de DIFP. La mezcla de reacción se concentra en aproximadamente 1 ml por 15 ml del tubo Centriprep 30 kDa. El concentrado se mezcla con 9 ml del tampón (5 mM de fosfato de sodio, 35 mM de cloruro de sodio, pH 7,4) y se concentra otra vez a 1 ml. El concentrado se dializa a 6 °C contra 1 l del tampón (5 mM de fosfato de sodio, 35 mM de NaCl) en un tubo de diálisis durante 16 horas. El dialisato se ajusta a un contenido de SDS del 0,1 % con una solución de SDS al 1 % en agua. La muestra se elimina por centrifugación a 10 000 g durante 10 minutos y el sobrenadante se elimina.

El material así obtenido se analiza de nuevo (electroforesis de gel de poliacrilamida SDS; véase Figura 11). El análisis espectrométrico de masa del oligómero truncado producido revela que el oligómero se compone de la A β (1-42) truncada.

Caracterización de los oligómeros A β (1-42)

Ejemplo 16

Electroforesis de gel de poliacrilamida SDS (SDS PAGE)

El peso molecular bajo condiciones de desnaturalización se caracteriza analizando las preparaciones de los ejemplos 2a, 5a, 9, 12, 13 y 14a, todos los cuales contienen los oligómeros A y B, bajo condiciones de desnaturalización de acuerdo a condiciones estándares en un SDS PAGE de Tris-glicina al 4-20 %.

La evaluación del SDS PAGE (Figura 1) revela que la proteína A β (1-42) de inicio presente aún en la preparación del oligómero A aparece como una banda en aproximadamente 4 kDa, mientras los oligómeros A1 o A2 del ejemplo 2a, que están denominados 1 y 2 en la Figura 1, son visibles en aproximadamente 15 kDa (banda más débil) y en aproximadamente 20 kDa (banda principal).

En la preparación del oligómero B puede detectarse comparativamente poca proteína de partida A β (1-42) (banda relativamente débil en aproximadamente 4 kDa). En contraste, los oligómeros B1 o B2 del ejemplo 5a, que están denominados 3 y 4 en la Figura 1, aparecen en aproximadamente 38 kDa y aproximadamente 48 kDa (véanse las flechas). Los pesos moleculares correspondientemente más elevados de aproximadamente 42 kDa y aproximadamente 52 kDa se originan de los oligómeros B derivados de biotina y fluoresceína de los ejemplos 9 y 12 (Figuras 3, 4).

El análisis de las preparaciones que contienen los respectivos productos de reticulación A-CL y B-CL (ejemplos 13 y 14a; Figura 2) muestra que las dos muestras mantienen esencialmente su grado de oligomerización (véase senda A y la senda B con B'). El comportamiento de migración ligeramente diferente comparado a los oligómeros A y B pueden explicarse por una capacidad de unión SDS ligeramente alterada y por la modificación de los grupos amino del término N o del residuo de lisina.

El análisis de los oligómeros A β (20-42) truncados (del Ejemplo 15a) muestra que la doble banda 38/48 kDa (Figura 11, senda A) se convierte a una doble banda 28/38 kDa (Figura 11; senda B) por el desdoblamiento proteolítico del péptido N terminal con termolisina. De manera similar, el análisis de los oligómeros de la A β (1-42) truncados (del ejemplo 15b) muestra que la doble banda 38/48 kDa (Figura 11; senda A) se convierte a una doble banda 33/40 kDa (Figura 11; anillo C) por desdoblamiento proteolítico del péptido N-terminal con endoproteasa GluC.

Ejemplo 17

Cromatografía de permeación de gel

Para estudiar el comportamiento de peso molecular bajo condiciones no desnaturalizadas en mayor detalle, se lleva a cabo una cromatografía de permeación de gel (GPC, por sus siglas en inglés) a manera de un proceso FPLC utilizando una columna Superose 12 HR10/30. La GPC se activa a 4 °C.

La columna se equilibra con 5 volúmenes de columna de tampón de PBS (velocidad de flujo 0,5 ml/min, detección de UV, 214 nm) y se calibra primero utilizando estándares de proteína. Subsecuentemente, se analiza la preparación del oligómero B de la A β (1-42) del ejemplo 5a (Figura 5, inferior) y, en comparación, la misma concentración del liofilizado de la A β (1-42) recientemente pesado y disuelto en PBS, después de eliminar por centrifugación los componentes insolubles a 10 000 g durante 5 minutos (Figura 5, superior).

La evaluación revela que la preparación del oligómero B de la proteína A β (1-42) presenta una fracción de proteína caracterizada por un pico principal en el intervalo de peso molecular de alrededor de aproximadamente 50 kDa.

Como bajo condiciones de desnaturalización en la SDS PAGE, esta fracción de la proteína difiere significativamente de la proteína A β (1-42) monomérica caracterizada por un pico principal del intervalo del peso molecular de alrededor de aproximadamente 16 kDa.

- 5 Para estudiar el comportamiento de peso molecular de los oligómeros B de la A β (1-42) del ejemplo 6b así como los oligómeros B-CL de la A β (1-42) del ejemplo 14a bajo condiciones no desnaturalizadas, se lleva a cabo una cromatografía de permeación de gel (GPC) a manera de proceso de FPLC utilizando una columna Superose 12 HR120/30 a temperatura ambiente. La columna se equilibra con 5 volúmenes de columna de tampón de PBS (velocidad de flujo 0,5 ml/min, detección de UV, 214 nm) y se calibra primero utilizando estándares de proteína.
- 10 Subsecuentemente, el oligómero B de la A β (1-42) del ejemplo 6b se diluye a 1 mg/ml con tampón de PBS así como se diluye y analiza el oligómero B-CL de la A β (1-42) del ejemplo 14a a 1 mg/ml con tampón de PBS (Figura 12).

La evaluación revela que la preparación del oligómero B de la A β (1-42) con contenido de SDS reducido presenta una fracción de proteína caracterizada por un pico principal en el intervalo de peso molecular de alrededor de aproximadamente 100 kDa. En comparación a esto, la preparación del oligómero B-CL de la A β (1-42) con contenido de SDS reducido presenta una fracción de proteína caracterizada por un pico principal en el intervalo de peso molecular de alrededor de aproximadamente 60 kDa.

Ejemplo 18

20 Electroforesis de gel de poliacrilamida nativa (NATIVE PAGE) de los oligómeros B de la A β (1-42) del ejemplo 5a

El peso molecular bajo condiciones nativas se caracteriza analizando las preparaciones que contienen los oligómeros B del ejemplo 5a bajo condiciones no naturalizadas en un gel de Tris-glicina al 4-20 %.

25 El detergente presente en las preparaciones se neutraliza por el detergente no iónico Triton X-100. Con este fin, se pipetea 1 μ l (el 4 % de Triton X-100) a 10 μ l de la preparación del ejemplo 5a e se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos. Subsecuentemente, se mezclan 10 μ l con el mismo volumen de tampón de muestra nativo (4 ml de 1M de Tris, pH 6,8, 8 ml de glicerol, 1 ml de azul de bromofenol en 50 ml de H₂O) y se lleva a cabo la electroforesis (tampón de activación: 7,5 g, de Tris, 36 g de glicina a 2,5 l de H₂O).

30 La evaluación de NATIVA PAGE revela que la A β (1-42) del péptido de partida presente aún en la preparación del oligómero B aparece como banda en aproximadamente 28 kDa (senda A, indicada con 1), mientras que las bandas principales de la preparación del ejemplo 5a son visibles en un peso molecular aparente de 64-90 kDa (senda A, indicada con 2) (Figura 6).

35 Es importante que los pesos moleculares puedan asignarse a los oligómeros de acuerdo con la invención, en particular los oligómeros B, también en métodos analíticos de peso molecular nativo tal como cromatografía de permeación de gel (véase el ejemplo 17) o la electroforesis de gel nativo (véase el ejemplo 18).

