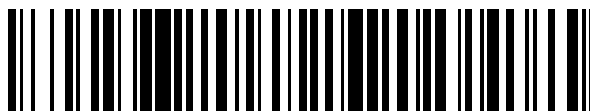


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 002**

51 Int. Cl.:

C12N 15/53	(2006.01)	G01N 33/573	(2006.01)
A61K 31/7088	(2006.01)	C12N 9/00	(2006.01)
A61K 38/44	(2006.01)	A61K 31/713	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)		
A61K 39/395	(2006.01)		
A61K 48/00	(2006.01)		
A61P 25/28	(2006.01)		
C07K 16/40	(2006.01)		
C12N 5/12	(2006.01)		
C12N 9/02	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2007** **E 12161575 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016** **EP 2495327**

54 Título: **Métodos y composiciones para tratar y detectar enfermedades mediadas por SOD1 mal plegada**

30 Prioridad:

03.03.2006 US 778379 P
 03.03.2006 US 367609
 09.05.2006 US 798728 P
 09.05.2006 US 798727 P
 01.12.2006 US 565967

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.04.2017

73 Titular/es:

PROMIS NEUROSCIENCES INC. (50.0%)
1920 Yonge Street, Suite 200
Toronto, ON M4S 3E2 , CA y
UNIVERSITY HEALTH NETWORK (50.0%)

72 Inventor/es:

CASHMAN, NEIL;
CHAKRABARTTY, AVIJIT;
RAKHIT, RISHI y
OSTERMANN, JOACHIM, BERNHARD

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 608 002 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

Métodos y composiciones para tratar y detectar enfermedades mediadas por SOD1 mal plegada

5 Campo de la invención

La invención se refiere a composiciones y su uso en el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica.

Antecedentes de la invención

10

Mal plegamiento y agregación de proteínas

Las proteínas pueden plegarse en estructuras complejas y muy compactadas. El plegamiento no es solamente crucial para la actividad biológica, sino que el fallo de las proteínas en plegarse apropiadamente o en permanecer plegadas puede dar lugar a enfermedades (revisado en 48). El mal plegamiento puede causar, en algunos casos, la agregación de proteínas, que puede dar lugar adicionalmente a depósitos concretos extracelularmente (por ejemplo, placas) o intracelularmente (por ejemplo, inclusiones en el citosol o en el núcleo).

15

Las enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD), enfermedad de Huntington (HD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y enfermedades por priones se caracterizan por depósitos neurales de proteína agregada mal plegada (revisado en 49).

20

Las enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y enfermedad de Parkinson/demencia con cuerpos de Lewy (PD, LBD) también plantean grandes desafíos para nuestra población envejecida y para el sistema de asistencia sanitaria.

25

AD, ALS y PD/LBD esporádica están asociadas con acumulación neural de multímeros patológicos de polipéptidos mal plegados (estos podrían ser preferentemente fibrillas, protofilamentos y agregados amorfos), incluyendo el fragmento amiloide beta (Abeta) de la proteína precursora amiloide (APP) en AD; la superóxido dismutasa-1 (SOD1) en ALS, AD y PD, y la alfa-sinucleína en PD y LBD. Adicionalmente la polineuropatía amiloidótica familiar (FAP) resulta de la agregación de transtiretina para formar depósitos amiloides. Como con las enfermedades por priones, mutaciones en genes que codifican estos polipéptidos están asociadas con formas familiares dominantes autosómicas de AD, ALS y PD.

30

35 ALS y mal plegamiento de proteínas

La esclerosis lateral amiotrófica (ALS) es una enfermedad neuromuscular mortal que afecta a aproximadamente 30.000 pacientes en Norte América, con 5.000 nuevos casos por año. En ALS, también conocida como "enfermedad de Lou Gehrig", los músculos de las extremidades, para hablar y tragar, y la respiración se debilitan y atrofian, debido a la degeneración de las células nerviosas motoras que los alimentan desde la médula espinal y el cerebro. La mitad de los pacientes afectados mueren en 3 años, siendo la supervivencia de más de 5 años de menos del 20 %.

40

ALS pertenece a una familia de trastornos neurodegenerativos mortales, que incluye enfermedades por priones, enfermedades de Alzheimer y Parkinson, y en que se cree que las proteínas mal plegadas agregadas causan eliminación progresiva de las células cerebrales. Aproximadamente el 20 % de ALS familiar (hereditaria) está asociada con mutaciones en el gen que codifica la superóxido dismutasa-1 (SOD1), una enzima de defensa de radicales libres intracelular (véase 73 y la Tabla 1 para la lista de mutaciones conocidas). Los depósitos intracelulares de SOD1 mal plegada agregada se han observado en ALS familiar, y también en la ALS no familiar más común (esporádica), que sugiere que la agregación de SOD1 puede subyacer a todas las ALS.

50

Los experimentos realizados en cultivo celular y ratones transgénicos para SOD1 mutante humana han establecido que SOD1 mal plegada extracelular es muy tóxica para las neuronas motoras (1), en parte por activación de las rutas de eliminación por células inmunitarias locales (microglía). Recientemente, también ha quedado claro que SOD1 mal plegada se exporta de la célula por mecanismos tanto secretores como constitutivos (1, 2).

55

La agregación de SOD1 puede progresar a través de un mecanismo de mal plegamiento dirigido por molde basado en proteína (3) similar al propuesto para las enfermedades por priones (4). Por tanto, SOD1 mal plegada en el espacio extracelular no solamente es directamente tóxica para las neuronas motoras, sino que también participa en la propagación de una célula a otra de la enfermedad en todo el sistema nervioso por un proceso de mal plegamiento con un molde tipo prión.

60

TABLA 1. Mutaciones detectadas en SOD1 en FALS.

Aminoácidos	Mutación	Aminoácidos	Mutación	Aminoácidos	Mutación
4	A -> S (en FALS).	67	L -> R (en FALS).	112	I -> M (en FALS).
4	A -> T (en FALS).	72	G -> S (en FALS).	112	I -> T (en FALS).
4	A -> V (en FALS).	76	D -> Y (en FALS).	113	I -> T (en FALS).
6	C -> F (en FALS).	80	H -> A (en ALS).	114	G -> A (en FALS).
7	V -> E (en FALS).	84	L -> F (en FALS).	115	R -> G (en FALS).
8	L -> Q (en FALS).	84	L -> V (en FALS).	118	V -> VFLQ (en FALS).
8	L -> V (en FALS).	85	G -> R (en FALS).	124	D -> V (en FALS).
12	G -> R (en FALS).	86	N -> S (en FALS).	125	D -> H (en FALS).
14	V -> G (en FALS).	89	A -> V (en FALS).	126	L -> S (en FALS).
14	V -> M (en FALS).	90	D -> A (en FALS).	133	Ausente (en ALS).
16	G -> S (en ALS).	90	D -> V (en FALS).	134	S -> N (en FALS).
21	E -> G (en FALS).	93	G -> A (en FALS).	139	N -> K (en FALS).
21	E -> K (en FALS).	93	G -> C (en FALS).	144	L -> F (en FALS).
37	G -> R (en FALS).	93	G -> D (en FALS).	144	L -> S (en FALS).
38	L -> R (en FALS).	93	G -> R (en FALS).	145	A -> T (en FALS).
38	L -> V (en FALS).	93	G -> V (en FALS).	146	C -> R (en FALS).
41	G -> D (en FALS).	100	E -> G (en FALS).	148	V -> G (en FALS).
41	G -> S (en FALS).	100	E -> K (en FALS).	148	V -> I (en FALS).
43	H -> R (en FALS).	101	D -> G (en FALS).	149	I -> T (en FALS).
45	F -> C (en FALS).	101	D -> N (en FALS).	151	I -> T (en FALS).
46	H -> R (en FALS).	104	I -> F (en FALS).		
48	H -> Q (en FALS).	105	S -> L (en FALS).		
49	E -> K (en FALS).	106	L -> V (en FALS).		
65	N -> S (en FALS).	108	G -> V (en FALS).		

Enfermedad de Alzheimer

- 5 AD es una enfermedad neurodegenerativa de demencia común (memoria y cognición alteradas) asociada con la acumulación en el cerebro de placas extracelulares compuestas predominantemente de los péptidos Abeta (1-40), Abeta (1-42) y Abeta (1-43), todos los cuales son productos proteolíticos de APP (revisado en 50). Además, los haces neurofibrilares, compuestos principalmente de proteína tau fosforilada de forma anormal (una proteína asociada con microtúbulos neuronales), se acumulan de forma intracelular en neuronas que mueren (revisado en 49). Las formas familiares de AD pueden estar causadas por mutaciones en el gen APP, o en los genes de presenilina 1 o 2 (revisado en 51), cuyos productos proteicos están implicados en el procesamiento de APP en Abeta. Las variantes alélicas de Apolipoproteína E también influyen en la edad de la aparición de las formas tanto esporádica como familiar de AD (revisado en 52). Abeta, tau y tau fosforilada se han detectado en la sangre y CSF de pacientes con AD y en controles normales (53 - 55). La inmunización de pacientes con enfermedad de Alzheimer con Abeta ha demostrado algunos resultados de tratamiento preliminares prometedores, aunque limitados por meningoencefalitis autoinmunitaria en seres humanos (56 - 58).

Enfermedad de Parkinson

- 20 PD es un trastorno neurodegenerativo del movimiento, el segundo solamente tras AD en predominancia (-350 por 100.000 habitantes, revisado en 59). Se caracteriza clínicamente por rigidez, lentitud de movimientos y temblores. La mayoría de los casos de enfermedad de Parkinson son esporádicos, pero las formas tanto esporádicas como familiares de la enfermedad se caracterizan por cuerpos de Lewy intracelulares en neuronas que mueren de la sustancia negra, una población de neuronas del mesencéfalo (-60.000) que se han diezmado selectivamente en PD. Los cuerpos de Lewy están compuestos predominantemente de alfa-sinucleína (60). Las mutaciones en, y la duplicación de, el gen que codifica la alfa-sinucleína se han encontrado en pacientes con enfermedad de Parkinson familiar (revisado en 61). Otro gen asociado con PD recesiva autosómica es parkina, que está implicada en la degradación de la alfa-sinucleína (61). Los cuerpos de Lewy corticales difusos compuestos de alfa-sinucleína se observan en enfermedad con cuerpos de Lewy (LBD), un síndrome de demencia asociado con cambios parkinsonianos de tono, alucinaciones y fluctuación rápida de los síntomas (62). LBD puede ser la segunda forma más común de demencia neurodegenerativa después de AD, representando del 20 al 30 por ciento de los casos entre las personas por encima de la edad de 60 años. Similar al enfoque de vacuna para la enfermedad de Alzheimer (58 - 60) se han obtenido resultados prometedores en un modelo de ratón de enfermedad de Parkinson/con cuerpos de Lewy por inmunización con alfa-sinucleína (63). Otros síndromes de demencia incluyen demencias frontotemporales, enfermedad de Pick y demencia corticobasal, y otros conocidos para la medicina neurológica.

SOD1 se ha detectado en agregados proteicos de AD y PD

- 40 El estrés oxidativo se ha implicado en varias enfermedades neurodegenerativas, incluyendo ALS, PD y AD. Las

especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS respectivamente) generadas en estos entornos pueden participar en la lesión celular, incluyendo la oxidación anormal de proteínas o lípidos. Otras marcas distintivas patológicas de dicha enfermedad incluyen acumulaciones de desechos citoesqueléticos y muerte neuronal selectiva, frecuentemente atribuida a estrés oxidativo y la proteína soluble acumulada (74-81). Varias enzimas, incluyendo SOD1, tienen papeles antioxidantes. Las alteraciones en la actividad de dichas enzimas pueden contribuir a un estado patológico neurodegenerativo.

Recientemente, Choi et al. (64) informó de que SOD1 es una diana principal del daño oxidativo en cerebros AD y PD. Apreciaron que el nivel total de SOD1 está aumentado tanto en AD como en PD y que SOD1 forma agregados proteicos que se asocian con placas seniles amiloides y haces neurofibrilares en cerebros AD. Choi et al. (64) han sugerido que AD, PD y ALS pueden compartir un mecanismo patogénico común. También se ha demostrado recientemente que SOD1 se secreta en el espacio extracelular, en una forma que es tóxica para las neuronas, pero más accesible por agentes terapéuticos extracelulares (1).

La implicación de que SOD1 mal plegada extracelular desempeña un papel en la patogénesis de ALS proporciona una oportunidad para el tratamiento con anticuerpos de enfermedades autodegenerativas, ya que este compartimento es accesible para la neutralización por anticuerpos. En seres humanos normales, las IgG pueden cruzar la barrera hematoencefálica hasta niveles entre 1/100 y 1/1000 de las concentraciones en circulación; y una trasudación de inmunoglobulinas a menudo está aumentada en enfermedades que afectan a la barrera hematoencefálica. Sin embargo, el tratamiento de pacientes humanos con anticuerpos o vacunas dirigidas a epítomos extracelulares accesibles sobre proteínas ubicuas puede conducir a efectos autoinmunitarios nocivos tales como los observados con Abeta en enfermedad de Alzheimer. Por tanto, sigue existiendo una necesidad en la técnica de composiciones y métodos para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades relacionadas con SOD1 mal plegada, tales como ALS, AD y PD.

Goldberg (2005) "SESSION 7A Protein Folding and Degradation Defects", Amyotrophic Lateral Sclerosis Vol. 6, N.º 4, Supl. 1: páginas 33-35 describe una SOD1 monomérica/mal plegada C45 detectada en modelos de ratón de ALS usando un anticuerpo diseñado.

El documento WO 2007/025385 describe un anticuerpo que se une específicamente a una superóxido dismutasa 1 (SOD1) anormal, y que neutraliza su efecto patológico cuando se administra a un animal tal como a un ser humano. El anticuerpo es un anticuerpo monoclonal producido por líneas celulares de hibridoma depositadas en la International Depository Authority of Canada el 29 de agosto de 2006 con los números de acceso ADI-290806-01, ADI-290806-02 y ADI-290806-03. También se describe el uso del anticuerpo en el tratamiento, prevención y diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas tales como esclerosis lateral amiotrófica, Parkinson y Alzheimer en un animal tal como en un ser humano.

El documento US 5.849.290 y la base de datos Geneseq (24 de febrero de 2009) "Human Cu/Zn SOD exon 2 protein fragment", recuperado del número de acceso EBI GSP: AAW82448 describe la secuencia de aminoácidos del fragmento de la proteína SOD Cu/Zn humana codificado por el exón 2 del gen SOD1.

Sumario de la invención

SOD1 mal plegada es tóxica para las neuronas (1) y se cree que participa en la muerte celular neuronal y la disfunción en esclerosis lateral amiotrófica y otras enfermedades neurodegenerativas. La presente invención usa epítomos específicos de enfermedad por SOD1 (DSE) como una diana para vacunas o inmunoterapia para esclerosis lateral amiotrófica. También se describen DSE como una diana para vacunas o inmunoterapia para (ALS), enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD) y enfermedades con cuerpos de Lewy (LBD). La invención aísla y aborda epítomos que se presentan selectivamente por formas no nativas de SOD1 que están asociadas con ALS. Estos epítomos no se presentan o están accesibles en formas nativas de SOD1. Por ejemplo, los epítomos específicos de enfermedad tales como específicos de ALS, específicos de AD y específicos de PD, no se presentan por las formas dimericas nativas de SOD1. Sin embargo, los epítomos específicos de enfermedad se presentan o están accesibles cuando el monómero SOD1 no logra asociarse o se disocia de su estado homodimérico normal, y en otras formas no nativas de SOD1, incluyendo monómeros de SOD1 mal plegados, dímeros de SOD1 mal plegados y agregados de SOD1. Estos epítomos se presentan selectivamente o están accesibles en formas no nativas de SOD1, y son característicos de afecciones, enfermedades y trastornos relacionados con SOD1 no nativa.

En esta solicitud, epítomos "específicos de ALS" se refiere a epítomos que se presentan en las formas asociadas a ALS de SOD1, epítomos "específicos de AD" se refiere a epítomos que se presentan en las formas asociadas a AD de SOD1, y epítomos "específicos de PD" se refiere a epítomos que se presentan en las formas asociadas a PD de SOD1 que surgen de procesos tales como mal plegamiento, agregación o disociación. SOD1 mal plegada presenta muchos de los mismos epítomos en cada uno de ALS, AD y PD, sin embargo, por conveniencia en este documento, los epítomos se describen como "específicos" a esa enfermedad porque, dentro del organismo de un sujeto particular, los epítomos se presentan específicamente solamente en la SOD1 tóxica no nativa que causa, subyace o está asociada con la enfermedad neurodegenerativa. Dichos epítomos específicos de enfermedad, por tanto,

incluyen los epítomos sobre el monómero de SOD1 que se revelan cuando el monómero de SOD1 se disocia de su estado homodimérico normal, los epítomos se presentan selectivamente o están accesibles en formas de SOD1 no nativas incluyendo monómero de SOD1 mal plegado, dímero de SOD1 mal plegado y los epítomos se presentan selectivamente o están accesibles en agregados de SOD1.

5 La presente invención proporciona composiciones, anticuerpos aislados, inmunógenos y usos de dichas composiciones, anticuerpos aislados e inmunógenos en el tratamiento de ALS, así como hibridomas, kits y métodos para obtener dichos anticuerpos como se define en las reivindicaciones adjuntas.

10 Se describen epítomos que se presentan por o están accesibles en formas no nativas de SOD1, incluyendo:

DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) (documento WO 2005/019828);
 NPLSRKHGGPKDEE (DSE3) (documento WO 2005/019828);
 IKGLTEGLHGF (DSE5) (8);
 15 HCIIGRTLTVH (DSE 6) (8); y
 GLHGFHVH (DSE7),

así como los epítomos adicionales que se presentan por o están accesibles solamente en formas monoméricas de SOD1, que incluyen:

20 RLACGVIGI (DSE1); y
 KAVCVLK (DSE4).

La presente solicitud describe estos epítomos y/o determinantes antigénicos contenidos dentro de estos epítomos, y
 25 asimismo cualquier epítomo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1, como dianas para intervención inmunoterapéutica. Por ejemplo, los péptidos aislados correspondientes a estos epítomos son útiles para reducir o inhibir la participación de SOD1 monomérica, dimérica o mal plegada en agregación de SOD1, que es característica de trastornos relacionados con SOD1 mal plegada, tal como esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer y/o enfermedad de Parkinson. Por consiguiente, los péptidos aislados correspondientes a
 30 estos epítomos pueden usarse para tratar esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer y/o enfermedad de Parkinson y pueden usarse para provocar una respuesta inmunitaria selectiva en un animal contra las moléculas SOD1 monoméricas, agregadas o mal plegadas, y para inhibir o neutralizar el efecto tóxico de estas especies de SOD1 mal plegadas en neuronas. En el caso donde el péptido aislado correspondiente a un epítomo específico de enfermedad se usa en una vacuna, el péptido aislado puede ser cualquier análogo de los péptidos aislados
 35 indicados que produce anticuerpos endógenos contra ese epítomo. Además, el inventor proporciona proteínas de unión tales como anticuerpos y fragmentos que se unen a los epítomos específicos de esclerosis lateral amiotrófica, anticuerpos y fragmentos que se unen a epítomos específicos de enfermedad de Alzheimer y anticuerpos y fragmentos que se unen a epítomos específicos de enfermedad de Parkinson. Estos anticuerpos pueden usarse para detectar o tratar la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

40 Por consiguiente, se describe una composición útil para inhibir la agregación de SOD1 mediada por SOD1 monomérica o mal plegada, y por tanto para tratar trastornos de SOD1 incluyendo enfermedades neurodegenerativas tales como esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer y/o enfermedad de Parkinson. Por consiguiente, se describe una composición para tratar una enfermedad neurodegenerativa tal como
 45 ALS, AD o PD en un sujeto, que comprende una cantidad eficaz de un péptido aislado correspondiente a un epítomo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 (opcionalmente mencionado como un epítomo específico de enfermedad), o un inmunógeno que comprende dicho péptido, en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado, tal como uno farmacéuticamente aceptable. También se describe una composición para tratar ALS en un sujeto, que comprende una cantidad eficaz de un péptido aislado correspondiente a un epítomo presentado
 50 selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1, o un análogo del mismo que provoca anticuerpos endógenos que se unen a ese epítomo o un inmunógeno que comprende dicho péptido aislado, en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado, tal como uno farmacéuticamente aceptable. También se describe una composición para tratar AD en un sujeto, que comprende una cantidad eficaz de un péptido aislado correspondiente a un epítomo
 55 presentado selectivamente o asociado con formas no nativas de SOD1, o un análogo del mismo que provoca anticuerpos endógenos que se unen a ese epítomo o un inmunógeno que comprende dicho péptido aislado o análogo, en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado, tal como uno farmacéuticamente aceptable. También se describe una composición para tratar PD en un sujeto, que comprende una cantidad eficaz de un péptido aislado correspondiente a un epítomo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1, o un
 60 inmunógeno que comprende dicho péptido, en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado, tal como uno farmacéuticamente aceptable.

