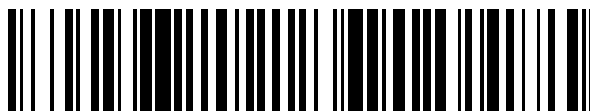


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 611**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2010 PCT/EP2010/058403**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2010 WO10146058**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2010 E 10726057 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2443149**

54 Título: **Anticuerpos inhibidores de BACE1**

30 Prioridad:

15.06.2009 EP 09162713

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2017

73 Titular/es:

**VIB VZW (50.0%)
Rijvisschestraat 120
9052 Gent, BE y
KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN K.U.
LEUVEN R&D (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DE STROOPER, BART;
ZHOU, LUJIA y
ANNAERT, WIM**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 602 611 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos inhibidores de BACE1

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a anticuerpos con una especificidad para BACE1, más específicamente, la invención proporciona anticuerpos monoclonales anti-BACE1 consistentes en 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras, que se unen a BACE1 y son capaces de inhibir la actividad de BACE1, y en donde dichos anticuerpos monoclonales se unen a un epítipo conformacional de BACE1 que comprende los residuos de aminoácidos 332 a 334 del bucle D y los residuos de aminoácidos 376 a 379 del bucle F de BACE1. Dichos anticuerpos se pueden utilizar para la investigación y aplicaciones médicas. Aplicaciones específicas incluyen el uso de anticuerpos
10 específicos para BACE1 para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

ANTECEDENTES

15 La enfermedad de Alzheimer ("AD") es una enfermedad neurodegenerativa devastadora que afecta a millones de pacientes de edad avanzada en todo el mundo y es la causa más común de admisión en el asilo de ancianos. La AD se caracteriza clínicamente por la pérdida progresiva de la memoria, la orientación, la función cognitiva, el juicio y la estabilidad emocional. Al aumentar la edad, el riesgo de desarrollar la AD aumenta de forma exponencial, de modo que hacia los 85 años un 20-40% de la población se ve afectada. La memoria y la función cognitiva se deterioran rápidamente dentro de los primeros 5 años después del diagnóstico de insuficiencia leve a moderada, y la muerte debido a complicaciones de la enfermedad es un resultado inevitable. El diagnóstico definitivo de la AD sólo se puede hacer post-mortem, basado en el examen histopatológico de tejido cerebral del paciente. Dos características
20 histológicas de la AD son la aparición de ovillos neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada y de placas amiloides proteicas, ambos dentro de la corteza cerebral de pacientes con AD. Las placas amiloides se componen principalmente de un péptido de 37 a 43 aminoácidos designados beta-amiloide, a los que también se alude como beta-amiloide, amiloide beta o Abeta. Ahora está claro que el péptido Abeta deriva de una proteína de la membrana integral tipo 1, denominada proteína precursora de amiloide beta (a la que también se alude como APP) a través de dos eventos proteolíticos secuenciales. En primer lugar, la APP se hidroliza en un sitio N-terminal de la hélice alfa de la transmembrana por una enzima proteolítica específica a la que se alude como beta-secretasa (la aspartil proteasa unida a membrana BACE1). El producto N-terminal soluble de este evento de escisión se difunde fuera de la membrana, dejando atrás el producto de escisión C-terminal asociado a la membrana, al que se alude como C99. La proteína C99 se hidroliza entonces adicionalmente dentro de la hélice alfa de la transmembrana por una enzima
25 proteolítica específica a la que se alude como gamma-secretasa. Este segundo evento de escisión libera el péptido Abeta y deja un "trozo" asociado a la membrana. El péptido Abeta así generado se secreta de la célula en la matriz extracelular en donde finalmente forma las placas amiloides asociadas con la AD.

35 A pesar de una intensa investigación durante los últimos 100 años, el pronóstico de los pacientes con AD ahora es todavía bastante el mismo que el de pacientes hace un siglo, ya que todavía no existe cura real disponible. Existen dos tipos de fármacos aprobados por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos y utilizados en clínica hoy en día para tratar el AD: inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) y memantina. Existe una amplia evidencia en la técnica de que el péptido amiloide beta, el principal componente de las placas amiloides que son específicas de la etiología de la AD, tiene un papel clave en el desarrollo de la enfermedad AD (Hardy et al. 2002, Golde et al. 2006). Por lo tanto, una de las estrategias más preferidas para reducir el A β es disminuir su producción por parte de inhibidores de γ - y β -secretasa. Una estrategia fue el desarrollo de inhibidores de gamma-secretasa, sin embargo dichos inhibidores a menudo dan como resultado efectos secundarios graves, ya que la gamma-secretasa está implicada en el procesamiento proteolítico de al menos 30 proteínas (De Strooper et al. 2003). Todavía otra estrategia atractiva es el desarrollo de inhibidores de β -secretasa (BACE1), ya que los ratones inactivados con BACE1 son viables y no tienen un fenotipo patológico obvio (p. ej., Roberds et al., 2001, Ohno et al., 2004, Ohno et al. 2006).

45 BACE1, también llamado memapsina 2 y Asp2, es una aspartil proteasa unida a membrana de tipo I de 501 aminoácidos, y comparte características estructurales significativas con proteasas aspárticas eucariotas de la familia de la pepsina (p. ej., Hussain et al. 1999, Lin et al. 2000). Al igual que otras proteasas aspárticas, BACE1 tiene un péptido señal N-terminal (residuos 1-21) y un pro-péptido (residuos 22-45). El péptido señal de 21 aminoácidos transloca la proteasa en el ER en el que el péptido señal se escinde y del que BACE1 se dirige entonces a la superficie de la célula. Después de su paso a través de la red trans-Golgi (TGN), parte de BACE1 se dirige a la superficie celular desde donde se internaliza en los primeros compartimientos endosomales. BACE1 entra entonces en una ruta de reciclaje directo a la superficie celular o se dirige a vesículas endosomales finales destinadas a los

lisosomas o al TGN. En el TGN se podría re-transportar a la membrana celular. Dada su larga semivida y la rápida tasa de reciclaje, BACE1 madura puede ciclarse múltiple veces entre la superficie celular, el sistema endosomal y la TGN durante el curso de su vida útil (p. ej., Huse et al. 2000, Wahle et al. 2005). BACE1, por lo tanto, no se localiza exclusivamente en los endosomas, sino que se traslada entre las membranas y los orgánulos intracelulares (Volbracht et al. 2009) la escisión mediada por BACE1 de APP en el sitio β se produce en endosomas tempranos, en donde el entorno de carácter ácido es óptimo para su actividad enzimática. Sin embargo, cuando se utilizó APP, que contiene la denominada mutación sueca, como sustrato celular, la escisión β se produjo preferentemente en el ER y la TGN (Thinakaran et al. 1996). Aunque BACE1 se ha convertido en un objetivo primordial de fármacos establecido para la terapia de la AD, el desarrollo de fármacos inhibidores eficaces de BACE1 sigue siendo un gran desafío. Numerosos esfuerzos han contribuido al diseño racional de fármacos inhibidores de pequeño peso molecular de BACE1, sin embargo, el progreso ha sido incentivado debido a la naturaleza grande y poco complaciente del sitio activo BACE1, y la necesidad de desarrollar un fármaco que penetre en la barrera hematoencefálica (BBB) con alta potencia y alta selectividad frente a otras proteasas aspárticas. En un estudio se encontró que disminuyendo los niveles de BACE1 utilizando vectores lentivirales que expresan BACE1 que fijan como objetivo siARNs se reducía la producción de amiloide y los déficits neurodegenerativos y de comportamiento en ratones transgénicos APP, un modelo de la enfermedad de Alzheimer (Singer et al., 2005). La solicitud de patente WO 02/47466 describe que agentes inhibidores de BACE1 (tal como un anticuerpo) serían útiles para inhibir la interacción de BACE1 con su APP sustrato. La solicitud de patente WO 2009/121948 describe anticuerpos de dominio único, carentes de una cadena ligera, que realizan una actividad inhibidora de BACE1. Por lo tanto, existe una necesidad de enfoques alternativos dirigidos a BACE1 como terapias potenciales para la AD.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Un primer aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal anti-BACE1 aislado que consiste en 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras, caracterizado porque dicho anticuerpo monoclonal inhibe la escisión mediada por BACE1 de la proteína precursora beta amiloide (APP), y en el que dicho anticuerpo monoclonal une un epítipo conformacional BACE1 que comprende los residuos de aminoácidos 332 a 334 del bucle D y los residuos de aminoácidos 376 a 379 del bucle F de BACE1, tal como se recoge en SEQ ID NO: 1.

En una realización específica, dicho anticuerpo se caracteriza, además, porque es secretado por una línea celular de hibridoma con el número de acceso LMBP 6871CB. En otra realización específica, dicho anticuerpo se caracteriza, además, porque es un anticuerpo monoclonal humanizado.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un fragmento activo del anticuerpo de la presente invención, caracterizado porque dicho fragmento inhibe la escisión mediada por BACE1 de la proteína precursora beta amiloide (APP).

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una línea celular de hibridoma con el número de acceso LMBP 6871CB.

Los anticuerpos anti-BACE1 inhibidores de la invención son útiles como medicamento, en particular en muchas aplicaciones para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer en sujetos en necesidad del mismo.

La invención se refiere, además, a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento activo de la presente invención y al menos un soporte, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptable.

También se prevé en esta memoria el anticuerpo de acuerdo con la presente invención o el fragmento activo de acuerdo con la presente invención para su uso en un ensayo de diagnóstico.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIGURA 1. (A) Representación esquemática del rastreo de hibridoma para mAbs (anticuerpos monoclonales) inhibitorios de BACE1. Se seleccionaron tres candidatos para su posterior análisis, los mAbs 5G7 y 14F10 se identificaron a partir de rastreo de ensayos mca-FRET, el mAb 1A11 se identificó a partir de rastreo de ensayos de células. (B) La inhibición de BACE1 por los mAbs 5G7, 14F10 y 1A11 en el ensayo MBP-C125Swe de BACE1, el sustrato es una proteína de fusión de la proteína de unión a maltosa (MBP) y 125 aminoácidos del extremo carboxilo de la APP humana que contienen

- doble mutación sueca, las IC50 de los tres mAbs son 0,47nM (5G7), 0,46nM (14F10) y 0,76nM (1A11).
- FIGURA 2.** Modulación de la actividad de BACE1 en el ensayo de mcaFRET, el sustrato es un pequeño péptido FRET MCA-SEVENLDAEFRK(Dnp)-RRRR-NH2, la IC50 (o EC50) de los tres mAbs son 0,06nM (5G7), 1,6nM (14F10) y 0,38nM (1A11).
- FIGURA 3.** El mAb 1A11 inhibe la actividad de BACE1 en células SH-SY5Y/APPwt. Células SH-SY5Y/APPwt fueron tratadas con 300 nM de los mAbs 1A11, 5G7 y 14F10 (disueltos en PBS). PBS se utilizó como control negativo, mientras que un compuesto inhibidor de BACE1 se utilizó como control positivo (CT+). Después de 24 horas de tratamiento, A β y sAPP β de medio acondicionado se analizaron por transferencia Western, el tratamiento con el mAb 1A11 disminuyó la generación de A β y sAPP β .
- FIGURA 4.** El mAb 1A11 inhibe la actividad de BACE1 en las neuronas cultivadas primarias del ratón. Cultivos de neuronas primarias se transdujeron con APPwt humana por virus del bosque Semiliki, y se trataron con 100 nM de mAb 1A11, mAb 5G7 y mAb 14F10 (resuelto en PBS), se utilizaron PBS y el control negativo, mientras que un compuesto inhibidor de BACE1 se utilizó como control positivo. Después de tratamiento durante 24 horas, el medio acondicionado y extractos de células se analizaron por transferencia Western. El tratamiento con el mAb 1A11 inhibió fuertemente la generación de A β , sAPP β y CTF β .
- FIGURA 5.** Efectos inhibidores dependientes de la dosis del mAb 1A11 sobre la actividad de BACE1 en neuronas cultivadas primarias de ratón. Neuronas cultivadas primarias de ratón se transdujeron con APPwt humana por el virus del bosque Semiliki, y se trataron con diluciones de mAb 1A11 que varían desde 0,031 nM a 100 nM. Las neuronas fueron marcadas metabólicamente con marcaje con 35S-metionina durante 6 horas. APP de longitud completa y CTFs de extractos de células se detectaron con formación de imágenes de fósforo después de IP con un anticuerpo policlonal APP C-terminal, A β y sAPP β a partir de medio acondicionado se analizaron mediante transferencia de western directa (A). Los niveles de CTF β se cuantificaron para la inhibición de la actividad de BACE1 (B).
- FIGURA 6.** El fragmento de unión al antígeno (Fab) del mAb 1A11 inhibe la actividad de BACE1 en neuronas cultivadas primarias de ratón. Neuronas cultivadas primarias se transdujeron con APPwt humana por virus del bosque Semiliki, y se trataron con Fabs 200 nM generados a partir de mAb 1A11, mAb 5G7 y mAb 14F10 (disuelto en PBS). Después de tratamiento durante 24 horas, el medio acondicionado y los extractos de células se analizaron por transferencia Western. El Fab del mAb 1A11 inhibía fuertemente la generación de A β , sAPP β y CTF β .
- FIGURA 7.** La administración estereotáxica del mAb 1A11 inhibe la actividad de BACE1 in vivo. A ratones de tipo salvaje se inyectó por vía estereotáxica 1 μ l del mAb 1A11 (4 μ g/ μ l resuelto en PBS) al hipocampo y a la corteza del hemisferio derecho. Para el control, se inyectó PBS en el hipocampo y la corteza del hemisferio izquierdo. 24 horas después de la inyección, los ratones fueron sacrificados y las muestras de cerebro se analizaron por transferencia Western. El mAb 1A11 inhibía la generación de CTF β en ambos hipocampos y en la corteza.
- FIGURA 8.** La tinción de inmunofluorescencia de células HEK-BACE1 con los mAbs 1A11 y 5G7. A. Tinción de células fijadas con paraformaldehído al 4% y permeabilizadas en Triton X-100 al 0,1%. B. Tinción de la superficie de células vivas a 4°C.
- FIGURA 9.** La inmunorreactividad del mAb 1A11 con mutantes por delección de BACE1 en transferencia Western. (A) Un esquema para el inmunógeno de longitud completa BACE46-460 (1 #) y los mutantes de delección (2 # - 9 #). La numeración de aminoácidos tal como se utiliza aquí se corresponde con la secuencia de aminoácidos de la proteína completa BACE1 humana tal como se presenta en la Figura 14. (B) El anticuerpo anti-GST reconoce todas estas proteínas recombinantes. (C) Los mutantes de delección 1 # (BACE46-460), 4 # (BACE240-460) y 8 # (BACE314-460) son inmunorreactivos, mientras que todo el resto de las delecciones no tienen inmunorreactividad con el mAb 1A11.
- FIGURA 10.** Estructura tridimensional de los residuos del dominio catalítico C-terminal de BACE1 314-446 (Ser253-Asn385 en esta figura). El archivo PDB 2g94 se utilizó para crear esta figura. Los residuos 332-334 en el bucle D y los residuos 376-379 en el bucle F están representados en la cinta negra, mientras que los residuos restantes están representados en la cinta gris.
- FIGURA 11.** La mutagénesis de los aminoácidos 376-379 (mut376-9 SQDD a WAAA) en el bucle F y los aminoácidos 332-334 (mut332-4 QAG a AGA) en el bucle D abolen la inmunorreactividad del mAb 1A11 con BACE1 en la transferencia Western. El anticuerpo anti-GST reconoce BACE1 tanto de tipo salvaje como mutante mut376-9 (A) o BACE1 mutante mut332-4 (B), mientras que el mAb 1A11 reconoce sólo BACE1 de tipo salvaje.
- FIGURA 12.** La mutagénesis de los aminoácidos 376-379 (mut376-9 SQDD a WAAA) en el bucle F y los aminoácidos 332-334 (mut332-4 QAG a AGA) en el bucle D abolen la inmunorreactividad del mAb

1A11 con BACE1 en la inmunoprecipitación. Formas de tipo salvaje y mutantes de BACE1 se expresaron en células de mamífero, se utilizaron extractos de células para la inmunoprecipitación. Los inmunoprecipitados se detectaron por transferencia Western utilizando el anticuerpo monoclonal anti-BACE1 10B8. Se utilizó una cantidad similar de BACE1 de tipo salvaje y mutante mut376-9 (A) o BACE1 mutante mut332-4 (B) como entrada para la inmunoprecipitación. El mAb1A11 se une sólo con BACE1 de tipo salvaje, pero no con BACE1 mutante mut376 (A) o BACE1 mutante mut332-4 (B). Otro mAb 5G7 que reconoce el epítipo conformacional en BACE1 se utilizó como control positivo.