40 Después de complejar el SDS, los oligómeros B a los cuales pueden asignarse en la SDS PAGE pesos moleculares de aproximadamente 38 y 48 kDa se detectan en la electroforesis de gel nativa como banda en el intervalo de peso molecular de aproximadamente 64-90 kDa con respecto a las proteínas estándares seleccionadas. Tras este método no puede esperarse proporcionar una lectura exacta del peso molecular, ya que el comportamiento de migración de los oligómeros se determina sustancialmente por sus cargas intrínsecas, además de su tamaño. Sin embargo, el resultado puede conducir a la conclusión de que se presenta una especie oligomérica definida.

Ejemplo 19

- 50 a) Estabilidad de los oligómeros B de la A β (1-42) en distintas concentraciones de proteína en tampones fisiológicos

Los oligómeros B de la A β (1-42) obtenidos según el ejemplo 6b se prueban para estabilidad en tampón de PBS bajo las siguientes condiciones.

55 Se diluyen 5 mg/ml con PBS en 2 x etapas de dilución hasta 0,08 mg/ml. Todas las soluciones obtenidas se incuban a temperatura ambiente durante 24 horas. A continuación, se analizó el patrón de banda en una SDS PAGE en comparación con una preparación de control congelada. El patrón de banda es idéntico en todas las muestras.

- 60 b) Estabilidad de los oligómeros B de la A β (1-42) a distintas temperaturas y después de diferentes períodos de tiempo en tampones fisiológicos.

Los oligómeros B de la A β (1-42) obtenidos según el ejemplo 6b se diluyen a 0,5 mg/ml con tampón de PBS y se incuban a temperatura ambiente durante 24 horas o 96 horas o a 37 °C. A continuación, se analizó el patrón de banda en una SDS PAGE. El patrón de banda es idéntico en todas las muestras.

65

Ejemplo 20

Proteólisis de los oligómeros B de la A β (1-42) mediante distintas proteasas (tripsina, quimiotripsina, termolisina, elastasa, papaína)

5 Las alícuotas de la preparación del oligómero B de la A β (1-42) obtenida según el ejemplo 6b se diluyen a 0,5 mg/ml con tampón (20 mM de fosfato de sodio, 140 mM de NaCl, pH 7,4) y se incuban en cada caso con 1/50 de la cantidad en peso de las soluciones de proteasa indicadas en la Figura 9 bajo las siguientes condiciones a 37 °C y pH 7,4 durante 20 horas. Se analiza entonces 1 μ g de las alícuotas de mezclas reactivas en una SDS-PAGE (Figura 9).

10 La SDS PAGE muestra que, a partir de la preparación de los oligómeros B de la A β (1-42), todas las proteasas revierten la doble banda a aproximadamente 38/48 kDa a una doble banda kDa en aproximadamente 32/28 kDa bajo las condiciones de proteólisis limitada elegida.

Ejemplo 21

Estabilidad de los oligómeros B de la A β (1-42) en plasma de rata

20 Se incuban 4 μ l de la preparación del oligómero B de la A β (1-42) preparada según el ejemplo 6b con 76 μ l de plasma de rata a temperatura ambiente durante 0 h, 1 h, 2 h, 4 h y 8 h. Las incubaciones se detienen congelando en hielo seco.

25 Subsecuentemente, todas las muestras se analizan en una SDS PAGE, después de la adición del tampón de muestra SDS. Después se realiza una evaluación de la estabilidad a través de la tinción de los oligómeros B de A β (1-42) en Western blot. Para la detección se utilizó el anticuerpo 6E10 anti-A β (1-42) (empresa Signet). Las bandas se hacen visibles por un anticuerpo IgG anti-ratón acoplado a alcalifosfatasa y adición del sustrato NBT/BCIP. Tanto el peso molecular como la intensidad del patrón de banda observada permanecen casi sin cambios durante un período de 2 h, 4 h y 8 h.

30 Este resultado sugiere que los oligómeros B de la A β (1-42) presentan una estabilidad de plasma elevada. De acuerdo a ésta, la vida promedio biológica en el plasma está en el intervalo de aproximadamente 8 horas o más prolongada.

Ejemplo 22

Unión de los oligómeros de biotina-A β (1-42) con pesos moleculares de 17 kDa y 22 kDa [oligómeros A de biotina-A β (1-42)] o de 42 kDa y 52 kDa [oligómeros B de la biotina-A β (1-42)] a la superficie de las células neuronales humanas.

40 La unión de la proteína β -amiloide(1-42) humana y las dos preparaciones del oligómero A de la A β (1-42) y el oligómero B de la A β (1-42) a la línea IMR-32 de célula de neuroblastoma humano (Número ATCC: CCL-127) se estudia por medio de FACScan (Becton Dickinson). Se incuban una suspensión de células IMR-32 (1,5 x 10⁶ células/0,1 ml de PBS) con la proteína β -amiloide(1-42) humana etiquetada con biotina (material de péptido sintético, liofilizado, AnaSpec) y las preparaciones que contienen los oligómeros A o B etiquetados con biotina (ejemplos 8 o 9) a 37 °C durante 20 minutos. Las células se lavan subsecuentemente con tampón (PBS más el 1 % de BSA) y se incuban a temperatura ambiente con fluoresceína acoplada a isotiocianato de estreptavidina (empresa Sigma) durante 20 minutos. Después de una etapa de lavado con tampón, la unión a la superficie de las células IMR-32 se analizó por FACScan. La línea sombreada muestra la fluorescencia de fondo en ausencia de los componentes etiquetados con biotina. La adición de las preparaciones individuales resultó en un fuerte incremento de fluorescencia asociada a células y está representada por la línea gruesa. La unión de los oligómeros A (Figura 7B) y B (Figura 7C) a las superficies celulares se diferencia claramente de la unión de la proteína β -amiloide (1-42) monomérica (Figura 7A). Los datos muestran los sitios de unión específicos para los oligómeros en superficies celulares humanas.

Ejemplo 23

Detección de los oligómeros B de la A β (1-42) en homogenatos de cerebro de rata después de la administración icv

60 Se aplicaron 10 nmoles de una preparación del oligómero B de A β (1-42) obtenida según el ejemplo 6b como bolo icv a ratas. Los cerebros se preparan después de 15 minutos o después de 120 minutos. Se preparan asimismo cerebros de animales de control no tratados. Para este propósito, en cada caso, se mezcla 1 g de cerebro de rata con 9 ml de tampón de interrupción A (200 ml de fosfato de sodio 5 mM, 35 mM de NaCl, 300 mM de sacarosa, ajustado a pH 7,4, con 4 comprimidos del coctel inhibidor de proteasa Complete®, empresa Roche) en un tubo Falcon de 50 ml y se interrumpe bajo ultrasonido (Ultra Turrax) en hielo durante 2 minutos. La solución se deja

reposar durante 20 minutos, luego se agita brevemente y se divide en 8 x 1 ml de alícuotas (= homogenato).

Para llevar a cabo la detección cuantitativamente, se prepara primero una serie de estándares de la preparación del oligómero B de la A β (1-42) en el intervalo de concentración de 1,58 ng/ μ l - 0,005 ng/ μ l.

5 Además, como control positivo, se procesa también un homogenato a partir de un cerebro de control de una rata no tratada y se prepara una serie de estándares de la preparación del oligómero B de la A β (1-42) en este homogenato de cerebro en la misma manera. Los homogenatos se centrifugan entonces en la ultracentrifugadora a 100 000 g durante 1 hora y los sobrenadantes se utilizan para los análisis subsecuentes.

10 A partir de la comparación de los valores medidos en ambas series de estándares (PBS contra el sobrenadante de homogenato de cerebro de control), el contenido de oligómero B de la A β (1-42) puede determinarse cuantitativamente como sigue, primero en el control positivo y luego, en comparación con el mismo, también en la muestra de cerebro de las ratas tratadas.