Se describe un péptido aislado correspondiente a un epítomo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1, que se selecciona del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla 2 o de la Tabla 2A (descritas a continuación) o un análogo de los mismos.

65

Tabla 2. Péptidos aislados correspondientes a epítomos selectivamente accesibles en formas no nativas de SOD1

5 RLACGVIGI (SEQ ID NO: 1, DSE1);
 DLGKGGNEESTKTGNAGS (SEQ ID NO: 2, DSE2);
 NPLSRKHGGPKDEE; (SEQ ID NO: 3, DSE3):

10 IKGLTEGLHGF; SEQ ID NO: 5, DSE5);
 HCIIGRTLTVH; SEQ ID NO: 6, DSE6);
 RLA[ácido cisteico]GVIGI (DSE1a); SEQ ID NO: 8, DSE1a);
 KAVCVLK (DSE4); SEQ ID NO: 4, DSE4) y GLHGFHVH (DSE7) SEQ ID NO: 7, DSE7).

15 Estos péptidos aislados enumerados en la Tabla 2 se mencionan en este documento como los "péptidos aislados de la Tabla 2".

20 Se describe una composición farmacéutica para tratar la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto, que comprende una cantidad eficaz de un epítomo específico de esclerosis lateral amiotrófica aislado, o un inmunógeno que comprende dicho epítomo, en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado, tal como uno farmacéuticamente aceptable. En una descripción, el epítomo o una forma inmunogénica del mismo se presenta selectivamente o es accesible en la forma monomérica de SOD1. Dichos epítomos incluyen aquellos que reconocen un epítomo del monómero SOD1 que descansa normalmente en la superficie de contacto del dímero SOD1. Otro de dichos epítomos son aquellos accesibles en la superficie de SOD1 cuando lo monómeros de SOD1 están en su estado asociado normal, por ejemplo, cuando SOD1 está en su forma dimérica o cuando está en su forma agregada. En descripciones particulares, el péptido aislado correspondiente a un epítomo específico de esclerosis lateral amiotrófica se selecciona del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

30 También son útiles análogos de los péptidos aislados y péptidos aislados modificados. Los análogos y péptidos aislados modificados comprenden péptidos de origen *in vivo* y modificados por ingeniería molecular correspondientes a los epítomos presentados o accesibles en formas no nativas de SOD1 que retienen la capacidad de provocar la producción de anticuerpos que reconocen específicamente los epítomos correspondientes en formas monoméricas, mal plegadas o agregadas de SOD1. En una descripción, el análogo peptídico aislado comprende un ácido cisteico. Se describe un péptido aislado análogo correspondiente a un epítomo que comprende RLAC*GVIGI (DSE1 a), donde * indica una cisteína oxidada, en forma de ácido cisteico.

35 Se describe una composición para tratar un trastorno, enfermedad o afección mediada por SOD1 que comprende una cantidad eficaz de un ácido nucleico aislado que codifica un péptido o análogo correspondiente a un epítomo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado. Se describe una composición para tratar la esclerosis lateral amiotrófica, que comprende una cantidad eficaz de un ácido nucleico aislado que codifica un péptido correspondiente a un epítomo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 en mezcla con diluyente o vehículo adecuado.

40 En una descripción, el ácido nucleico codifica un péptido aislado correspondiente a un epítomo seleccionado del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

45 Se describe una composición para tratar la esclerosis lateral amiotrófica, que comprende una cantidad eficaz de un ácido nucleico que codifica un péptido aislado correspondiente a un epítomo específico de esclerosis lateral amiotrófica en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado, donde el péptido aislado correspondiente al epítomo específico de esclerosis lateral amiotrófica se selecciona del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla 2 o de la tabla 2A, o un análogo de los mismos.

50 Estas composiciones pueden usarse para tratar la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Alzheimer y/o la enfermedad de Parkinson y en métodos para tratar la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Alzheimer y/o la enfermedad de Parkinson.

55 Las composiciones son útiles particularmente para tratar una enfermedad neurodegenerativa usando inmunoterapia dirigida a un epítomo presentado en SOD1 mal plegada, donde el tratamiento comprende inmunoterapia activa, es decir, terapia basada en vacuna en que el péptido aislado correspondiente a un epítomo se usa en un inmunógeno para producir anticuerpos que reconocen SOD1 monomérica o mal plegada en el destinatario, o comprende inmunoterapia pasiva en que se administra un anticuerpo contra el péptido aislado correspondiente al epítomo al destinatario. La composición típicamente es una composición farmacéutica.

60 Por consiguiente, se describe una composición para provocar una respuesta inmunitaria en un animal, que comprende una cantidad eficaz de un péptido aislado correspondiente a un epítomo presentado en formas no nativas de SOD1 en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado. La afección, enfermedad o trastorno médico incluye, aunque sin limitación, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson.

5 Otra descripción es una composición para provocar una respuesta inmunitaria en un animal, que comprende una cantidad eficaz de un péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado, donde el péptido aislado correspondiente al epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica se selecciona del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

10 En una descripción, la composición es una composición farmacéutica para tratar la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto por inmunización activa, que comprende una cantidad eficaz de un péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica, o un inmunógeno que comprende dicho péptido aislado correspondiente a dicho epítipo, en mezcla con un vehículo adecuado, tal como un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. En una descripción, el péptido aislado o una forma inmunogénica del mismo corresponde a un epítipo presentado selectivamente o accesible en la forma monomérica de SOD1. Dichos epítipos incluyen aquellos epítipos en el monómero de SOD1 que normalmente descansa en la superficie de contacto del dímero de SOD1. Otros de dichos epítipos son aquellos accesibles en la superficie de SOD1 cuando
15 está en forma dimerica, o cuando SOD1 está en su forma agregada. Se describe el péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica que se selecciona del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

20 Se describe una composición para provocar una respuesta inmunitaria en un animal, que comprende una cantidad eficaz de un ácido nucleico que codifica un péptido correspondiente a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1, en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado. La afección, enfermedad o trastorno médico es un trastorno de SOD1 tal como una enfermedad neurodegenerativa que incluye, aunque sin limitación, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson.

25 Una descripción adicional es una composición para provocar una respuesta inmunitaria en un animal, que comprende una cantidad eficaz de un ácido nucleico que codifica un péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado, donde el péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica se selecciona del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

30 Estas composiciones son útiles para provocar una respuesta inmunitaria en un animal y son útiles en métodos para provocar una respuesta inmunitaria en un animal contra formas no nativas de SOD1, incluyendo una respuesta inmunitaria contra epítipos específicos de esclerosis lateral amiotrófica, epítipos específicos de enfermedad de Alzheimer y/o epítipos específicos de enfermedad de Parkinson.

35 Estas composiciones son útiles para generar proteínas de unión, tales como anticuerpos contra formas no nativas de SOD1, incluyendo anticuerpos que se unen a epítipos específicos de esclerosis lateral amiotrófica, epítipos específicos de enfermedad de Alzheimer y/o epítipos específicos de enfermedad de Parkinson.

40 Por consiguiente, se describen anticuerpos exógenos específicos para formas no nativas de SOD1, incluyendo epítipos específicos de esclerosis lateral amiotrófica, epítipos específicos de enfermedad de Alzheimer y/o epítipos específicos de enfermedad de Parkinson.

45 En una descripción, los anticuerpos específicos para formas no nativas de SOD1 se producen usando una composición que comprende un péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de enfermedad seleccionado del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

50 En una descripción, el anticuerpo se une al epítipo RLACGVIGI. En otra descripción, el anticuerpo se une al epítipo DLGKGGNEESTKTGNAGS. En otra descripción, el anticuerpo se une al epítipo NPLSRKHGGPKDEE. En un aspecto de la invención, el anticuerpo se une al epítipo IKGLTEGLHGF. En otra descripción, el anticuerpo se une al epítipo HCIIGRTLVVH. En otra descripción, el anticuerpo se une al epítipo RLAC*GVIGI. En otra descripción, el anticuerpo se une al epítipo KAVCVLK. En un aspecto de la invención, el anticuerpo se une al epítipo GLHGFHVH.

55 Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos y/o fragmentos de unión a epítipo y análogos de los mismos. La invención comprende adicionalmente hibridomas que producen anticuerpos contra DSE5. Las realizaciones de la presente invención incluyen los hibridomas per se, así como la descendencia de los mismos, fusiones posteriores con los mismos y ADN y ARN endógeno que codifica el anticuerpo contra SOD1. En aspectos
60 relacionados, la invención, por tanto, proporciona adicionalmente un método para producir anticuerpos que se unen selectivamente a DSE5, que comprende la etapa de cultivar los hibridomas. Estos anticuerpos son útiles para tratar la esclerosis lateral amiotrófica por inmunización pasiva. Por ejemplo, inhiben o neutralizan el efecto tóxico de estas especies mal plegadas de SOD1 en las neuronas, y/o evitan la progresión de la enfermedad por eliminación inmunológica de agregados tóxicos de SOD, inhibiendo la agregación de SOD1 mediada por SOD1 mal plegada, y/o
65 bloqueando el proceso de mal plegamiento dirigido por molde SOD1. Por tanto, la invención incluye composiciones útiles para tratar la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto, que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo

específico para DSE5 o DS7 en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado.

Además de los anticuerpos, también se describen otros agentes que se unen específicamente a epítomos presentados o accesibles en formas no nativas de SOD1 y no presentados o accesibles en formas nativas de SOD1.

5 Los agentes que se unen incluyen polipéptidos, moléculas pequeñas, aptámeros nucleicos o peptídicos, anticuerpos y anticalinas.

10 Más generalmente, se describe un método para tratar a un sujeto que tiene una afección, enfermedad o trastorno médico mediado por una forma no nativa de la superóxido dismutasa (SOD), comprendiendo el método la etapa de administrar al sujeto una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente seleccionado de (1) una proteína en forma de un anticuerpo o fragmento del mismo que se une selectivamente a la forma monomérica o mal plegada de SOD1, y/o (2) un inmunógeno que provoca la producción de dicho anticuerpo por dicho sujeto, y/o (3) una secuencia de ácido nucleico que codifica (1) o (2).

15 Los métodos descritos, por tanto, se refieren a aplicaciones inmunoterapéuticas de anticuerpos contra SOD1 que se unen selectivamente a epítomos accesibles en las formas monoméricas o mal plegadas de SOD1 presentes en estados patológicos. El método puede realizarse como monoterapia, en que un anticuerpo cualquiera o un epítomo cualquiera se administra al sujeto. Como alternativa, el método puede realizarse como una terapia de combinación, en que el sujeto se trata para recibir tanto un anticuerpo o péptido seleccionado correspondiente a un epítomo como otro agente útil en el tratamiento o control de la enfermedad.

20 Estos anticuerpos son útiles para detectar formas no nativas de formas monoméricas, diméricas o agregadas de SOD1, y de ese modo son útiles para diagnosticar la esclerosis lateral amiotrófica. Se describe un método de detección o diagnóstico de la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto, que comprende las etapas de:

25 (a) poner en contacto una muestra de ensayo de dicho sujeto con un anticuerpo específico para un epítomo específico de esclerosis lateral amiotrófica, donde el anticuerpo se une a un epítomo específico de esclerosis lateral amiotrófica para producir un complejo de anticuerpo-antígeno;

(b) medir la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno en la muestra de ensayo; y

30 (c) comparar la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno en la muestra de ensayo con un control donde una diferencia en la cantidad del complejo de anticuerpo-antígeno en la muestra de ensayo en comparación con el control es indicativa de esclerosis lateral amiotrófica. Opcionalmente, y en el caso donde el epítomo SOD1 mal plegado está enmascarado dentro de una agregación de SOD1, el método proporciona la etapa de tratar la muestra para promover la disgregación del agregado de SOD1 para exponer el epítomo diana antes de la etapa

35 (a).

Estos anticuerpos y/o fragmentos de unión de los mismos se conjugan de forma útil con marcadores para producir un agente de diagnóstico.

40 Se describen kits que comprenden las composiciones y anticuerpos descritos para tratar enfermedades neurodegenerativas tales como esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson, por ejemplo para inhibir la agregación de SOD1; para provocar una respuesta inmunitaria en un animal; o para detectar SOD1 mal plegada, y de ese modo diagnosticar una enfermedad neurodegenerativa tal como esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson.

45 También se describen novedosos péptidos aislados. En una descripción los péptidos aislados novedosos comprenden péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

50 RLACGVIGI (SEQ ID NO: 1, DSE1)

ACGVIGI (SEQ ID NO: 9, análogo de DSE1)

Ac-GG-RLACGVIG-GGKG (SEQ ID NO: 10, análogo de DSE1)

CDLGKGGNEESTKTGNAGS (SEQ ID NO: 11, análogo de DSE2)

CNPLSRKHGGPKDEE (SEQ ID NO: 12, análogo de DSE3)

CIKGLTEGLHGF (SEQ ID NO: 14, análogo de DSE5)

55 RLA[Ácido cisteico]GVIGI (SEQ ID NO: 8, DSE1a)

A[Ácido cisteico]GVIGI (SEQ ID NO: 13, análogo de DSE1a)

C-GGG-RLA[Ácido cisteico]GVIGI-GSG (SEQ ID NO: 15, análogo de DSE1a)

KAVCVLK (SEQ ID NO: 4, DSE4);

GSGKAVCLK (SEQ ID NO: 16, análogo de DSE 4); y

60 GLHGFHVH (SEQ ID NO: 7, DSE7).

En otra descripción, la invención comprende novedosos péptidos aislados modificados que comprenden RLA[Ácido cisteico]GVIGI (SEQ ID NO: 8, DSE1a), donde el resto de cisteína es ácido cisteico.

65 En descripciones relacionadas, estos péptidos se proporcionan en forma marcada, o como conjugados o fusiones, por ejemplo, "inmunógenos" útiles para producir anticuerpos o detectar SOD1 y para otros usos de diagnóstico y

terapéuticos. Dichos inmunógenos comprenden los péptidos acoplados, por ejemplo, a KLH o a antígeno MAP.

Ciertas descripciones se refieren a un método de i) provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto y/o ii) (tratar una afección, enfermedad o trastorno médico mediado por una forma mal plegada de la superóxido dismutasa (SOD) en un sujeto que necesita tratamiento, que comprende administrar una composición que comprende un ácido nucleico que codifica un inmunógeno aislado específico de esclerosis lateral amiotrófica (por ejemplo, péptido) de la invención en mezcla con un diluyente o un vehículo adecuado al sujeto. Por supuesto, dichos ácidos nucleicos codificarán solamente aquellas formas de los epítomos y péptidos que consisten en aminoácidos codificados genéticamente, pero los ácidos nucleicos también pueden producir, de forma endógena, análogos de los epítomos codificados que, después de expresarse tal cual, quedan modificados *in vivo* tal como por nitración, oxidación, carbonilación y similares por el entorno endógeno. Las secuencias de nucleótidos adecuadas de ARN y de ADN se exponen en esta solicitud (otras secuencias de ADN que tienen identidad de secuencia o equivalente sinónimos de codones también son útiles en los métodos). Ejemplos de afecciones, enfermedades o trastornos médicos incluyen ALS, enfermedad de Parkinson, enfermedad con cuerpos de Lewy o enfermedad de Alzheimer.

Se describe un método para i) aumentar la eliminación inmunológica de agregados de SOD, ii) reducir la agregación de SOD1 mediada por SOD1 mal plegada, y/o iii) reducir el mal plegamiento dirigido por molde de SOD1, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente seleccionado de (1) un anticuerpo exógeno aislado que se une selectivamente a la forma mal plegada de SOD, y/o (2) un inmunógeno que provoca la producción de un anticuerpo endógeno que se une selectivamente al monómero o a la forma mal plegada de SOD, y/o (3) una secuencia de ácido nucleico que codifica (1) o (2).

Se describe un método para tratar una afección, enfermedad o trastorno médico mediado por una forma mal plegada de la superóxido dismutasa (SOD) en un sujeto que necesita tratamiento, comprendiendo el método administrar al sujeto que necesita tratamiento un agente (tal como un anticuerpo exógeno o inmunógeno (por ejemplo, péptido)) descrito en este documento que i) causa eliminación inmunológica de agregados de SOD, ii) reduce la agregación de SOD1 mediada por SOD1 mal plegada y/o iii) reduce el mal plegamiento dirigido por molde de SOD1. También se describen métodos de tratamiento de afecciones, enfermedades o trastornos médicos descritos en este documento administrando a un sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo específico para epítomos descritos en este documento que se presentan selectivamente o están accesibles en formas no nativas de SOD1.

Otras características y ventajas de la presente invención llegarán a ser evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

35 Breve descripción de las figuras

Las realizaciones de la invención se describirán en relación a los dibujos en que:

La Figura 1 es un gráfico que demuestra que el anticuerpo anti-DSE1a reconoce preferentemente DSE1a sobre DSE1.

La Figura 2 es un gráfico que ilustra los datos de ELISA que muestran que el anticuerpo anti-DSE2 reconoce la proteína SOD1 oxidada.

La Figura 3A es un diagrama de antigenicidad de SOD1 usando el método de Hopp y Woods.

La Figura 3B es un diagrama de antigenicidad de SOD1 usando el método de Kolaskar y Tongaonkar.

La Figura 4A es una inmunotransferencia que muestra que DSE2 reconoce SOD1 humana y de ratón desnaturalizada.

La Figura 4B es una inmunotransferencia de SOD1 inmunoprecipitada de cerebro humano y murino normal que demuestra que el anticuerpo anti-DSE2 no inmunoprecipita SOD1 nativa.

La Figura 4C es una inmunotransferencia de SOD1 inmunoprecipitada de ratones transgénicos que sobreexpresan SOD1 humana de tipo silvestre y mutante.

La Figura 5A es una sección de cerebro humano de hipocampo normal en una mujer de 52 años de edad teñido con un anticuerpo contra DSE2.

La Figura 5B es una composición de las secciones del hipocampo humano de una mujer de 78 años de edad con enfermedad de Alzheimer en fase final sondeadas con anticuerpo monoclonal anti-DSE2.

La Figura 6 (A-F) es una composición de secciones cerebrales de una mujer de 79 años de edad con demencia sondeadas con anticuerpo monoclonal anti-DSE2.

Descripción detallada de la invención

Se describen composiciones inmunoterapéuticas y métodos que abordan específicamente especies tóxicas de SOD1, incluyendo a aquellos conformeros de SOD1 que puede asociarse con enfermedades neurodegenerativas, tales como ALS, AD y PD, identificando y aprovechando la ventaja terapéutica de epítomos inmunológicos (sitios de unión de anticuerpo) expuestos sobre la superficie molecular de SOD1 mal plegada y agregada. Estos epítomos no se presentan en SOD1 plegada normalmente nativa. Se describen epítomos previamente desconocidos que son útiles como dianas para diseñar compuestos o para producir anticuerpos para terapia o para diagnóstico. También se describe el uso inmunoterapéutico de epítomos identificados previamente presentados en formas mal plegadas y

agregadas de SOD1 pero no conservadas en formas nativas de SOD1 (véase 3 y el documento WO 2005/019828). Estos epítomos son dianas útiles para inmunoterapia pasiva o activa para prevenir la progresión de la enfermedad. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, estos epítomos previenen la progresión de la enfermedad por eliminación inmunológica o secuestro de agregados tóxicos de SOD1, bloqueando el proceso de mal plegamiento dirigido por molde de SOD1, neutralizando el efecto tóxico de estas especies mal plegadas de SOD1 en neuronas, y/o la inhibición del estrés oxidativo mediado por SOD1 mal plegada.

Composiciones y usos de los epítomos específicos de enfermedad

Los inventores han determinado que hay epítomos presentados selectivamente por, o accesibles en, SOD1 monomérica o formas mal plegadas de SOD1 en formas monoméricas, diméricas o agregadas, pero no en la forma nativa o homodimérica apropiadamente plegada de SOD1. Las formas mal plegadas de SOD1 se caracterizan por la adopción de una conformación, particularmente una conformación secundaria o terciaria que es diferente de la conformación adoptada por un dímero de SOD1 de tipo silvestre, y/o participa en la formación de agregados de SOD1 que son característicos de trastornos de SOD1 incluyendo enfermedades neurodegenerativas tales como esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson. Dicha SOD1 mal plegada puede tener una secuencia de tipo silvestre o una secuencia mutada. En ciertas realizaciones, los epítomos son aquellos presentados selectivamente por o accesibles en SOD1 mal plegada que tiene una secuencia de tipo silvestre o nativa. En otras realizaciones, los epítomos son estos presentados selectivamente por o accesibles en SOD1 mal plegada que tiene la secuencia mutada o no de tipo silvestre. En otras realizaciones, el epítomo se presenta por el monómero de SOD1 (en cualquier forma incluyendo de tipo silvestre, mutante, mal plegada y nativa), y se vuelve accesible en el monómero de SOD1 tras la disociación del monómero del homodímero de SOD1. El reconocimiento inmunológico de solamente SOD1 mal plegada reducirá o eliminará las manifestaciones autoinmunitarias causadas por la unión de anticuerpo a SOD1 nativa normal. El reconocimiento inmunológico de SOD1 mal plegada que es tipo silvestre, en particular, será útil particularmente en el tratamiento de ALS esporádica.