FIGURA 13. Los mutantes mut376-9 y mut332-4 de BACE1 son activos en ensayos celulares. Células HEK293 que expresaban de manera estable APP de tipo salvaje fueron transfectadas transitoriamente con BACE1 tipo mutante o salvaje; se utilizaron células no transfectadas (NT) como control negativo. sAPP β se detectó como lectura para la actividad de BACE1. En comparación con células no transfectadas, las células transfectadas con el mutante BACE1, mut376-9 (A) y mut332-4 (B) generaban un mayor nivel de sAPP β , lo que sugiere que los mutantes todavía están activos en la actividad de BACE1. En comparación con BACE1 de tipo salvaje, las formas mutantes de BACE1 mostraron un nivel similar de actividad de la enzima tal como se evaluó por la relación de nivel sAPP β a nivel de BACE1.

FIGURA 14. Secuencia de aminoácidos de la proteína BACE1 humana (aminoácidos 1-501; SEQ ID NO: 1).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

El término "antígeno" se refiere a una estructura, con frecuencia un polipéptido o proteína, para la cual tiene afinidad y especificidad una inmunoglobulina tal como un anticuerpo.

Las expresiones "determinante antigénico", "diana antigénica" y el término "epítipo" se refieren todos a un sitio de unión específica en un antígeno o sobre una estructura antigénica para el cual tiene especificidad y afinidad una inmunoglobulina tal como un anticuerpo.

La expresión "epítipo conformacional" se refiere a un epítipo con las características de la superficie en tres dimensiones de un antígeno, lo que permite encajar con precisión y unirse a anticuerpos. Las excepciones son epítopos lineales, que están determinados por la secuencia de aminoácidos (estructura primaria) en lugar de por la forma 3D (estructura terciaria) de una proteína.

El término "anticuerpo" se refiere a una proteína o un polipéptido que tiene afinidad por un antígeno o por un determinante antigénico. Dicho anticuerpo se compone habitualmente de 4 cadenas, 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras y, por tanto, es tetramérico. Una excepción a la misma son anticuerpos de camello que se componen de dímeros de cadenas pesadas y están desprovistos de cadenas ligeras, pero, no obstante, tienen un amplio repertorio de unión al antígeno. Normalmente, un anticuerpo tiene tanto regiones variables como constantes, por lo que las regiones variables son mayoritariamente las responsables de determinar la especificidad del anticuerpo y comprenderán regiones determinantes de la complementariedad (CDRs).

El término "especificidad" se refiere a la capacidad de una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo, de unirse preferentemente a una diana antigénica frente a una diana antigénica diferente y no necesariamente implica alta afinidad.

El término "afinidad" se refiere al grado en el cual una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo, se une a un antígeno con el fin de desplazar el equilibrio de antígeno y anticuerpo hacia la presencia de un complejo formado por su unión. Así pues, en los casos en los que un antígeno y un anticuerpo se combinan en concentración relativamente igual, un anticuerpo de alta afinidad se unirá al antígeno disponible con el fin de desplazar el equilibrio hacia una alta concentración del complejo resultante.

La expresión "región determinante de la complementariedad" o "CDR" se refiere a un bucle variable dentro de las regiones variables de cadenas H (pesadas) o L (ligeras) (también abreviadas como VH y VL, respectivamente) y contiene las secuencias de aminoácidos capaces de unirse específicamente a dianas antigénicas. Estas regiones CDR explican la especificidad básica del anticuerpo para una estructura determinante antigénica particular. A este tipo de regiones también se las alude como "regiones hipervariables". Las CDRs representan tramos no-contiguos de aminoácidos dentro de las regiones variables pero, independientemente de la especie, se han encontrado que los

lugares posicionales de estas secuencias de aminoácidos críticas dentro de las regiones de cadena pesada y ligera variables tienen localizaciones similares dentro de las secuencias de aminoácidos de las cadenas variables. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de todos los anticuerpos canónicos tienen cada uno 3 regiones CDR, cada una no contigua con las otras (denominadas L1, L2, L3, H1, H2, H3) de las respectivas cadenas ligeras (L) y pesadas (H). Las regiones CDR aceptadas han sido descritas por Kabat et al. (1991).

El término "sujeto" se refiere a seres humanos y otros mamíferos.

Alcance de la solicitud

Aunque BACE1 se ha convertido en un objetivo primordial de fármacos establecido para la terapia de la enfermedad de Alzheimer (AD), el desarrollo de fármacos inhibidores eficaces de BACE1 sigue siendo un gran desafío. Numerosos esfuerzos se centran en el diseño racional de inhibidores de BACE1. Sin embargo, la aparición de un fármaco eficaz inhibidor de BACE1 ha sido lenta. Se necesitan enfoques alternativos dirigidos a que BACE1 surja como terapias potenciales para la AD.

En la presente solicitud se han desarrollado inhibidores alternativos de la actividad de BACE1 a través de la generación de anticuerpos monoclonales (mAb) con una especificidad para BACE1. Mediante la aplicación de ensayos funcionales (incluyendo el ensayo FRET de BACE1 y el ensayo de actividad basado en células) en el rastreo del hibridoma, inhibidores de mAb para BACE1 fueron recuperados con éxito. La estrategia de rastreo de la presente solicitud se valida para que sea factible para el rastreo modulador de mAb para BACE1 u otras proteasas similares. En particular, estos anticuerpos monoclonales específicos para BACE1, capaces de inhibir la actividad de BACE1, se pueden utilizar para la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. A modo de ejemplo, sin limitación, se demostró que el mAb 1A11 inhibe la actividad de BACE1 en ensayo enzimático, en neuronas cultivadas, así como in vivo mediante la administración estereotáxica al hipocampo/corteza de ratones C57BL6 (Ejemplos 2-6). Se cree que el mAb 1A11 es altamente selectivo (el epítipo de unión está en estructuras únicas de BACE1 - véase el Ejemplo 7), así como un candidato a fármaco muy potente (IC50 ~ 4 nM en cultivos neuronales - véase el Ejemplo 4).

Por lo tanto, se describe en esta memoria un anticuerpo anti-BACE aislado, caracterizado porque dicho anticuerpo es capaz de inhibir la actividad de BACE1.

Se entiende que 'la inhibición de la actividad' es equivalente a la expresión 'regulación negativa de la actividad'. En general, inhibición significa que la actividad de BACE1 es inhibida al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95% o incluso un 96%, 97%, 98%, 99% o incluso 100%. La inhibición de BACE1 se puede determinar tal como se menciona en esta memoria adicionalmente en los ejemplos. Debería estar claro que los anticuerpos inhibidores no están inhibiendo la actividad de BACE2 u otras proteasas aspárticas o, en otras palabras, son selectivos contra BACE2 u otras proteasas aspárticas.

También se describe en esta memoria un anticuerpo que es secretado por una línea celular de hibridoma con el número de acceso LMBP 6871 CB o LMBP 6872CB o LMBP 6873CB.

Preferiblemente, dicho anticuerpo se une específicamente al ectodominio de BACE1. Más específicamente, dicho anticuerpo es específico para la unión de un epítipo de BACE1, en particular un epítipo conformacional de BACE1, más particularmente un epítipo conformacional de BACE1. A modo de ejemplo, sin limitación, dicho epítipo conformacional puede comprender la combinación de bucles D y F, más particularmente los residuos 332-334 (QAG) del bucle D y los residuos 376-379 (SQDD; SEQ ID NO: 11) del bucle F. Los bucles D y F fueron descritos en Hong et al. (2000).

Preferiblemente, dicho anticuerpo se caracteriza, además, porque es un anticuerpo monoclonal humano o un anticuerpo monoclonal humanizado.

Productos terapéuticos de polipéptidos y, en particular, productos terapéuticos basados en anticuerpos tienen un potencial significativo como fármacos debido a que tienen una especificidad exquisita a su diana y una baja toxicidad inherente. En particular, las características de los anticuerpos monoclonales tales como una alta afinidad, alta selectividad y la estructura distinta y dominios de función susceptibles de ingeniería genética de proteínas para administración terapéutica, los hacen posibles candidatos a fármacos. Se informó que BACE1 circula a través de la

superficie de la célula (véase también la sección de Antecedentes). Anticuerpos monoclonales inhibidores de BACE1 pueden fijar como objetivo BACE1 en la superficie celular y pueden ser internalizados para inhibir la generación de A β en la vía endocítica.

5 Sin embargo, se sabe por el experto en la materia que un anticuerpo que ha sido obtenido para una diana terapéuticamente útil requiere una modificación adicional con el fin de prepararlo para la terapia humana, a fin de evitar una reacción inmunológica no deseada en un individuo humano tras la administración. El proceso de modificación se denomina comúnmente "humanización". Es conocido por el experto en la materia que los anticuerpos desarrollados en especies, excepto en los seres humanos, requieren una humanización para hacer que el anticuerpo sea terapéuticamente útil en los seres humanos ((1) injerto de CDR: Protein Design Labs: documentos US6180370, US5693761; Genentech documento US6054297; Celltech: documentos EP626390, US5859205; (2) Recubrimiento: Xoma: documentos US5869619, US5766886, US5821123). La humanización de anticuerpos implica la tecnología de ADN recombinante, y se aparta de partes de secuencias de ADN genómicas de roedores y/o humanas que codifican las cadenas H y L o de clones de ADNc que codifican cadenas H y L. Técnicas para la humanización de anticuerpos no humanos son conocidas por el experto en la materia, ya que éstas forman parte del estado actual de la técnica. Anticuerpos de mamíferos no humanos o anticuerpos de animales pueden humanizarse (véase, por ejemplo, Winter y Harris 1993). Los anticuerpos o anticuerpos monoclonales pueden ser versiones humanizadas de anticuerpos de, por ejemplo, anticuerpos de roedores o anticuerpos monoclonales de roedores.

También se prevén en esta memoria fragmentos activos de los anticuerpos anti-BACE1 inhibidores tal como se describe en esta memoria.

20 La expresión "fragmento activo" se refiere a una porción de un anticuerpo que por sí misma tiene alta afinidad para un determinante antigénico, o epítipo, y contiene una o más CDRs que representan tal especificidad. Ejemplos no limitantes incluyen Fab, F(ab)'2, scFv, dímeros de cadena pesada-ligera, nanocuerpos, anticuerpos de dominio y estructuras de cadena sencilla tal como una cadena ligera completa o una cadena pesada completa. Un requisito adicional para la "actividad" de dichos fragmentos es que dichos fragmentos sean capaces de inhibir la actividad de BACE1.

25 Los anticuerpos tal como se describen en esta memoria, o sus fragmentos activos, pueden marcarse mediante un marcador adecuado, dicho marcador puede ser, por ejemplo, del tipo enzimático, colorimétrico, quimioluminiscente, fluorescente o radiactivo.

30 También se describen en esta memoria líneas celulares de hibridoma con el número de acceso LMBP 6871CB o LMBP 6872CB o LMBP 6873CB que secretan los anticuerpos anti-BACE1 inhibidores.

Los anticuerpos anti-BACE1 inhibidores, tal como se describen en esta memoria, son útiles como un medicamento, en particular en muchas aplicaciones para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer en sujetos en necesidad del mismo. En particular, los anticuerpos se pueden utilizar para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades asociadas con una sobre-expresión de BACE1. Un ejemplo de una enfermedad en la que se produce una sobre-expresión de BACE1 es la enfermedad de Alzheimer. En una realización particular, los anticuerpos de la invención o fragmentos activos de los mismos se pueden utilizar en la prevención y/o en la reducción de la formación de péptido amiloide beta (A β) y/o la proteína precursora de amiloide beta (APP).

40 En general, "cantidad terapéuticamente eficaz", "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" significa la cantidad necesaria para conseguir el resultado o los resultados (de inhibición de la unión de BACE1; tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer) deseados. Una persona de experiencia ordinaria en la técnica reconocerá que la potencia y, por lo tanto, una "cantidad eficaz" puede variar para el anticuerpo que inhibe la unión de BACE1. Un experto en la técnica puede evaluar fácilmente la potencia del anticuerpo. Por "farmacéuticamente aceptable" se quiere dar a entender un material que no es biológicamente o de otro modo indeseable, es decir, el material puede administrarse a un individuo junto con el compuesto sin provocar un efecto biológico indeseable o interactuar de una manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

45 La expresión 'medicamento para tratar' se refiere a una composición que comprende anticuerpos tal como se describe anteriormente y un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable (ambas expresiones pueden utilizarse indistintamente) para tratar o para prevenir enfermedades tal como se describe en esta memoria. La administración de un anticuerpo tal como se describe anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma puede ser por medio de administración oral, inhalada o parenteral. En realizaciones particulares el anticuerpo se administra a través de administración intratecal o intracerebroventricular. El compuesto activo puede administrarse solo o preferiblemente formulado como una composición farmacéutica. Una cantidad eficaz para tratar