15 1) Detección por dot blot

Se añade 1 μ l de gotas de las muestras de serie estándares y de los extractos de muestra a partir de los animales tratados sobre papel de nitrocelulosa, y se detecta la A β (1-42) utilizando el anticuerpo 6E10 (anti-A β (1-42)). La tinción se lleva a cabo utilizando una alcalifosfatasa acoplada a IgG anti-ratón y por adición del reactivo de tinción NBT/BCIP.

25 Aunque no es detectable ninguna A β (1-42) (0,01 nmoles/g) en los extractos de cerebro de ratas no tratadas, aproximadamente 0,4 nmoles/g de la A β (1-42) pueden detectarse en ratas sacrificadas 15 minutos después del tratamiento comparando la intensidad de tinción con las concentraciones correspondientes del control positivo, y aproximadamente 0,2 nmoles/g pueden detectarse además por el mismo método en las ratas sacrificadas 120 minutos después del tratamiento. Esto resulta en una vida media biológica promedio de aproximadamente 105 minutos de los oligómeros B de la A β (1-42) aplicada exógenamente.

30 2) Detección por Western blot

Todas las muestras analizadas por dot blot se analizan asimismo en Western blot. La Western blot se desarrolla asimismo con mMAb 6E10 (anti-A β (1-42); empresa Signet) y además con una alcalifosfatasa acoplada a IgG anti-ratón y agregando el reactivo de tinción NBT/BCIP.

35 Las bandas reactivas anti-A β (1-42) ocurren únicamente en el intervalo 38/48 kDa, lo cual corresponde al peso molecular aparente de los oligómeros B de la A β (1-42), es decir, la estructura oligomérica se retiene todavía con la administración *in vivo*, aún después de 2 horas.

40 Además, como en el método de dot blot, pueden estimarse las mismas concentraciones en los cerebros de ratas de 15 minutos (0,4 nmoles/g) así como de las ratas de 120 minutos (0,2 nmoles/g) comparando las intensidades de tinción con bandas intensamente teñidas correspondientemente de los oligómeros B de A β (1-42) en el control positivo.

45 Ejemplo 24

Acción neurotóxica de los oligómeros de la A β (1-42) con pesos moleculares de 38 kDa y 48 kDa [oligómeros B de la A β (1-42)] en neuronas corticales de ratón

50 La preparación y cultivo de neuronas corticales de murino se realiza como cultivo de mezcla con células gliales siguiendo el ejemplo de la bibliografía (Choi *et al.* (1987) J. Neurosci, 7, 357-368). En embriones se liberan mecánicamente en los días 14-15 de desarrollo las cortezas de las meninges y regiones cerebrales más profundas. Las células se separan una de la otra por incubación durante 5-7 minutos en una solución de tripsina al 0.05 % a 37 °C y se pipetea subsecuentemente varias veces a través de una pipeta de Pasteur con abertura reducida.

55 Después de determinar el número de células, se seleccionan 430 000 células en 0,5 ml de medio de mantenimiento (medio esencial mínimo con 0,8 mM de glutamina, 18 mM de glucosa, 23 mM de NaHCO₃ y el 10 % de suero de caballo) por 2 cm² en material de cultivo celular que se ha recubierto con poli-L-ornitina y laminina. El cultivo y las posteriores incubaciones de las células se realizan en un incubador de cultivo celular humidificado a 37 °C, 5 % de CO₂. Después de 3-5 días en cultivo, la propagación de las células gliales se interrumpe por una incubación de 1 día con una mezcla de (+)-5-fluoro-2'-desoxiuridina/uridina (10 μ M de cada una). Después de 14 días en el cultivo, se estudia la acción tóxica de los oligómeros B de la A β (1-42). Para este propósito, las células se incuban en tampón de células de cerebro (120 mM de NaCl, 5,4 mM de KCl, 1,8 mM de CaCl₂, 15 mM de glucosa, 25 mM de HEPES, pH 7,2) durante 15 minutos. Las células 1 control se incuban con 300 μ M de L-glutamato en tampón de células de cerebro el mismo tiempo. La solución madre del oligómero A β se diluye con medio libre de suero (medio esencial mínimo con 0,8 mM de glutamina, 20 mM de glucosa, 26 mM de NaHCO₃) en distintas concentraciones finales y se

incuba durante 24 horas. Las células de control 1 tratadas con L-glutamato se incuban en paralelo en medio libre de suero. Otro grupo de células (células de control 2) se tratan solo con tampón de células de cerebro y medio libre de suero. Los sobrenadantes del cultivo celular se eliminan después de 24 horas, las células restantes se destruyen por la incubación de 20 minutos en agua destilada y la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) se determina enzimáticamente en ambas soluciones. Para la evaluación, se determina la relación de la actividad de LDH de los sobrenadantes de cultivo celular a la suma de las actividades de LDH del sobrenadante y las células restantes y se forma el promedio de las determinaciones cuádruples. Se llevan a cabo 3 experimentos, estando presente cada condición experimental por cuadruplicado (n = 12). El promedio de las células tratadas con glutamato (células de control 1) se establece al 100 % de muerte neuronal, el promedio de las células que no se han tratado ni con L-glutamato ni con los oligómeros A β (células de control 2) se establece al 0 % de muerte neuronal y los valores de las células tratadas con los oligómeros A β se convierten de manera correspondiente. El promedio de neurotoxicidad de todas las determinaciones en las concentraciones utilizadas en cada caso muestra una acción tóxica considerable de los oligómeros A β (1-42) con pesos moleculares de 38 kDa y 48 kDa [oligómero B de la A β (1-42)], véase la Figura 8.

15 Ejemplo 25

Producción de los anticuerpos

20 Los cocteles utilizados para la inmunización contienen en todos los casos adyuvantes (empresa Biogenes) con esencialmente los siguientes componentes:

95 %	de aceite de parafina
2,4%	de Tween 40
0,1%	de colesterol
0,1%	de lipopolisacárido

25 El adyuvante se mezcla con una solución del antígeno en una relación 2:1 hasta que se obtiene una emulsión estable. La emulsión se inyecta y forma un depósito a partir del cual se libera continuamente el antígeno.

a) Producción de antisuero policlonal por inmunización de conejos con oligómeros B de la A β (20-42) truncados del ejemplo 15a.

30 Se inmunizan 2 conejos con la preparación del oligómero B de la A β (20-42) no conjugado del ejemplo 15a de acuerdo a un protocolo estándar:

Día 1	Inmunización primaria y la toma de suero preinmune
Día 7	Primer estímulo
Día 14	Segundo estímulo
Día 28	Tercer estímulo y sangrado
Día 35	Toma de sangre

35 Los antisueros se obtienen a partir de la sangre de conejo dejando reposar el último a temperatura ambiente y la centrifugación subsecuente a temperatura ambiente. El suero obtenido de esta manera se denomina suero (a1).

Se acoplan 2 mg de la preparación del oligómero B de la A β (20-42) del ejemplo 15a a LPH con glutardialdehído bajo condiciones estándares y se inmunizan 2 conejos más con este oligómero B de la A β (20-42) conjugado de acuerdo a un protocolo estándar:

40	Día 1	Inmunización primaria y toma del suero preinmune
	Día 7	Primer estímulo
	Día 14	Segundo estímulo
	Día 28	Tercer estímulo y sangrado
	Día 35	Toma de sangre

45 Los antisueros se obtienen a partir de la sangre de conejo dejando al último permanecer a temperatura ambiente y la centrifugación subsecuente a temperatura ambiente. El suero obtenido de esta manera se denomina suero (a2).

b) Producción de antisueros policlonales por inmunización de conejos con oligómeros B de la A β (12-42) truncados del ejemplo 15b.

50 Se inmunizan 2 conejos con la preparación del oligómero B de la A β (12-42) no conjugada del ejemplo 15b de acuerdo al protocolo estándar:

ES 2 567 437 T3

Día 1	Inmunización primaria y toma de suero preinmune
Día 7	Primer estímulo
Día 14	Segundo estímulo
Día 28	Tercer estímulo y sangrado
Día 35	Toma de sangre

Los antisueros se obtienen a partir de la sangre del conejo, dejando al último permanecer a temperatura ambiente y la centrifugación subsecuente a temperatura ambiente. El suero obtenido de esta manera se denomina suero (b1).