El término "SOD1" como se usa en este documento significa la superóxido dismutasa 1 e incluye todas las formas análogas y mutantes de todas las especies, particularmente SOD1 humana (es decir, hSOD1) y menciona opcionalmente como SOD. La secuencia de aminoácidos de SOD1 humana (por ejemplo, número de acceso UniProtKB/TrEMBL Q6NR85; número de acceso a GenBank CAG46542; SEQ ID NO: 17) y la secuencia de nucleótidos de ARNm (por ejemplo, número de acceso a GenBank NM_000454; SEQ ID NO: 18) de SOD1 humana se han caracterizado previamente.

"Tipo silvestre" se refiere a la secuencia primaria de aminoácidos de una proteína nativa o no mutante, y SOD1 de tipo silvestre se refiere a SOD1, y particularmente SOD1 humana, que puede mencionarse opcionalmente como hSOD1, que tiene una secuencia de aminoácidos nativa o de origen natural. La secuencia de aminoácidos de SOD1 humana se proporciona en la SEQ ID NO: 17 y la secuencia de ácido nucleico se proporciona en la SEQ ID NO: 18. "Tipo silvestre" también puede hacer referencia a la estructura nativa normal de una proteína específica (por ejemplo, las coordenadas a nivel atómico de la estructura cristalina de la proteína SOD1 dimérica nativa están disponibles en el número de acceso del Protein Data Bank 1PUO). SOD1 plegada de tipo silvestre se menciona opcionalmente como SOD1 "plegada de forma nativa", SOD1 "plegada normalmente" y/o SOD1 "plegada apropiadamente".

"SOD mutante" se refiere a formas de SOD, y particularmente formas endógenas de SOD, que aparecen como resultado de mutación genética que produce, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos, tales como aquellas sustituciones características, por ejemplo, de ALS familiar. Dichas sustituciones incluyen las enumeradas en la Tabla 1.

"Mal plegada" como se usa en este documento, se refiere a la estructura secundaria y terciaria de una proteína, e indica que la proteína ha adoptado una conformación que no es normal para esa proteína en su estado de funcionamiento apropiado. Aunque el mal plegamiento puede estar causado por mutaciones en una proteína, tales como delección, sustitución o adición de aminoácidos, la proteína de secuencia de tipo silvestre también puede estar mal plegada en enfermedad, y exponer epítomos específicos de enfermedad, por ejemplo, como resultado de condiciones microambientales y/o modificación de aminoácidos tales como nitración, oxidación, carbonilación u otra modificación.

En ciertas realizaciones, en el caso donde SOD1 no nativa es SOD1 mutante tal como una forma de SOD1 que comprende variaciones de secuencia características de ALS familiar, el mutante de SOD1 no nativo es diferente a un mutante donde uno o más de los aminoácidos A4, G37, G85, o G93 está mutado.

Un "epítomo", como se usa en este documento, significa una región de una proteína que se reconoce por un receptor de células B o de células T, o un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo. El epítomo está representado opcionalmente en este documento por la secuencia lineal de aminoácidos o la región de la proteína reconocida por el anticuerpo. Los "péptidos aislados correspondientes a un epítomo" opcionalmente se mencionan en sí mismos como un "epítomo".

Un epítopo es "accesible" en el contexto de la presente memoria descriptiva cuando está accesible a la unión por un anticuerpo o por un fragmento de unión del mismo. Un epítopo específico de enfermedad de la invención puede estar parcial o completamente expuesto sobre la superficie molecular de una proteína mal plegada en una forma accesible para unión del anticuerpo, y parcial o completamente oculto del reconocimiento por el anticuerpo en la isoforma plegada de forma nativa de la proteína. Dicho epítopo se presenta o está accesible de forma selectiva en una conformación mal plegada o no nativa de una proteína y no se presenta o está accesible en la conformación nativa de la proteína. "Presentada de forma selectiva o accesible" se usa contextualmente, para indicar que el epítopo mencionado está disponible para la unión a un anticuerpo u otra proteína de unión en SOD1 mal plegada y no disponible para la unión del anticuerpo en formas nativas de SOD1. El epítopo específico de enfermedad es suficientemente diferente de una parte correspondiente de SOD1 nativa plegada apropiadamente (es decir, SOD1 que tiene actividad SOD1 no patológica normal), habitualmente en términos de su conformación, de modo que un anticuerpo puede unirse selectivamente al epítopo.

Un epítopo comprende uno o más determinantes antigénicos. Por ejemplo, un anticuerpo generado contra un péptido aislado correspondiente a un epítopo específico de enfermedad reconoce parte de o toda dicha secuencia epitópica. Por consiguiente, en una realización, una parte de un péptido aislado correspondiente a un epítopo presentado o accesible en SOD1 mal plegada que retiene un determinante antigénico se usa para crear anticuerpos contra dicho epítopo.

Cuando se hace referencia a epítopos de SOD1 presentados selectivamente en ALS, los epítopos se mencionan opcionalmente como epítopos específicos de ALS; cuando se hace referencia a epítopos presentados selectivamente en enfermedad de Alzheimer, los epítopos se mencionan opcionalmente como epítopos específicos de AD y asimismo cuando se hace referencia a epítopos presentados selectivamente en enfermedad de Parkinson, los epítopos se mencionan opcionalmente como epítopos específicos de PD para facilitar la referencia de la enfermedad nombrada. Sin embargo, se entiende que los epítopos específicos de ALS de SOD1 no están limitados a ALS, sino que se presentan opcionalmente en otras enfermedades neurodegenerativas tales como AD y PD; los epítopos específicos de AD de SOD1 no están limitados a AD, sino que se presentan opcionalmente en otras enfermedades neurodegenerativas tales como ALS y PD; y los epítopos de SOD1 específicos de PD no están limitados a PD, sino que se presentan opcionalmente en otras enfermedades neurodegenerativas tales como AD y ALS. Los epítopos que están accesibles selectivamente en formas de SOD1 que están asociadas con afecciones, enfermedades y trastornos mediados con SOD1 se mencionan opcionalmente como epítopos específicos de enfermedad.

Un epítopo puede reconocerse selectivamente por un anticuerpo en una conformación de una proteína y no en una segunda conformación de la proteína. "Selectivo" se usa contextualmente para caracterizar las propiedades de unión de un anticuerpo. Un anticuerpo que se une selectivamente a un epítopo dado se unirá a ese epítopo con mayor avidez o con más especificidad, respecto a otros epítopos diferentes presentados por la misma molécula. Por ejemplo, un anticuerpo se une selectivamente a un epítopo específico de enfermedad si se une a SOD1 mal plegada en que el epítopo específico de enfermedad está accesible, de forma dos veces más eficaz de lo que se une a SOD1 nativa donde el epítopo específico de enfermedad no está accesible. En otras realizaciones, el anticuerpo se une de forma 3-5 veces, 5-7 veces, 7-10, 10-15, 5-15, o 5-30 veces más eficaz.

Los epítopos que son "específicos de enfermedad", en el contexto de la presente memoria descriptiva, son epítopos que se presentan o están accesibles selectivamente por una o más formas mal plegadas de SOD1 que son características de una enfermedad particular o de una categoría de enfermedad.

A causa de la especificidad de enfermedad de SOD1 de estos epítopos, son dianas útiles para tratar trastornos, enfermedades y afecciones mediadas por SOD1 tales como esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson o para producir una respuesta inmunitaria en un animal. Por ejemplo, la vacunación de sujetos diagnosticados con esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson con una composición que comprende péptidos aislados correspondientes a los epítopos específicos de esclerosis lateral amiotrófica, epítopos específicos de enfermedad de Alzheimer o epítopos específicos de enfermedad de Parkinson, respectivamente, inhibe la formación de agregados de SOD1 en la enfermedad bloqueando la participación de las especies moleculares de SOD1 mal plegadas en el proceso de agregación y/o bloqueando el mal plegamiento dirigido por molde de SOD1, o induciendo la eliminación basada en complejo inmunitario de formas unidas a anticuerpo de SOD1 neurotóxica mal plegada y/o agregados.

Los epítopos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 se encuentran en SOD1 asociada con enfermedades neurodegenerativas y son útiles para tratar, diagnosticar o prevenir enfermedades relacionadas con SOD1 mal plegada, incluyendo enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y/o esclerosis lateral amiotrófica.

La expresión "epítopo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1" como se usa en este documento, se refiere a un epítopo que se presenta selectivamente o está accesible en SOD1 monomérica o SOD1 mal plegada en formas monoméricas, dimericas o agregadas, pero no sobre la superficie molecular de la forma homodimérica nativa, plegada correctamente de SOD1. En otros términos, los epítopos pueden caracterizarse como

aquellos que dan lugar a anticuerpos que se unen selectivamente a formas de SOD1 asociadas con enfermedades relacionadas con SOD1 mal plegada, incluyendo enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y/o esclerosis lateral amiotrófica, respecto a la forma homodimérica nativa de SOD1.

5 Los siguientes 7 epítomos se han identificado como epítomos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1:

10 RLACGVIGI (SEQ ID NO: 1, DSE1);
 DLGKGGNEESTKTGNAGS (SEQ ID NO: 2, DSE2) (documento WO 2005/019828);
 NPLSRKHGGPKDEE (SEQ ID NO: 3, DSE3) (documento WO 2005/019828);
 IKGLTEGLHGF (SEQ ID NO: 5, DSE5) (8);
 HCIIGRTLTVVH (SEQ ID NO: 6, DSE6) (8)
 KAVCVLK (SEQ ID NO: 4, DSE4); y
 GLHGFHVH (SEQ ID NO: 7, DSE7).

15 Un experto en la materia apreciará que los epítomos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 pueden ser la totalidad o parte de las secuencias anteriores. El término "parte de" como se usa en este documento se refiere a la secuencia que retiene la actividad epitópica de unión a un anticuerpo selectivo para formas no nativas de SOD1 y donde el anticuerpo se genera opcionalmente por inmunización con un péptido aislado correspondiente a dicho epítomo en un animal. También se describen análogos de las secuencias anteriores, tales como RLA[Ácido cisteico]GVIGI (DSE1a), que tiene una cisteína oxidada.

20 La expresión "epítomo específico de enfermedad de Alzheimer" como se usa en este documento, se refiere a un epítomo que está selectivamente presente o accesible en SOD1 monomérica o SOD1 mal plegada en forma monomérica, dimérica o agregada, pero no en la forma homodimérica nativa de SOD1. En otros términos, los epítomos pueden caracterizarse como aquellos donde la inmunización con un inmunógeno que comprende péptidos aislados correspondientes a dichos epítomos da lugar a anticuerpos que se unen selectivamente a formas asociadas a enfermedad de Alzheimer de SOD1, respecto a la forma homodimérica nativa de SOD1.

30 Un experto en la materia apreciará que el epítomo específico de enfermedad de Alzheimer puede ser la totalidad o parte de las secuencias anteriores. El término "parte de", como se usa en este documento, se refiere a la secuencia que retiene la actividad epitópica de unión de un anticuerpo selectivo para formas no nativas de SOD1 donde el anticuerpo se genera opcionalmente por inmunización con un péptido aislado correspondiente a la totalidad o parte de dicho epítomo en un animal. También se describen análogos de las secuencias anteriores.

35 La expresión "epítomo específico de enfermedad de Parkinson", como se usa en este documento, se refiere a un epítomo que está selectivamente presente o accesible en SOD1 monomérica o SOD1 mal plegada en forma monomérica, dimérica o agregada, pero no en la forma homodimérica nativa de SOD1. En otros términos, los epítomos pueden caracterizarse como aquellos donde la inmunización con un inmunógeno que comprende péptidos aislados correspondientes a dichos epítomos da lugar a anticuerpos que se unen selectivamente a formas asociadas a enfermedad de Parkinson de SOD1, respecto a la forma homodimérica nativa de SOD1.

40 Un experto en la materia apreciará que el epítomo específico de enfermedad de Parkinson puede ser la totalidad o parte de las secuencias anteriores. El término "parte de", como se usa en este documento, se refiere a la secuencia que retiene la actividad epitópica de unión de un anticuerpo selectivo para formas no nativas de SOD1, donde el anticuerpo se genera opcionalmente por inmunización con un péptido aislado correspondiente a la totalidad o parte de dicho epítomo en un animal. También se describen análogos de las secuencias anteriores.

50 La expresión "epítomo específico de esclerosis lateral amiotrófica", como se usa en este documento, se refiere a un epítomo que está selectivamente presente o accesible en SOD1 monomérica o SOD1 mal plegada en forma monomérica, dimérica o agregada, pero no en la forma homodimérica nativa de SOD1. En otros términos, los epítomos pueden caracterizarse como aquellos que dan lugar a anticuerpos que se unen selectivamente a formas asociadas a ALS de SOD1, respecto a la forma homodimérica nativa de SOD1.

55 Un experto en la materia apreciará que el epítomo específico de esclerosis lateral amiotrófica puede ser la totalidad o parte de las secuencias anteriores. El término "parte de", como se usa en este documento, se refiere a la secuencia que retiene la actividad epitópica de unión de un anticuerpo selectivo para formas no nativas de SOD1, donde el anticuerpo se genera opcionalmente por inmunización con un péptido aislado correspondiente a la totalidad o parte de dicho epítomo en un animal. También se describen análogos de las secuencias anteriores.

60 El término "análogo", como se usa en este documento, incluye partes, extensiones, sustituciones, variantes, modificaciones o equivalentes químicos y derivados de los mismos de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos descritas en este documento que realizan sustancialmente la misma función que el péptido, proteína o moléculas de ácido nucleico descritas en este documento sustancialmente del mismo modo. Por ejemplo, los análogos de péptidos y proteínas incluyen, sin limitación, sustituciones conservativas de aminoácidos. Los análogos de péptidos también incluyen la modificación de ácido cisteico de un aminoácido, como en RLAC*GVIGI (DSE1 a). Por ejemplo,

un aminoácido se acetila opcionalmente (Ac-). Los análogos de los péptidos y proteínas también incluyen adiciones y deleciones a los péptidos y proteínas descritos en este documento. Los análogos de ácidos nucleicos incluyen sustituciones de nucleótidos degenerados que codifican un péptido aislado como se describe en este documento. Además, los péptidos análogos y secuencias nucleotídicas análogas incluyen derivados de los mismos.

5 Una "sustitución conservativa de aminoácido", como se usa en este documento, es una en que un resto de aminoácido se reemplaza con otro resto de aminoácido sin anular las propiedades deseadas del péptido.

10 La expresión "derivado de un péptido" se refiere a un péptido que tiene uno o más restos derivatizados químicamente por reacción de un grupo lateral funcional. Dichas moléculas derivatizadas incluyen, por ejemplo, aquellas moléculas en que los grupos amino libres se han derivatizado para formar clorhidratos de amina, grupos p-tolueno sulfonilo, carbobenzoxi, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres pueden derivatizarse para formar sales, ésteres metílicos y etílicos u otros tipos de ésteres o hidracidas. Los grupos hidroxilo libres pueden derivatizarse para formar derivados O-acilo u O-alquilo. El nitrógeno de imidazol de histidina puede derivatizarse para formar N-im-bencilhistidina. También se incluyen como derivados aquellos péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácido de origen natural de los veinte aminoácidos convencionales. Por ejemplo: puede sustituirse 4-hidroxi prolina en el lugar de la prolina; puede sustituirse 5-hidroxisilisina en el lugar de lisina; puede sustituirse 3-metilhistidina en el lugar de histidina; puede sustituirse homoserina en el lugar de serina; y puede sustituirse ornitina en el lugar de lisina. Un derivado de un péptido también incluye opcionalmente péptidos que comprenden formas de aminoácidos que están oxidadas.

25 El estrés oxidativo puede conducir a daños en las proteínas, ADN y lípidos celulares. Se ha informado de estrés oxidativo en AD y PD (64). Los inventores han demostrado que anticuerpos selectivos para DSE1a que comprenden una cisteína oxidada en forma de ácido cisteico, tienen alta afinidad por SOD1 mal plegada. Otros aminoácidos también pueden oxidarse o nitrarse como resultado del estrés oxidativo. Por ejemplo, la histidina, arginina y lisina pueden formar grupos carbonilo, la metionina puede oxidarse en sulfóxido de metiona y la fenilalanina puede nitrarse en nitrotriptófano. Adicionalmente la cisteína puede oxidarse en ácido cisteína sulfínico.

30 Por consiguiente, los epítomos en una realización comprenden uno o más aminoácidos oxidados o nitrados. En realizaciones específicas de la invención, el epítomo de SOD1 puede comprender un aminoácido oxidado o nitrado, particularmente cisteína oxidada, es decir, ácido cisteico.

35 Los péptidos aislados correspondientes a epítomos presentados selectivamente en SOD1 no nativa, en una realización comprenden uno o más aminoácidos oxidados o nitrados. En realizaciones específicas de la invención el epítomo de SOD1 puede comprender un aminoácido oxidado o nitrado, particularmente cisteína oxidada, es decir, ácido cisteico.

40 Los péptidos asilados correspondientes a epítomos que son útiles en la presente invención, por tanto, son opcionalmente péptidos que incorporan secuencias correspondientes a tramos de aminoácidos contiguos dentro de la secuencia de SOD1 humana para formar epítomos selectivamente accesible solamente en formas monoméricas de SOD1, o en cualquier forma de SOD1 que esté mal plegada o sea no nativa. Los epítomos que se han identificado como selectivamente accesibles en SOD1 no nativa comprenden los siguientes tramos de aminoácidos de hSOD1:

45 RLACGVIGI (SEQ ID NO: 1 en SOD1 SEQ ID NO: 17 restos 143-151) DLGKGGNEESTKTGNAGS (SEQ ID NO: 2 en SOD1 SEQ ID NO: 17 restos 125-142);
 NPLSRKHGGPKDEE; (SEQ ID NO: 3 en SOD1 SEQ ID NO: 17 restos 65-78);
 IKGLTEGLHGF (SEQ ID NO: 5 en SOD1 SEQ ID NO: 17 restos 35-42);
 HCIIGRTLTVVH (SEQ ID NO: 6 en SOD1 SEQ ID NO: 17 restos 110-120);
 50 KAVCVLK (SEQ ID NO: 4 en SOD1 SEQ ID NO: 17 restos 3-9); y
 GLHGFHVH (SEQ ID NO: 7 en SOD1 SEQ ID NO: 17 restos 41-48)

55 Para servir como inmunógeno útil para inmunoterapia activa o para crear anticuerpos para su uso, por ejemplo, en inmunoterapia pasiva, el péptido incorpora de forma deseable un mínimo de aproximadamente 3, 4, 5, 6 o 7 restos del epítomo específico de enfermedad de SOD1. En una realización, el péptido aislado correspondiente a un epítomo comprende de forma deseable al menos 8 restos de SOD1. El péptido se acomodará dentro de un tramo de SOD1 que es de menos de 20 restos. Se describe el uso de péptidos que comprenden una parte aún más grande de SOD1, posiblemente produciendo múltiples anticuerpos, que requiere la selección de aquellos que se unen selectivamente a un epítomo característico de SOD1 mal plegada.

60 Las secuencias de SOD1 útiles para abordarse de acuerdo con la presente descripción incluyen las regiones de hSOD1 que incorporan los restos 3-9, los restos 35-45, los restos 41-48, los restos 65-78, los restos 125-142, los restos 143-151 y los restos 145-151. Como se aprecia, dicha secuencia peptídica correspondiente a epítomos de SOD1 mal plegada puede truncarse para incorporar un mínimo de cualquiera de 5, 6 o 7 restos de las regiones indicadas. Por ejemplo, DSE1 que tiene la secuencia RLACGVIGI, puede truncarse retirando los primeros dos aminoácidos "RL". Además, estas regiones pueden ampliarse, como se indica, para incorporar restos de SOD1 65 flanqueantes adicionales hasta una cantidad máxima de restos que impacte de alguna manera en el equilibrio

deseado entre el coste de la producción de péptido o vacuna y la especificidad deseada y otras propiedades del anticuerpo resultante.