la enfermedad de Alzheimer que expresa el antígeno reconocido por el anticuerpo depende de los factores habituales tales como la naturaleza y gravedad del trastorno que se está tratando y el peso del mamífero. Sin embargo, una dosis unitaria estará normalmente en el intervalo de 0,01 a 50 mg, por ejemplo de 0,01 a 10 mg, o de 0,05 a 2 mg de anticuerpo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las dosis unitarias se administrarán normalmente una vez o más de una vez al día, por ejemplo 2, 3 ó 4 veces al día, más habitualmente de 1 a 3 veces al día, de manera que la dosis diaria total está normalmente en el intervalo de 0,0001 a 1 mg/kg; por tanto, una dosis diaria total adecuada para un adulto de 70 kg es de 0,01 a 50 mg, por ejemplo de 0,01 a 10 mg o más habitualmente 0,05 a 10 mg. Se prefiere en gran medida que el compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administre en forma de una composición de dosis unitaria, tal como una dosis unitaria de composición oral, parenteral o inhalada. Tales composiciones se preparan por mezcla y se adaptan adecuadamente para la administración oral, inhalada o parenteral, y como tal pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, preparaciones líquidas orales, polvos, gránulos, pastillas, polvos reconstituibles, disoluciones o suspensiones inyectables e infusibles o supositorios o aerosoles. Los comprimidos y las cápsulas para administración oral se presentan habitualmente en una dosis unitaria, y contienen excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, cargas, diluyentes, agentes de formación de comprimidos, lubricantes, disgregantes, colorantes, aromatizantes y agentes humectantes. Los comprimidos se pueden revestir de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Cargas adecuadas para su uso incluyen celulosa, manitol, lactosa y otros agentes similares. Disgregantes adecuados incluyen almidón, polivinilpirrolidona y derivados de almidón tales como glicolato sódico de almidón. Lubricantes adecuados incluyen, por ejemplo, estearato de magnesio. Agentes humectantes farmacéuticamente aceptables incluyen lauril-sulfato de sodio. Estas composiciones orales sólidas se pueden preparar por métodos convencionales de mezclado, relleno, formación de comprimidos o similares. Las operaciones de mezclado repetidas se pueden utilizar para distribuir el agente activo en las composiciones que emplean grandes cantidades de cargas. Tales operaciones son, por supuesto, convencionales en la técnica. Preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas, disoluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o se pueden presentar como un producto seco para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, por ejemplo sorbitol, jarabe, metilcelulosa, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio o grasas comestibles hidrogenadas, agentes emulsionantes, por ejemplo lecitina, monooleato de sorbitán, o acacia; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), por ejemplo, aceite de almendras, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos tales como ésteres de glicerol, propilenglicol o alcohol etílico; conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de metilo o propilo o ácido sórbico y, si se desea, agentes aromatizantes o colorantes convencionales. Las formulaciones orales también incluyen formulaciones de liberación sostenida convencionales tales como comprimidos o gránulos que tienen un recubrimiento entérico. Preferiblemente, las composiciones para inhalación se presentan para administración al tracto respiratorio como rapé o un aerosol o disolución para un nebulizador, o como un polvo microfino para insuflación, solo o en combinación con un soporte inerte tal como lactosa. En tal caso, las partículas de compuesto activo tienen adecuadamente diámetros de menos de 50 micras, preferiblemente menos de 10 micras, por ejemplo entre 1 y 5 micras, tal como entre 2 y 5 micras. Una dosis inhalada favorecida estará en el intervalo de 0,05 a 2 mg, por ejemplo de 0,05 a 0,5 mg, de 0,1 a 1 mg o de 0,5 a 2 mg. Para la administración parenteral, se preparan formas de dosis unitaria fluidas que contienen un compuesto tal como se describe en esta memoria y un vehículo estéril. El compuesto activo, dependiendo del vehículo y la concentración, puede estar suspendido o disuelto. Las disoluciones parenterales se preparan normalmente disolviendo el compuesto en un vehículo y esterilizando por filtración antes de introducirlo en un vial o ampolla adecuado y de sellarlo. Ventajosamente, adyuvantes tales como un anestésico local, conservantes y agentes tampón se disuelven también en el vehículo. Para mejorar la estabilidad, la composición se puede congelar después de introducirla en el vial y separar el agua en vacío. Las suspensiones parenterales se preparan sustancialmente de la misma manera, excepto que el compuesto se suspende en el vehículo en lugar de disolverse y esterilizarse por exposición a óxido de etileno antes de suspenderlo en el vehículo estéril. Ventajosamente, un agente tensioactivo o humectante se incluye en la composición para facilitar la distribución uniforme del compuesto activo. En su caso, se pueden incluir pequeñas cantidades de broncodilatadores, por ejemplo aminas simpaticomiméticas tales como isoprenalina, isoetarina, salbutamol, fenilefrina y efedrina; derivados de xantina tales como teofilina y aminofilina y corticosteroides tales como prednisolona y estimulantes adrenales tales como ACTH. Como es práctica común, las composiciones normalmente estarán acompañadas de instrucciones escritas o impresas para uso en el tratamiento médico de que se trate.

Los anticuerpos descritos en esta memoria se pueden formular para permitir el transporte a través de la barrera hematoencefálica (BBB) (Pardridge 2007). El transporte de los anticuerpos a través de la BBB se puede lograr con, pero no se limita a, caballos de Troya moleculares. El caballo de Troya molecular de BBB más potente conocido hasta la fecha es un anticuerpo monoclonal para el receptor de la insulina humana (HIRmAb). Un anticuerpo monoclonal anti-beta-amiloide ha sido tratado mediante ingeniería genética y fusionado con HIRmAb para atravesar la BBB, como un nuevo agente terapéutico basado en anticuerpos para la enfermedad de Alzheimer (Boado et al. 2007). Además, se están investigando diversos sistemas de administración de fármacos (p. ej., microesferas,

nanopartículas, nanogeles, entre otros) para facilitar la administración al cerebro de fármacos a base de anticuerpos (Patel et al. 2009), y todos ellos se pueden utilizar en la práctica de la solicitud.

La solicitud describe, además, una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento activo de la presente invención y al menos un soporte farmacéuticamente aceptable, adyuvante o diluyente.

- 5 También se proporciona en esta memoria la composición farmacéutica anteriormente descrita para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis trastornos descritos en esta memoria, que comprende una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo y, si se requiere, un soporte farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 Un "soporte", o "adyuvante", en particular un "soporte farmacéuticamente aceptable" o "adyuvante farmacéuticamente aceptable" es cualquier excipiente, diluyente, soporte y/o adyuvante que, por sí mismos, no inducen la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición ni tampoco educen protección. Preferiblemente, un soporte o adyuvante farmacéuticamente aceptable potencia la respuesta inmunitaria educida por un antígeno. Soportes o adyuvantes adecuados típicamente comprenden uno o más de los compuestos incluidos en la siguiente lista no exhaustiva: macromoléculas grandes metabolizadas lentamente tales como
15 proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivos.

Un "diluyente", en particular un "vehículo farmacéuticamente aceptable", incluye vehículos tales como agua, solución salina, soluciones salinas fisiológicas, glicerol, etanol, etc. Sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH, conservantes se pueden incluir en tales vehículos.

- 20 Debe quedar claro que el método terapéutico tal como se describe en esta memoria para la enfermedad de Alzheimer también se puede utilizar en combinación con cualquier otra terapia de la enfermedad AD conocida en la técnica tales como inhibidores de la gamma-secretasa, u otros inhibidores de la beta-secretasa.

También se describe aquí una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada de un anticuerpo anti-BACE1, capaz de inhibir la actividad de BACE1. Dicha CDR también puede ser incorporada en una composición que comprende además, por ejemplo, un soporte, adyuvante o diluyente. También se describen en esta memoria
25 secuencias de ácidos nucleicos de CDR aisladas, así como cualquier vector o ácido nucleico recombinante (ADN, ARN, PNA, LNA, o cualquier híbrido de los mismos; lineal o circular; independientes del tipo de cadena) que comprende dicho ácido nucleico de CDR. Cualquier célula huésped que comprende una secuencia de ácido nucleico de CDR de este tipo, vector o ácido nucleico recombinante es también parte de la solicitud.

30 También queda abarcada en esta memoria una región variable de un anticuerpo anti-BACE1 aislado capaz de inhibir la actividad de BACE1. Dicha región variable también se puede incorporar en una composición que comprende, además, por ejemplo, un soporte, adyuvante o diluyente. Las secuencias de ácidos nucleicos de la región variable aisladas son parte de la solicitud, así como cualquier vector o ácido nucleico (ADN, ARN, PNA, LNA, o cualquier híbrido de los mismos; lineal o circular; independiente del tipo de cadena) recombinante, que comprende un ácido
35 nucleico de la región variable de este tipo. Cualquier célula huésped que comprende esta secuencia de ácido nucleico de la región variable, vector o ácido nucleico recombinante es también parte de la solicitud.

También se describen en esta memoria compuestos que son capaces de inhibir la actividad de BACE1, comprendiendo dichos compuestos al menos una CDR tal como se describió anteriormente o al menos una región variable tal como se describió anteriormente. Un compuesto de este tipo se puede utilizar en la prevención y/o el
40 tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Dichos compuestos también se pueden incorporar en una composición que comprende, además, por ejemplo, un soporte, adyuvante o diluyente. Ejemplos no limitantes de tales compuestos son los aptámeros de proteínas y anticuerpos biespecíficos o fragmentos activos de los mismos.

También se describe en esta memoria un método para producir o generar o seleccionar anticuerpos capaces de inhibir la actividad de BACE1, que comprende

- 45 (i) inmunizar un animal no humano con BACE1, y
(ii) rastrear una pluralidad de líneas de hibridoma para anticuerpos capaces de inhibir la actividad de BACE1.

Alternativamente, también se abarca en esta memoria un método de producir o generar o seleccionar anticuerpos capaces de inhibir la actividad de BACE1, que comprende

- (i) inmunizar un animal no humano con BACE1, y
- (ii) rastrear una pluralidad de líneas de hibridoma para anticuerpos capaces de inhibir la actividad de BACE1, y
- (iii) aislar una línea de hibridoma que produce dicho anticuerpo.

5 Cualquier animal adecuado, p. ej., un animal de sangre caliente, en particular un mamífero tal como un conejo, ratón, rata, camello, oveja, vaca o cerdo o un ave tal como un pollo o pavo, se puede inmunizar con BACE1 o al menos una parte, fragmento, determinante antigénico o epítipo de la misma, utilizando cualquiera de las técnicas bien conocidas en la técnica adecuada para generar una respuesta inmune. Procedimientos para la inmunización de animales son bien conocidos en la técnica. Tal como se apreciará por un experto normal en la técnica, el

10 inmunógeno puede mezclarse con un adyuvante o hapteno con el fin de aumentar la respuesta inmune (por ejemplo, adyuvante de Freund completo o incompleto o adyuvante de lípido A), o con un soporte tal como hemocianina de lapa bocallave (KLH).

Una vez que un animal adecuado ha sido inmunizado y una respuesta inmune contra el antígeno ha sido establecida por el animal, se seleccionan células productoras de anticuerpos a partir del animal para identificar las células que producen anticuerpos que tienen una actividad deseada. A menudo, estos métodos emplean la tecnología de hibridomas, en la que células del bazo del animal inmunizado se fusionan con una célula inmortal adecuada para producir células de hibridoma. Los sobrenadantes de estas células de hibridoma se pueden rastrear y los clones positivos se expanden de acuerdo con procedimientos estándares (p. ej., Harlow et al. 1998) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Primera edición (1998) Cold Spring Harbor, N.Y.).

15

La inmunización en la etapa (i) de los métodos anteriores se puede hacer con BACE1 o al menos una parte, fragmento, determinante antigénico o epítipo de la misma. En particular, dicha inmunización se puede hacer con el ectodominio de BACE1. El rastreo de las líneas de hibridoma en la etapa (ii) puede realizarse utilizando una o más técnicas de rastreo conocidas per se. Preferiblemente, se hace un rastreo funcional midiendo la actividad inhibidora de BACE1 en un ensayo de rastreo basado en células y/o un ensayo de rastreo libre de células, según se ejemplifica de una manera no limitativa en la sección de Ejemplos. Preferiblemente, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales.

20

25

Los anticuerpos tal como se describen en esta memoria se pueden utilizar para la preparación de un ensayo de diagnóstico. BACE1 puede ser detectada en una diversidad de células y tejidos, especialmente en células y tejidos del cerebro, en donde el grado de expresión corrobora la gravedad de la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, se proporciona un método de detectar *in situ* la localización y la distribución de la expresión de BACE1 en una muestra biológica. El método comprende la etapa de hacer reaccionar la muestra biológica con un anticuerpo anti-BACE1 detectable tal como se describe en esta memoria y detectar la localización y distribución de dicho anticuerpo. La expresión "muestra biológica" se refiere a células y tejidos, incluyendo, pero no limitados a las células y tejidos del cerebro. La expresión se refiere, además, a los fluidos corporales. Por lo tanto, en esta memoria se describe un método para detectar la proteína BACE1 en un fluido corporal de un paciente. El método comprende las etapas de hacer reaccionar el fluido corporal con un anticuerpo anti-BACE1 tal como se describe en esta memoria y vigilar la reacción. El fluido corporal es, por ejemplo, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, efusiones pleurales o saliva. La vigilancia de la reacción se puede efectuar haciendo que el anticuerpo sea marcado con un resto detectable, o para utilizar su región constante como un resto detectable inherente, al que un segundo anticuerpo que incluye un resto detectable puede unirse específicamente. BACE1 de CSF se puede detectar, por ejemplo, en pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer. Preferiblemente, la reacción del fluido corporal con el anticuerpo anti-BACE1 se efectúa en disolución. Alternativamente, la reacción del fluido corporal con el anticuerpo anti-BACE1 se efectúa sobre un sustrato capaz de adsorber las proteínas presentes en el fluido corporal, todo ello como es bien conocido en la técnica de diagnóstico basada en anticuerpos. Además se describe en esta memoria un método para detectar la presencia, ausencia o el nivel de proteína BACE1 en una muestra biológica. El método comprende las siguientes etapas. En primer lugar, las proteínas se extraen de la muestra biológica y se obtiene de este modo una pluralidad de proteínas. El extracto de proteínas puede ser un extracto bruto y también puede incluir material no proteináceo. En segundo lugar, las proteínas se separan por tamaño, p. ej., mediante electroforesis, filtración en gel, etc. En cuarto lugar, las proteínas separadas por tamaño se hacen interactuar con un anticuerpo anti-BACE1. Finalmente se detecta la presencia, ausencia o el nivel del anticuerpo anti-BACE1 que ha interactuado. En el caso de electroforesis en gel, la interacción con el anticuerpo se lleva a cabo típicamente después de transferencia de las proteínas separadas por tamaño sobre un soporte sólido (membrana).

30

35

40

45

50

Los métodos para producir los anticuerpos anti-BACE1 descritos anteriormente, o fragmentos activos de los mismos, forman un aspecto integral de la solicitud. En particular, tales métodos pueden comprender las etapas de: (i) obtener una preparación bruta de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo por medio de la expresión recombinante del

55

anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o mediante síntesis química del anticuerpo o fragmento de anticuerpo; (ii) purificar dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la preparación bruta obtenida en (i).

Alternativamente, un fragmento activo de los anticuerpos anti-BACE1 inhibidores tal como se describe en esta memoria puede obtenerse o producirse por un método que comprende las etapas de:

- 5 (i) obtener una preparación bruta de un anticuerpo que comprende dicho fragmento por medio de expresión recombinante del anticuerpo o por medio de síntesis química del anticuerpo;
 (ii) purificar dicho anticuerpo a partir de la preparación bruta obtenida en (i);
 (iii) aislar el fragmento activo del anticuerpo purificado en (ii).

10 En los métodos citados anteriormente, la expresión recombinante no se limita a la expresión en líneas celulares de hibridoma.

Cualquier célula huésped que comprende y/o secreta (i) un anticuerpo anti-BACE1 inhibidor tal como se describe en esta memoria, (ii) un fragmento activo de (i), (iii) una secuencia de aminoácidos de CDR (i), (iv) una variable región de la secuencia de aminoácidos de (i), o (v) un compuesto que comprende (i), (ii), (iii) o (iv) es también parte de la solicitud.

15 EJEMPLOS

Depósitos biológicos

Las siguientes líneas celulares de hibridoma que secretan anticuerpos monoclonales tal como se mencionado a lo largo de la memoria descriptiva se depositaron de acuerdo con el Tratado de Budapest:

Línea celular de hibridoma	Fecha de depósito	Institución para el depósito	Número de Acceso
MAB-B1-1A11	13 de de mayo de 2009	Colección de plásmidos BCCM / LMBP	LMBP 6871 CB
MAB-B1-14F10	13 de de mayo de 2009	Colección de plásmidos BCCM / LMBP	LMBP 6872CB
MAB-B1-5G7	13 de de mayo de 2009	Colección de plásmidos BCCM / LMBP	LMBP 6873CB

Los particulares de la institución para el depósito son:

- 20 - Colección de Plásmido BCCM/LMBP: Departamento de Biología Molecular Biomédica de la Universidad de Gante, edificio 'Fiers-Schell-Van Montagu', Technologiepark 927, B-9052 Gent - Zwijnaarde, Bélgica

Las notaciones "MAB-B1-1A11" y "1A11" se utilizan indistintamente a lo largo de la memoria descriptiva para la línea celular de hibridoma objeto o el anticuerpo monoclonal secretado por la línea celular de hibridoma.

- 25 Las notaciones "MAB-B1-14F10" y "14F10" se utilizan indistintamente a lo largo de la memoria descriptiva para la línea celular de hibridoma objeto o el anticuerpo monoclonal secretado por la línea celular de hibridoma.

Las notaciones "MAB-B1-5G7" y "5G7" se utilizan indistintamente a lo largo de la memoria descriptiva para la línea celular de hibridoma objeto o el anticuerpo monoclonal secretado por la línea celular de hibridoma.