- 5 Se acoplan 2 mg de la preparación del oligómero B de la A β (12-42) del ejemplo 15b a LPH con glutardialdehído bajo condiciones estándares y se inmunizan 2 conejos más con este oligómero B de la A β (12-42) conjugado de acuerdo a un protocolo estándar.

Día 1	Inmunización primaria y toma de suero preinmune
Día 7	Primer estímulo
Día 14	Segundo estímulo
Día 28	Tercer estímulo y sangrado
Día 35	Toma de sangre

- 10 Los antisueros se obtienen de la sangre del conejo dejando al último permanecer a temperatura ambiente y la centrifugación subsecuente a temperatura ambiente. El suero obtenido de esta manera se denomina suero (b2).

c) Producción de antisueros policlonales por inmunización de conejos con oligómeros B-CL de la A β (1-42) del ejemplo 14a.

- 15 Se inmunizan 2 conejos con la preparación de los oligómeros B-CL de la A β (1-42) no conjugados del ejemplo 14a de acuerdo a un protocolo estándar:

Día 1	Inmunización primaria y toma de suero preinmune
Día 7	Primer estímulo
Día 14	Segundo estímulo
Día 28	Tercer estímulo y sangrado
Día 35	Toma de sangre

- 20 Los antisueros se obtienen de la sangre del conejo dejando al último permanecer a temperatura ambiente y la centrifugación subsecuente a temperatura ambiente. El suero obtenido de esta manera se denomina suero (c1).

d) Producción de antisueros policlonales por inmunización de conejos con la preparación B del oligómero de la A β (1-42) del ejemplo 6b.

- 25 Se inmunizan 2 conejos con la preparación de los oligómeros B de la A β (1-42) no conjugada del ejemplo 6b de acuerdo a un protocolo estándar:

Día 1	Inmunización primaria y toma de suero preinmune
Día 7	Primer estímulo
Día 14	Segundo estímulo
Día 28	Tercer estímulo y sangrado
Día 35	Toma de sangre

- 30 Los antisueros se obtienen a partir de la sangre del conejo dejando al último permanecer a temperatura ambiente y la centrifugación subsecuente a temperatura ambiente. El suero obtenido de esta manera se denomina suero (d1).

Se acoplan 2 mg de la preparación del oligómero B de la A β (1-42) del ejemplo 6b a LPH, con glutardialdehído bajo condiciones estándares y se inmunizan 2 conejos más con esta preparación del oligómero B de la A β (1-42) conjugada de acuerdo a un protocolo estándar;

- 35

Día 1	Inmunización primaria y toma de suero preinmune
Día 7	Primer estímulo
Día 14	Segundo estímulo
Día 28	Tercer estímulo y sangrado
Día 35	Toma de sangre

Los antisueros se obtienen a partir de la sangre del conejo dejando al último permanecer a temperatura ambiente y la centrifugación subsecuente a temperatura ambiente. El suero obtenido de esta manera se denomina suero (d2).

- 40

Ejemplo 26

La caracterización de los antisueros policlonales a partir de las inmunizaciones del ejemplo 25 es relativa a su reacción cruzada con distintas formas A β (1-42).

5 Para caracterizar los antisueros policlonales, las series de dilución en el intervalo de 100 pmoles/ μ l-0,01 pmol/ μ l de las diversas formas A β (1-42) se prepararon en PBS. En cada caso, 1 μ l de la muestra se aplicó a una membrana de nitrocelulosa; la detección se realizó utilizando los sueros de conejo correspondientes del ejemplo 25. Una detección que utiliza mMAb 6E10 (empresa Signet) se llevó a cabo como comparación. La alcalifosfatasa acoplada a IgG anti-conejo (para la comparación: una alcalifosfatasa acoplada a IgG anti-ratón) se utilizó para tinción junto con la adición del reactivo NTB/BCIP de tinción. La Figura 10 muestra las dot blot obtenidas de esta manera, que pueden evaluarse numéricamente como sigue:

Antígeno	6E10	Suero (a1)	Suero (a2)	Suero (d1)	Suero (c1)
Oligómero	0,1	0,5	10	0,1	0,5
Monómero	0,1	10	100	0,1	1
Fibrilla	1	100	>100	0,5	1
APP	0,01	>1	1	0,1	0,1
A β (1-40)*	0,1	100	n.d.	0,5	10
*no mostrado en la Figura 10					

15 Los números en la tabla indican la cantidad mínima de antígeno visible [en pmoles; en cada caso con base en el monómero excepto para APP] (límite de detección).

20 La comparación de las reacciones inmunológicas con suero de conejo (a1) que se obtuvo por inmunización con el oligómero de la A β (20-42) no conjugado del ejemplo 15a muestra claramente que los anticuerpos que están dirigidos contra estos oligómeros reaccionan de forma cruzada únicamente débilmente con las otras formas tales como fibrillas, APP y monómeros. En contraste, es reconocible una reacción cruzada claramente más fuerte con el oligómero B de la A β (1-42) (véase fila 1) y, además, una reacción cruzada con el antígeno CL estabilizado. Estos datos indican una estructura claramente diferente de la forma oligomérica presente aquí, en comparación con APP, monómero así como la estructura de fibrilla. Los anticuerpos se unen a las estructuras específicas del oligómero.

25 Las reacciones inmunológicas con suero de conejo (a2) que se obtuvo por inmunización con el oligómero de la A β (20-42) conjugada del ejemplo 15a muestra asimismo que los anticuerpos que están dirigidos contra estos oligómeros reaccionan de forma cruzada solo débilmente con las otras formas tales como fibrillas y monómero. En contraste, es reconocible una reacción cruzada débil con el oligómero B de la A β (1-42) (véase fila 1), y además, una reacción cruzada con el antígeno CL estabilizado así como con APP. Estos datos indican una estructura asimismo claramente diferente de la forma oligomérica presente aquí, en comparación con monómero así como la estructura de fibrilla.

35 En comparación con esto, las reacciones inmunológicas con suero de conejo (d1) que se obtuvo por inmunización con el oligómero de la A β (1-42) del ejemplo 6b, así como suero de conejo (c1) que se obtuvo por inmunización con el oligómero B-CL de la A β (1-42) del ejemplo 14a muestran que los anticuerpos que están dirigidos contra estos oligómeros reaccionan de forma cruzada con las otras formas tales como fibrillas, APP y monómero comparablemente tan fuertemente como con los oligómeros B de la A β (1-42) (véase fila 1). Estos anticuerpos muestran una reacción inmune comparable a aquella de mMAb 6E10 (empresa Signet) y no se unen a estructuras específicas de oligómero.

40 Correspondientemente, los ratones se inmunizaron con los oligómeros de la A β (1-42) del ejemplo 6b y se establecieron anticuerpos monoclonales en una manera conocida per se. A este respecto, 2 de entre 10 anticuerpos monoclonales secretaron hibridomas cuyos perfiles de unión son similares a aquellos del antisuero (a1), en particular con respecto a las reactividades evaluadas anteriormente.

Ejemplo 27

Preparación de fibrillas de la A β (1-42)

50 Se diluyen 100 μ l de 2 mg/ml de la solución de la A β (1-42) en 0,1 % de NH₄OH con 300 μ l de tampón (20 mM de fosfato de sodio, 140 mM de NaCl, pH 7,4) a 0,5 mg/ml y se ajusta a un pH 7,4 con 0,1 M de HCl (100 μ M de A β (1-42)). La muestra se incuba a 37 °C durante 24 horas y se elimina entonces por centrifugación a 10 000 g durante 10 minutos. El residuo de proteína obtenido se vuelve a suspender con 400 μ l de tampón (20 mM de fosfato de sodio, 140 mM de NaCl, pH 7,4). La preparación de fibrillas de la A β (1-42) obtenida en esta manera puede almacenarse a -20 °C y se utiliza para estudios adicionales.