5 En una descripción, el péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de enfermedad comprende todo o parte de la secuencia de un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en los péptidos de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

10 Los péptidos correspondientes a estos epítipos pueden comprender adicionalmente restos de aminoácido adicionales no de SOD1 particularmente en los extremos N y C-terminales de los mismos, que puede ser útiles en la conjugación del péptido con un agente útil, por ejemplo, para provocar una respuesta inmunitaria, o un agente que sirve como marca útil en la producción del péptido o para controlar su presencia. Por ejemplo, el péptido puede comprender adicionalmente un resto Cys N-terminal para ayudar con el acoplamiento a KLH o similares. El péptido puede comprender adicionalmente uno, dos, tres o más restos de glicina flanqueantes, o una combinación de glicina/serina o de glicina/lisina tal como GSG o GGKG, para mejorar la respuesta inmunitaria aumentando la longitud del péptido sin cambiar la especificidad de los anticuerpos que se forman. El péptido correspondiente al epítipo puede comprender adicionalmente un enlazador eficaz para acoplar el péptido en tándem con otra copia del mismo péptido o uno diferente correspondiente al mismo epítipo o uno diferente. Como alternativa, el péptido correspondiente a un epítipo puede comprender adicionalmente una marca de polihistidina o Flag. En otra realización, los péptidos pueden comprender aminoácidos adicionales que potencian la inmunogenicidad o solubilidad del péptido. En una realización, el número de aminoácidos adicionales es de 1 a aproximadamente 10, preferiblemente de 1 a 8, más preferiblemente de 1 a 5. De forma importante, los restos adicionales no afectan de forma material a la conformación del péptido. En una descripción, el péptido aislado correspondiente al epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica comprende 6 aminoácidos adicionales y comprende la secuencia GGRLACGVIGGGK. En otra descripción, el péptido aislado correspondiente al epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica comprende 4 aminoácidos adicionales y comprende la secuencia GGRLACGVIGIAQ.

30 En una descripción, las secuencias de aminoácidos análogas del péptido aislado correspondiente a epítipos específicos de enfermedad presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 típicamente tienen al menos: el 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de identidad de secuencia con las secuencias anteriores. En otra descripción, las secuencias de aminoácidos análogas del péptido aislado correspondiente a epítipos específicos de ALS, epítipos específicos de PD o epítipos específicos de AD tiene al menos: el 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de identidad de secuencia con las secuencias anteriores. La expresión "identidad de secuencia" como se usa en este documento se refiere al porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias polipeptídicas. Para determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias polipeptídicas, se alinean las secuencias de aminoácidos de esas dos secuencias, preferiblemente usando el algoritmo Clustal W (9), junto con la matriz de valores BLOSUM 62 (10) y una penalización por abertura de hueco de 10 y una penalización por extensión de hueco de 0,1, de modo que se obtenga la coincidencia de mayor orden entre dos secuencias donde al menos el 50 % de la longitud total de una de las secuencias está implicada en la alineación. Otros métodos que pueden usarse para alinear secuencias son el método de alineación de Needleman y Wunsch (11), revisado por Smith y Waterman (12) de modo que se obtenga la coincidencia de mayor orden entre las dos secuencias y se determine la cantidad de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias. Otros métodos para calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos están generalmente reconocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, aquellos descritos por Carillo y Lipton (13) y aquellos descritos en Computational Molecular Biology (14). En líneas generales, se emplearán programas informáticos para dichos cálculos. Los programas informáticos que pueden usarse a este respecto incluyen, aunque sin limitación, GCG (15) BLASTP, BLASTN y FASTA (16).

50 Por tanto, aunque las dianas epitópicas preferidas comprenden la secuencia que se encuentra en hSOD1, se describen análogos de estas secuencias epitópicas que, como se ha indicado anteriormente, incluyen derivados, extensiones, truncamientos, aminoácidos modificados y similares. Dichas formas de los péptidos aislados correspondientes a epítipos específicos de enfermedad están abarcadas por el término "análogos". Dichos análogos también son útiles para crear anticuerpos que se unirán a los epítipos presentes en SOD mal plegada o monomérica, por ejemplo, a uno de los siete epítipos identificados anteriormente en este documento.

55 Por tanto, respecto a los epítipos preferidos identificados anteriormente, los péptidos aislados útiles correspondientes a análogos epitópicos, incluyen péptidos aislados que comprenden, aunque sin limitación:

Para RLACGVIGI:

60 truncamiento N-terminal de R o RL; extensión N-terminal con G o GG o acetil-GG y/o extensión C-terminal con G, GG, GK o GGKG, por ejemplo, para llegar a acetil-RLACGVIVIVGGKG; con o sin oxidación de C para producir ácido cisteico, para llegar a AC*GVIVIVG, incluyendo CGGRLAC*GVIGIGSG; RLAC*GVIGIGSG y CRLAC*GVIGIGSG; (donde C* indica ácido cisteico)

65 Para DLGKGGNEESTKTGNAGS; truncamiento N-terminal de D, DL, DLG, DLGK y/o truncamiento C-terminal de S, GS, AGS, NAGS; extensión N-terminal con C o con G, GG o GGG; extensión C-terminal con G, GG, GS o GSG; por ejemplo para llegar a

CDLGKGGNEESTKTGNAGS, con o sin modificación interna por carbonilación de uno o dos restos de K, por ejemplo; e incluyendo péptidos tales como LGKGGNEESTKTGNAGS, DLGKGGNEESTKTGNAG, GKGGNEESTKTGNAGS, DLGKGGNEESTKTGNA, KGGNEESTKTGNAGS, DLGKGGNEESTKTGN, GGNEESTKTGNAGS, DLGKGGNEESTKTG, LGKGGNEESTKTGNAG, GKGGNEESTKTGNA, o KGGNEESTKTGN.

Para NPLSRKHGGPKDEE;
truncamiento N-terminal de N, NP, NPL y/o truncamiento C-terminal de E, EE, DEE; extensión N-terminal con C o con G, GG o GGG; extensión C-terminal con G, GG, GS o GSG; por ejemplo para llegar a CNPLSRKHGGPKDEE, con o sin modificación interna por carbonilación de uno o dos restos de H, por ejemplo;

Para IKGLTEGLHGF;
adición N-terminal de C, para llegar a CIKGLTEGLHGF

Y para HCIIGRTLTVVH;
truncamiento N-terminal de H o HC y/o truncamiento C-terminal de H, o VH, extensión N-terminal para incluir la secuencia de SOD en los restos 109 o 108/109 y/o para incluir G, GG, o GGG y/o extensión C-terminal por uno o dos restos de SOD tales como los restos 121 o 121/122, por ejemplo para llegar a GGGHCIIGRTLTVVHGSG.

Los ejemplos de los péptidos descritos anteriormente se resumen en la Tabla 2A

Tabla 2A. Péptidos aislados de DSE y análogos

ACGVIGI (SEQ ID NO: 9, análogo de DSE1);
Ac-GG-RLACGVIG-GGKG (SEQ ID NO: 10, análogo de DSE1);
CDLGKGGNEESTKTGNAGS (SEQ ID NO: 11, análogo de DSE2);
CNPLSRKHGGPKDEE (SEQ ID NO: 12; análogo de DSE3);
CIKGLTEGLHGF (SEQ ID NO: 14, análogo de DSE5);
RLA[Ácido cisteico]GVIGI (SEQ ID NO: 8, DSE1a);
A[Ácido cisteico]GVIGI (SEQ ID NO: 13, análogo de DSE1a);
C-GGG-RLA[Ácido cisteico]GVIGI-GSG (SEQ ID NO: 15, análogo de DSE1a); y GSGKAVCLK (SEQ ID NO: 16, análogo de DSE4).

Como se ha indicado anteriormente, se describe un epítipo de DSE1, un péptido aislado correspondiente al epítipo y un anticuerpo dirigido contra el epítipo. Los experimentos caracterizaron adicionalmente DSE1. Los inventores prepararon anticuerpos dirigidos contra epítipos encontrados en formas no nativas de SOD1. Los inventores detectaron SOD1 mal plegada de los tejidos medulares de modelos de ratón de ALS G85R, G93A y G37R por inmunoprecipitación usando el anticuerpo contra SED1. Los inventores también detectaron SOD1 mal plegada en secciones medulares de modelos de ratón de ALS G93A, G37R y de un paciente humano con ALS, usando el anticuerpo contra SED1 como sonda. Los inventores usaron SED1 para determinar la localización subcelular de SOD1 mal plegada donde se determinó que el sitio principal de deposición de SOD1 mal plegada es las mitocondrias vacuoladas dentro de las neuronas motoras del asta ventral. Además, se detectó SOD1 mal plegada en las fracciones de médula espinal tanto mitocondrial como citoplasmática, pero se inmunoprecipitaron solamente cantidades minoritarias de fracciones similares de tejidos de hígado y cerebro del ratón G93A. En ratones G85R, SOD1 mal plegada estaba enriquecido en mitocondrias de médula espinal y cerebro en comparación con la cantidad recuperada del citosol. Los inventores también demostraron que SOD1 mal plegada estaba inicialmente ausente, pero se detectaba antes de la aparición de la enfermedad y se correlaciona con pérdida de neuronas motoras en ratones del modelo de ALS.

En el caso donde el péptido aislado correspondiente a un epítipo per se o su análogo no es suficientemente inmunogénico, incluso cuando se administra con adyuvantes convencionales, el péptido aislado o el análogo peptídico aislado puede administrarse en forma de un "inmunógeno", en que el péptido aislado correspondiente al epítipo o a los análogos se fusiona a o se conjuga con un agente que potencia la inmunogenicidad del péptido. Por tanto, la inmunogenicidad o eficacia de la composición para tratar la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Alzheimer y/o la enfermedad de Parkinson o para provocar una respuesta inmunitaria también puede potenciarse conjugando el péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de enfermedad (por ejemplo, tal como un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica) directamente, tal como a través de un enlace amida, o indirectamente a través de un enlazador químico tal como carbodiimida o cualquier secuencia espaciadora peptídica tal como una glicina o una secuencia de glicina-serina incluyendo Gly-4-S, a una molécula que potencia la inmunogenicidad del péptido correspondiente al epítipo. Por ejemplo, un péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica puede conjugarse con el antígeno MAP, o hemocianina de lapa californiana (KLH). KLH es una proteína respiratoria encontrada en moluscos. Su gran tamaño la hace muy inmunogénica, y la gran cantidad de restos de lisina disponibles para la conjugación la hacen muy útil para unirse a un polipéptido, tal como un péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica.

La conjugación de KLH puede hacerse a través de restos de Cys N-terminales añadidos al péptido aislado correspondiente al epítipo, si no hay otro sitio conveniente disponible en el péptido para la conjugación con KLH.

5 Por tanto, la composición para provocar una respuesta inmunitaria puede comprender un inmunógeno. Un "inmunógeno", como se usa en este documento, significa una sustancia que provoca una respuesta inmunitaria y/o causa producción de un anticuerpo. Además de los péptidos aislados, los conjugados y fusiones descritas en este documento, son útiles péptidos miméticos que provocan anticuerpos de reacción cruzada contra epítipos específicos de enfermedad de SOD1 (véase 82).

10 Un experto en la materia apreciará que puede haber otros epítipos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1, tales como otros epítipos específicos de esclerosis lateral amiotrófica, otros epítipos específicos de enfermedad de Alzheimer y/u otros epítipos específicos de enfermedad de Parkinson. Por ejemplo, otros epítipos específicos de enfermedad pueden identificarse usando el ensayo de protección de epítipos descrito en el documento WO 2005/019828. En otro ejemplo, otros epítipos específicos de enfermedad pueden identificarse
15 el método descrito en Khare et al. (8). Además, los epítipos útiles pueden identificarse como aquellos que se presentan selectivamente en SOD1 que está desnaturalizada o en SOD1 que está sometida a condiciones desnaturalizantes tales como agentes caotrópicos, calor, pH extremos o detergentes conocidos para los expertos en la materia, o tratada de otro modo para inducir la adopción de una conformación mal plegada, respecto a una SOD1 de control a pH neutro.

20 Se describe un método de identificación de epítipos específicos de enfermedad en proteínas no nativas asociadas a enfermedad. El fundamento de la selección de epítipos específicos de enfermedad se basa en varias consideraciones. Los epítipos peptídicos lineales seleccionados deben estar ocultos en un estado inaccesible al anticuerpo en la isoforma normal de la proteína diana, pero deben estar expuestos en la superficie de la isoforma mal plegada patológica de modo que los epítipos peptídicos lineales puedan unirse por un anticuerpo específico para el epítipo normalmente ocultado. Otras consideraciones incluyen el papel predicho o definido de forma experimental del epítipo específico definido en la formación de agregados, y la longitud e inmunogenicidad adecuadas de un péptido correspondiente al epítipo como una diana para inmunización o inmunoterapia. Los epítipos específicos de enfermedad óptimos se benefician de la seguridad de la respuesta inmunitaria contra un antígeno no nativo, con minimización de autoinmunidad y la eficacia comparativa de regímenes de adyuvante mínimo para vacunas terapéuticas. Los epítipos específicos de enfermedad óptimos también se benefician de la eficacia de la neutralización e inhibición de la actividad tóxica y dirigida por molde de proteínas mal plegadas por unión de anticuerpos. La neutralización también puede acelerar la degradación de las especies proteicas mal plegadas por sistemas tales como el sistema retículo-endotelial y por las células efectoras inmunitarias del SNC
25 residentes tales como microglía.

Composiciones que comprenden epítipos para tratar enfermedades neurodegenerativas mediadas por SOD1

40 Se describe una composición para tratar la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto, que comprende una cantidad eficaz de un péptido aislado correspondiente a un epítipo presentado selectivamente o accesible en una forma no nativa de SOD1 en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado, tal como uno farmacéuticamente aceptable. La expresión "péptido aislado" se refiere al péptido que se ha producido, por ejemplo, por técnicas recombinantes o sintéticas, y se ha retirado de la fuente que produjo el péptido, tal como células recombinantes o reactivos residuales de síntesis peptídica. El péptido aislado está opcionalmente "purificado", que significa al menos: un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 % o un 99 % de pureza y opcionalmente pureza de calidad farmacéutica.

50 Un "péptido aislado correspondiente a un epítipo", como se usa en este documento, se refiere al péptido producido que comprende el epítipo o una región del epítipo y es igual o similar en secuencia a un epítipo específico de enfermedad en SOD1 no nativa. "Epítipo" se usa opcionalmente para hacer referencia al péptido aislado producido que corresponde al epítipo en SOD1 presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1.

55 En el caso donde el péptido aislado correspondiente al epítipo específico de enfermedad, per se no es suficientemente inmunogénico, incluso cuando se administra con adyuvantes convencionales, el péptido aislado puede administrarse en forma de un inmunógeno, en que el péptido aislado está fusionado a o conjugado con un agente que potencia la inmunogenicidad de dicho péptido. Se describe el péptido aislado correspondiente a un epítipo presentado selectivamente o accesible en una forma no nativa de SOD1, que comprende todo o parte de un péptido aislado de la Tabla 2 o de la Tabla 2A mencionado anteriormente en este documento.

60 Como se usa en este documento, la propiedad de inhibir o reducir la formación de agregados de SOD1 se revela como una reducción en la tasa de formación, cantidad o tamaño de agregados neurotóxicos de SOD1, como se revela usando ensayos establecidos para este propósito, y como se ejemplifica en este documento.

65 Se describe una composición útil para tratar la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto que comprende una cantidad eficaz de un péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado, tal como uno farmacéuticamente aceptable, tal como vehículos

farmacéuticamente aceptables. En otras descripciones, el péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica comprende la secuencia de un péptido aislado de la Tabla 2 o de la Tabla 2A mencionado anteriormente.

- 5 Como se usa en este documento, la expresión "tratar la esclerosis lateral amiotrófica", como se usa en este documento, incluye inhibir la enfermedad, prevenir la enfermedad o reducir los síntomas asociados con la enfermedad.

Composiciones que comprenden epítopos para provocar respuestas inmunitarias

- 10 Se describe una composición para provocar una respuesta inmunitaria en un animal, que comprende una cantidad eficaz de un epítipo aislado presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado. Se describe el epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1, que comprende un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en los péptidos aislado de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

- 15 Se describe una composición para provocar una respuesta inmunitaria en un animal, que comprende una cantidad eficaz de un péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado, donde el epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica comprende un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

- 20 La expresión "provocar una respuesta inmunitaria" se define como iniciar, desencadenar, causar, potenciar, mejorar o aumentar cualquier respuesta del sistema inmunitario, por ejemplo, de naturaleza humoral o mediada por células. El inicio o potenciación de una respuesta inmunitaria puede evaluarse usando ensayos conocidos para los expertos en la materia incluyendo, aunque sin limitación, ensayos de anticuerpos (por ejemplo, ensayos ELISA), ensayos de citotoxicidad específicos de antígeno y la producción de citoquinas (por ejemplo, ensayos ELISPOT).

- 25 La composición para provocar una respuesta inmunitaria puede comprender un inmunógeno. Un "inmunógeno", como se usa en este documento significa una sustancia que provoca una respuesta inmunitaria y/o causa la producción de un anticuerpo. Se describe el inmunógeno que comprende un péptido aislado seleccionado de los péptidos aislados proporcionados en la Tabla 2 o en la Tabla 2A. Se describe el péptido aislado que se conjuga a un vehículo adecuado tal como KLH. Además de los péptidos aislados descritos en este documento, son útiles péptido miméticos que provocan anticuerpos de reactividad cruzada contra epítopos específicos de enfermedad de SOD1. El término "animal" o "sujeto", como se usa en este documento, incluye todos los miembros del reino de animales incluyendo mamíferos, preferiblemente seres humanos.

- 30 Como se usa en este documento, la expresión "cantidad eficaz" significa una cantidad eficaz, a dosificaciones y periodos de tiempo necesarios para conseguir un resultado deseado. Las cantidades eficaces pueden variar de acuerdo con factores tales como la patología, edad, género, peso del animal. El régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.

Composiciones farmacéuticas que comprenden péptidos aislados correspondientes a epítopos específicos de enfermedad

- 35 Las composiciones descritas en este documento pueden prepararse por métodos conocidos per se para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que pueden administrarse a sujetos, opcionalmente como una vacuna, de modo que se combine una cantidad eficaz de la sustancia activa en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (17). En esta base, las composiciones incluyen, aunque no exclusivamente, soluciones de las sustancias en asociación con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, y contenidas en soluciones tamponadas con un pH adecuado e iso-osmóticas con los fluidos fisiológicos.

- 40 Las composiciones farmacéuticas incluyen, sin limitación, polvos liofilizados o soluciones o suspensiones inyectables estériles acuosas o no acuosas, que pueden contener adicionalmente antioxidantes, tampones, bacteriostáticos u solutos que vuelven a las composiciones sustancialmente compatibles con los tejidos o con la sangre de un destinatario pretendido. Otros componentes que pueden estar presentes en dichas composiciones incluyen agua, tensioactivos (tales como Tween), alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, por ejemplo. Las soluciones y suspensiones de inyección improvisada pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos, comprimidos o soluciones o suspensiones concentradas. La composición puede suministrarse, por ejemplo, pero a modo de limitación, como un polvo liofilizado que se reconstituye con agua estéril o solución salina antes de su administración al paciente.

- 45 Las composiciones farmacéuticas pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen esencialmente composiciones químicamente inertes y no tóxicas que no interfieren con la eficacia de la actividad biológica de la composición farmacéutica. Ejemplos de vehículos

farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque sin limitación, agua, soluciones salinas, soluciones de glicerol, etanol, cloruro de N-(1(2,3-dioleiloxi)propil)N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), diolesilfosfatidil-etanolamina (DOPE), y liposomas. Dichas composiciones deben contener una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para administración directa al paciente.

5 La composición puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable que incluye, sin limitación, aquellas formadas con grupos amino libres tales como los derivados de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellas formadas con grupos carboxilo libres tales como las derivadas de hidróxido de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

10 La inmunogenicidad puede mejorarse significativamente si el agente o agentes inmunizantes o inmunógenos (por ejemplo, péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica o una fusión o conjugado del mismo con un agente inmunopotenciador) y/o composición se co-inmuniza, independientemente del formato de administración, con un adyuvante. Habitualmente, se usan adyuvantes como una solución al 0,05 al 1,0 % en solución salina tamponada con fosfato. Los adyuvantes potencian la inmunogenicidad de un inmunógeno pero no son necesariamente inmunogénicos en sí mismos. Los adyuvantes pueden actuar reteniendo el inmunógeno de forma local cerca del sitio de administración para producir un efecto de depósito que facilita una liberación lenta y sostenida del inmunógeno a las células del sistema inmunitario. Los adyuvantes también pueden atraer a células del sistema inmunitario hasta un depósito de inmunógeno y estimulan dichas células para provocar respuestas inmunitarias. Por tanto, realizaciones de esta invención abarcan composiciones que comprenden adicionalmente adyuvantes.