Materiales y Métodos

- 30 **Inmunización y producción de hibridomas.** Cinco ratones BACE1-/-BACE2-/- de 9 semanas de edad recibieron cuatro inmunizaciones en un intervalo de cuatro semanas, componiéndose cada una de las inmunizaciones por una inyección intraperitoneal de la proteína purificada del ectodominio BACE1 humano (aminoácidos 45-460, generados a partir de cultivo celular HEK293) en mezcla 1: 1 con adyuvante de Freund. La primera inmunización contenía 50 µg de inmunógeno en mezcla con adyuvante completo de Freund, mientras que todas las inmunizaciones posteriores utilizaban 40 µg en mezcla de inmunógeno con adyuvante incompleto de Freund. Dos semanas después de la
- 35 cuarta inmunización, anticuerpos específicos para BACE1 en el suero de cada uno de los ratones inmunizados se titularon por ELISA. Para la generación de hibridomas se eligieron los dos ratones con los títulos más altos (detectables después de dilución durante 40.000 veces en ELISA).

- 40 Los hibridomas se produjeron tres meses después de la cuarta inmunización, cuando los títulos de anticuerpos en suero cayeron significativamente. Cada uno de los ratones recibió un refuerzo final que consistía en una inyección intravenosa en la vena de la cola usando 30 µg de inmunógeno. Los ratones fueron sacrificados y se aisló el bazo y se fusionó con células de mieloma en una relación 4: 1. En total, se recogieron 200 millones de células de bazo y se

fusionaron con 50 millones de células de mieloma para generar hibridomas, y la mezcla de células se dividió en veintisiete placas de 96 pocillos recubiertas con capa de alimentación de ratón. Las células se cultivaron primero en medio HAT durante dos semanas para la selección de hibridomas, a continuación, se cultivaron en medio de HA durante otra semana antes del cambio a medio de crecimiento normal DMEM (Invitrogen) suplementado con FCS al 15% (Hyclone). Más del 90% de los pocillos tienen células que crecen después de la selección de hibridomas.

Rastreo de hibridomas mediante ELISA. El rastreo ELISA de clones de hibridoma positivos que producen anticuerpos anti-BACE1 se realizó de acuerdo con el protocolo estándar de ELISA. Brevemente, placas de poli(cloruro de vinilo) de 96 pocillos (BD Falcon) se recubrieron con 1 µg/ml de proteína del ectodominio de BACE1 purificado (en PBS) a razón de 50 µl/pocillo durante la noche a 4°C. Después de bloquear con BSA al 2% en PBS durante una hora a temperatura ambiente (TA), se añadieron 50 µl de sobrenadantes de hibridoma a las placas y se incubaron durante 2 horas. A continuación, las placas se lavaron con PBS + Tween-20 al 0,05%, y se incubaron con IgG-HRP de anti-ratón (Innova Biosciences) a una dilución de 1: 5000 en tampón de bloqueo durante 1 hora a TA. Después del lavado, las placas se desarrollaron con 50 µl de 0,2 mg/ml de tetrametil bencidina (Sigma) en NaAc 0,1 M de pH 4.9 y H₂O₂ al 0,03% durante 25 minutos. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 50 µl de H₂SO₄ 2M y las placas se leyeron en un lector ELISA a una DO de 450 nm.

Rastreo de hibridomas mediante el ensayo mca-Fret. El rastreo del ensayo mca-Fret de hibridomas se realizó de acuerdo con el protocolo estándar proporcionado por Eli Lilly con alguna modificación. Brevemente, enzima BACE1Fc se diluyó en tampón de reacción (acetato de amonio 50 mM, pH 4,6, BSA al 3%, Triton X-100 al 0,7%) a una concentración de 1 µg/ml, y un pequeño sustrato de péptido FRET MCA-SEVENLDAEFRK(Dnp)-RRRR-NH₂ se diluyó en tampón de reacción a una concentración de 125 µM. 20 µl de sobrenadantes de hibridoma se mezclaron con 30 µl de dilución de enzima y 50 µl de dilución de sustrato en placas de poliestireno negro de 96 pocillos (Costar), las placas se leyeron inmediatamente para la señal de línea de base con Envision (excitación 355 nm, emisión 430 nm, 1 s/pocillo), y después se incubaron durante la noche en la oscuridad a temperatura ambiente. Las placas se leyeron a la mañana siguiente utilizando el mismo protocolo lector.

Rastreo de hibridomas mediante tinción de inmunofluorescencia. Células HEK293 que expresan de forma estable BACE1 se cultivaron en placa de 96 pocillos pretratada con 0,2 mg/ml de poli-L-lisina. Las células se lavaron con PBS y después se fijaron con paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron en Triton X-100 al 0,1%. Después de bloquear las células con 5% de suero de cabra diluido en tampón de bloqueo (FCS al 2%, BSA al 2% y gelatina al 0,2% en PBS) durante la noche a 4°C, se añadieron 50 µl de sobrenadantes de hibridoma a cada uno de los pocillos de las células y se incubaron durante 2 horas a TA. Después, las células se lavaron y se incubaron adicionalmente con IgG anti-ratón de cabra Alexa Fluor 488 (Invitrogen) a una dilución 1:1000 en tampón de bloqueo durante 1 hora a TA. Después del lavado, la placa de 96 pocillos se leyó mediante el analizador IN Cell Analyzer 1000 (Amersham/GE Healthcare).

Rastreo de hibridomas mediante ensayo celular. Células SH-SY5Y que expresan de manera estable APP se cultivaron en placas de 24 pocillos hasta el 90% de confluencia. Después del lavado, las células fueron tratadas con 100 µl de sobrenadantes de hibridoma mezclados con 100 µl de medio de crecimiento DMEM reciente complementado con 4,5 g/L de glucosa, 0,11 g/L de piruvato de sodio y FCS al 15% a 37°C con 5% de CO₂ y 70% de humedad relativa. Sobrenadantes de células de hibridoma negativos mezclados con medio reciente se utilizaron como control negativo. Después del tratamiento durante 24 horas, el medio acondicionado se recogió y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min a 4°C, los sobrenadantes se analizaron mediante transferencia Western para sAPPβ y sAPPα utilizando anticuerpos policlonal anti-sAPPβ (Covance) y 6E10 (Signet).

Isotipificación, Subclonación y Purificación de Anticuerpos. Los isotipos de 1A11, 5G7, 14F10 y 2G3 se determinaron mediante un kit de Isotipado de Anticuerpos Monoclonales de Ratón (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante como IgG1 (1A11, 5G7), IgG2b (14F10) e IgM (2G3). Los clones de hibridoma 1A11, 5G7 y 14F10 se subclonaron cuatro veces por dilución limitante. La producción de anticuerpos se llevó a cabo mediante el cultivo de clones de hibridoma en biorreactores CelineCL-1000 (VWR) utilizando medio DMEM complementado con glutamina 4 mM, 4 g/L de D-glucosa y FCS al 15% a 37°C con 5% de CO₂ y 70% de humedad relativa. Los anticuerpos se purificaron mediante cromatografía de afinidad de proteína G Sepharose 4 (Sigma) y se dializaron en PBS utilizando membrana de diálisis MWCO 6000-8000 Daltons (Spectrum). El rendimiento de los anticuerpos cada uno de los biorreactores cultivados durante 6-7 días fue de alrededor de 4 ~ 10 mg. Partes alícuotas de los anticuerpos fueron rápidamente congeladas con nitrógeno líquido antes de su almacenamiento a -70 °C.

Prueba de ensayo neuronal de mAbs utilizando Transducción del Virus del Bosque Semliki y marcaje metabólico.

Para generar cultivos primarios de neuronas corticales mixtas derivados de ratón de tipo salvaje, el cerebro total de embriones de 14 días de edad se diseccionó en medio HBSS (Gibco), se tripsinizó y se sembró en platos (Nunc) pre-revestidas con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich). Los cultivos se mantuvieron en medio neurobasal (Gibco) con suplemento B27 (Gibco BRL) y 5 μ M de arabinósido de citosina para prevenir la proliferación de células gliales. Neuronas primarias cultivadas durante tres días fueron transducidas con APP humana (APP tipo salvaje o APP sueca) utilizando Virus del Bosque Semliki (SFV). Después de 1 hora de transducción del SFV, se reemplazó el medio con medio neurobasal reciente seguido de un período post-transducción de 2 horas. Después de 2 horas de post-transducción, el medio neurobasal se reemplazó por MEM libre de metionina (Gibco BRL) complementado con 100 μ Ci/ml de [³⁵S]metionina (ICN Biomedicals), mientras tanto se añadieron al medio mAbs (en PBS). Después de 6 horas marcaje metabólico, se recogió el medio acondicionado y las células se lavaron en PBS enfriado con hielo y se lisaron en tampón IP (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, desoxicolato de sodio al 1% y SDS al 0,1%) complementado con inhibidor de proteasa completo (Roche). Extracto de células se inmunoprecipitó utilizando 25 μ l de proteína G Sepharose y anticuerpo APP C-terminal B63.9 durante la noche a 4°C. Los inmunoprecipitados se eluyeron finalmente en tampón de muestra NuPage (Invitrogen) y se sometieron a electroforesis en geles al 10% de acrilamida NuPAGE Bis-Tris en condiciones reductoras y MES en el tampón de desarrollo (Invitrogen). Los resultados se analizaron mediante un Phosphor Imager (Molecular Dynamics) e ImaqQuaNT4.1. sAPP β y A β del medio acondicionado se analizaron por transferencia Western directa utilizando anticuerpo policlonal anti-sAPP β (Covance) y WO-2 (The Genetics Company).

Construcción de plásmidos para el mapeo de epítomos. Todos los mutantes de delección BACE1 se generaron mediante amplificación por PCR a partir de ADNc que codifica BACE1 humana y se subclonaron en vectores pGEX4T. Todos los mutantes fueron validados mediante secuenciación de ADN.

Mutagénesis dirigida al sitio. La mutagénesis del bucle F SQDD (SEQ ID NO: 11) a WAAA (SEQ ID NO: 12) (aminoácidos 376-379) y el bucle D QAG a AGA (aminoácidos 332-334) se realizó utilizando el Kit de Mutagénesis Dirigido al Sitio QuikChange II XL (Stratagene) de acuerdo con el procedimiento previsto. Construcciones pGEX4T-BACE46-460 y pcDNA3-BACE1-501 se utilizaron como moldes. Todos los mutantes fueron validados mediante secuenciación de ADN.

Expresión y purificación de proteínas de fusión GST. *Escherichia coli* BL21 (Novagen) transformada con mutantes de delección pGEX4T-BACE1 se desarrolló de manera logarítmica (100 ml, A₆₀₀ = 0,8) y se indujo con IPTG 0,2 mM (Sigma) durante 3 horas. Las células se sedimentaron después y se resuspendieron en 15 ml de BugBuster Master Mix (Novagen) complementada con Inhibidor de Proteasa Completo (Roche). Los componentes bacterianos se lisaron durante 15 min a TA con rotación, y después se sedimentaron a 20.000xg durante 30 a 4°C. Los sobrenadantes se mezclaron con 300 μ l de perlas de glutatión-sefarosa (Pharmacia) durante 1 hora a 4°C. Después de la incubación, las perlas se lavaron con PBS y las proteínas se eluyeron con L-glutatión 10 mM (Sigma) en Tris-HCl 50 mM pH 8,0.

Resultados**Ejemplo 1. Identificación de inhibidores del mAb de BACE1 candidatos a partir del rastreo de hibridomas**

Con el fin de generar anticuerpos monoclonales anti-BACE1, los hibridomas se produjeron después de una serie de inmunizaciones de ratones BACE1-/-BACE2-/-con la proteína ectodominio de BACE1 humana purificada (aminoácidos 45-460) (SEQ ID NO: 13). El rastreo del hibridoma se inició 2-3 semanas después de la siembra de las células en placas de 96 pocillos, cuando la mayoría de los pozos eran > 80% confluentes. Se aplicaron rastreos funcionales, incluyendo el rastreo del ensayo FRET de BACE1 y el rastreo del ensayo basado en células en la etapa de rastreo temprano de hibridoma (véase la Figura 1A). Sobrenadantes de hibridoma se rastrearon primero mediante ELISA en el ectodominio BACE inmovilizado (inmunógeno). 377 de alrededor de 2400 hibridomas dieron un resultado positivo en este ensayo (las señales ELISA de los pocillos positivos fueron de 5 a 30 veces por encima del fondo).

Los hibridomas positivos del rastreo de ELISA fueron testados adicionalmente en el ensayo mca-FRET de BACE1. Sobrenadantes de 6 pocillos (2G3, 5G7, 2G6, 10G1, 14F10, 17B12) de un total de 377 pocillos testados inhibían la actividad de BACE1 en el ensayo FRET. Hibridoma (2G6, 10G1, 17B12) no creció o se convirtió en negativo en ensayos adicionales, probablemente debido a la proliferación rápida de hibridomas no secretores y, por lo tanto, no estaban disponibles para su posterior análisis. Los otros pocillos (2G3, 5G7, 14F10) fueron seleccionados como

inhibidores de BACE1 candidatos potenciales para una caracterización adicional. 2G3 resultó ser una IgM y, por lo tanto, no se caracterizó adicionalmente.

En paralelo al rastreo mediante ensayo mca-Fret, la tinción de inmunofluorescencia de células HEK293 que expresan de forma estable BACE1 se utilizó para rastrear los sobrenadantes de hibridomas. Se testaron 96 pocillos de los hibridomas que exhibían las señales más altas en el rastreo ELISA y 25 pocillos de ellos mostraron una fuerte inmunorreactividad para BACE1 en la tinción de inmunofluorescencia.

Los 25 pocillos de hibridomas que dieron mejor señal tanto en el ELISA como en la tinción de inmunofluorescencia, se rastrearon adicionalmente mediante un ensayo celular para ver si inhibían la actividad de BACE1. Células SH-SY5Y que expresan de manera estable APP fueron tratadas con sobrenadantes de hibridoma durante 24 horas, sAPP β de medio acondicionado se analizó como lectura de la actividad de BACE1. En este ensayo celular, el sobrenadante del pocillo 1A11 disminuyó la generación de sAPP β . Por lo tanto, 1A11 fue elegido como uno de los candidatos para la inhibición de BACE1.

En resumen, la recuperación con éxito de los inhibidores del mAb BACE1 validó la viabilidad de esta estrategia en el rastreo de inhibidores de mAb.

15 **Ejemplo 2. Los mAbs 1A11, 5G7 y 14F10 modulan la actividad de BACE1 en ensayos enzimáticos**

Los tres inhibidores de BACE1 candidatos, 1A11, 5G7 y 14F10, se caracterizaron primero por MBP-ELISA, que utiliza como sustrato la secuencia C-terminal de 125 aminoácidos de APP^{swe}, que es un sustrato de gran tamaño. En este ensayo MBP-ELISA, los tres mAbs pueden inhibir completamente la actividad de BACE1 (Figura 1 B). Las IC₅₀ de 5G7, 14F10 y 1A11 son 0,47nM, 0,46nM o 0,76nM, respectivamente. También se testaron los tres mAbs en el ensayo mca-Fret (Figura 2), que utiliza un pequeño péptido FRET como sustrato. En este ensayo, 5G7 y 14F10 pueden inhibir completamente la actividad de BACE1 con una IC₅₀ de 0,06 nM y 1,6 nM (14F10), respectivamente. Inesperadamente, 1A11, el inhibidor de BACE1 recuperado del ensayo celular, estimulaba la actividad de BACE1.

Los resultados de los dos ensayos enzimáticos sugieren que el mAb 1A11 es un inhibidor estérico para la interacción del sustrato grande de BACE1 (BACE1-APP).