Ejemplo 28

Efectos de los oligómeros B-CL de la A β (1-42) (del ejemplo 14b) en cortes de hipocampo

5 Se adaptaron cortes hipocampales transversales de 400 μ M de grosor en una cámara de corte de inmersión a 34 °C bajo perfusión por solución de Ringer gaseada (124 mM de NaCl, 4,9 mM de KCl, 1,3 mM de MgSO₄, 2,5 mM de CaCl₂, 1,2 mM de KH₂PO₄, 25,6 mM de NaHCO₃, 10 mM de glucosa). Subsecuentemente, se estimuló el colateral de Schaffer con la ayuda de un electrodo de estimulación monopolar y se derivó el potencial postsináptico excitatorio (fEPSP, por sus siglas en inglés) en estrato radiatum. Los pulsos de prueba se dieron con el 30 % del nivel de estímulo que genera un fEPSP máximo. Para la inducción de la potenciación a largo plazo, se aplicaron 100 pulsos tres veces cada 10 minutos, con pulsos sencillos que tienen un ancho de 200 μ s (tétanos fuertes). La potenciación resultante de los fEPSP se registró durante al menos 240 minutos. La inyección del oligómero B-CL del ejemplo 14b (500 nM) comenzó 20 minutos antes del primer tétano y se detuvo 10 minutos después del último tétano. La elevación (inclinación) de las fEPSP se determinó y aplicó respecto al tiempo.

15 La reproducción de la Figura 14 muestra que el lavado de los oligómeros de la A β (1-42) suprime la potenciación a largo plazo en el hipocampo, sobre todo en la fase de mantenimiento. Por consiguiente, los oligómeros B-CL de la A β (1-42) influyen en el almacenamiento de información de células nerviosas (memoria celular).

20 Ejemplo 29

Unión de los oligómeros B de la A β (1-42) (del ejemplo 5b) a neuronas hipocampales primarias de rata

25 Se estudió la unión de los oligómeros B de la A β (1-42) de rata del ejemplo 5b a neuronas de rata hipocampales primarias. Las neuronas hipocampales se cultivaron en medio neurobasal con suplemento B27 en cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina y se utilizaron en el día 14 del cultivo. Los oligómeros se unieron a la membrana celular de las neuronas agregando 200 nM (concentración de la A β monomérica total) de oligómeros al medio de cultivo fresco e incubando a 37 °C durante 15 minutos. Después de la eliminación del medio que contiene A β , se llevaron a cabo dos etapas de lavado con medio y se fijaron las células entonces en el 3,7 % de formaldehído. Después del lavado adicional de las células, se bloquearon los sitios de unión no específicos con el 10 % de suero de burro normal en tampón de PBS a temperatura ambiente durante 90 minutos. Se aplicó 6E10 (de ratón) como el primer anticuerpo en una dilución de 1:2000 a temperatura ambiente durante 2 horas. Las células se lavaron de nuevo e incubaron con el segundo anticuerpo (de burro) que está dirigido contra ratón y está acoplado al tinte fluorescente Cy3, a temperatura ambiente durante 2 horas. Después que las células se habían lavado de nuevo, los cubreobjetos con las neuronas se fijaron a un portaobjetos con medio de montaje. Las neuronas hipocampales con los oligómeros de A β de unión se representaron en el microscopio fluorescente. El control utilizado fue una mezcla en donde se omitió el primer anticuerpo 6E10. Este control muestra así la fluorescencia no específica que no está basada en A β .

40 Como se ve en la reproducción 15a, los oligómeros se unen a la superficie celular de las neuronas de una manera discontinua. En contraste a esto, el control sin el primer anticuerpo 6E10 muestra solamente una fluorescencia no específica baja por la unión del segundo anticuerpo a las neuronas (reproducción 15b).

REIVINDICACIONES

1. Oligómero de la $\beta(1-42)$ amiloide truncado N-terminalmente soluble en solución salina fisiológica a diferencia de formas fibrilares más bien globulares que comprende fragmentos de $A\beta(X-42)$, en el cual X representa un número de 10 a 24, pudiendo conseguirse el oligómero según un método que comprende que:
- (a) el detergente pueda actuar sobre una proteína $\beta(1-42)$ amiloide monomérica para formar un oligómero A de la $A\beta(1-42)$ soluble en solución salina fisiológica más bien globular a diferencia de formas fibrilares;
- (b) el efecto del detergente se reduzca y el oligómero A de la $A\beta(1-42)$ se vuelva a incubar para formar un oligómero B de la $A\beta(1-42)$ soluble en solución salina fisiológica más bien globular a diferencia de formas fibrilares; y
- (c) el oligómero B de la $A\beta(1-42)$ se trate con proteasa, siendo el detergente un compuesto de la fórmula R-X, en el que el resto R representa opcionalmente alquilo ramificado con 6 a 20 átomos de carbono u opcionalmente alqueno ramificado con 6 a 20 átomos de carbono, y el resto X representa un grupo ácido o su sal, y presentando el oligómero B de la $A\beta(1-42)$ un peso molecular aparente en la electroforesis en gel de SDS de aproximadamente 38 kDa y/o aproximadamente 48 kDa.
2. Oligómero según la reivindicación 1, representando X un número de 10 a 22.
3. Oligómero según la reivindicación 1, estando seleccionado el fragmento de $A\beta(12-42)$, $A\beta(13-42)$, $A\beta(14-42)$, $A\beta(15-42)$, $A\beta(16-42)$, $A\beta(17-42)$, $A\beta(18-42)$, $A\beta(19-42)$, $A\beta(20-42)$.
4. Oligómero según la reivindicación 1, siendo el fragmento un fragmento de $A\beta(20-42)$.
5. Oligómero según la reivindicación 1, siendo el fragmento un fragmento de $A\beta(12-42)$.
6. Oligómero según la reivindicación 4, siendo la proteasa termolisina.
7. Oligómero según una de las reivindicaciones 1 a 6, estando seleccionado X de $-\text{COO}^-\text{M}^+$, $-\text{SO}_3^-\text{M}^+$ y $-\text{OSO}_3^-\text{M}^+$ y M^+ para un catión de hidrógeno o un catión orgánico o inorgánico seleccionado de cationes de metales alcalinos y alcalinotérreos y cationes de amonio.
8. Oligómero según la reivindicación 7, siendo el detergente dodecilsulfato sódico.
9. Oligómero según una de las reivindicaciones 1 a 8, estando el oligómero etiquetado, inmovilizado o reticulado.
10. Oligómero según la reivindicación 9, estando etiquetado el oligómero con etiquetas fluorescentes, etiquetas luminiscentes, etiquetas colorimétricas, etiquetas radioactivas o etiquetas magnéticas.
11. Medio farmacéutico, por ejemplo, una vacuna, que contiene un oligómero según una de las reivindicaciones 1 a 10, y opcionalmente un portador fisiológicamente digerible.
12. Oligómero según una de las reivindicaciones 1 a 10 para el uso en el tratamiento de una amiloidosis, como la enfermedad de Alzheimer.
13. Oligómero según una de las reivindicaciones 1 a 10 para el uso en un procedimiento de detección diagnóstico *in vitro* o *in vivo*.
14. Método para la preparación de un oligómero de la $\beta(1-42)$ amiloide truncado N-terminalmente a diferencia de formas fibrilares más bien globulares soluble en solución salina fisiológica que comprende fragmentos de $A\beta(X-42)$, en el cual X representa un número de 10 a 24, comprendiendo el método que:
- (a) el detergente pueda actuar sobre una proteína $\beta(1-42)$ amiloide monomérica para formar un oligómero A de la $A\beta(1-42)$ soluble en solución salina fisiológica más bien globular a diferencia de formas fibrilares;
- (b) el efecto del detergente se reduzca y el oligómero A de la $A\beta(1-42)$ se vuelva a incubar para formar un oligómero B de la $A\beta(1-42)$ soluble en solución salina fisiológica más bien globular a diferencia de formas fibrilares; y
- (c) el oligómero B de la $A\beta(1-42)$ se trate con proteasa, siendo el detergente un compuesto de la fórmula R-X, en el que el resto R representa opcionalmente alquilo ramificado con 6 a 20 átomos de carbono u opcionalmente alqueno ramificado con 6 a 20 átomos de carbono, y el resto X representa un grupo ácido o su sal, y presentando el oligómero B de la $A\beta(1-42)$ un peso molecular aparente en la electroforesis en gel de SDS de aproximadamente 38 kDa y/o aproximadamente 48 kDa.