25 Se han usado adyuvantes durante muchos años para mejorar las respuestas inmunitarias del hospedador para, por ejemplo, vacunas. Los adyuvantes intrínsecos (tales como lipopolisacáridos) normalmente son los componentes de bacterias muertas o atenuadas usadas como vacunas. Los adyuvantes extrínsecos son inmunomoduladores que se unen típicamente de forma no covalente a antígenos y se formulan para potenciar las respuestas inmunitarias del hospedador. Por tanto, se han identificado adyuvantes que potencian la respuesta inmunitaria contra antígenos suministrados de forma parenteral. Algunos de estos adyuvantes son tóxicos, sin embargo, y pueden causar efectos secundarios indeseables haciéndolos inadecuados para su uso en seres humanos y para muchos animales. De hecho, solamente el hidróxido de aluminio, el sulfato de aluminio y el fosfato de aluminio (mencionados habitualmente de forma colectiva como alumbre) se usan rutinariamente como adyuvantes en vacunas humanas y veterinarias. Puede usarse alumbre con agentes inmunoestimuladores tales como MPL o 3-DMP; QS21; y aminoácidos monoméricos o poliméricos tales como ácido poliglútamico o polilisina. La eficacia del alumbre en respuestas crecientes de anticuerpos contra toxoide diftérico y tetánico está bien establecida. No obstante, tienen limitaciones. Por ejemplo, el alumbre es ineficaz para vacunación contra la gripe y provoca de forma incoherente una respuesta inmunitaria mediada por células con otros inmunógenos. Los anticuerpos provocados por antígenos con adyuvante de alumbre son principalmente del isotipo IgG1 en ratones, que puede no ser óptimo para la protección por algunos agentes de vacuna.

40 Una amplia gama de adyuvantes extrínsecos puede provocar respuestas inmunitarias potentes contra inmunógenos. Estos incluyen saponinas tales como Stimulons (QS21, Aquila, Worcester, Mass.) o partículas generadas a partir de las mismas tales como ISCOM (complejos inmunoestimuladores) e ISCOMATRIX, en complejo con antígenos proteicos de membrana (complejos inmunoestimuladores), polímeros Pluronic con aceite mineral, micobacterias muertas y aceite mineral, adyuvante completo de Freund, productos bacterianos tales como muramil dipéptido (MDP) y lipopolisacárido (LPS), así como lípido A y liposomas.

50 En un aspecto de esta invención, los adyuvantes útiles en cualquiera de las realizaciones de la invención descrita en este documento son los siguientes. Los adyuvantes para inmunización parenteral incluyen compuestos de aluminio (tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio e hidroxifosfato de aluminio). El antígeno puede precipitarse con, o adsorberse sobre, el compuesto de aluminio de acuerdo con protocolos convencionales. También pueden usarse otros adyuvantes tales como RIBI (ImmunoChem, Hamilton, MT) en administración parenteral.

55 Los adyuvantes para inmunización a la mucosa incluyen toxinas bacterianas (por ejemplo, la toxina colérica (CT), la toxina termo-inestable (LT) de *E. coli*, la toxina A de *Clostridium difficile* y la toxina *pertussis* (PT), o combinaciones, subunidades, toxoides o mutantes de las mismas). Por ejemplo, puede ser útil una preparación purificada de la subunidad B de la toxina colérica nativa (CTB). También son adecuados fragmentos, homólogos, derivados y fusiones con cualquiera de estas toxinas, con la condición de que retengan la actividad adyuvante. Preferiblemente, se usa un mutante que tiene toxicidad reducida. Se han descrito mutantes adecuados (por ejemplo, en el documento WO 95/17211 (mutante Arg-7-Lys CT), en el documento WO 96/6627 (mutante Arg-192-Gly LT), y en el documento WO 95/34323 (mutante Arg-9-Lys y Glu-129-Gly PT)). Mutantes adicionales de LT que pueden usarse en los métodos y composiciones de la invención incluyen, por ejemplo, mutantes Ser-63-Lys, Ala-69-Gly, Glu-110-Asp, y Glu-112-Asp. Otros adyuvantes (tales como monofosforil lípido A (MPLA) bacteriano de diversas fuentes (por ejemplo, *E. coli*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium*, o *Shigella flexneri*, saponinas, o microesferas de poliláctido glicólido (PLGA)) también pueden usarse en administración a la mucosa.

65 Otros adyuvantes incluyen citoquinas tales como interleuquinas, por ejemplo, IL-1, IL-2 e IL-12, quimioquinas, por

ejemplo, CXCL10 y CCL5, factor estimulador de macrófagos y/o factor de necrosis tumoral. Otros adyuvantes que pueden usarse incluyen oligonucleótidos CpG (Davis. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 247:171-183, 2000).

Las emulsiones de aceite en agua incluyen escualeno; aceite de cacahuate; MF59 (documento WO 90/14387); SAF (Syntex Laboratories, Palo Alto, Calif.); y RibitTM (Ribi Immunochem, Hamilton, Mont.). Las emulsiones de aceite en agua pueden usarse con agentes inmunoestimuladores tales como muramil dipéptidos (por ejemplo, N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), -acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamil-L-alanina-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-di-palmitoxi propilamida (DTP-DPP) teramida (TM)), u otros componentes de la pared celular bacteriana.

Los adyuvantes útiles para inmunización a la mucosa y parenteral incluyen polifosfazeno (por ejemplo, documento WO 95/2415), DC-chol (3 b-(N-(N',N'-dimetil aminometano)-carbamoil) colesterol (por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 5.283.185 y documento WO 96/14831) y QS-21 (por ejemplo, documento WO 88/9336).

Un adyuvante puede acoplarse a un inmunógeno para administración (Livingston. *J Immunol.*, 159: 1383-1392, 1997). Por ejemplo, puede acoplarse directamente un lípido tal como ácido palmítico a uno o más péptidos de modo que el cambio en la conformación de los péptidos que comprenden el inmunógeno no afecte a la naturaleza de la respuesta inmunitaria contra el inmunógeno.

La elección de un adyuvante puede depender de varios factores, incluyendo la vía de administración, la eficacia del adyuvante, el régimen de dosificación, la estabilidad de la vacuna que contiene al adyuvante y la especie que se está vacunando. El adyuvante puede administrarse con un inmunógeno como una composición individual. Además, puede administrarse un adyuvante antes, de forma concurrente con o después de la administración del inmunógeno.

La inmunogenicidad o eficacia de la composición para tratar la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Alzheimer y/o la enfermedad de Parkinson o provocar una respuesta inmunitaria también puede potenciarse conjugando el péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de enfermedad (por ejemplo, tal como un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica) directamente, tal como a través de un enlace amida, o indirectamente a través de un enlazador químico tal como carbodiimida o cualquier secuencia espaciadora peptídica tal como una secuencia de glicina o glicina-serina incluyendo Gly4-S, a una molécula que potencia la inmunogenicidad del epítipo. Por ejemplo, un péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica puede conjugarse a hemocianina de lapa californiana (KLH). KLH es una proteína respiratoria encontrada en moluscos. Su gran tamaño la hace muy inmunogénica, y la gran cantidad de restos de lisina disponibles para conjugación la hacen muy útil para su fijación a una proteína, tal como un péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica.

Se encuentran otras directrices sobre la técnica de vacunación de péptidos en el trabajo que muestra que un epítipo específico de enfermedad para la proteína de prion mal plegada (6) proporciona una diana para células de neuroblastoma infectadas de priones *in vitro* (7), y que la vacunación de péptidos de ratones con este epítipo es protectora contra la inoculación de priones infecciosos.

Los péptidos aislados correspondientes a los epítipos o a los análogos de los mismos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1, incluyendo epítipos específicos de esclerosis lateral amiotrófica, específicos de enfermedad de Alzheimer o específicos de enfermedad de Parkinson se preparan fácilmente usando una diversidad de métodos conocidos para los expertos en la materia. Por consiguiente, los péptidos que corresponden a epítipos específicos de enfermedad tales como epítipos específicos de esclerosis lateral amiotrófica pueden prepararse por síntesis química usando técnicas bien conocidas en la química de proteínas, tales como síntesis en fase sólida (18) o síntesis en solución homogénea (19).

Los péptidos correspondientes a los epítipos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1, incluyendo epítipos específicos de esclerosis lateral amiotrófica, específicos de enfermedad de Alzheimer o específicos de enfermedad de Parkinson también producirse por tecnología de ADN recombinante. Para preparar péptidos correspondientes a los epítipos específicos de esclerosis lateral amiotrófica por técnicas de ADN recombinante, debe prepararse una secuencia de ADN que codifica el péptido correspondiente al epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica. Por consiguiente, se describe el uso de ácidos nucleicos purificados y aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica epítipos específicos de esclerosis lateral amiotrófica para tratar la esclerosis lateral amiotrófica o para provocar una respuesta inmunitaria.

En una descripción, la secuencia de ácido nucleico que codifica los péptidos correspondientes a epítipos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1, se incorpora en un vector de expresión adaptado para transfección o transformación de una célula hospedadora. En otra descripción, la secuencia de ácido nucleico que codifica los péptidos correspondientes a epítipos específicos de esclerosis lateral amiotrófica se incorpora en un vector de expresión adaptado para transfección o transformación de una célula hospedadora. Las moléculas de ácido nucleico pueden incorporarse de un modo conocido en un vector de expresión apropiado que asegura la expresión de la proteína. Los posibles vectores de expresión incluyen, aunque sin limitación, cósmidos,

plásmidos o virus modificados (por ejemplo, retrovirus deficientes en replicación, adenovirus y virus adenoasociados). El vector debe ser compatible con la célula hospedadora usada. Los vectores de expresión son "adecuados para transformación de una célula hospedadora", lo que significa que los vectores de expresión contienen una molécula de ácido nucleico que codifica los péptidos correspondientes a epítopos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1, incluyendo epítopos específicos de esclerosis lateral amiotrófica, epítopos específicos de enfermedad de Alzheimer y epítopos específicos de enfermedad de Parkinson, y secuencias reguladoras seleccionadas basándose en las células hospedadoras a usarse para la expresión, que están unida de forma funcional a la molécula de ácido nucleico. "Unido de forma funcional" pretende indicar que el ácido nucleico está unido a secuencias reguladoras de un modo que permite la expresión del ácido nucleico.

Las secuencias reguladoras adecuadas pueden obtenerse de una diversidad de fuentes, incluyendo genes bacterianos, fúngicos, víricos, de mamífero o de insecto (por ejemplo, véanse las secuencias reguladoras descritas en Goeddel (20)). La selección de secuencias reguladoras apropiadas depende de la célula hospedadora elegida como se analiza a continuación, y puede conseguirse fácilmente por los expertos en la materia. Ejemplos de dichas secuencias reguladoras incluyen: un promotor y potenciador de la transcripción o secuencia de unión a ARN polimerasa, una secuencia de unión al ribosoma, incluyendo una señal de inicio de la traducción. Adicionalmente, dependiendo de la célula hospedadora elegida y del vector empleado, pueden incorporarse otras secuencias, tales como un origen de replicación, sitios de restricción de ADN adicionales, potenciadores y secuencias que confieren capacidad de inducción de la transcripción en el vector de expresión.

Los vectores de expresión recombinantes también pueden contener un gen marcador que facilita la selección de células hospedadoras transformadas o transfectadas con una molécula recombinante descrita en este documento. Ejemplos de genes marcadores de selección son genes que codifican una proteína tal como G418 e higromicina que confieren resistencia a ciertos fármacos, β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa, luciferasa de luciérnaga o una inmunoglobulina o parte de la misma tal como la parte Fc de una inmunoglobulina preferiblemente IgG. La transcripción del gen marcador de selección se controla por cambios en la concentración de la proteína marcadora de selección tal como β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa o luciferasa de luciérnaga. Si el gen marcador de selección codifica una proteína que confiere resistencia a antibióticos tal como resistencia a neomicina, las células transformantes pueden seleccionarse con G418. Las células que han incorporado el gen marcador de selección sobrevivirán, mientras que las otras células morirán. Esto hace posible visualizar y ensayar la expresión de vectores de expresión recombinantes descritos en este documento y en particular para determinar el efecto de una mutación sobre la expresión y fenotipo. Se apreciará que los marcadores de selección pueden introducirse en un vector diferente del ácido nucleico de interés.

Los vectores de expresión recombinantes pueden introducirse en células hospedadoras para producir una célula hospedadora transformante. La expresión "célula hospedadora transformante" pretende incluir células procariotas y eucariotas que se han transformado o transfectado con un vector de expresión recombinante que codifica los epítopos específicos de esclerosis lateral amiotrófica. Las expresiones "transformado con", "transfectado con", "transformación" y "transfección" pretenden abarcar la introducción de ácido nucleico (por ejemplo, un vector) en una célula por una de muchas posibles técnicas conocidas en la técnica. Las células procariotas pueden transformarse con ácido nucleico por, por ejemplo, electroporación o transformación mediada por cloruro de calcio. El ácido nucleico puede introducirse en células de mamífero mediante técnicas convencionales tales como co-precipitación con fosfato de calcio o con cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofectina, electroporación o microinyección. Los métodos adecuados para transformar y transfectar células hospedadoras pueden encontrarse en Sambrook et al. (21), y otros libros de texto de laboratorio.

Las células hospedadoras adecuadas incluyen una amplia diversidad de células hospedadoras procariotas y eucariotas. Por ejemplo, las proteínas de la invención pueden expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (usando baculovirus), células de levadura o células de mamífero. Otras células hospedadoras adecuadas pueden encontrarse en Goeddel (20).

Más particularmente, las células hospedadoras bacterianas adecuadas incluyen *E. coli*, *B. subtilis*, *Salmonella typhimurium* y diversas especies dentro del género *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*, así como muchas otras especies bacterianas bien conocidas para los expertos en la materia. Los vectores de expresión bacterianos adecuados preferiblemente comprenden un promotor que funciona en la célula hospedadora, uno o más marcadores fenotípicos de selección y un origen bacteriano de replicación. Los promotores representativos incluyen el sistema promotor de β -lactamasa (penicilinas) y lactosa (véase Chang et al. (22)), el promotor trp (23) y promotor tac (24). Los marcadores de selección representativos incluyen diversos marcadores de resistencia a antibióticos tales como los genes de resistencia a canamicina o ampicilina. Los vectores de expresión adecuados incluyen, aunque sin limitación, bacteriófagos tales como derivados de lambda o plásmidos tales como pBR322 (véase, Bolivar et al. (25)), los plásmidos pUC pUC18, pUC19, pUC118, pUC119 (véase, Messing (26) y Vieira y Messing (27)), y pNH8A, pNH16a, pNH18a, y Bluescript M13 (Stratagene, La Jolla, Calif.). Los vectores de expresión de fusión típicos que pueden usarse se han analizado anteriormente, por ejemplo, pGEX (Amrad Corp., Melbourne, Australia), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ). Ejemplos de vectores de expresión no de fusión inducibles incluyen pTrc (28) y pET 11 d (29).

Las células hospedadoras de levadura y fúngicas adecuadas incluyen, aunque sin limitación, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, los géneros *Pichia* o *Kluyveromyces* y diversas especies del género *Aspergillus*. Ejemplos de vectores para la expresión en la levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSec1 (30), pMFa (31), pJRY88 (32), y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Los protocolos para transformación de levaduras y hongos son bien conocidos para los expertos en la materia (véase, Hinnen et al. (33); Itoh et al. (34), y Cullen et al. (35)).

Las células de mamífero adecuadas incluyen, entre otras: células COS (por ejemplo, ATCC N.º CRL 1650 o 1651), BHK (por ejemplo, ATCC N.º CRL 6281), CHO (ATCC N.º CCL 61), HeLa (por ejemplo, ATCC N.º CCL 2), 293 (ATCC N.º 1573) y NS-1. Los vectores de expresión adecuados para dirigir la expresión en células de mamífero generalmente incluyen un promotor (por ejemplo, derivado de material vírico tal como polioma, Adenovirus 2, citomegalovirus y virus 40 de simio), así como otras secuencias del control de la transcripción y la traducción. Ejemplos de vectores de expresión en mamífero incluyen pCDM8 (36) y pMT2PC (37).

Dados los contenidos proporcionados en este documento, los promotores, terminadores y métodos para introducir vectores de expresión de un tipo apropiado en células de plantas, aves e insectos también pueden conseguirse fácilmente. Por ejemplo, las proteínas descritas en este documento pueden expresarse a partir de células vegetales (véase, Sinkar et al. (38), que revisa el uso de vectores de *Agrobacterium rhizogenes*; véase también Zambryski et al. (39), que describe el uso de vectores de expresión de células vegetales, incluyendo, entre otros, pAS2022, pAS2023, y pAS2034).

Las células de insecto adecuadas incluyen células y líneas celulares de especies *Bombyx* o *Spodoptera*. Los vectores baculovíricos disponibles para la expresión de proteínas en células cultivadas de insecto (células SF 9) incluyen la serie pAc (40) y la serie pVL (41). Algunos sistemas de expresión de baculovirus-células de insecto adecuados para la expresión de proteínas recombinantes se describen en el documento PCT/US/02442.

Los vectores de expresión recombinantes que contienen las secuencias de nucleótidos que codifican el péptido correspondiente a epítopos presentados selectivamente o accesibles no nativos de SOD1, incluyendo epítopos específicos de esclerosis lateral amiotrófica, epítopos específicos de enfermedad de Alzheimer y epítopos específicos de enfermedad de Parkinson también pueden contener genes que codifican un resto de fusión (es decir, una "proteína de fusión") que proporciona expresión aumentada del péptido recombinante; y ayuda a la purificación del péptido recombinante diana actuando como ligando en purificación por afinidad. Por ejemplo, puede añadirse un sitio de escisión proteolítico a la proteína recombinante diana para permitir la separación de la proteína recombinante del resto de fusión después de la purificación de la proteína de fusión. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Amrad Corp., Melbourne, Australia), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionan la glutatión S-transferasa (GST), la proteína de unión a maltosa E, o proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante.

Composiciones de ácido nucleico para tratar enfermedades neurodegenerativas mediadas por SOD1

Se describe una composición para provocar una respuesta inmunitaria en un animal, que comprende una cantidad eficaz de un ácido nucleico que codifica un péptido correspondiente a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado, donde el péptido corresponde a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 seleccionados del grupo que consiste en los péptidos de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

Se describen ácidos nucleicos asilados que codifican los péptidos correspondientes a los epítopos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1, incluyendo las siguientes moléculas de ARN, equivalentes de codones sinónimos de las mismas y sus equivalentes de ADN y complementos:

Para RLACGVIGI;

AGGUUAGCUUGUGGUGUUUAUAGGUUA (SEQ ID NO: 19).

Para DLGKGGNEESTKTGNAGS;

GAUUUAGGUAAAGGUGGUAUAUGAAGAAAGUACUAAAACUGGUAAUGCUGGUAGU (SEQ ID NO: 20).

Para NPLSRKHGGPKDEE;

AAUCCUUUAAGUCGUAAACACGGAGGACCGAAGGACGAGGAG (SEQ ID NO: 21).

Para IKGLTEGLHGF;

AUAAAGGGGAAAACAGAAGGACUCCACGGCUUU (SEQ ID NO: 22).

Para HCIIGRTLTVH;

CACUGUAUUUUGGCAGGACCCUCGUUGUUCAC (SEQ ID NO: 23).

5 Otros ácidos nucleicos útiles incluyen:

Para RLACGVIGI (DSE1: 143-151);

CGUUUGGCUUGUGGUGUAAUUGGGAUC (SEQ ID NO: 24).

10

Para ACGVIGI (DSE1: 145-151);

GCUUGUGGUGUAAUUGGGAUC (SEQ ID NO: 25).

15

Para DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2: 125-142);

GACUUGGGCAAAGGUGGAAAUGAAGAAAGUACAAAGACAGGAAACGCUUGGAAGU (SEQ ID NO: 26).

20

Para NPLSRKHGGPKDEE (DSE3: 65-78);

AAUCCUCUAUCCAGAAAACACGGUGGGCCAAAGGAUGAAGAG (SEQ ID NO: 27).

25

Para KAVCVLK (DSE4: 3-9);

AAGCCGUGUGCGUGCUGAAG (SEQ ID NO: 28).

30

Para IKGLTEGLHGF (DSE5: 35-45);

AUAAAAGGACUGACUGAAGGCCUGCAUGGAUUC (SEQ ID NO: 29).

35

Para HCIIGRTLTVH (DSE6: 110-120);

CAUUGCAUCAUUGGCCGCACACUGGUGGUCCAU (SEQ ID NO: 30).

40

Para GLHGFHVH (DSE7: 41-48);

GGCCUGCAUGGAUCCAUGUUCU (SEQ ID NO: 31).

45

Los ácidos nucleicos se mencionan en este documento como "ácidos nucleicos de la Tabla 2C".

50

Se describe una composición para tratar la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto, que comprende una cantidad eficaz de un ácido nucleico aislado que codifica un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica aislado en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado, donde el epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica comprende un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en los péptidos de la Tabla 2 o de la Tabla A, o un análogo de los mismos.