25 **Ejemplo 3. Mab 1A11 inhibe BACE1 en células de neuroblastoma humano**

Los tres inhibidores de mAb candidatos, 5G7, 14F10 y 1A11 se testaron en un ensayo celular. Células SH-SY5Y que expresan establemente APP de tipo salvaje se cultivaron en placas de 6 pocillos a 90% de confluencia y se incubaron con mAbs 300 nM durante 24 horas. PBS se utilizó como control negativo (los mAbs se disolvieron en PBS) y el compuesto III inhibidor de BACE1 (Merck Company) diluido a 1 μ M en PBS se utilizó como control positivo. Después de tratamiento durante 24 horas, A β , sAPP β y sAPP α de medio condicionado se analizaron por transferencia Western. Tal como se muestra en la Figura 3, el mAb 1A11 inhibía la generación de A β y sAPP β , mientras que el tratamiento con 5G7 y 14F10 no tuvo efectos inhibidores sobre la actividad de BACE1 celular.

Ejemplo 4. Mab 1A11 inhibe significativamente la escisión con BACE1 de APPwt en neuronas cultivadas Los mAbs 5G7, 14F10 y 1A11 se testaron adicionalmente en cultivos neuronales primarios. Neuronas primarias de ratón cultivadas durante tres días fueron transducidas con APPwt humano utilizando virus del bosque Semliki (SFV) y fueron tratadas con mAbs 300 nM (en PBS) durante 24 horas. El PBS se utilizó como control negativo y 1 μ M de compuesto inhibidor III de BACE1 (Merck Company) se utilizó como control positivo. Después de 24 horas de tratamiento, A β , sAPP β y sAPP α de medio acondicionado, junto con APP de longitud completa, CTF β y CTF α de lisados celulares se analizaron por transferencia Western. Tal como se muestra en la Figura 4, el tratamiento con 1A11 disminuyó significativamente A β , sAPP β , y la generación de CTF β , mientras que los productos de escisión de α -secretasa CTF α y sAPP α aumentaron. Los otros dos mAbs, 5G7 y 14F10, no tuvieron efectos inhibidores sobre la escisión con BACE1 de APPwt.

Se estableció una curva de dosis-respuesta para el mAb 1A11 utilizando neuronas como antes, transducidas con SFV-humano APPwt y se marcaron metabólicamente con marcaje metabólico de ³⁵S-metionina durante 6 horas. APP de longitud completa y CTFs de lisados de células se detectaron con phosphor imaging después de la inmunoprecipitación con anticuerpos policlonales de APP C-terminales. A β y sAPP β de medio acondicionado se analizaron por transferencia Western directa. Los niveles de CTF β se cuantificaron para la actividad de BACE1. Tal

como se muestra en la Figura 5, 1A11 puede inhibir > 90% de la actividad de BACE1 con una concentración de 100 nM, y la IC50 aparente en este ensayo se estimó como 3,7 nM.

Se ha demostrado que BACE1 circula a través de la superficie celular y recicla entre la superficie celular, el endosoma y TNG varias rondas durante su larga semi-vida (p. ej., Huse et al. 2000, Wahle et al. 2005). Sin embargo, se desconoce qué porcentaje de BACE1 sufre el tráfico de la superficie celular, por lo que sólo se pudo especular si la fijación como objetivo de BACE1 de la superficie celular sería lo suficientemente eficaz para bloquear la actividad de BACE1 celular principal. Los resultados anteriores demuestran que el mAb inhibidor de BACE1, específico para el ectodominio de BACE1, es co-internaliza probablemente a través de la unión a BACE1 de la superficie celular. Además, la fijación como objetivo de BACE1 de la superficie celular es eficiente en el bloqueo de la actividad de BACE1 celular principal tal como se muestra en los ensayos de cultivo neuronal anteriores.

Ejemplo 5. El fragmento de unión al antígeno (Fab) de 1A11 inhibe BACE1 en neuronas cultivadas

Fragmentos de unión a antígeno (Fab) de los tres mAbs, 5G7, 14F10 y 1A11, se generaron utilizando el kit de preparación de Fab (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La pureza de los Fabs generados fue testada en gel NuPAGE mediante tinción con azul. Para testar los Fabs en el ensayo neuronal, neuronas primarias de ratón cultivadas de tres días se transdujeron con APPwt humano utilizando virus del bosque Semliki (SFV) y se trataron con Fabs 200 nM (en PBS). Después de 24 horas de tratamiento, A β , sAPP β y sAPP α de medio acondicionado, junto con APP de longitud completa, CTF β y CTF α de lisados celulares se analizaron mediante transferencia Western. Tal como se muestra en la Figura 6, 1A11Fab inhibía la actividad de BACE1, ya que disminuyó la generación de A β , sAPP β y CTF β , mientras que 5G7Fab y 14F10Fab no tuvieron ningún efecto inhibitorio sobre la actividad de BACE1.

Ejemplo 6. inyección estereotáctica del mAb 1A11 inhibe la BACE1 en ratones de tipo salvaje

La actividad del mAb 1A11 fue testada in vivo mediante inyección estereotáctica en el cerebro de ratones de tipo salvaje. Brevemente, el mAb 1A11 se administró en el cerebro de ratones de tipo salvaje de tres meses de edad en las coordenadas estereotácticas (bregma -2.46 mm; lateral +/- 2,6 mm; ventral -2.5mm). Una muestra del mAb se inyectó en el lado derecho del cerebro con una dosis de 4 μ g en un volumen total de 1 μ l, para el control, 1 μ l de PBS se inyectó en el lado izquierdo del cerebro. 24 horas después de la inyección, los ratones fueron sacrificados para la disección del cerebro. Rodajas de cerebro (~ 1,5 mm de espesor) que contiene los sitios de inyección fueron diseccionados adicionalmente para el hipocampo y la corteza. Muestras de cerebro se analizaron mediante transferencia Western para CTF β . Tal como se muestra en la Figura 7, la administración de 1A11 disminuyó la generación de CTF β , lo que sugiere que el mAb era capaz de inhibir la actividad de BACE1 en el cerebro de ratones de tipo salvaje.

Ejemplo 7. Mapeo del epítipo de anticuerpos monoclonales que inhiben BACE1

Curiosamente, se demostró que los dos inhibidores de BACE1 candidatos, los mAbs 5G7 y 14F10, no tuvieron efectos inhibitorios sobre BACE1 en ensayos con células, mientras que tienen una fuerte actividad en ensayos libres de células. Se encontró que 5G7 no se une a BACE1 expuesta a la superficie celular. Tal como se muestra por la tinción de inmunofluorescencia (Figura 8), 5G7 no se unía a BACE1 de la superficie celular en condiciones nativas. Experimentos de inmunoprecipitación demostraron que 5G7 inmunoprecipitaba BACE1 derramada a partir de medio acondicionado de células HEK293 que expresan de forma estable BACE1, pero no inmunoprecipitaban BACE1 de longitud completa unida a la membrana, mientras 1A11 inmunoprecipitaba ambas formas de BACE1. Estos resultados sugieren que el epítipo para la unión de 5G7 no está disponible en BACE1 unida a la membrana. Esto podría atribuirse a la estructura compleja de BACE1, por ejemplo por asociación de una proteína que cubre el sitio de unión, o por impedimento estérico provocado por la membrana. Para ilustrar aún más esto, se demostró mediante el mapeo del epítipo que 5G7 se une a otro epítipo conformacional en la superficie del ectodominio de BACE1 (la reactividad de los anticuerpos a varios residuos dentro de este epítipo, incluyendo K299, E303 y Q386 se confirmó por mutagénesis). Se asume que este epítipo es 'inaccesible' en la superficie celular debido a la posible asociación con otras proteínas.

Para determinar el epítipo de unión del mAb 1A11, se generaron una serie de mutantes de delección de BACE1 con la etiqueta GST fusionada N-terminal y se purificaron del cultivo bacteriano. La inmunorreactividad del mAb 1A11 a los mutantes de delección de BACE1 se testó por transferencia Western. Tal como se muestra en la Figura 9, el mutante de delección más corto que reacciona con el mAb 1A11 era BACE 314-460 [SEQ ID NO: 9], con una

inmunorreactividad similar a la del inmunógeno BACE 46-460 de longitud completa [SEQ ID NO: 2]. Esto indica que el epítipo de unión del mAb 1A11 está totalmente situado dentro de BACE 314-460 [SEQ ID NO: 9].

Además, se demostró que el epítipo de unión para el mAb 1A11 no es un epítipo lineal. Tal como se muestra en la Figura 9, el mAb 1A11 reacciona con BACE314-460 [SEQ ID NO: 9], pero no con BACE329-460 [SEQ ID NO: 10].

5 En caso de que el epítipo sea lineal, debe estar localizado al menos parcialmente dentro de BACE314-329 (15 aminoácidos) [SEQ ID NO: 14]. Considerando que la longitud de un epítipo lineal está normalmente dentro de los 15 aminoácidos, el epítipo completo del mAb 1A11, en caso de que sea lineal, debe estar dentro de BACE314-344 [SEQ ID NO: 15]. Sin embargo, tres mutantes de delección BACE46-349 [SEQ ID NO: 8], BACE46-364 [SEQ ID NO: 7] y BACE46-390 [SEQ ID NO: 16], que incluyen el epítipo dentro de BACE314-344 [SEQ ID NO: 115], fueron todos
10 negativos en inmunorreacciones con el mAb 1A11. Los resultados contradictorios sugieren que el epítipo del mAb 1A11 no es lineal, sino conformacional. Se ha reseñado anteriormente que un epítipo conformacional también puede ser detectado por transferencia Western, probablemente debido a la renaturalización del epítipo durante o después de la transferencia de la proteína a una membrana (Zhou et al. 2007), lo que podría explicar por qué el mAb 1A11 con el epítipo conformacional reacciona todavía con BACE1 en la transferencia Western.

15 Para determinar el epítipo conformacional de la unión del mAb 1A11, los autores de la invención exhibieron la estructura 3-D del extremo C de los residuos 314-446 del dominio catalítico de BACE1 (Figura 10). Cerca del extremo N de la estructura, encontraron dos bucles D y F que sobresalen que estaban cerca uno del otro y representaban un epítipo conformacional potencial en BACE1. Los bucles D y F fueron descritos en Hong et al. (2000). Se sabe que los bucles expuestos que sobresalen son altamente inmunogénicos. Aquí, los autores de la
20 invención testaron si el epítipo de mAb 1A11 se encuentra en los bucles D y F. La mutagénesis de tres aminoácidos en el bucle D (aminoácidos 332-334 QAG a AGA) y cuatro aminoácidos en el bucle F (aminoácidos 376-379 SQDD [SEQ ID NO: 11] a WAAA [SEQ ID NO: 12]) se generaron por separado a partir de BACE46-460 [SEQ ID NO: 2] y se testaron mediante transferencia Western. Tal como se muestra en la Figura 11, los dos mutantes perdían inmunorreactividad con el mAb 1A11 a un nivel indetectable en comparación con BACE46-460 de tipo salvaje [SEQ ID NO: 2], lo que sugiere que estos aminoácidos contribuyen en la unión del anticuerpo.

Para validar adicionalmente el epítipo, los autores de la invención generaron la misma mutagénesis de BACE1 de longitud completa (1-501) en el vector de expresión de mamíferos, y expresaron las formas mutantes de BACE1 en células HEK293. Los extractos celulares que contenían BACE1 mutante o BACE1 de tipo salvaje se testaron por
30 inmunoprecipitación utilizando el mAb 1A11. Tal como se muestra en la Figura 12, las dos formas mutantes de BACE1 generadas a partir de células de mamífero perdían inmunorreactividad con el mAb 1A11 a un nivel indetectable en comparación con el BACE1 de tipo salvaje. Las actividades celulares de dos formas mutantes de BACE1 también se testaron con el fin de demostrar que los mutagénesis no provocan cambios en el plegamiento de la proteína total. Tal como se muestra en la Figura 13, los dos mutantes siguen siendo activos en el procesamiento de APP en los sitios β y β' , lo que sugiere que estos mutantes están correctamente plegados.

35 En conclusión, la mutagénesis de los residuos 332-334 en el bucle D o los residuos 376-379 en el bucle F, sin cambiar el plegamiento de la proteína BACE1, abolía totalmente la unión del mAb 1A11 en ambos ensayos de transferencia Western y de inmunoprecipitación, indicando que el mAb 1A11 se une al epítipo conformacional que comprende la combinación de bucles D y F. Curiosamente, el bucle F y el bucle D se describieron previamente como estructuras únicas en BACE1 (Hong et al., 2000), que no se presentan en otras proteasas aspárticas de la familia de pepsina. La única excepción a la familia de pepsina, que comparte las estructuras es BACE2, la homología más
40 próxima de BACE1. Aunque las estructuras de bucle son similares entre BACE1 y BACE2, la secuencia de aminoácidos en el bucle F y el bucle D son diferentes. Además de ello, los datos enzimáticos confirmaron que el mAb 1A11 no reacciona de forma cruzada con BACE2. Desde el punto de vista terapéutico, se prevé que el mAb 1A11, ya que se une a la estructura única de BACE1, sea altamente selectivo contra BACE2 y otras proteasas aspárticas.
45

Referencias

- Boado RJ, Zhang Y, Zhang Y, Xia CF, Pardridge WM (2007) Fusion antibody for Alzheimer's disease with bidirectional transport across the blood-brain barrier and abeta fibril disaggregation. *Bioconjug Chem.* 18:447-55.
- De strooper B (2003): Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active γ -secretase complex. *Neuron*, 38:9-12.
- 50 - Golde TE, Dickson D, Hutton M. (2006). Filling the gaps in the abeta cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer's Res* , 3:421-430.
- Hardy, J. and Selkoe, D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580):353-6.
- 55 - Harlow et al. (1998) *Antibodies: A Laboratory Manual*, First edition (1998) Cold Spring Harbor, N.Y.).