15. Método según la reivindicación 14, estando seleccionado X de $-\text{COO}-\text{M}^+$, $-\text{SO}_3-\text{M}^+$ y $-\text{OSO}_3-\text{M}^+$ y M^+ para un catión de hidrógeno o un catión orgánico o inorgánico seleccionado de cationes de metales alcalinos y alcalinotérreos y cationes de amonio.
- 5 16. Método según la reivindicación 15, siendo el detergente dodecilsulfato sódico.
17. Método según una de las reivindicaciones 14 a 16, estando seleccionada la proteasa de: tripsina, quimotripsina, termolisina, elastasa, papaína y endoproteinasa GluC.
- 10 18. Método según una de las reivindicaciones 14 a 17 que, antes de la etapa (a), comprende además que pueda actuar un agente de ruptura de puentes de hidrógeno, como HFIP, sobre la proteína $\text{A}\beta(1-42)$.

FIG. 1

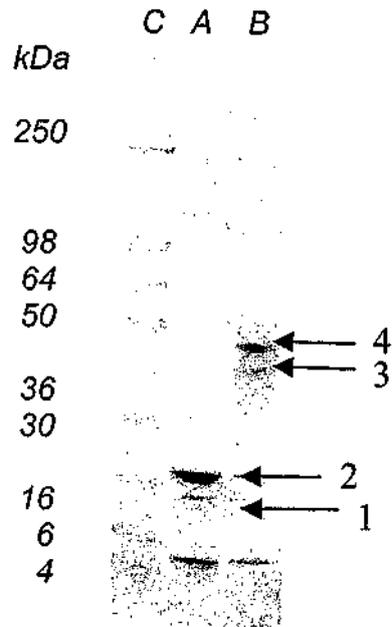


FIG. 2

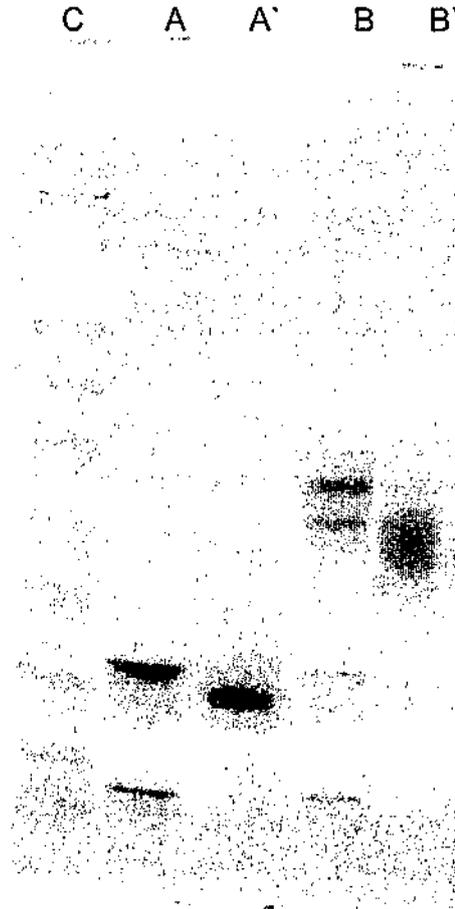


FIG. 3

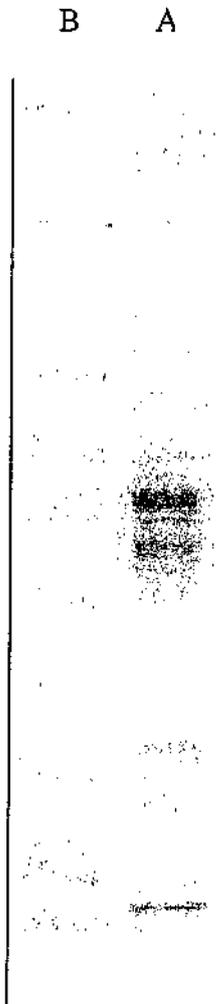


FIG. 4



FIG. 5

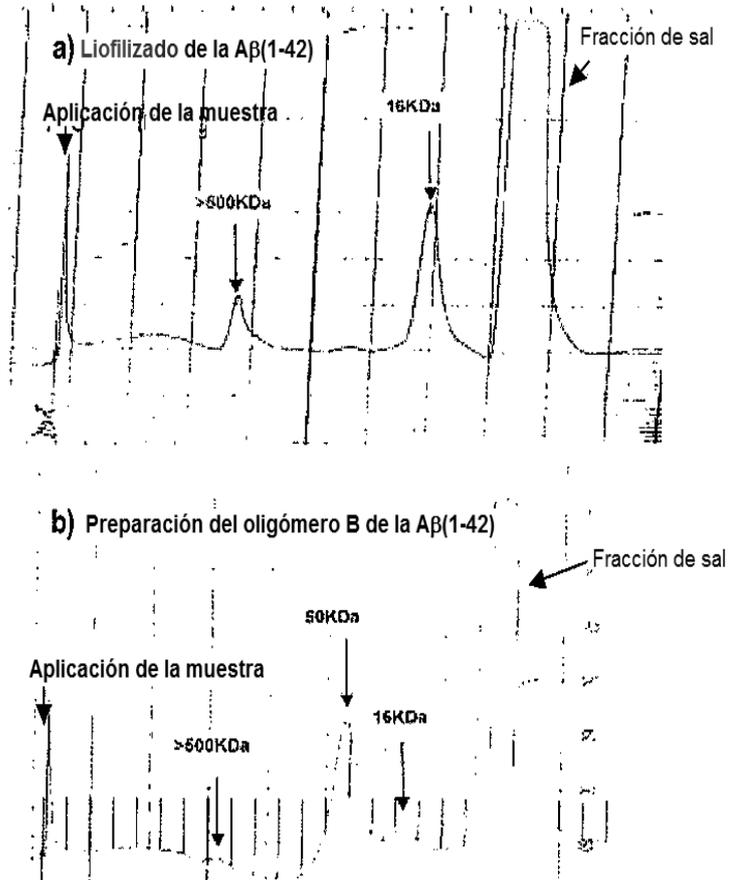


FIG. 6

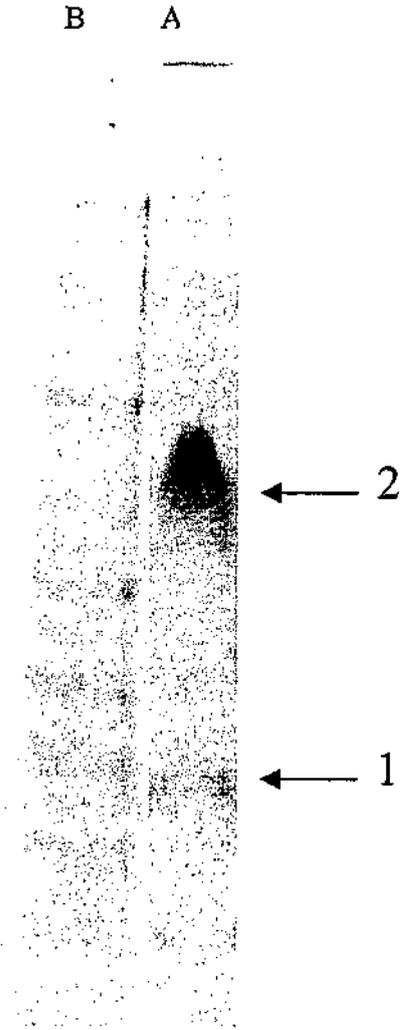
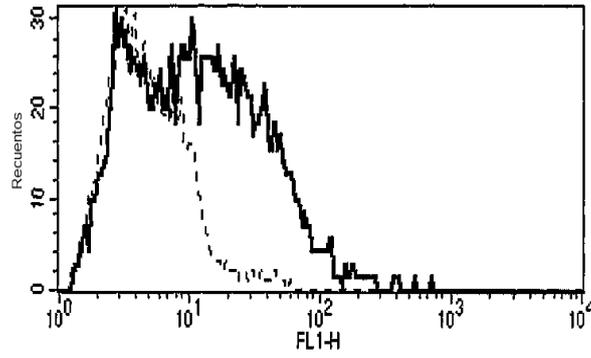
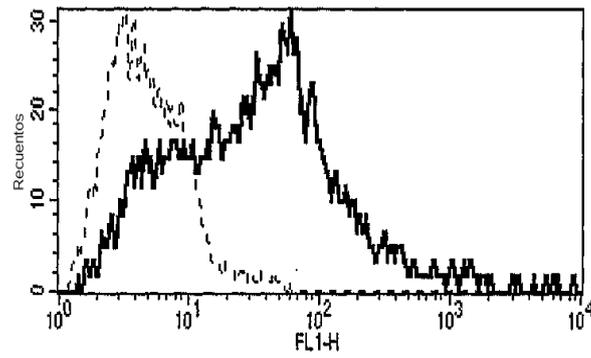


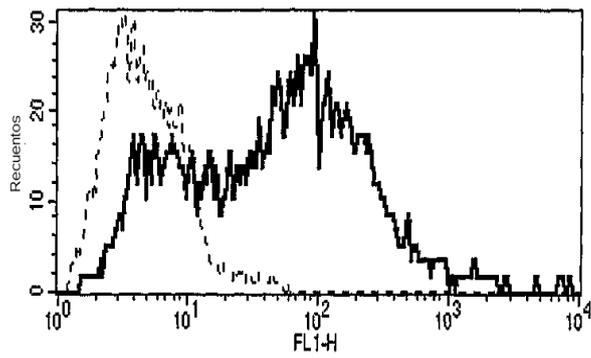
FIG. 7



A



B



C

FIG. 8

Oligómero B de la A β (1-42)