55

Se describe una composición para provocar una respuesta inmunitaria en un animal, que comprende una cantidad eficaz de un ácido nucleico aislado que codifica un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica aislado en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado, donde el epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica comprende un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en los péptidos de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

60

Se describen ácidos nucleicos aislados que codifican los péptidos correspondientes a epítipos específicos de esclerosis lateral amiotrófica, incluyendo las siguientes moléculas de ARN, equivalentes de codones sinónimos de las mismas y sus equivalentes de ADN enumerados en los ácidos nucleicos de la Tabla 2C.

65

Un experto en la materia apreciará que hay varios modos de administración disponibles cuando se usa una composición que contiene una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un péptido correspondiente a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1, incluyendo un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica aislado, un epítipo específico de enfermedad de Alzheimer aislado y un epítipo específico de enfermedad de Parkinson aislado. Las moléculas recombinantes descritas anteriormente pueden introducirse directamente en células o en tejidos *in vivo* usando vehículos de suministro tales como vectores retrovíricos, vectores adenovíricos y vectores de virus ADN. También pueden introducirse en células *in vivo* usando técnicas físicas tales como microinyección y electroporación o métodos químicos tales como co-precipitación e incorporación de ADN en liposomas. Las moléculas recombinantes también pueden suministrarse en forma de un aerosol o por lavado. Las moléculas de ácido nucleico descritas en este documento también pueden aplicarse de

70

forma extracelular, tal como por inyección directa en las células.

Método de tratamiento médico de la enfermedad usando ácidos nucleicos

5 Los vectores que contienen las moléculas de ácido nucleico descritas en este documento se administran
 opcionalmente al SNC de mamíferos, preferiblemente seres humanos, en terapia génica usando técnicas descritas a
 continuación. Los polipéptidos producidos a partir de las moléculas de ácido nucleico se administran fácilmente al
 10 SNC de mamíferos, preferiblemente seres humanos. La descripción se refiere a un método de tratamiento médico
 de un mamífero, preferiblemente un ser humano, administrando al mamífero un vector de la invención o una célula
 que contiene un vector descrito en este documento. Las enfermedades neurales tales como enfermedad de
 Parkinson, enfermedad de Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica se tratan como se describe en esta solicitud o
 usando métodos conocidos en la técnica (patentes de Estados Unidos n.º 7175840, 7157098, 7141044, 6.309.634;
 6936594; solicitudes de Estados Unidos n.º 2006073119; 2004265283; 2002107213; 2006122116). Las
 15 enfermedades, tales como enfermedades hematológicas o enfermedades neurales (neurodegenerativas), se tratan
 como se describe en esta solicitud y se conoce en la técnica. Las enfermedades nerviosas de células madre a
 tratarse por trasplante de células madre neurales incluyen enfermedades que provocan daño o pérdida de células
 neurales, por ejemplo, parálisis, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, ALS, esclerosis múltiple. El
 vector de la invención es útil como marcador de células madre y para expresar genes que causan que las células
 20 madre se diferencien (por ejemplo, factor de crecimiento).

Métodos de tratamiento usando péptidos aislados correspondientes a epítomos específicos de enfermedad

Un aspecto de la invención es las composiciones de la invención para su uso en el tratamiento de la esclerosis
 lateral amiotrófica en un sujeto que lo necesite.

25 Se describe un método de tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto que lo necesite, que
 comprende administrar al sujeto una composición que comprende un epítomo específico de esclerosis lateral
 amiotrófica, en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado.

30 Se describe el epítomo específico de esclerosis lateral amiotrófica que comprende un péptido aislado seleccionado
 del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

Métodos de tratamiento usando ácidos nucleicos aislados

35 Se describe un método de tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto que lo necesite, que
 comprende administrar al sujeto un ácido nucleico aislado que codifica un péptido correspondiente a un epítomo
 presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 en mezcla con un diluyente o vehículo
 adecuado. En ciertas descripciones, los ácidos nucleicos comprenden ácidos nucleicos seleccionados del grupo de
 ácidos nucleicos de la Tabla 2C.

40 En una descripción, el epítomo comprende un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en los péptidos
 aislados de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

45 Se describe un método de tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto que lo necesite, que
 comprende administrar al sujeto una composición que comprende un ácido nucleico que codifica un péptido
 correspondiente a un epítomo específico de esclerosis lateral amiotrófica en mezcla con un diluyente o vehículo
 adecuado. En una descripción, el ácido nucleico comprende un ácido nucleico seleccionado del grupo de ácidos
 nucleicos de la Tabla 2C.

50 En una descripción adicional, el epítomo específico de esclerosis lateral amiotrófica comprende un péptido aislado
 seleccionado del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los
 mismos.

55 Se describe un método para tratar a un sujeto que tiene una afección, enfermedad o trastorno médico mediado por
 una forma mal plegada de la superóxido dismutasa (SOD), comprendiendo el método la etapa de administrar al
 sujeto una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente seleccionado de (1)
 un anticuerpo que se une selectivamente a la forma mal plegada de SOD y/o (2) un inmunógeno que provoca la
 producción de dicho anticuerpo por dicho sujeto, y/o (3) una secuencia de ácido nucleico que codifica (1) o (2).

Métodos para provocar una respuesta inmunitaria usando un péptido aislado correspondiente a un epítomo específico de enfermedad

60 Las composiciones descritas pueden usarse para provocar una respuesta inmunitaria en un animal y pueden usarse
 en métodos para provocar una respuesta inmunitaria en un animal contra un epítomo presentado selectivamente o
 65 accesible en SOD1 no nativa, incluyendo el epítomo específico de esclerosis lateral amiotrófica, el epítomo específico
 de enfermedad de Alzheimer o el epítomo específico de enfermedad de Parkinson.

Se describe un método para provocar una respuesta inmunitaria en un animal usando una de las composiciones de la invención.

5 Se describe un método para provocar una respuesta inmunitaria en un animal, usando una composición que comprende un péptido aislado correspondiente a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado. Se describe el péptido aislado correspondiente a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1, que es un péptido seleccionado del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

10 Se describe un método para provocar una respuesta inmunitaria en un animal, usando una composición que comprende un péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado. Se describe el péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica que es un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

15 **Método para provocar una respuesta inmunitaria usando un ácido nucleico aislado**

20 Se describe un método para provocar una respuesta inmunitaria en un animal, usando una composición que comprende un ácido nucleico que codifica un péptido aislado correspondiente a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado para tratar la esclerosis lateral amiotrófica. Se describe el péptido aislado correspondiente a un epítipo que comprende un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

25 Se describe un método para provocar una respuesta inmunitaria en un animal, usando una composición que comprende un ácido nucleico que codifica un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica aislado en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado. Se describe el péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica que es un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

30 **Uso de un péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de enfermedad en la fabricación de un medicamento**

35 Se describe el uso de un péptido aislado correspondiente a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 en la fabricación de un medicamento para tratar la esclerosis lateral amiotrófica. Se describe el péptido aislado correspondiente a un epítipo que comprende un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

40 **Uso de un ácido nucleico aislado en la fabricación de un medicamento**

45 Se describe el uso de un ácido nucleico aislado que codifica un péptido que corresponde a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 en la fabricación de un medicamento para tratar la esclerosis lateral amiotrófica. Se describe el péptido aislado correspondiente a un epítipo que comprende un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

50 Como se ha descrito anteriormente, la inmunogenicidad y, por tanto, la eficacia de una vacuna puede mejorarse significativamente si el agente de inmunización (por ejemplo, el péptido aislado correspondiente a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1) y/o composiciones del mismo se co-inmunizan con un adyuvante. Por consiguiente, los métodos descritos y usos incluyen el uso de un adyuvante.

Uso de ácidos nucleicos aislados correspondientes a epítopos específicos de enfermedad para tratar enfermedades neurodegenerativas mediadas por SOD1

55 Se describe el uso de un ácido nucleico aislado que corresponde a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado para tratar la esclerosis lateral amiotrófica. Se describe el uso de un ácido nucleico aislado que codifica un péptido que corresponde a un epítipo específico de enfermedad. Se describe el ácido nucleico que codifica un péptido que corresponde a un epítipo específico de enfermedad que comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en los péptidos de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

60 Se describe el uso de un péptido aislado correspondiente a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado para tratar la esclerosis lateral amiotrófica. Se describe el péptido aislado correspondiente a un epítipo que comprende un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

Composiciones y usos de agentes de unión específicos para los epítomos específicos de enfermedad que se unen a epítomos específicos de enfermedad

Los epítomos presentados en SOD1 mal plegada pueden unirse y/o neutralizarse por varios agentes naturales o modificados por ingeniería diferentes, tales como anticuerpos, otros polipéptidos, moléculas pequeñas, aficuerpos (Wahlberg et al., Proc Natl Acad Sci USA, 100:3185-3190, 2003); anticalinas (Schlehuber y Skerra, Biophys Chem., 96:213-28, 2002); y aptámeros de ácido nucleico y proteicos (Cullen et al. Cell, 58: 423-466, 1989). En ciertas descripciones, el agente es un anticuerpo que se une selectivamente a un epítomo específico de enfermedad o un análogo del mismo presentado o accesible en SOD1 no nativa.

Generación de anticuerpos

Los epítomos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 pueden usarse para preparar anticuerpos. Se describen anticuerpos específicos para moléculas de SOD1 mal plegada, preferiblemente moléculas de SOD1 mal plegada asociadas con enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y/o esclerosis lateral amiotrófica.

En una descripción, los epítomos específicos de esclerosis lateral amiotrófica pueden usarse para preparar anticuerpos específicos para los epítomos específicos de esclerosis lateral amiotrófica. En una descripción, los anticuerpos son específicos para las moléculas de SOD1 mal plegada. En otras descripciones, los anticuerpos son anticuerpos aislados.

En otra descripción, el anticuerpo aislado específico para el epítomo específico de esclerosis lateral amiotrófica se prepara administrando una de las composiciones descritas en este documento a un animal.

Otra descripción incluye un anticuerpo aislado para un epítomo específico de esclerosis lateral amiotrófica, donde el epítomo específico de esclerosis lateral amiotrófica comprende un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

El término "anticuerpo", como se usa en este documento, pretende incluir anticuerpos monoclonales incluyendo anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, anticuerpos policlonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos y anticuerpos quiméricos. El anticuerpo puede ser de fuentes recombinantes y/o producirse en animales transgénicos. La expresión "fragmento de anticuerpo", como se usa en este documento, pretende incluir Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos y multímeros de los mismos y fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales. Por ejemplo, los fragmentos F(ab')₂ pueden generarse tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante puede tratarse para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab'. La digestión con papaína puede conducir a la formación de fragmentos Fab. Los fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpo biespecíficos y otros fragmentos también pueden sintetizarse por técnicas recombinantes. Los anticuerpos son opcionalmente de cualquier isotipo útil, incluyendo IgM que, en una realización, se usa para aplicaciones de diagnóstico e IgG, tal como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 que es una realización que se usa para aplicaciones terapéuticas.

"Anticuerpo aislado" se refiere al anticuerpo producido *in vivo* o *in vitro* que se ha retirado de la fuente que produjo el anticuerpo, por ejemplo, un animal, hibridoma u otra línea celular (tal como células recombinantes que producen anticuerpo). El anticuerpo aislado está opcionalmente "purificado", que significa al menos: un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 % o un 99 % de pureza y opcionalmente pureza de calidad farmacéutica.

"Anticuerpo endógeno" se refiere al anticuerpo producido por un sujeto, tal como un mamífero (por ejemplo, ser humano), como parte de una respuesta inmunitaria en el sujeto.

"Anticuerpo exógeno" se refiere a un anticuerpo que es no propio o foráneo para un sujeto, tal como un mamífero (por ejemplo, un ser humano). La expresión "anticuerpo exógeno" abarca un anticuerpo aislado, así como un anticuerpo aislado y purificado. Para producir anticuerpos monoclonales, pueden recogerse células productoras de anticuerpos (linfocitos) de un sujeto inmunizado con un inmunógeno que comprende un péptido aislado correspondiente a un epítomo específico de SOD1 mal plegada, incluyendo un epítomo específico de esclerosis lateral amiotrófica, un epítomo específico de enfermedad de Alzheimer o un epítomo específico de enfermedad de Parkinson, y puede fusionarse con células de mieloma por procedimientos convencionales de fusión de células somáticas inmortalizando de ese modo estas células y produciendo células de hibridoma. Dichas técnicas son bien conocidas en la técnica (por ejemplo, la técnica de hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein (42), así como otras técnicas tales como la técnica de hibridoma de células B humanas (43), la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (44), y la exploración de bibliotecas combinatorias de anticuerpos (45)). Las células de hibridoma pueden explorarse de forma inmunoquímica para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con los epítomos específicos de esclerosis lateral amiotrófica y los anticuerpos monoclonales pueden aislarse.

Los anticuerpos específicos o fragmentos de anticuerpo, reactivos contra antígenos o moléculas particulares, tales como epítomos presentados selectivamente o accesibles en formas mal plegadas de SOD1, incluyendo epítomos específicos de esclerosis lateral amiotrófica, epítomos específicos de enfermedad de Alzheimer o epítomos específicos de enfermedad de Parkinson también pueden generarse explorando bibliotecas de expresión que

5 codifican genes de inmunoglobulina o partes de los mismos, expresados en bacterias con componentes de superficie celular. Por ejemplo, los fragmentos Fab completos, las regiones VH y las regiones FV pueden expresarse en bacterias usando bibliotecas de expresión en fagos (véase, por ejemplo, Ward et al. (46); Huse et al. (45); y McCafferty et al. (47)).

10 La expresión "anticuerpo humanizado", como se usa en este documento, significa que el anticuerpo o fragmento comprende regiones flanqueantes conservadas humanas (mencionadas alternativamente como regiones constantes) y las regiones hipervariables (mencionadas alternativamente como el dominio de unión a antígeno) que son de origen no humano. Por ejemplo, la región hipervariable puede ser de un ratón, rata u otra especie. La inmunización de anticuerpo a partir de especies no humanas se ha descrito bien en la bibliografía. Véase, por

15 ejemplo, el documento EP-B1 0 239400 y Carter y Merchant 1997 (Curr Opin Biotechnol 8, 449-454, 1997). Los anticuerpos humanizados también se obtienen fácilmente en el mercado (por ejemplo, Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Gran Bretaña.).

Las formas humanizadas de anticuerpos de roedor se generan fácilmente por injerto de CDR (Riechmann et al. Nature, 332:323-327, 1988). En este enfoque, los seis bucles de CDR que comprenden el sitio de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal de roedor se unen a las correspondientes regiones flanqueantes humanas. El injerto de CDR a menudo produce anticuerpos con afinidad reducida ya que los aminoácidos de las regiones flanqueantes pueden influir en el reconocimiento del antígeno (Foote y Winter. J Mol Biol, 224: 487-499, 1992). Para mantener la afinidad del anticuerpo, a menudo es necesario reemplazar ciertos restos flanqueantes por mutagénesis dirigida al

20 sitio u otras técnicas recombinantes y puede asistirse por modelado informático del sitio de unión a antígeno (Co et al. J Immunol, 152: 2968-2976, 1994).

Las formas humanizadas de anticuerpos se obtienen opcionalmente por recubrimiento (Pedersen et al. J Mol Biol, 235: 959-973, 1994). En este enfoque, solamente se humanizan los restos superficiales de un anticuerpo de roedor.

30 La expresión "anticuerpos humanos", como se usa en este documento, se refiere a anticuerpos que son, o corresponden a, anticuerpos que se producen de forma endógena en un sujeto humano, sin embargo, los anticuerpos humanos también se producen opcionalmente de forma exógena a través de técnicas bioquímicas. Los anticuerpos humanos específicos para un antígeno particular pueden identificarse por una estrategia de presentación en fagos (Jespers et al. Bio/Technology, 12: 899-903, 1994). En un enfoque, la cadena pesada de un anticuerpo de roedor dirigido contra un antígeno específico se clona y aparea con un repertorio de cadenas ligeras humanas para presentarse como fragmentos Fab en fagos filamentosos. El fago se selecciona por unión al antígeno. La cadena ligera humana seleccionada posteriormente se aparea con un repertorio de cadenas pesadas humanas para su presentación en fagos, y el fago se selecciona de nuevo por unión al antígeno. El resultado es un fragmento

35 Fab de anticuerpo humano específico para un antígeno particular. En otro enfoque, se producen bibliotecas de fagos donde los miembros presentan diferentes fragmentos de anticuerpo humano (Fab o Fv) sobre sus superficies externas (Dower et al., documento WO 91/17271 y McCafferty et al., documento WO 92/01047). Los fagos que presentan anticuerpos con una especificidad deseada se seleccionan por enriquecimiento de afinidad para un antígeno específico. El fragmento Fab o Fv humano identificado a partir de cualquier enfoque puede volver a clonarse para su expresión como un anticuerpo humano en células de mamífero.

40

45

Los anticuerpos humanos se obtienen opcionalmente de animales transgénicos (patentes de Estados Unidos n.º 6.150.584; 6.114.598 y 5.770.429). En este enfoque, se delecta el gen de la región de unión de cadena pesada (J_H) en un ratón mutante quimérico o de la línea germinal. La serie del gen de inmunoglobulina de línea germinal humana posteriormente se transfiere a dicho ratón mutante. El ratón transgénico resultante entonces es capaz de generar un repertorio completo de anticuerpos humanos tras exposición al antígeno.

50

Los anticuerpos humanizados o humanos se seleccionan de cualquier clase de inmunoglobulinas incluyendo: IgM, IgG, IgD, IgA o IgE; y cualquier isotipo, incluyendo: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo humanizado o humano puede incluir secuencias de uno o más de un isótopo o clase. Además, estos anticuerpos se producen típicamente como fragmentos de unión a antígeno tales como Fab, Fab' F(ab')₂, Fd, Fv y fragmentos de anticuerpo de un único dominio, o como anticuerpos de cadena sencilla en que las cadenas pesada y ligera están unidas por un espaciador. Además, los anticuerpos humanos o humanizados pueden existir en forma monomérica o polimérica. El anticuerpo humanizado opcionalmente comprende una cadena no humana y una cadena humanizada (es decir, una cadena pesada o ligera humanizada).

55

60

Adicionalmente, los anticuerpos específicos para los epítomos de la invención se aíslan fácilmente explorando bibliotecas de presentación en fagos de anticuerpos. Por ejemplo, opcionalmente se explora una biblioteca en fagos de anticuerpos usando un epítomo específico de enfermedad de la presente invención para identificar fragmentos de anticuerpos específicos para el epítomo específico de enfermedad. Los fragmentos de anticuerpo identificados

65 opcionalmente se usan para producir una diversidad de anticuerpos recombinantes que son útiles con diferentes

realizaciones de la presente invención. Las bibliotecas de presentación en fagos de anticuerpos están disponibles en el mercado, por ejemplo, a través de Xoma (Berkeley, California). Los métodos para explorar bibliotecas en fagos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica.

5 También se describen anticuerpos que compiten selectivamente con anticuerpos creados usando un inmunógeno que comprende un péptido aislado de la Tabla 2 y de la Tabla 2A y análogos de los mismos. Se realizan ensayos de competición para proporcionar un método de determinación de si un anticuerpo de ensayo desplaza a un anticuerpo descrito en este documento, que comprende poner en contacto un epítipo presentado en una forma no nativa de SOD1 con un anticuerpo de ensayo y un anticuerpo creado usando un inmunógeno que comprende un péptido
10 aislado de la Tabla 2, Tabla 2A o análogos de los mismos y a continuación determinando si el anticuerpo de ensayo desplaza selectivamente el anticuerpo descrito en este documento de la unión del epítipo. El anticuerpo de ensayo se considera que desplaza selectivamente el anticuerpo descrito en este documento si el anticuerpo de ensayo tiene al menos 1,5 veces o al menos 2 veces mayor afinidad de unión por el epítipo.

15 Estos anticuerpos específicos para epítipos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 pueden usarse para tratar la esclerosis lateral amiotrófica. En una realización, los anticuerpos de la invención pueden usarse para tratar la esclerosis lateral amiotrófica. Por ejemplo, la infusión pasiva de anticuerpos específicos para un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica puede inhibir la formación de agregados de SOD1 y/o puede bloquear el mal plegamiento dirigido por molde de SOD1.

20

Composiciones que comprenden anticuerpos

Un aspecto adicional de la invención es una composición para tratar la esclerosis lateral amiotrófica, que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo específico para un epítipo que consiste en DSE5 o en DSE7 o un análogo que
25 consiste en DSE5 o en DSE7, comprendiendo el análogo la modificación de un aminoácido por oxidación o nitración en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado. Se describe el epítipo que comprende un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

30 Un aspecto de la invención es una composición para tratar la esclerosis lateral amiotrófica, que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo específico para un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica que consiste en DSE5 o en DSE7 o un análogo que consiste en DSE5 o en DSE7, comprendiendo el análogo la modificación de un aminoácido por oxidación o nitración en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado.