- Hong L, Koelsch G, Lin X, Wu S, Terzyan S, Ghosh AK, Zhang XC, Tang J. Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor. *Science*. 2000 Oct;290(5489):150-3.
- Huse JT, Pijak DS, Leslie GJ, Lee VM, Doms RW. (2000) Maturation and endosomal targeting of β - site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease β -secretase. *J Biol Chem*, 275:33729-33737.
- 5 - Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, et al (1999): Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as β -Secretase. *Mol Cell Neurosci*, 14:419-427.
- Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. and Foeller, C., 1991. Sequences of proteins of immunological interest. US Public Health Services, NIH, Bethesda, MD. (1991)
- 10 - Lin X, Koelsch G, Wu S, Downs D, Dashti A, Tang J (2000): Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the β -secretase site of β -amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:1456-1460.
- Ohno M, Sametsky EA, Younkin LH, Oakley H, Younkin SG, Citron M, Vassar R, Disterhoft JF (2004): BACE1 Deficiency Rescues Memory Deficits and Cholinergic Dysfunction in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuron*, 41:27-33.
- 15 - Ohno M, Chang L, Tseng W, Oakley H, Citron M, Klein WL, Vassar R, Disterhoft JF (2006): Temporal memory deficits in Alzheimer's mouse models: rescue by genetic deletion of BACE1. *Eur J Neurosci*, 23:251-260.
- Pardridge WM (2007) Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today*. 12: 54-61.
- Patel MM, Goyal BR, Bhadada SV, Bhatt JS, Amin AF (2009). Getting into the brain: approaches to enhance brain drug delivery. *CNS Drugs* 23:35-58.
- 20 - Roberds SL, Anderson J, Basi G, Bienkowski MJ, Branstetter DG, Chen KS, Freedman SB, Frigon NL, Games D, Hu K, et al (2001): BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary β -secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum Mol Genet*, 10:1317-1324.
- Singer O, Marr RA, Rockenstein E, Crews L, Coufal NG, Gage FH, Verma IM, Masliah E. Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat Neurosci*. 2005 Oct;8(10):1343-9
- 25 - Thinakaran G, Teplow DB, Siman R, Greenberg B, Sisodia SS.(1996) Metabolism of the 'Swedish' amyloid precursor protein variant in neuro2a (N2a) cells. Evidence that cleavage at the 'beta-secretase' site occurs in the golgi apparatus. *J Biol Chem* .271:9390-9397
- Volbracht C, Penzkofer S, Mansson D, Christensen KV, Fog K, Schildknecht S, Leist M, Nielsen J. Measurement of cellular beta-site of APP cleaving enzyme 1 activity and its modulation in neuronal assay systems. *Anal Biochem*. 15 de abril de 2009;387(2):208-20.
- 30 - Wahle, T., Prager, K., Raffler, N., Haass, C., Famulok, M. y Walter, J. (2005) GGA proteins regulate retrograde transport of BACE1 from endosomes to the trans-Golgi network. *Mol.Cell. Neurosci*.
- Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashler JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, et al (1999): Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β -secretase activity. *Nature*, 402:533-537.
- 35 - Zhou YH, Chen Z, Purcell RH, Emerson SU. Positive reactions on Western blots do not necessarily indicate the epitopes on antigens are continuous. *Immunol Cell Biol*. enero de 2007;85(1):73-8.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> VIB VZW KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN, K.U.LEUVEN R&D

<120> Anticuerpos Inhibidores de BACE1

5

<130> BDS/ABB/V312

<150> EP09162713.3

<151> 15-06-2009

10

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

15

<210> 1

<211> 501

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 602 611 T3

Met Ala Gln Ala Leu Pro Trp Leu Leu Leu Trp Met Gly Ala Gly Val
 1 5 10 15

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

Gly Leu Gly Gly Ala Pro Leu Gly Leu Arg Leu Pro Arg Glu Thr Asp
 35 40 45

Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val Glu Met Val
 50 55 60

Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Val Glu Met Thr
 65 70 75 80

Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val Asp Thr Gly Ser
 85 90 95

Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala Ala Pro His Pro Phe Leu His Arg Tyr
 100 105 110

Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Leu Arg Lys Gly Val
 115 120 125

Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly Lys Trp Glu Gly Glu Leu Gly Thr Asp
 130 135 140

Leu Val Ser Ile Pro His Gly Pro Asn Val Thr Val Arg Ala Asn Ile
 145 150 155 160

Ala Ala Ile Thr Glu Ser Asp Lys Phe Phe Ile Asn Gly Ser Asn Trp
 165 170 175

ES 2 602 611 T3

Glu Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Ala Glu Ile Ala Arg Pro Asp Asp
 180 185 190

Ser Leu Glu Pro Phe Phe Asp Ser Leu Val Lys Gln Thr His Val Pro
 195 200 205

Asn Leu Phe Ser Leu Gln Leu Cys Gly Ala Gly Phe Pro Leu Asn Gln
 210 215 220

Ser Glu Val Leu Ala Ser Val Gly Gly Ser Met Ile Ile Gly Gly Ile
 225 230 235 240

Asp His Ser Leu Tyr Thr Gly Ser Leu Trp Tyr Thr Pro Ile Arg Arg
 245 250 255

Glu Trp Tyr Tyr Glu Val Ile Ile Val Arg Val Glu Ile Asn Gly Gln
 260 265 270

Asp Leu Lys Met Asp Cys Lys Glu Tyr Asn Tyr Asp Lys Ser Ile Val
 275 280 285

Asp Ser Gly Thr Thr Asn Leu Arg Leu Pro Lys Lys Val Phe Glu Ala
 290 295 300

Ala Val Lys Ser Ile Lys Ala Ala Ser Ser Thr Glu Lys Phe Pro Asp
 305 310 315 320

Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln Leu Val Cys Trp Gln Ala Gly Thr Thr
 325 330 335

Pro Trp Asn Ile Phe Pro Val Ile Ser Leu Tyr Leu Met Gly Glu Val
 340 345 350

Thr Asn Gln Ser Phe Arg Ile Thr Ile Leu Pro Gln Gln Tyr Leu Arg
 355 360 365

Pro Val Glu Asp Val Ala Thr Ser Gln Asp Asp Cys Tyr Lys Phe Ala
 370 375 380

Ile Ser Gln Ser Ser Thr Gly Thr Val Met Gly Ala Val Ile Met Glu
 385 390 395 400

Gly Phe Tyr Val Val Phe Asp Arg Ala Arg Lys Arg Ile Gly Phe Ala
 405 410 415

Val Ser Ala Cys His Val His Asp Glu Phe Arg Thr Ala Ala Val Glu
 420 425 430

ES 2 602 611 T3

Gly Pro Phe Val Thr Leu Asp Met Glu Asp Cys Gly Tyr Asn Ile Pro
435 440 445

Gln Thr Asp Glu Ser Thr Leu Met Thr Ile Ala Tyr Val Met Ala Ala
450 455 460

Ile Cys Ala Leu Phe Met Leu Pro Leu Cys Leu Met Val Cys Gln Trp
465 470 475 480

Arg Cys Leu Arg Cys Leu Arg Gln Gln His Asp Asp Phe Ala Asp Asp
485 490 495

Ile Ser Leu Leu Lys
500

<210> 2

<211> 415

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 602 611 T3

Glu Thr Asp Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val
 1 5 10 15

Glu Met Val Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Val
 20 25 30

Glu Met Thr Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val Asp
 35 40 45

Thr Gly Ser Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala Ala Pro His Pro Phe Leu
 50 55 60

His Arg Tyr Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Leu Arg
 65 70 75 80

Lys Gly Val Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly Lys Trp Glu Gly Glu Leu
 85 90 95

Gly Thr Asp Leu Val Ser Ile Pro His Gly Pro Asn Val Thr Val Arg
 100 105 110

Ala Asn Ile Ala Ala Ile Thr Glu Ser Asp Lys Phe Phe Ile Asn Gly
 115 120 125

Ser Asn Trp Glu Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Ala Glu Ile Ala Arg
 130 135 140

Pro Asp Asp Ser Leu Glu Pro Phe Phe Asp Ser Leu Val Lys Gln Thr

ES 2 602 611 T3

<210> 3
 <211> 294
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 3

Glu Thr Asp Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val
 1 5 10 15

Glu Met Val Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Val
 20 25 30

Glu Met Thr Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val Asp
 35 40 45

Thr Gly Ser Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala Ala Pro His Pro Phe Leu
 50 55 60

His Arg Tyr Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Leu Arg
 65 70 75 80

Lys Gly Val Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly Lys Trp Glu Gly Glu Leu
 85 90 95

Gly Thr Asp Leu Val Ser Ile Pro His Gly Pro Asn Val Thr Val Arg
 100 105 110

Ala Asn Ile Ala Ala Ile Thr Glu Ser Asp Lys Phe Phe Ile Asn Gly
 115 120 125

Ser Asn Trp Glu Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Ala Glu Ile Ala Arg
 130 135 140

Pro Asp Asp Ser Leu Glu Pro Phe Phe Asp Ser Leu Val Lys Gln Thr
 145 150 155 160

His Val Pro Asn Leu Phe Ser Leu Gln Leu Cys Gly Ala Gly Phe Pro
 165 170 175

Leu Asn Gln Ser Glu Val Leu Ala Ser Val Gly Gly Ser Met Ile Ile
 180 185 190

Gly Gly Ile Asp His Ser Leu Tyr Thr Gly Ser Leu Trp Tyr Thr Pro
 195 200 205

Ile Arg Arg Glu Trp Tyr Tyr Glu Val Ile Ile Val Arg Val Glu Ile
 210 215 220

ES 2 602 611 T3

Asn Gly Gln Asp Leu Lys Met Asp Cys Lys Glu Tyr Asn Tyr Asp Lys
225 230 235 240

Ser Ile Val Asp Ser Gly Thr Thr Asn Leu Arg Leu Pro Lys Lys Val
245 250 255

Phe Glu Ala Ala Val Lys Ser Ile Lys Ala Ala Ser Ser Thr Glu Lys
260 265 270

Phe Pro Asp Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln Leu Val Cys Trp Gln Ala
275 280 285

Gly Thr Thr Pro Trp Asn
290

<210> 4

<211> 195

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 602 611 T3

Glu Thr Asp Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val
 1 5 10 15
 Glu Met Val Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Val
 20 25 30
 Glu Met Thr Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val Asp
 35 40 45
 Thr Gly Ser Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala Ala Pro His Pro Phe Leu
 50 55 60
 His Arg Tyr Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Leu Arg
 65 70 75 80
 Lys Gly Val Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly Lys Trp Glu Gly Glu Leu
 85 90 95
 Gly Thr Asp Leu Val Ser Ile Pro His Gly Pro Asn Val Thr Val Arg
 100 105 110
 Ala Asn Ile Ala Ala Ile Thr Glu Ser Asp Lys Phe Phe Ile Asn Gly
 115 120 125
 Ser Asn Trp Glu Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Ala Glu Ile Ala Arg
 130 135 140
 Pro Asp Asp Ser Leu Glu Pro Phe Phe Asp Ser Leu Val Lys Gln Thr
 145 150 155 160
 His Val Pro Asn Leu Phe Ser Leu Gln Leu Cys Gly Ala Gly Phe Pro
 165 170 175
 Leu Asn Gln Ser Glu Val Leu Ala Ser Val Gly Gly Ser Met Ile Ile
 180 185 190
 Gly Gly Ile
 195

<210> 5
 <211> 221
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 602 611 T3

Ile Asp His Ser Leu Tyr Thr Gly Ser Leu Trp Tyr Thr Pro Ile Arg
 1 5 10 15

Arg Glu Trp Tyr Tyr Glu Val Ile Ile Val Arg Val Glu Ile Asn Gly
 20 25 30

Gln Asp Leu Lys Met Asp Cys Lys Glu Tyr Asn Tyr Asp Lys Ser Ile
 35 40 45

Val Asp Ser Gly Thr Thr Asn Leu Arg Leu Pro Lys Lys Val Phe Glu
 50 55 60

Ala Ala Val Lys Ser Ile Lys Ala Ala Ser Ser Thr Glu Lys Phe Pro
 65 70 75 80

Asp Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln Leu Val Cys Trp Gln Ala Gly Thr
 85 90 95

Thr Pro Trp Asn Ile Phe Pro Val Ile Ser Leu Tyr Leu Met Gly Glu
 100 105 110

Val Thr Asn Gln Ser Phe Arg Ile Thr Ile Leu Pro Gln Gln Tyr Leu
 115 120 125

Arg Pro Val Glu Asp Val Ala Thr Ser Gln Asp Asp Cys Tyr Lys Phe
 130 135 140

Ala Ile Ser Gln Ser Ser Thr Gly Thr Val Met Gly Ala Val Ile Met
 145 150 155 160

Glu Gly Phe Tyr Val Val Phe Asp Arg Ala Arg Lys Arg Ile Gly Phe
 165 170 175

Ala Val Ser Ala Cys His Val His Asp Glu Phe Arg Thr Ala Ala Val
 180 185 190

Glu Gly Pro Phe Val Thr Leu Asp Met Glu Asp Cys Gly Tyr Asn Ile
 195 200 205

Pro Gln Thr Asp Glu Ser Thr Leu Met Thr Ile Ala Tyr
 210 215 220

<210> 6
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 6

ES 2 602 611 T3

Asn Ile Phe Pro Val Ile Ser Leu Tyr Leu Met Gly Glu Val Thr Asn
 1 5 10 15

Gln Ser Phe Arg Ile Thr Ile Leu Pro Gln Gln Tyr Leu Arg Pro Val
 20 25 30

Glu Asp Val Ala Thr Ser Gln Asp Asp Cys Tyr Lys Phe Ala Ile Ser
 35 40 45

Gln Ser Ser Thr Gly Thr Val Met Gly Ala Val Ile Met Glu Gly Phe
 50 55 60

Tyr Val Val Phe Asp Arg Ala Arg Lys Arg Ile Gly Phe Ala Val Ser
 65 70 75 80

Ala Cys His Val His Asp Glu Phe Arg Thr Ala Ala Val Glu Gly Pro
 85 90 95

Phe Val Thr Leu Asp Met Glu Asp Cys Gly Tyr Asn Ile Pro Gln Thr
 100 105 110

Asp Glu Ser Thr Leu Met Thr Ile Ala Tyr
 115 120

<210> 7

<211> 319

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 7

Glu Thr Asp Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val
 1 5 10 15

Glu Met Val Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Val
 20 25 30

ES 2 602 611 T3

Glu Met Thr Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val Asp
 35 40 45
 Thr Gly Ser Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala Ala Pro His Pro Phe Leu
 50 55 60
 His Arg Tyr Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Leu Arg
 65 70 75 80
 Lys Gly Val Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly Lys Trp Glu Gly Glu Leu
 85 90 95
 Gly Thr Asp Leu Val Ser Ile Pro His Gly Pro Asn Val Thr Val Arg
 100 105 110
 Ala Asn Ile Ala Ala Ile Thr Glu Ser Asp Lys Phe Phe Ile Asn Gly
 115 120 125
 Ser Asn Trp Glu Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Ala Glu Ile Ala Arg
 130 135 140
 Pro Asp Asp Ser Leu Glu Pro Phe Phe Asp Ser Leu Val Lys Gln Thr
 145 150 155 160
 His Val Pro Asn Leu Phe Ser Leu Gln Leu Cys Gly Ala Gly Phe Pro
 165 170 175
 Leu Asn Gln Ser Glu Val Leu Ala Ser Val Gly Gly Ser Met Ile Ile
 180 185 190
 Gly Gly Ile Asp His Ser Leu Tyr Thr Gly Ser Leu Trp Tyr Thr Pro
 195 200 205
 Ile Arg Arg Glu Trp Tyr Tyr Glu Val Ile Ile Val Arg Val Glu Ile
 210 215 220
 Asn Gly Gln Asp Leu Lys Met Asp Cys Lys Glu Tyr Asn Tyr Asp Lys
 225 230 235 240
 Ser Ile Val Asp Ser Gly Thr Thr Asn Leu Arg Leu Pro Lys Lys Val
 245 250 255
 Phe Glu Ala Ala Val Lys Ser Ile Lys Ala Ala Ser Ser Thr Glu Lys
 260 265 270
 Phe Pro Asp Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln Leu Val Cys Trp Gln Ala
 275 280 285

ES 2 602 611 T3

Gly Thr Thr Pro Trp Asn Ile Phe Pro Val Ile Ser Leu Tyr Leu Met
290 295 300

Gly Glu Val Thr Asn Gln Ser Phe Arg Ile Thr Ile Leu Pro Gln
305 310 315

<210> 8

<211> 304

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 602 611 T3

Glu Thr Asp Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val
 1 5 10 15
 Glu Met Val Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Val
 20 25 30
 Glu Met Thr Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val Asp
 35 40 45
 Thr Gly Ser Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala Ala Pro His Pro Phe Leu
 50 55 60
 His Arg Tyr Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Leu Arg
 65 70 75 80
 Lys Gly Val Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly Lys Trp Glu Gly Glu Leu
 85 90 95
 Gly Thr Asp Leu Val Ser Ile Pro His Gly Pro Asn Val Thr Val Arg
 100 105 110
 Ala Asn Ile Ala Ala Ile Thr Glu Ser Asp Lys Phe Phe Ile Asn Gly
 115 120 125
 Ser Asn Trp Glu Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Ala Glu Ile Ala Arg
 130 135 140
 Pro Asp Asp Ser Leu Glu Pro Phe Phe Asp Ser Leu Val Lys Gln Thr
 145 150 155 160
 His Val Pro Asn Leu Phe Ser Leu Gln Leu Cys Gly Ala Gly Phe Pro
 165 170 175
 Leu Asn Gln Ser Glu Val Leu Ala Ser Val Gly Gly Ser Met Ile Ile
 180 185 190
 Gly Gly Ile Asp His Ser Leu Tyr Thr Gly Ser Leu Trp Tyr Thr Pro
 195 200 205