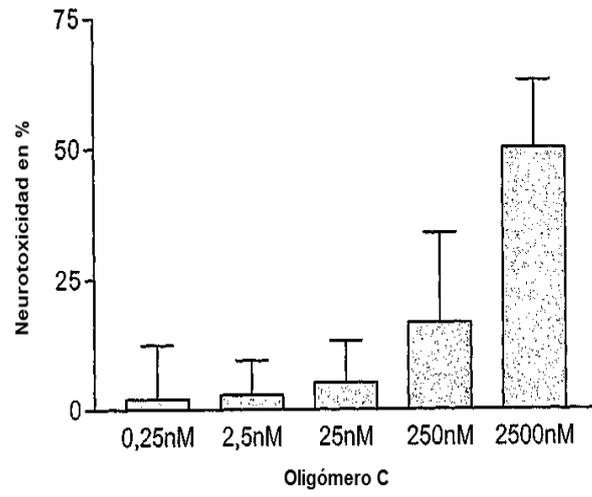


FIG. 9

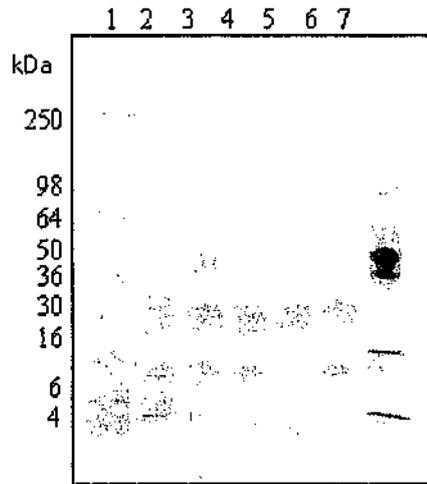


FIG. 10

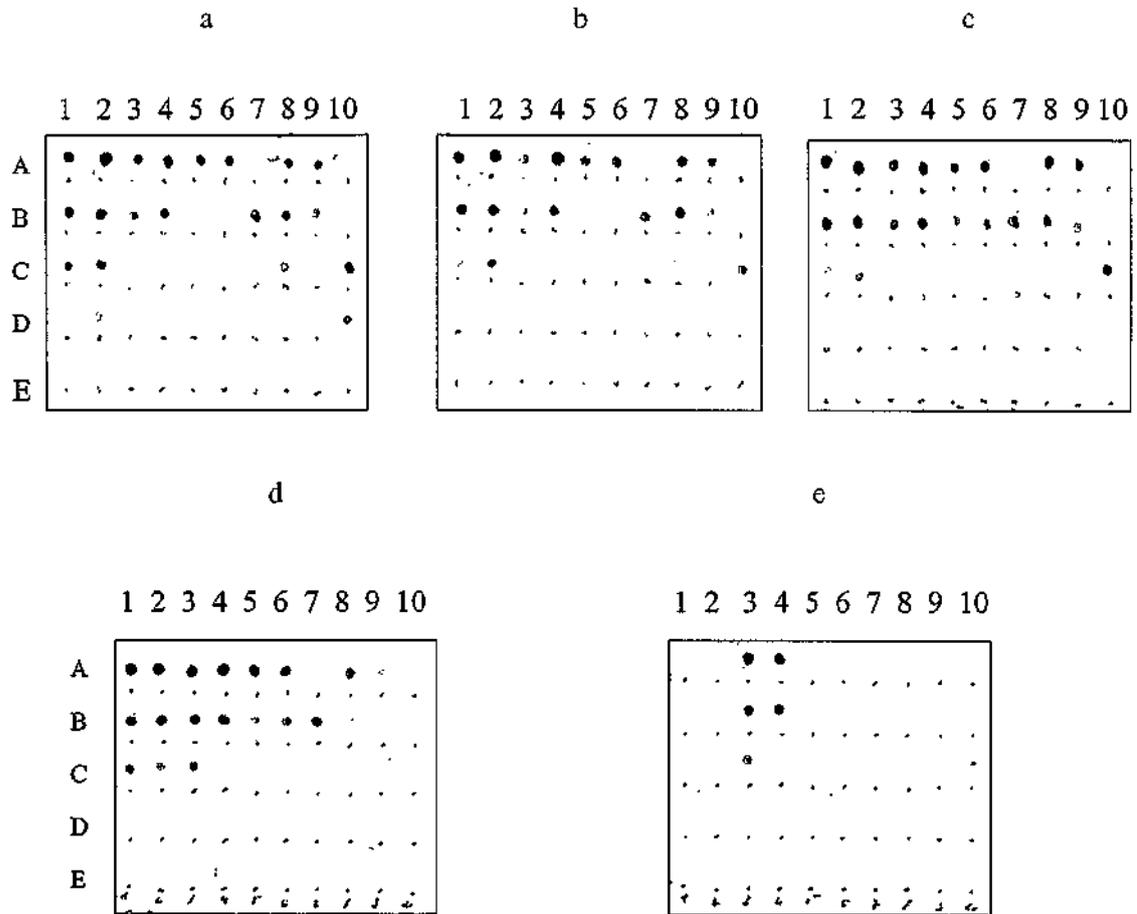


FIG. 11

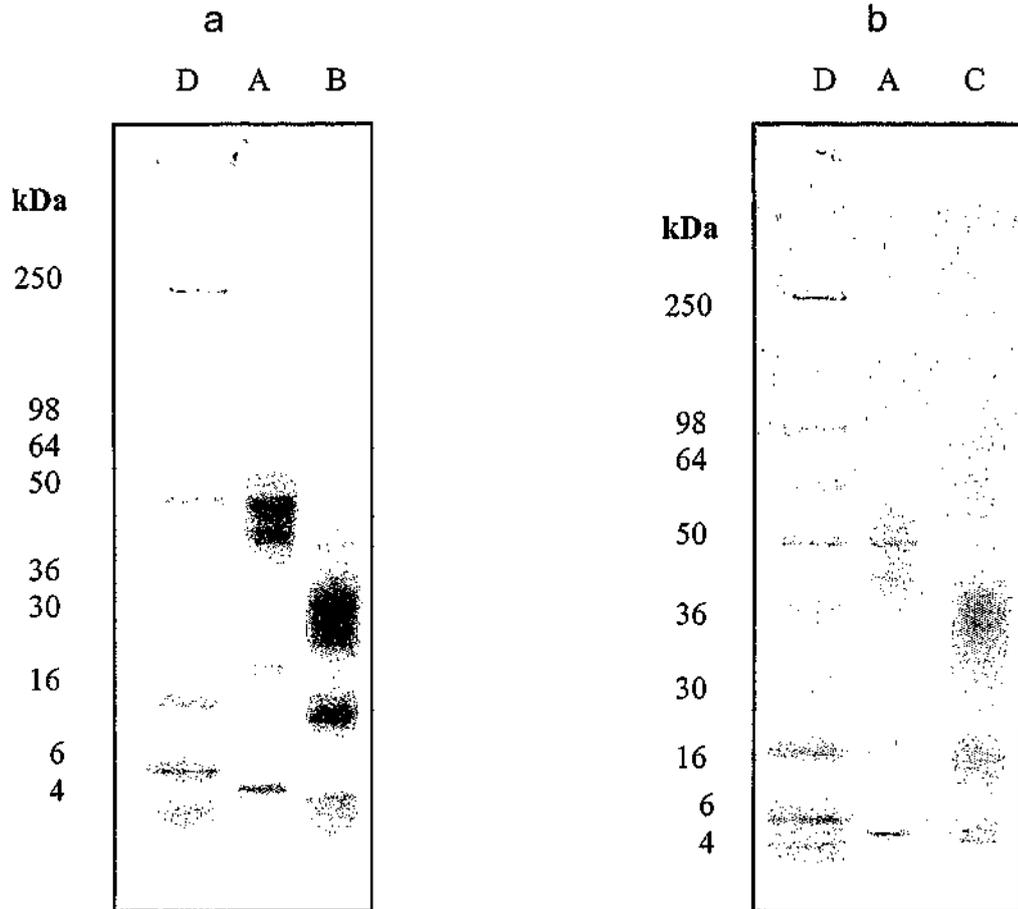


FIG. 12