35 En una realización, los anticuerpos son anticuerpos humanizados. En otra realización, los anticuerpos se administran a la sangre o al fluido espinal de un sujeto con esclerosis lateral amiotrófica.

Se describen métodos y usos de los anticuerpos para tratar la esclerosis lateral amiotrófica.

Método de tratamiento: inmunización pasiva

Se describe un método de tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo que se une a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado.

45

Además de anticuerpos, los epítipos presentados en SOD1 mal plegada pueden unirse y/o neutralizarse por varios agentes naturales o modificados por ingeniería diferentes tales como otros polipéptidos, moléculas pequeñas, aficuerpos (Wahlberg et al., Proc Natl Acad Sci USA, 100:3185-3190, 2003); anticalinas (Schlehuber y Skerra, Biophys Chem., 96:213-28, 2002); y aptámeros de ácido nucleico y proteicos (Cullen et al. Cell, 58: 423-466, 1989).

50

Los aficuerpos son proteínas de unión modificadas por ingeniería basadas en la estructura de triple hélice del dominio Z derivado de la proteína A de estafilococos (Wahlberg et al., Proc Natl Acad Sci USA, 100:3185-3190, 2003). El dominio Z consiste en 58 restos que se unen a la parte Fc de IgG de diferentes especies (Nygren y Uhlen. Curr Opin Struct Biol., 7:463-469, 1997). Aleatorizando simultáneamente 13 posiciones de aminoácido localizadas
55 en las dos hélices que componen la superficie de unión a Fc del dominio Z, se crea una biblioteca de proteínas de unión (aficuerpos) y se usa para explorar la unión a dianas deseadas por tecnología de presentación en fagos (Nord, et al. Protein Eng., 8:601-608, 1995; Nord et al. Nat Biotechnol. 15:772-777, 1997). Los aficuerpos tienen una estructura secundaria similar al dominio Z nativo y tienen constantes de disociación (KD) en el intervalo micromolar para sus dianas respectivas (Nord et al. Nat Biotechnol., 15:772-777, 1997).

60

Las anticalinas son una clase de proteínas de unión a ligando modificadas por ingeniería derivadas de la estructura proteica de lipocalina (Schlehuber y Skerra, Biophys Chem., 96:213-28, 2002; Weiss y Lowman. Chem. Biol., 7:R177-R184, 2000; Skerra. J Biotechnol., 74:257-275, 2001). El proceso de preparación de las anticalinas se describe en el documento EP1017814. El sitio de unión a ligando de las anticalinas puede volver a modificarse por
65 ingeniería por sustituciones de aminoácido, u otros enfoques recombinantes, para alterar la especificidad de unión de la proteína. Las anticalinas son similares a los anticuerpos porque poseen alta afinidad y especificidad por sus

ligandos prescritos. Sin embargo, las anticalinas tienen varias ventajas sobre los anticuerpos, incluyendo un tamaño más pequeño; una composición peptídica sencilla; y un sitio de unión que se manipula fácilmente.

5 Los aptámeros son cortos oligonucleótidos de ADN monocatenario, oligonucleótidos de ARN o polipéptidos con la capacidad de reconocer diversas moléculas diana con alta afinidad y especificidad (Cullen et al. Cell, 58: 423-466, 1989). Los aptámeros se identifican opcionalmente por un proceso de evolución y selección *in vitro* llamado SELEX (evolución sistémica de ligandos por enriquecimiento exponencial), y los métodos para obtener aptámeros específicos para un polipéptido de interés son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Brody E N, Gold L. J Biotechnol. Marzo de 2000; 74(1):5-13. Los métodos para la selección eficaz de aptámeros que se unen a cualquier polipéptido de interés se describen en la publicación de Estados Unidos n.º 20050142582.

15 Como los anticuerpos, los aptámeros asumen una forma tridimensional específica y estable *in vivo*, que proporciona unión específica a moléculas diana y provocan una respuesta biológica. Además, las afinidades de unión de los aptámeros son análogas a las de los anticuerpos (revisado en Nimjee et al. Annu Rev Med, 56: 555 - 83, 2005). Los aptámeros tienen varias ventajas sobre los anticuerpos, incluyendo estabilidad a 80 °C, semivida larga, baja inmunogenicidad (Retina, 22: 143-152, 2002), baja variabilidad entre lotes, amplia distribución tisular debido a su pequeño tamaño, se modifican fácilmente para alterar su distribución tisular y propiedades de eliminación, por ejemplo, por pegilación (Tucker et al. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 732: 203-212, 1999).

20 En una descripción, el epítipo comprende un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

Uso de anticuerpos para tratar la enfermedad

25 Se describe el uso de un anticuerpo que se une a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado para tratar la esclerosis lateral amiotrófica. En una descripción, el epítipo comprende un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

30 Uso del anticuerpo en la fabricación de un medicamento

Se describe el uso de un anticuerpo que se une a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 en la fabricación de un medicamento para tratar la esclerosis lateral amiotrófica. En una descripción, el epítipo comprende un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla 2 o de la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

35 Los siguientes ejemplos se describen únicamente con fines de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención.

40 Métodos de administración de las composiciones

Las composiciones de la invención se administran fácilmente, por ejemplo, por administración parenteral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraventricular, intratecal, intraorbital, oftálmica, intracapsular, intramedular, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, en aerosol u oral.

45 En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica se administra de forma sistémica.

En otras realizaciones, la composición farmacéutica se administra directamente al cerebro u otra parte del SNC. Por ejemplo, dichos métodos incluyen el uso de un catéter implantable y una bomba, que serviría para descargar una dosis predeterminada a través del catéter al sitio de infusión. Un experto en la materia reconocería adicionalmente que el catéter puede implantarse por técnicas quirúrgicas que permiten la visualización del catéter para posicionar el catéter adyacente al sitio deseado de administración o infusión en el cerebro. Dichas técnicas se describen en Elsberry et al., patente de Estados Unidos 5.814.014 "Techniques of Treating Neurodegenerative Disorders by Brain Infusion". Los inventores también han contemplado otros métodos tales como los descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos 20060129126 (Kaplitt y During "Infusion device and method for infusing material into the brain of a patient"). Los dispositivos para suministrar fármacos al cerebro y otras partes del SNC están disponibles en el mercado (por ejemplo, SynchroMed® EL Infusion System; Medtronic, Minneapolis, Minnesota).

60 En otra realización, la composición farmacéutica se administra al cerebro usando métodos tales como modificación de los compuestos de la invención para permitir el transporte mediado por receptor a través de la barrera hematoencefálica.

Otras realizaciones contemplan la co-administración de los compuestos de la invención con moléculas biológicamente activas que se sabe que facilitan el transporte a través de la barrera hematoencefálica.

65 En otra realización, los compuestos de la invención se reformulan como proteínas de fusión o quiméricas para

posibilitar su transporte a través de la barrera hematoencefálica. Dichas tecnologías se describen en la patente de Estados Unidos 4902505, "Chimeric peptides for neuropeptide delivery through the blood-brain barrier".

5 La invención también contempla métodos adicionales para administrar los compuestos a través de la barrera hematoencefálica tales como los dirigidos a aumentar de forma transitoria la permeabilidad de la barrera hematoencefálica como se describe en la patente de Estados Unidos 7012061 "Method for increasing the permeability of the blood brain barrier".

10 Un experto en la materia reconocerá la diversidad de métodos adecuados para administrar los compuestos de la invención directamente al cerebro o a través de la barrera hematoencefálica y será capaz de modificar estos métodos para administrar de forma segura los productos de la invención.

Dosis y formulaciones

15 La forma de dosificación es opcionalmente una forma líquida de dosificación. La expresión "forma líquida de dosificación" se refiere a formas no sólidas de dosificación adecuadas para, aunque sin limitación, administración parenteral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraventricular, intratecal, intraorbital, oftálmica, intracapsular, intramedular, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, en aerosol u oral. Pueden prepararse soluciones de un compuesto de la invención en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, DMSO y mezclas de los mismos con o sin alcohol, y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos. Un experto en la materia conocería el modo de preparar formulaciones adecuadas. Los procedimientos convencionales e ingredientes para la selección y preparación de formulaciones adecuadas se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (2003 - 20ª edición) y en la Farmacopea de Estados Unidos: The National Formulary (USP 24 NF19) publicada en 1999. Las formulaciones contienen opcionalmente excipientes incluyendo, aunque sin limitación, agentes tamponantes, un antioxidante, un estabilizante, un vehículo, un diluyente y un agente para el ajuste del pH.

30 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida que exista facilidad de inyección.

35 Un experto en la materia reconocería que la forma de dosificación y formulación elegidas depende de las características de la composición. Por ejemplo, un experto en la materia sabría que una composición que comprende un anticuerpo puede requerir una formulación diferente que una composición que comprende un ácido nucleico y elegiría una formulación y una forma de dosificación adecuadas a la composición.

40 Los factores adicionales que afectan a la dosis eficaz de una formulación incluyen la vía de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del sujeto, la especie del sujeto, si el tratamiento es profiláctico o terapéutico, si se están administrando otras medicaciones y si también se administra un adyuvante.

45 La cronología de las inmunizaciones opcionalmente varía de una vez al día, a una vez a la semana, a una vez al mes, a una vez al año, a una vez cada diez años. Un régimen típico incluye una inmunización seguida por inyecciones de refuerzo a intervalos de 6 semanas. Otro régimen consiste en inmunización seguida por inyecciones de refuerzo 1, 2 y 12 meses después. Como alternativa, las inyecciones de refuerzo variarán dependiendo de la respuesta inmunitaria y el estado fisiológico del sujeto.

50 Para inmunización pasiva usando un anticuerpo dirigido contra un epítipo derivado de una forma no nativa de SOD1, la dosis varía opcionalmente de aproximadamente 0,0001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, de 0,5 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg y de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg del peso corporal del sujeto. En otras realizaciones, la dosis varía de aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 5 g/kg, de aproximadamente 500 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg y de aproximadamente 750 mg/kg a aproximadamente 1.5 g/kg del peso corporal del sujeto.

55 Para inmunización activa usando inmunógenos que comprende péptidos aislados o moléculas relacionadas correspondientes a epítipos específicos de enfermedad de formas no nativas de SOD1, la dosis varía opcionalmente de aproximadamente 0,0001 microgramos a 10 gramos, de aproximadamente 0,01 microgramos a aproximadamente 1 gramo, de aproximadamente 1 microgramos a aproximadamente 1 mg, y de aproximadamente 100 a 250 microgramos por tratamiento. En una realización, la cronología de administración del tratamiento es en uno o más de los siguientes: 0 meses, 2 meses, 6 meses, 9 meses, y/o 12 meses. En un régimen, la dosificación es a 2, 6, 9, y 12 meses después de la primera inmunización. En otro régimen, la dosificación es a 2 y 4 semanas después de la primera inmunización, y después mensualmente después de ello. En un régimen alternativo, la dosificación varía dependiendo del estado fisiológico del sujeto y/o la respuesta del sujeto a las inmunizaciones previas. La vía de administración opcionalmente incluye, aunque sin limitación, inyecciones intramusculares e intraperitoneales. En una realización, la composición se inyecta en el músculo deltoides.

Cuando un péptido aislado correspondiente a un epítipo es demasiado pequeño para ser inmunogénico, o cuando la inmunogenicidad está mejorada, el péptido se une opcionalmente o acopla a un vehículo adecuado. Los vehículos adecuados incluyen, aunque sin limitación, hemocianina de lapa californiana, antígeno MAP, albuminas séricas, moléculas de inmunoglobulina y toxoides de bacterias patogénicas. Los péptidos pueden unirse a vehículos por reticulación química, por ejemplo, para formar dendrímeros. En alternativa, los péptidos inmunogénicos pueden expresarse como proteínas de fusión con vehículos.

Pueden usarse anticuerpos monoclonales tales como mAb humanizados por infusión intravenosa. La concentración terapéutica del anticuerpo humanizado contra SOD1 DES puede ser de 1-10 microgramos por ml de concentración local en el SNC. En el entorno de una barrera hematoencefálica (BBB) no alterada, solamente 1-100 a 1-1000 de IgG penetra en el SNC. Por tanto, la concentración del anticuerpo terapéutico en la circulación periférica necesaria para alcanzar esta concentración en el SNC sería del orden de 100 microgramos/ml a como máximo 10 mg/ml, cerca del nivel de pre-tratamiento de IgG en plasma humano. Considerando que el volumen de sangre humana es de aproximadamente 5 litros, la dosificación de 50 gramos sería el límite superior, que es similar a la dosis de inmunoglobulina intravenosa policlonal combinada (IVIG) usada para tratar muchos trastornos inflamatorios y autoinmunitarios. Considerando que la degradación de IgG humana requiere 3-4 semanas, la dosificación una vez cada 3 semanas constituiría un régimen eficaz. Sin embargo, la dosificación de anticuerpos monoclonales humanizados anti-DSE podría ser muy inferior que el cálculo anterior, basándose en los experimentos de tratamiento en ratones proporcionados en los siguientes ejemplos. Se ha descubierto que la dosificación en ratones G93A por vía intraperitoneal de 1 mg de anticuerpo contra-DSE2 era terapéuticamente eficaz. Considerando que el volumen de sangre en un ratón es de 6-7 ml por 100 gramos de peso corporal, la concentración en circulación del mAb contra DSE2 era del orden de 1 mg/ml. Para dosificar a un ser humano con ALS, esto se traduciría en 1/10 de la IgG normal en circulación (habitualmente aproximadamente 10 mg/ml). El volumen de sangre humana es del orden de 5 litros, lo que sugeriría una dosis terapéutica eficaz de anticuerpo humanizado contra DSE2 del orden de 5 gramos mediante infusión i.v. Además, se ha apreciado leve alteración de la BBB en ALS, que presumiblemente es máxima en regiones de mayor neuroinflamación, es decir, aquellas regiones en que la enfermedad es más manifiesta, como las neuronas motoras del asta anterior, y las neuronas motoras corticales, así como ciertos tramos de fibras que están favorecidos por neuronas motoras corticales. Por tanto, es posible que la alteración selectiva de BBB en regiones de enfermedad máxima permita la eficacia terapéutica para concentraciones en circulación inferiores de anticuerpos contra SOD1 anti-DSE.

Los mAb humanizados contra DSE pueden usarse para infusión directa en el SNC mediante la vía intraventricular o por la vía intratecal. Ejemplos de dispositivos médicos que se usan para este propósito se fabrican por MedTronic. Como el CSF recircula varias veces al día, se requiere infusión continua, en lugar de un régimen de dosificación de 3-4 semanas. La concentración final de 1-10 microgramos por ml se conseguirá por infusión de como mucho 5 mg al día en los 500 ml por día de CSF.

Terapias de combinación

Los métodos descritos, por tanto, proporcionan la aplicación inmunoterapéutica de anticuerpos contra SOD1 en el tratamiento de afecciones, trastornos o enfermedades marcadas por la presencia de SOD1 mal plegada o monomérica.

El tratamiento de un sujeto afectado puede realizarse por monoterapia, del modo justamente descrito, administrando un anticuerpo seleccionado o una vacuna basada en epítipos seleccionada. En realizaciones de la presente descripción, el presente método puede realizarse administrando más de una especie de anticuerpo o más de una especie de epítipo. Por ejemplo, el método puede realizarse administrando un anticuerpo a la estructura de bucle electrostático [DSE 2] y un anticuerpo contra un epítipo accesible solamente sobre la superficie de contacto del dímero de SOD [DSE1a]. En una realización, el método de la presente descripción se realiza usando anticuerpos que se unen selectivamente a al menos dos epítipos diferentes accesibles selectivamente sobre SOD1 mal plegada, tal como un epítipo de superficie sobre el dímero de SOD, y un epítipo interfacial sobre el monómero de SOD. Asimismo, el método puede realizarse administrando dos epítipos diferentes, en forma de vacunas útiles para crear anticuerpos contra esos dos epítipos diferentes sobre SOD1 mal plegada o monomérica. En una descripción, el método implica la administración de dos o más epítipos, por ejemplo, DSE1a y DSE2. En otra descripción, el método implica la administración de tres o más epítipos, por ejemplo, DSE1a, DSE2 y DSE5. Además, el método puede realizarse usando una combinación de inmunoterapia pasiva y también inmunoterapia activa, en que el sujeto se trata para recibir tanto un anticuerpo seleccionado como una vacuna basada en epítipos seleccionada.

El método también puede realizarse como una terapia de combinación en que el anticuerpo contra SOD1 y/o epítipos seleccionados se administra en combinación con otro agente útil terapéuticamente en el tratamiento o control de la enfermedad particular.

En terapias de combinación para el tratamiento de ALS, los presentes agentes terapéuticos pueden usarse en combinación con riluzol y otros inhibidores de glutamato.

Los inventores también han descubierto que se retiene cobre en SOD1 oxidada catalizada por metal, que es una

especie agregada inmunorreactiva de DSE2. Los inventores también han descubierto que SOD1 oxidada por tratamiento con peróxido de hidrogeno presenta inmunorreactividad de DSE2 (Figura 2). El anticuerpo contra DSE2, que reacciona contra el bucle electrostático de SOD1 del sitio activo, puede estar bloqueando físicamente el acceso al cobre retenido de la especie mal plegada, y por tanto reduciendo la catálisis del oxígeno reactivo y de la especie de nitrógeno a través de la reacción de Haber-Weiss, la reacción de Fenton y otras. De forma notable, altas concentraciones de ascorbato en el SNC pueden estar facilitando el ciclo redox del cobre unido por SOD1 mal plegada, potenciando su capacidad de generar ROS y RNS. El estado agregado de SOD1, que se ha secretado preferentemente de las neuronas (1), altera su eliminación y degradación, "atrapando" cobre en una forma neurotóxica catalíticamente activa en cercana proximidad a neuronas motoras en ALS, y en neuronas del hipocampo y en otras neuronas en AD. Se aprecia la posibilidad de que Abeta pueda contribuir a este ciclo redox tóxico del cobre en AD (83).

Por consiguiente, en una terapia de combinación particularmente útil, los presentes agentes terapéuticos se usan en combinación con un antioxidante, para el tratamiento de ALS, AD y PD, así como para otros trastornos en que SOD1 disfuncional y/o la agregación de SOD1 provoca la acumulación tóxica de especies reactivas de oxígeno (ROS) o de especies reactivas de nitrógeno (RNS). Los antioxidantes son un grupo bien conocido de agentes fácilmente disponibles, e incluyen las vitaminas ácido ascórbico y alfa-tocoferol, y agentes farmacológicos tales como N-acetilcisteína. En realizaciones del presente método, el antioxidante es una SOD sintética funcional, que imita la acción enzimática de SOD endógena para reducir la acumulación de radicales superóxido. Los fármacos útiles relacionados incluyen aquellos que estabilizan el dímero de SOD, como se describe, por ejemplo, por Lansbury et al. en el documento US 2006/0194821. Otros fármacos que tienen el mismo efecto son útiles también. En realizaciones particulares, el antioxidante es un quelante de cobre, tal como penicilamina, clioquinol, 8-hidroxiquinolina y derivados tales como los descritos en el documento US2006/0089380, cuprizona, compuestos basados en ácido picolínico, compuestos de molibdeno, L-aurina y otros fármacos que tiene el efecto de inhibir el ciclo redox mediado por iones de cobre. Otros antioxidantes útiles más incluyen eliminadores de superóxido, eliminadores de peróxido y eliminadores de RNS. En una realización particular de la invención, los presentes agentes terapéuticos se usan en combinación con resveritrol, un antioxidante presente en uvas rojas y vino tinto. En una realización específica, el anticuerpo contra DSE2 o epítipo se usa en combinación con resveritrol.

Cuando se usa en combinación con los presentes agentes terapéuticos, el agente de combinación se administra del modo prescrito para ese agente, de acuerdo con la práctica convencional.

Diagnóstico

Los anticuerpos específicos para epítomos específicos de enfermedad por SOD1 tales como epítomos específicos de esclerosis lateral amiotrófica también pueden usarse para diagnosticar la esclerosis lateral amiotrófica. Por tanto, se describe un método de detección o de diagnóstico de la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto, que comprende las etapas de:

- (a) poner en contacto una muestra de ensayo de dicho sujeto con un anticuerpo de la invención, donde el anticuerpo se une a un epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica para producir un complejo de anticuerpo-antígeno;
- (b) medir la cantidad del complejo de anticuerpo-antígeno en la muestra de ensayo; y
- (c) comparar la cantidad del complejo de anticuerpo-antígeno en la muestra de ensayo con un control.

Donde una diferencia en la cantidad del complejo de anticuerpo-antígeno en la muestra de ensayo en comparación con el control es indicativa de esclerosis lateral amiotrófica.

Opcionalmente, en el caso donde el epítipo está enmascarado dentro del agregado de SOD1, el método comprende la etapa adicional de tratar la muestra en condiciones de disgregación, usando, por ejemplo, clorhidrato de guanidinio, para liberar la SOD1 mal plegada para su posterior detección.