ES 2 602 611 T3

Ile Arg Arg Glu Trp Tyr Tyr Glu Val Ile Ile Val Arg Val Glu Ile
 210 215 220

Asn Gly Gln Asp Leu Lys Met Asp Cys Lys Glu Tyr Asn Tyr Asp Lys
 225 230 235 240

Ser Ile Val Asp Ser Gly Thr Thr Asn Leu Arg Leu Pro Lys Lys Val
 245 250 255

Phe Glu Ala Ala Val Lys Ser Ile Lys Ala Ala Ser Ser Thr Glu Lys
 260 265 270

Phe Pro Asp Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln Leu Val Cys Trp Gln Ala
 275 280 285

Gly Thr Thr Pro Trp Asn Ile Phe Pro Val Ile Ser Leu Tyr Leu Met
 290 295 300

<210> 9
 <211> 147
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 9

Ser Thr Glu Lys Phe Pro Asp Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln Leu Val
 1 5 10 15

Cys Trp Gln Ala Gly Thr Thr Pro Trp Asn Ile Phe Pro Val Ile Ser
 20 25 30

Leu Tyr Leu Met Gly Glu Val Thr Asn Gln Ser Phe Arg Ile Thr Ile
 35 40 45

Leu Pro Gln Gln Tyr Leu Arg Pro Val Glu Asp Val Ala Thr Ser Gln
 50 55 60

Asp Asp Cys Tyr Lys Phe Ala Ile Ser Gln Ser Ser Thr Gly Thr Val
 65 70 75 80

Met Gly Ala Val Ile Met Glu Gly Phe Tyr Val Val Phe Asp Arg Ala
 85 90 95

Arg Lys Arg Ile Gly Phe Ala Val Ser Ala Cys His Val His Asp Glu
 100 105 110

Phe Arg Thr Ala Ala Val Glu Gly Pro Phe Val Thr Leu Asp Met Glu
 115 120 125

ES 2 602 611 T3

Asp Cys Gly Tyr Asn Ile Pro Gln Thr Asp Glu Ser Thr Leu Met Thr
 130 135 140

Ile Ala Tyr
 145

<210> 10

<211> 132

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 10

Val Cys Trp Gln Ala Gly Thr Thr Pro Trp Asn Ile Phe Pro Val Ile
 1 5 10 15

Ser Leu Tyr Leu Met Gly Glu Val Thr Asn Gln Ser Phe Arg Ile Thr
 20 25 30

Ile Leu Pro Gln Gln Tyr Leu Arg Pro Val Glu Asp Val Ala Thr Ser
 35 40 45

Gln Asp Asp Cys Tyr Lys Phe Ala Ile Ser Gln Ser Ser Thr Gly Thr
 50 55 60

Val Met Gly Ala Val Ile Met Glu Gly Phe Tyr Val Val Phe Asp Arg
 65 70 75 80

Ala Arg Lys Arg Ile Gly Phe Ala Val Ser Ala Cys His Val His Asp
 85 90 95

Glu Phe Arg Thr Ala Ala Val Glu Gly Pro Phe Val Thr Leu Asp Met
 100 105 110

Glu Asp Cys Gly Tyr Asn Ile Pro Gln Thr Asp Glu Ser Thr Leu Met
 115 120 125

Thr Ile Ala Tyr
 130

<210> 11

<211> 4

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Ser Gln Asp Asp
 1

ES 2 602 611 T3

<210> 12
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 12

Trp Ala Ala Ala
1

<210> 13
<211> 416
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens

<400> 13

ES 2 602 611 T3

Arg Glu Thr Asp Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe
 1 5 10 15

Val Glu Met Val Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr
 20 25 30

Val Glu Met Thr Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val
 35 40 45

Asp Thr Gly Ser Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala Ala Pro His Pro Phe
 50 55 60

Leu His Arg Tyr Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Leu
 65 70 75 80

Arg Lys Gly Val Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly Lys Trp Glu Gly Glu
 85 90 95

Leu Gly Thr Asp Leu Val Ser Ile Pro His Gly Pro Asn Val Thr Val
 100 105 110

Arg Ala Asn Ile Ala Ala Ile Thr Glu Ser Asp Lys Phe Phe Ile Asn
 115 120 125

Gly Ser Asn Trp Glu Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Ala Glu Ile Ala
 130 135 140

Arg Pro Asp Asp Ser Leu Glu Pro Phe Phe Asp Ser Leu Val Lys Gln
 145 150 155 160

Thr His Val Pro Asn Leu Phe Ser Leu Gln Leu Cys Gly Ala Gly Phe
 165 170 175

Pro Leu Asn Gln Ser Glu Val Leu Ala Ser Val Gly Gly Ser Met Ile
 180 185 190

Ile Gly Gly Ile Asp His Ser Leu Tyr Thr Gly Ser Leu Trp Tyr Thr
 195 200 205

ES 2 602 611 T3

Pro Ile Arg Arg Glu Trp Tyr Tyr Glu Val Ile Ile Val Arg Val Glu
 210 215 220

Ile Asn Gly Gln Asp Leu Lys Met Asp Cys Lys Glu Tyr Asn Tyr Asp
 225 230 235 240

Lys Ser Ile Val Asp Ser Gly Thr Thr Asn Leu Arg Leu Pro Lys Lys
 245 250 255

Val Phe Glu Ala Ala Val Lys Ser Ile Lys Ala Ala Ser Ser Thr Glu
 260 265 270

Lys Phe Pro Asp Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln Leu Val Cys Trp Gln
 275 280 285

Ala Gly Thr Thr Pro Trp Asn Ile Phe Pro Val Ile Ser Leu Tyr Leu
 290 295 300

Met Gly Glu Val Thr Asn Gln Ser Phe Arg Ile Thr Ile Leu Pro Gln
 305 310 315 320

Gln Tyr Leu Arg Pro Val Glu Asp Val Ala Thr Ser Gln Asp Asp Cys
 325 330 335

Tyr Lys Phe Ala Ile Ser Gln Ser Ser Thr Gly Thr Val Met Gly Ala
 340 345 350

Val Ile Met Glu Gly Phe Tyr Val Val Phe Asp Arg Ala Arg Lys Arg
 355 360 365

Ile Gly Phe Ala Val Ser Ala Cys His Val His Asp Glu Phe Arg Thr
 370 375 380

Ala Ala Val Glu Gly Pro Phe Val Thr Leu Asp Met Glu Asp Cys Gly
 385 390 395 400

Tyr Asn Ile Pro Gln Thr Asp Glu Ser Thr Leu Met Thr Ile Ala Tyr
 405 410 415

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 14

Ser Thr Glu Lys Phe Pro Asp Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln Leu Val
 1 5 10 15

ES 2 602 611 T3

<210> 15
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 15

Ser Thr Glu Lys Phe Pro Asp Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln Leu Val
1 5 10 15

Cys Trp Gln Ala Gly Thr Thr Pro Trp Asn Ile Phe Pro Val Ile
20 25 30

<210> 16
<211> 345
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens

<400> 16

ES 2 602 611 T3

Glu Thr Asp Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val
 1 5 10 15
 Glu Met Val Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Val
 20 25 30
 Glu Met Thr Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val Asp
 35 40 45
 Thr Gly Ser Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala Ala Pro His Pro Phe Leu
 50 55 60
 His Arg Tyr Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Leu Arg
 65 70 75 80
 Lys Gly Val Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly Lys Trp Glu Gly Glu Leu
 85 90 95
 Gly Thr Asp Leu Val Ser Ile Pro His Gly Pro Asn Val Thr Val Arg
 100 105 110
 Ala Asn Ile Ala Ala Ile Thr Glu Ser Asp Lys Phe Phe Ile Asn Gly
 115 120 125
 Ser Asn Trp Glu Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Ala Glu Ile Ala Arg
 130 135 140
 Pro Asp Asp Ser Leu Glu Pro Phe Phe Asp Ser Leu Val Lys Gln Thr
 145 150 155 160
 His Val Pro Asn Leu Phe Ser Leu Gln Leu Cys Gly Ala Gly Phe Pro
 165 170 175

ES 2 602 611 T3

Leu Asn Gln Ser Glu Val Leu Ala Ser Val Gly Gly Ser Met Ile Ile
 180 185 190

Gly Gly Ile Asp His Ser Leu Tyr Thr Gly Ser Leu Trp Tyr Thr Pro
 195 200 205

Ile Arg Arg Glu Trp Tyr Tyr Glu Val Ile Ile Val Arg Val Glu Ile
 210 215 220

Asn Gly Gln Asp Leu Lys Met Asp Cys Lys Glu Tyr Asn Tyr Asp Lys
 225 230 235 240

Ser Ile Val Asp Ser Gly Thr Thr Asn Leu Arg Leu Pro Lys Lys Val
 245 250 255

Phe Glu Ala Ala Val Lys Ser Ile Lys Ala Ala Ser Ser Thr Glu Lys
 260 265 270

Phe Pro Asp Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln Leu Val Cys Trp Gln Ala
 275 280 285

Gly Thr Thr Pro Trp Asn Ile Phe Pro Val Ile Ser Leu Tyr Leu Met
 290 295 300

Gly Glu Val Thr Asn Gln Ser Phe Arg Ile Thr Ile Leu Pro Gln Gln
 305 310 315 320

Tyr Leu Arg Pro Val Glu Asp Val Ala Thr Ser Gln Asp Asp Cys Tyr
 325 330 335

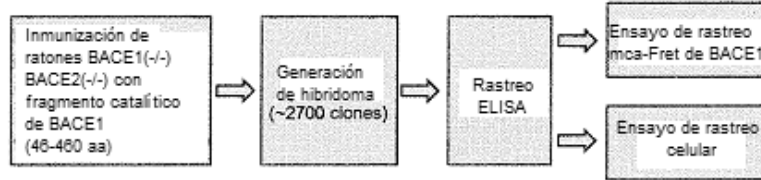
Lys Phe Ala Ile Ser Gln Ser Ser Thr
 340 345

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal anti-BACE1 aislado consistente en 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras, caracterizado por que dicho anticuerpo monoclonal inhibe la escisión mediada por BACE1 de la proteína precursora de amiloide beta (APP), y en donde dicho anticuerpo monoclonal se une a un epítipo conformacional de BACE1 que comprende los residuos de aminoácidos 332 a 334 del bucle D y los residuos de aminoácidos 376 a 379 del bucle F de BACE1, tal como se recoge en SEQ ID NO:1.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado, además, por que es secretado por línea celular de hibridoma con el número de acceso LMBP 6871CB.
- 10 3. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado, además, por que es un anticuerpo monoclonal humanizado.
4. Un fragmento activo del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicho fragmento inhibe la escisión mediada por BACE1 de la proteína precursora de amiloide beta (APP).
5. Una línea celular de hibridoma con el número de acceso LMBP 6871CB.
- 15 6. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el fragmento activo de acuerdo con la reivindicación 4, para uso como un medicamento.
7. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el fragmento activo de acuerdo con la reivindicación 4, para uso en la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 20 8. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el fragmento activo de acuerdo con la reivindicación 4 y al menos un soporte, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptable.
9. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el fragmento activo de acuerdo con la reivindicación 4, para uso en un ensayo de diagnóstico.

Figura 1

A



Ensayo MBP-C125Swe de BACE1

B

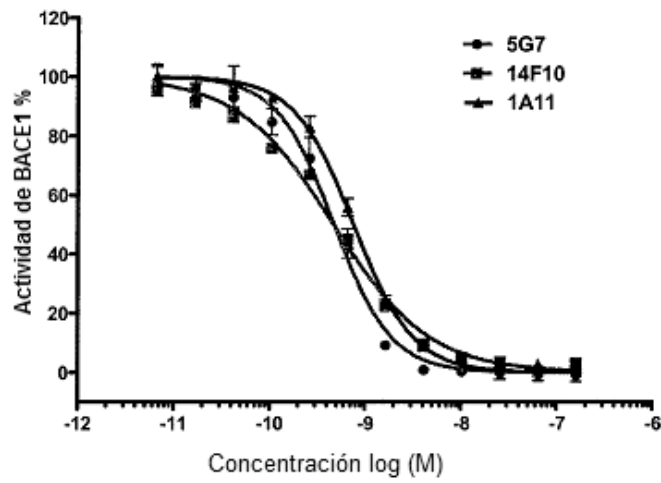


Figura 2

Ensayo mcaFret de BACE1

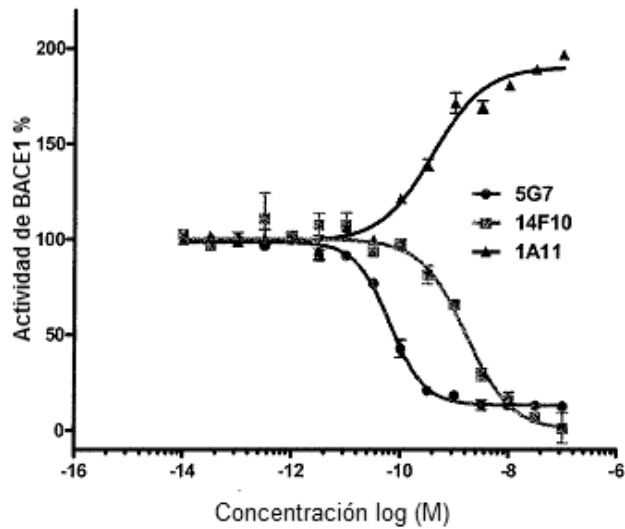


Figura 3

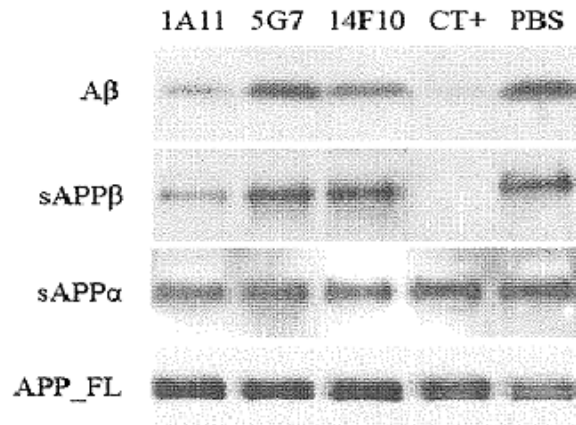


Figura 4

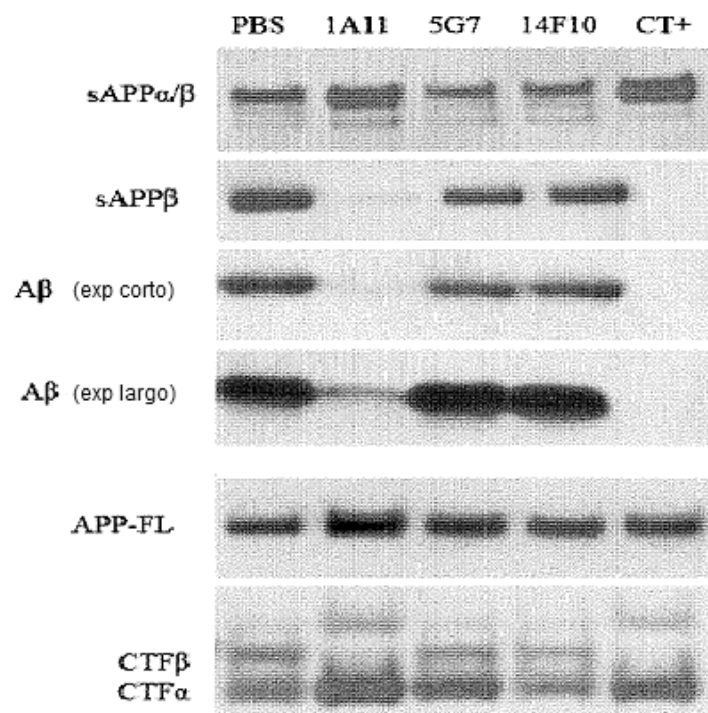
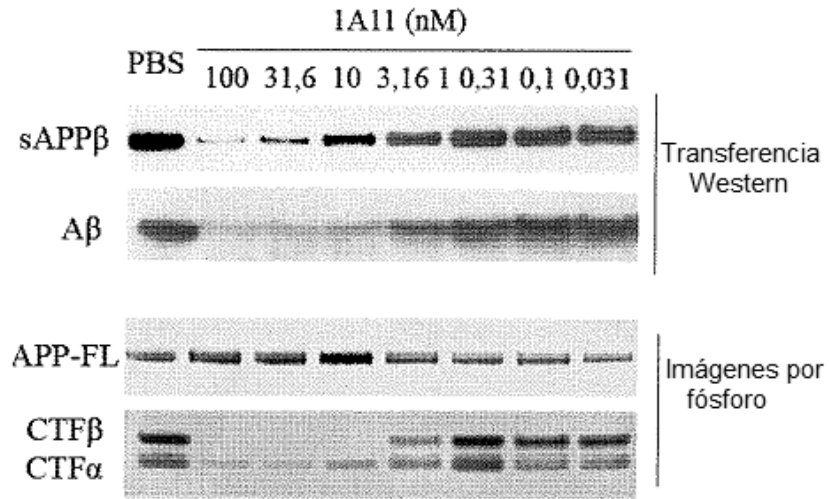