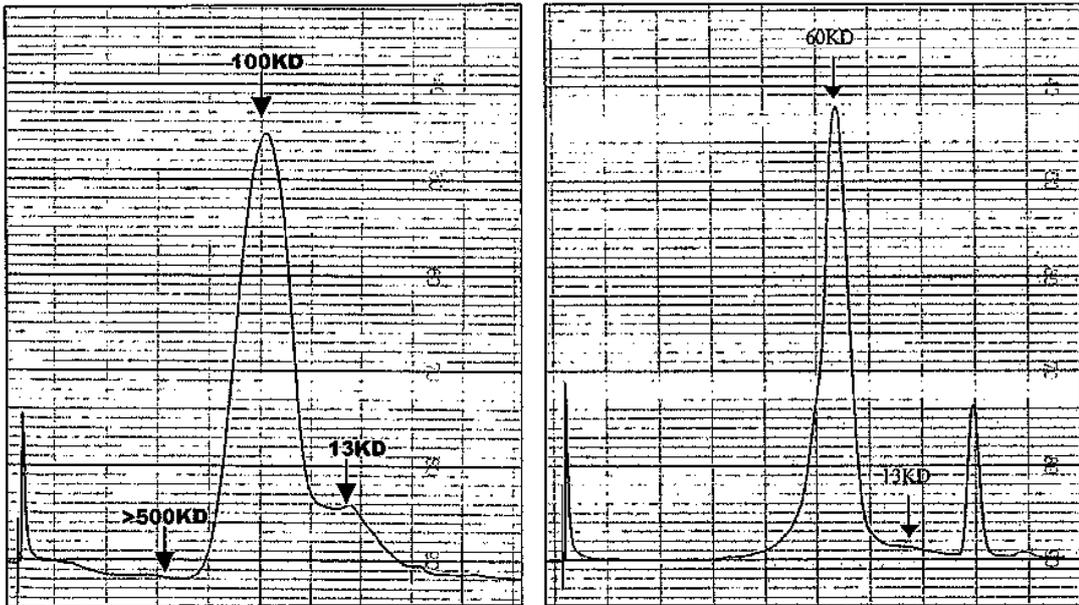


FIG. 13

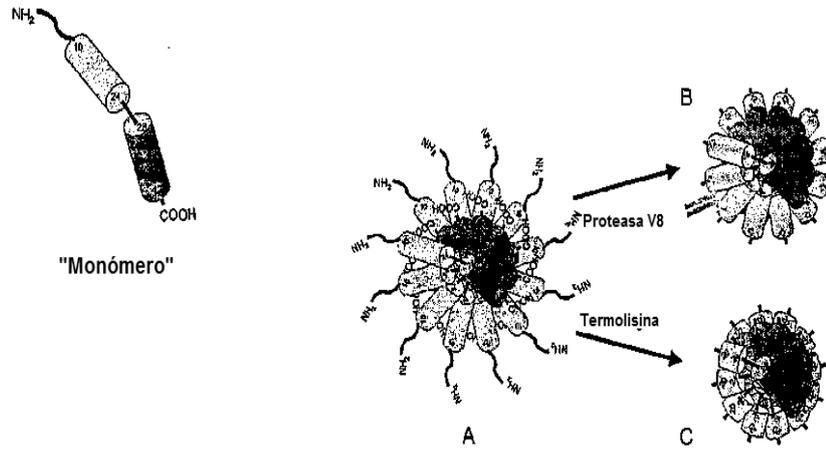


FIG. 14

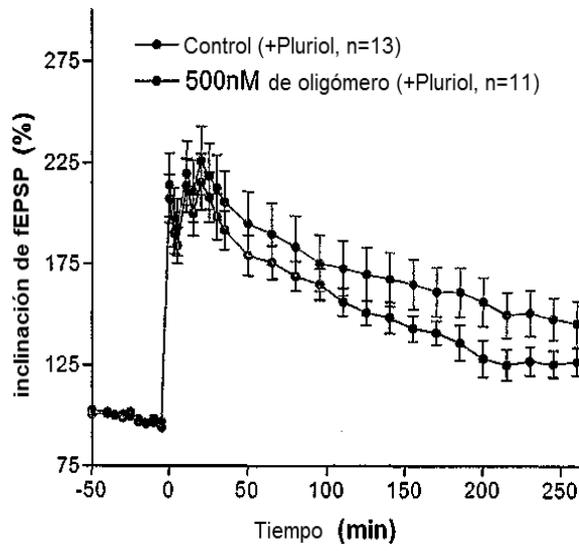
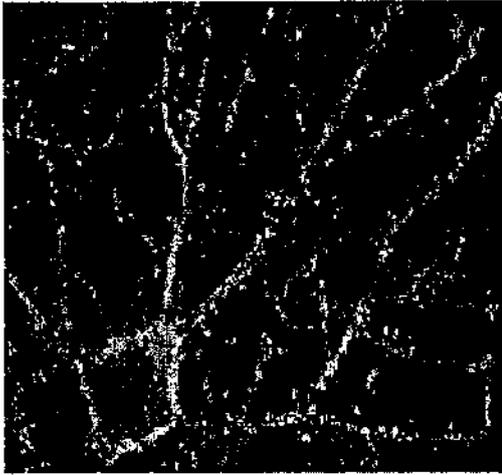


FIG. 15

a



b