Figura 5

A



B

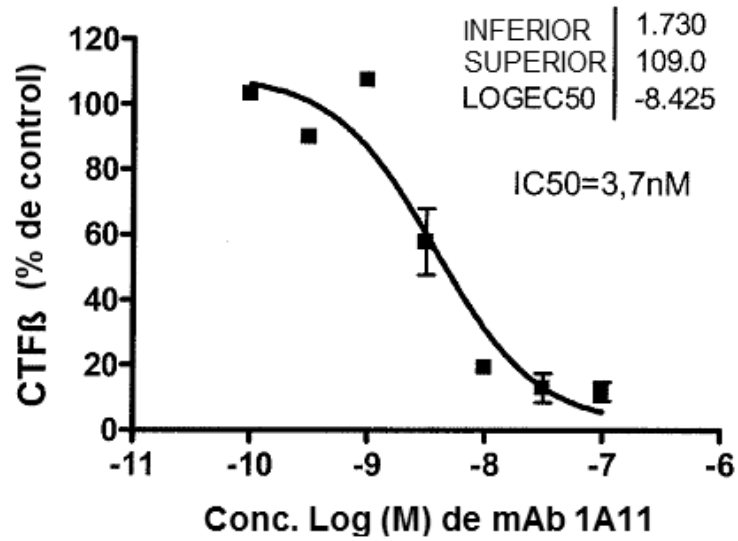


Figura 6

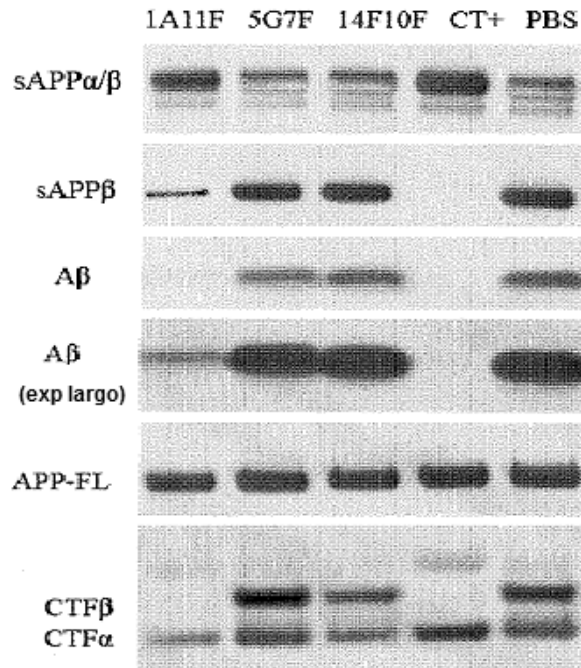


Figura 7

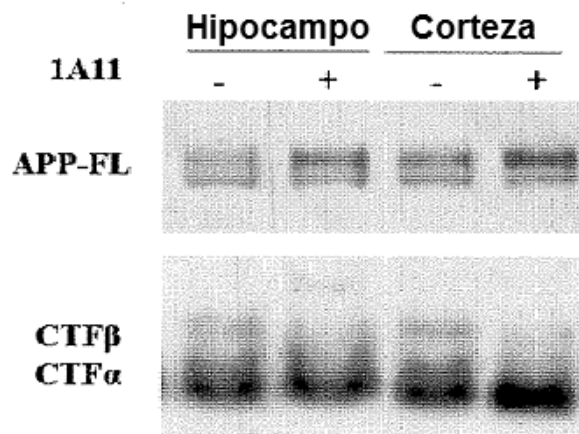


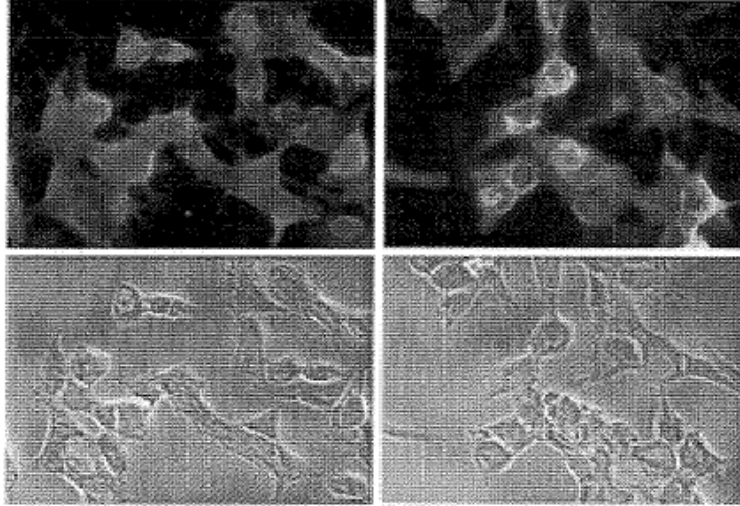
Figura 8

A

HEK293-BACE1 permeabilizado

1A11

5G7



B

Tinción de superficie 4°C de HEK293-BACE1

1A11

5G7

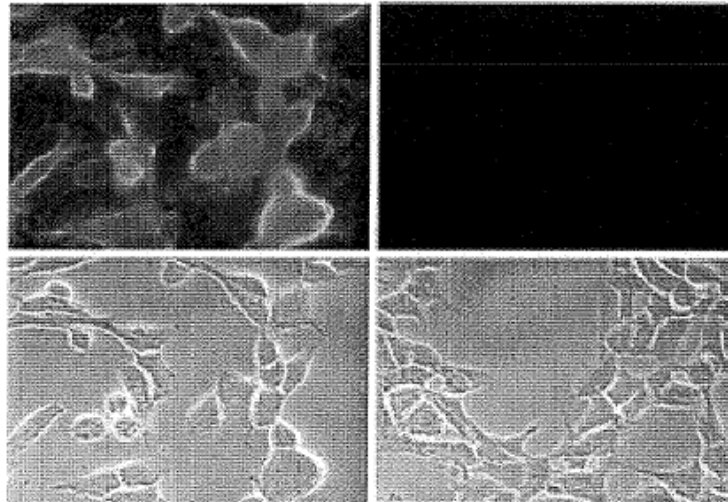
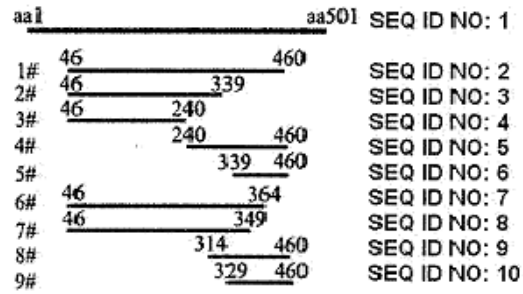
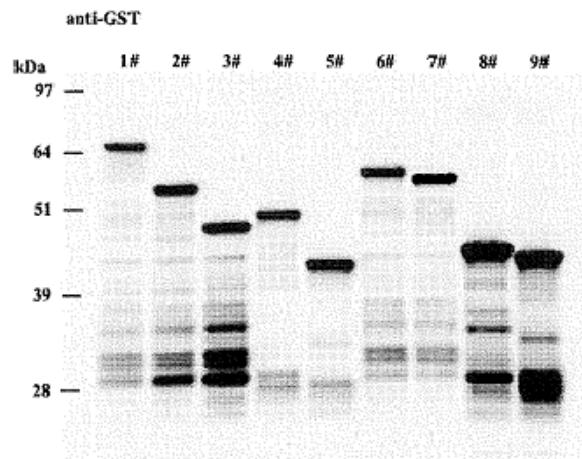


Figura 9

A.



B.



C.

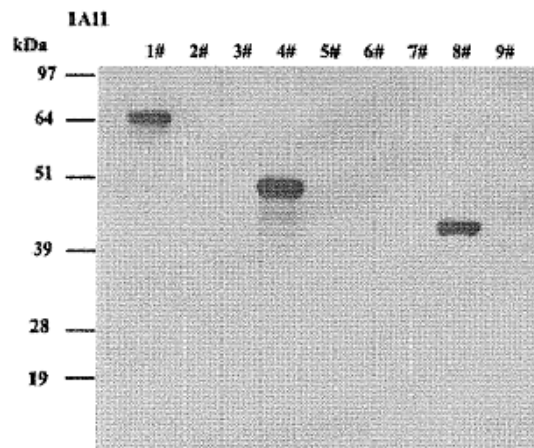


Figura 10

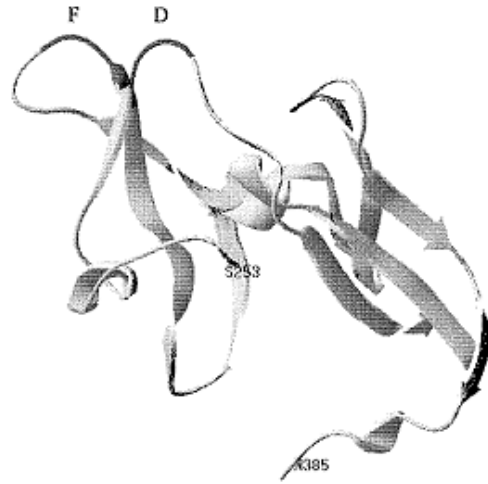
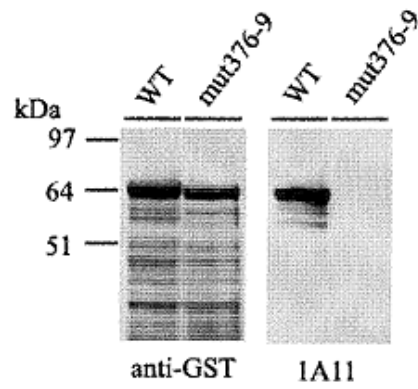


Figura 11

A



B

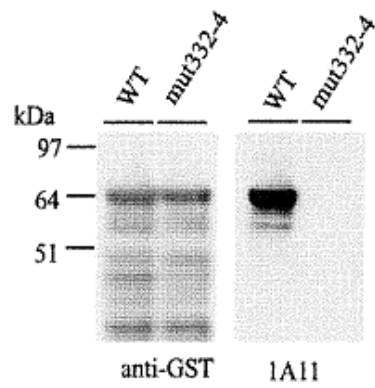
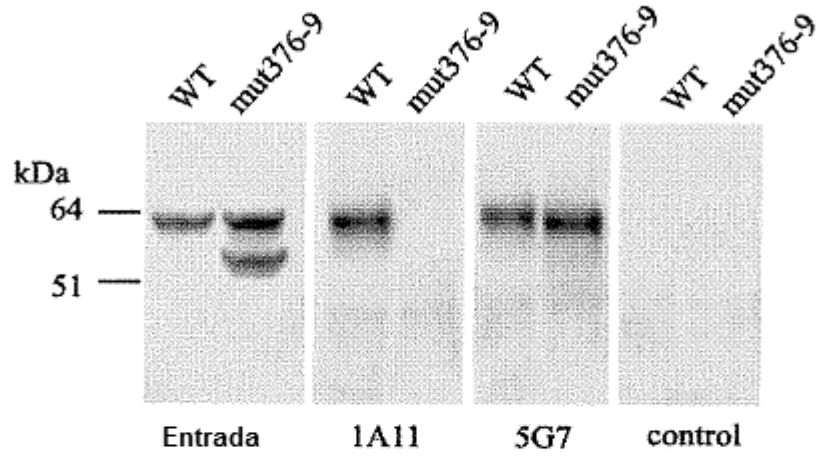


Figura 12

A



B

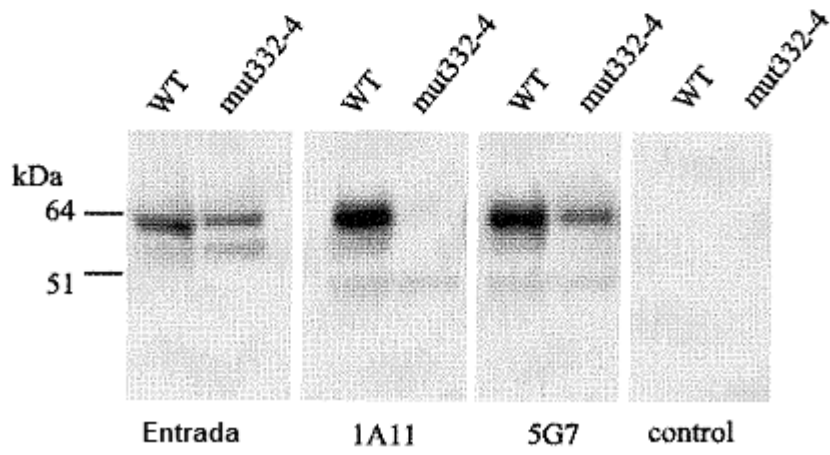
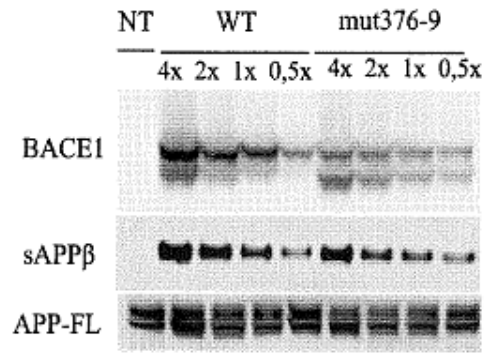


Figura 13

A



B

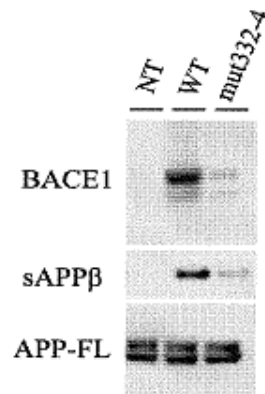


Figura 14

```
1  MAQALPWLLL WMGAGVLP AH GTQHGIRLPL RSGLGGAPLG LRLPRETDEE PEEPGRRGSF
61  VEMVDNLRGK SGQGYVEMT VGSPPQTLNI LVDTGSSNFA VAAAPHPFLH RYYQRQLSST
121 YRDLRKGYYV PYTQKWEGE LGTDLVSIPH GPNVTVRANI AAITESDKFF INGSNWEGIL
181 GLAYAEIARP DDSLEPPFDS LVKQTHV PNL FSLQLCGAGF PLNQSEVLAS VGGSMIIGGI
241 DHSLYTGSLW YTPIRREWYY EVIIVRVEIN GQDLKMDCKE YNYDKSIVDS GTTNLRLPKK
301 VFEAAVKS IK AASSTEKFPD GFWLGEQLVC WQAGTTPWNI FPVISLYLMG EVTNQSFRIT
361 ILPQQYLRPV EDVATSQDDC YKFAISQSST GTVMGAVIME GFYVVFDRAR KRIGFAVSAC
421 HVHDEFRTAA VEGPFVTLDM EDCGYNIPQT DESTLMTIAY VMAAICALFM LPLCLMVCQW
481 RCLRCLRQQH DDFADDISLL K
```