La expresión "detectar o controlar la esclerosis lateral amiotrófica" se refiere a un método o proceso de determinación de si un sujeto tiene o no tiene esclerosis lateral amiotrófica o del grado de la esclerosis lateral amiotrófica. Además, los anticuerpos de la invención pueden usarse para detectar o controlar la aparición y progresión de agregación de SOD1, y por tanto la progresión de la enfermedad. Los anticuerpos son adicionalmente útiles para controlar la progresión de la enfermedad durante el tratamiento con un método de la invención.

El término "control", como se usa en este documento, se refiere a una muestra de un sujeto o de un grupo de sujetos que sabe que tienen esclerosis lateral amiotrófica o que no tienen esclerosis lateral amiotrófica. Un experto en la materia apreciará que la diferencia en la cantidad del complejo de anticuerpo-antígeno variará dependiendo del control. Por ejemplo, si se sabe que el control tiene esclerosis lateral amiotrófica, entonces menos complejo de anticuerpo-antígeno medible en la muestra de ensayo en comparación con el control indica que el sujeto no tiene esclerosis lateral amiotrófica o que tiene menor grado de esclerosis lateral amiotrófica. Si se sabe que el control tiene esclerosis lateral amiotrófica, entonces igual cantidad o mayor de complejo de anticuerpo-antígeno medible en la muestra de ensayo en comparación con el control indica que el sujeto tiene esclerosis lateral amiotrófica. Si se

sabe que el control no tiene esclerosis lateral amiotrófica, entonces una cantidad menor o igual de complejo de anticuerpo-antígeno medible en la muestra de ensayo en comparación con el control indica que el sujeto no tiene esclerosis lateral amiotrófica. Si se sabe que el control no tiene esclerosis lateral amiotrófica, entonces mayor cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno medible en la muestra de ensayo en comparación con el control indica que el sujeto tiene esclerosis lateral amiotrófica.

El término "muestra", como se usa en este documento, se refiere a cualquier muestra de fluido, de células o de tejido de un sujeto que puede ensayarse para SOD1 mal plegada. En una realización, la muestra comprende, sin limitación, fluido cefalorraquídeo, plasma, suero sanguíneo, sangre completa, tejido de médula espinal, células del cerebro, neuronas motoras, una parte del asta dorsal o células sanguíneas periféricas, tales como eritrocitos, células mononucleares, linfocitos, monocitos y granulocitos.

Opcionalmente, en el caso donde el epítipo está enmascarado dentro del agregado de SOD1, el método comprende la etapa adicional de tratar la muestra en condiciones de disgregación, usando, por ejemplo, clorhidrato de guanidinio, para liberar la SOD1 mal plegada para posterior detección.

En una descripción, los anticuerpos se usan para determinar si SOD1 mal plegada está presente en la muestra. En otra realización, los anticuerpos se marcan con un marcador detectable.

En otra realización, los epítipos se usan para controlar la aparición y título de los anticuerpos introducidos en o creados dentro de un destinatario. En esta descripción, una muestra del paciente se muestra con el epítipo, y preferiblemente con un epítipo marcado, y se determina la presencia o cantidad de anticuerpo unido.

El marcador es preferiblemente capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el marcador puede ser radiopaco o un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I ; un compuesto fluorescente (fluoróforo) o quimioluminiscente (cromóforo), tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; una enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano rusticano; un agente de imágenes; o un ión metálico.

En otra descripción, la señal detectable es detectable indirectamente. Por ejemplo, puede usarse un anticuerpo secundario que es específico para el anticuerpo de la invención y contiene un marcador detectable, para detectar el anticuerpo de la invención.

Un experto en la materia apreciará que pueden usarse varios métodos para determinar si SOD1 mal plegada está presente en una mezcla usando los anticuerpos de la invención, incluyendo inmunoensayos tales como citometría de flujo, transferencia de Western, ELISA e inmunoprecipitación seguida por inmunocitoquímica por SDS-PAGE.

En una descripción, se detecta o controla una enfermedad relacionada con SOD1 mal plegada, tal como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad con cuerpos de Lewy y/o esclerosis lateral amiotrófica, en un sujeto usando citometría de flujo de una muestra del sujeto, incluyendo células sanguíneas periféricas, tales como eritrocitos, células mononucleares, linfocitos, monocitos y/o granulocitos, o células mononucleares encontradas en fluido cefalorraquídeo. En una realización adicional, las células ensayadas usando citometría de flujo pueden permeabilizarse usando reactivos conocidos para los expertos en la materia incluyendo, sin limitación, detergentes, etanol, metanol y paraformaldehído.

En una descripción, puede detectarse o controlarse una enfermedad relacionada con SOD1 mal plegada, tal como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y/o enfermedad con cuerpos de Lewy, en un sujeto usando citometría de flujo de una muestra del sujeto, incluyendo células sanguíneas periféricas, tales como eritrocitos, células mononucleares, linfocitos, monocitos y/o granulocitos, o células mononucleares encontradas en fluido cefalorraquídeo. En una realización adicional, las células ensayadas usando citometría de flujo pueden permeabilizarse usando reactivos conocidos para los expertos en la materia incluyendo, sin limitación, detergentes, etanol, metanol y paraformaldehído.

En otra descripción, puede detectarse o controlarse una enfermedad relacionada con SOD1 mal plegada, tal como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y/o enfermedad con cuerpos de Lewy, usando el ensayo de protección de epítipos descrito en el documento WO 2005/019828 titulado "Epitope Protection Assay and Method for Detecting Protein Conformations", que entró en fase nacional en los Estados Unidos el 17 de febrero de 2006. En otra descripción, se detecta o controla la esclerosis lateral amiotrófica usando el ensayo de protección de epítipos descrito en el documento WO 2005/019828.

Cualquiera de los métodos descritos para diagnosticar, detectar o controlar la agregación de SOD1 y el desarrollo de una enfermedad relacionada con SOD1 mal plegada puede usarse además de o en combinación con técnicas tradicionales de diagnóstico para enfermedades relacionadas con SOD1 mal plegada.

5 Cualquiera de los métodos descritos para diagnosticar, detectar o controlar la agregación de SOD1 y el desarrollo de esclerosis lateral amiotrófica puede usarse además de o en combinación con técnicas tradicionales de diagnóstico para esclerosis lateral amiotrófica. Las técnicas tradicionales de diagnóstico para esclerosis lateral amiotrófica incluyen exámenes físicos y neurológicos, y pueden incluir ensayos de electromiografía, ensayos de velocidad de la condición nerviosa e imágenes de resonancia magnética.

10 El diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa, y el control de la progresión de estos trastornos, es insatisfactorio en estos momentos. El diagnóstico definitivo puede hacerse solamente por examen tisular sobre evaluación de necropsia después de la muerte, o por biopsia (casi nunca utilizada en enfermedades neurodegenerativas). No es una exageración indicar que el diagnóstico presuntivo antemórtem de ALS, de AD y de PD se hace sobre la base de características clínicas, que a menudo están compartidas con otras enfermedades, e intentando excluir otros trastornos que imitan la enfermedad en cuestión. Se realiza "diagnóstico por exclusión" a través de neuroimágenes (exploraciones MRI y CAT) y ensayos en sangre para descartar diagnósticos confusos (tales como ensayos de la función de la tiroides). El ensayo especializado para trastornos neurodegenerativos diferentes (tales como evaluación neurológica para AD, exploración PET para PD y electromiografía para ALS), junto con el examen clínico, son predictivos del diagnóstico en autopsia del 70-90 % de los pacientes con AD y PD, y habitualmente más del 90 % de pacientes con ALS.

20 Los anticuerpos de la invención se describen como útiles para diagnóstico y se describen para su uso en la concentración de bajas cantidades de proteínas mal plegadas presentes en fluidos y tejidos del paciente por métodos de concentración tales como inmunoprecipitación. En una descripción, se usa un anticuerpo que reconoce un epítipo presentado selectivamente en formas no nativas de SOD1 para inmunoprecipitar SOD1 en sangre periférica. La presencia de SOD1 inmunoprecipitada puede detectarse opcionalmente por ELISA.

25 La invención también incluye kits para diagnosticar la esclerosis lateral amiotrófica, que comprenden un anticuerpo de la invención e instrucciones para el uso de los mismos. Un experto en la materia apreciará que el anticuerpo puede marcarse con un marcador detectable.

30 Se describen kits para diagnosticar ALS, AD y/o PD, que comprenden uno o más péptidos aislados correspondientes a epítipos específicos de enfermedad. En una descripción, el kit comprende un péptido aislado correspondiente a los epítipos específicos de enfermedad seleccionados del grupo que comprende DSE1, DSE1 a, DSE2, DSE3, DSE4, DSE5, DSE6 y DSE7. Los péptidos aislados pueden incluirse además de un anticuerpo que se une a dicho epítipo. En una descripción, el péptido aislado es un control positivo. En alternativa, el péptido aislado puede ser útil per se para explorar una muestra para detectar cualquier anticuerpo contra DSE presente, por ejemplo, en un paciente que experimenta inmunoterapia activa o pasiva basada en dichos péptidos y anticuerpos.

Selección de fármacos

40 Los anticuerpos de la invención se describen como para usarse para identificar y seleccionar sustancias útiles para el tratamiento o prevención de la esclerosis lateral amiotrófica o para la formación de SOD1 mal plegada, que está asociada con esclerosis lateral amiotrófica. Por ejemplo, el método de identificación de sustancias para tratar, inhibir o prevenir la esclerosis lateral amiotrófica puede incluir:

- 45 (a) poner en contacto una muestra de un sujeto tratado con una sustancia con uno cualquiera de los anticuerpos de la invención, donde la unión es indicativa de la presencia de SOD1 mal plegada en la muestra,
 (b) detectar el nivel de unión en la muestra, y
 (c) comparar el nivel de unión en la muestra con el nivel de unión en un control,

50 donde un nivel alterado de unión en la muestra en comparación con el control es indicativo de una sustancia para el tratamiento o prevención de la esclerosis lateral amiotrófica.

55 Un experto en la materia apreciará que el control puede ser una muestra de un sujeto no tratado con una sustancia o tratado con una sustancia que se sabe que no trata o previene la esclerosis lateral amiotrófica. Por tanto, si el "nivel alterado de unión" es un nivel reducido de unión en la muestra en comparación con el control, entonces esto es indicativo de una sustancia útil para el tratamiento o prevención de la esclerosis lateral amiotrófica. Además, el control puede ser una muestra del mismo sujeto, pero antes del tratamiento con la sustancia a ensayar o muestras del sujeto tomadas en diferentes puntos temporales durante el tratamiento con la sustancia a ensayar.

60 Las sustancias para el tratamiento o prevención de la esclerosis lateral amiotrófica también pueden identificarse usando células o líneas celulares. Por ejemplo, las células o líneas celulares pueden ponerse en contacto con una sustancia y después puede detectarse la presencia de SOD1 mal plegada en las células usando las proteínas de unión de la invención y pueden compararse con un control.

65 Un experto en la materia apreciará que puede explorarse una biblioteca de moléculas controlando el efecto de los compuestos candidatos sobre la inhibición de la conversión de SOD1 en una conformación mal plegada o específica de enfermedad.

Se describen sustancias identificadas usando los métodos de la invención, que son útiles para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica o para la formación de SOD1 mal plegada y/o agregada, que está asociada con esclerosis lateral amiotrófica.

5 Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de las realizaciones de la presente invención:

Ejemplos

10 Los inmunógenos que comprenden péptidos aislados correspondientes a epítomos específicos de enfermedad, por ejemplo, DSE1a, pueden referirse en los siguientes ejemplos a secuencias análogas de DSE (por ejemplo, el análogo DSE1 GGRLAC*GVIGIGSG que comprende secuencias de G N-terminales adicionales) como el número DSE (por ejemplo, DSE1) que está relacionado con el análogo.

Ejemplo 1

15 Generación de anticuerpos monoclonales contra DSE2

Un péptido aislado correspondiente al epítomo específico de esclerosis lateral amiotrófica (DLGKGGNEESTKTGNAGS) que alberga un resto Cys N-terminal se conjugó con KLH para inmunización de ratones BALB/c, y con BSA para exploración ELISA. Se dieron múltiples inyecciones a cada ratón a intervalos de 21 días. El adyuvante para la primera inyección fue adyuvante completo de Freund (Sigma, n.º Cat. F5881-6 x 10 ml). El adyuvante incompleto de Freund (Sigma, n.º Cat. F5506-6 x 10 ml) fue el adyuvante usado para las inyecciones restantes. Se recogió sangre de los ratones 7-10 días después de la 3ª inyección. La fusión celular se hizo 3-4 días después del refuerzo final sin ningún adyuvante.

25 El compañero de fusión usado fue Sp 2/0-Ag14 (ATCC n.º CRL-1581). La fusión entre el compañero de fusión SP2/0 y las células esplénicas se hizo a una relación 1:5 ($2,0 \times 10^7$: $1,0 \times 10^8$) en 1 ml de PEG precalentado (MW1450: Sigma, n.º Cat. P7181). Las células de fusión se resuspendieron en 50 ml de DMEM con FBS al 10 % y se sembraron en 5 placas de 96 pocillos a 100 µl/pocillo. Se añadieron 100 µl/pocillo de medio HAT DMEM 2 x a las células de fusión después de 24 horas. Los medios se cambiaron en los días 5 y 7 con medio HAT 1 x fresco. En el día 10-12, se recogieron 50 µl de sobrenadante de cada pocillo para la primera exploración ELISA. Los clones positivos se transfirieron a placas de 24 pocillos. Tras la confluencia, se exploraron los sobrenadantes de anticuerpo por ELISA con el antígeno usado para inmunizar los ratones y un antígeno no relacionado (transferrina humana). Los clones positivos se transfirieron a placas de 6 pocillos para la expansión o la subclonación de hibridoma. La subclonación se hizo por dilución limitante a 50-70 células/placa de 90 pocillos.

Ejemplo 2

40 Producción a gran escala de anticuerpos monoclonales

Para la producción a gran escala de anticuerpos, se inyectaron 0,2-0,5 ml de Pristano (Sigma, n.º Cat. T-7640) o IFA cada ratón (BALB/c) por i.p. para la sensibilización. En el día 7-11, se inyectaron de 500.000 a 5.000.000 de células de hibridoma en 0,5 ml de PBS 1 x en fase logarítmica a cada ratón por i.p. Se permitió que el fluido ascítico se acumulara durante 1-2 semanas. Pueden recogerse 2-5 ml de fluido ascítico de cada ratón, con una concentración de IgG de aproximadamente 1-9 mg/ml. Se usó proteína A para la purificación de IgG2 y 3, y la proteína G para IgG1.

50 El clon IgG mAb se denominó 10E11C11. Este anticuerpo presenta propiedades coherentes con su reconocimiento de un epítomo específico de enfermedad para SOD1 mal plegada. Este mAb se une a SOD1 desnaturalizada en membranas de inmunotransferencia, que reconoce SOD1 desnaturalizada monomérica (no estructurada). El mAb no reconoce la SOD1 dimérica en inmunotransferencia. En inmunoprecipitaciones mediadas por perlas magnéticas conjugadas con 10E11C11, no hay unión detectable de SOD1 nativa de cerebro humano normal o de cerebro de ratón y médula espinal. El mAb no inmunoprecipita de forma eficaz SOD1 deliberadamente mal plegada por bajo pH, el caótropro guanidina, o ambos. De forma más importante, 10E11C11 inmunoprecipita de forma eficaz SOD1 mal plegada en un modelo de ratón de ALS causado por sobreexpresión transgénica de SOD1 mutante (G93A). De forma notable, SOD1 endógena de ratón presente en el mismo tejido no se inmunoprecipita, lo que sugiere que la SOD1 mutante humana mal plegada no "co-recluta" SOD de ratón normal en este modelo de enfermedad.

60 También se crearon anticuerpos de una manera similar al epítomo NPLSRKHGGPKDEE, que alberga un resto Cys N-terminal.

Dichos anticuerpos están fácilmente disponibles y pueden obtenerse de Neil Cashman at the Brain Research Centre, UBC Hospital, 2211 Wesbrook Mall, Vancouver, Columbia Británica, V6T 2B5, Canadá (neil.cashman@utoronto.ca).

Ejemplo 3**Método 2 de generación de anticuerpos monoclonales contra DSE2**

5 Generación de anticuerpos monoclonales de ratón: 4 ratones BALB/c hembra se inmunizaron inicialmente por inyecciones intraperitoneales con 25 µg de KLH acoplada al péptido correspondiente a DSE2 (DLGKGGNEESTKTGNAGS, más una cisteína N-terminal para el acoplamiento con KLH por formación de puente disulfuro) por ratón en adyuvante completo de Freund. Se administraron cuatro refuerzos posteriores como
 10 anteriormente, espaciados a intervalos de 3 semanas, con adyuvante incompleto de Freund. Cuando el título del suero se había elevado más de 10 veces desde una muestra de suero preinmune, determinado por ELISA, los 2 mayores respondedores de ratón se reforzaron cada uno por vía intravenosa con 10 µg de KLH acoplado al antígeno proteico de péptido, en 100 µl de PBS estéril, pH 7,4. Tres días después los ratones donantes se sacrificaron y se
 15 recogieron las células esplénicas y se combinaron. La fusión de los esplenocitos con células de mieloma parentales SP2/0 BALB/c se realizó como se ha descrito previamente (véase el Ejemplo 1 anterior) excepto que se realizó selección de una etapa y clonación de los hibridomas en medio Clon EZ. Este medio semisólido permite la selección en HAT y la clonación en una única etapa y elimina el crecimiento excesivo de clones deseables de crecimiento más lento por hibridomas de crecimiento más rápido, quizá indeseables. Los clones se picaron 11 días
 20 después de la fusión y se resuspendieron en pocillos de placas de cultivo tisular de 96 pocillos en: 200 µl de medio DMEM (Invitrogen) que contenía suero bovino fetal al 20 %. Después de 4 días, los sobrenadantes se exploraron por ELISA indirecto para la actividad del anticuerpo en placas recubiertas con 1 µl/pocillo de péptido acoplado a BSA.

Condiciones de ELISA:

25 *Para la exploración y el ensayo:* El antígeno DSE-2-BSA se recubrió en la placa en dH₂O a 1 µg/pocillo y se secó durante una noche a 37 °C.

30 *Para el ensayo sobre antígeno de control negativo:* se recubrió 0,5 µg/pocillo de antígeno HT (transferrina humana) sobre la placa en dH₂O a 50 µl/pocillo y se secó durante una noche a 37 °C. *Bloqueo:* Las placas se bloquearon con leche desnatada en polvo al 3 % en PBS (pH 7,4) a 100 µl/pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

35 *1^{er} anticuerpo:* Se añadieron sobrenadante de cultivo tisular de hibridoma anti-DSE2 de ratón y controles monoclonales de anticuerpo a 100 µl netos por pocillo para la exploración y ensayo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación.

2^o anticuerpo usado para exploración y ensayo: Se usó anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG de ratón conjugado con HRP 1/10000 diluido en PBS-Tween (pH 7,4), se añadió a 100 µl/pocillo y se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación.

40 *Sustrato:* Se añadió tampón TMB (BioF_x n.º cat. TMBW-1000-01) a 50 µl/pocillo y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 50 µl de HCl 1 M por pocillo después de 15 minutos y se leyó a DO₄₅₀ nm.

45 La Tabla 3 muestra la exploración por ELISA de clones de hibridoma para anticuerpos dirigidos contra el epítipo específico de enfermedad DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2). Los anticuerpos generados por varios de los clones de hibridoma eran altamente específicos para péptidos correspondientes al epítipo específico de enfermedad, y no reconocían de forma detectable el antígeno de control HT (transferrina humana). Estos resultados muestran que pueden producirse anticuerpos monoclonales contra péptidos correspondientes a epítipos identificados como presentados selectivamente o accesibles en formas mal plegadas de SOD1.

50 **Tabla 3: Exploración por ELISA de clones de hibridoma para anticuerpos dirigidos contra DLGKGGNEESTKTGNAGS**

Clon	Exp. n.º 1 Antígeno DSE-2-BSA	Exp. n.º 2 Antígeno DSE-2-BSA	Antígeno HT	Isotipo
2A11	2,624	2,000	0,086	IgG
3H1	1,982	1,908	0,081	IgG
5G5	2,712	2,014	0,068	IgG
5G12	2,072	1,755	0,064	IgG
6C3	2,527	1,889	0,071	IgG
6G12	2,093	1,982	0,069	IgG
7E10	2,586	2,047	0,068	IgG
7F8	2,317	1,961	0,079	IgG
8C9	2,087	1,929	0,072	IgG
8D1	2,238	1,931	0,067	IgG
10C12	3,032	1,909	0,061	IgG
10F2	2,599	1,699	0,059	IgG

El clon de hibridoma 3H1 (número de acceso 220207-02) se depositó en la International Depository Authority of

Clon	Exp. n.º 1 Antígeno DSE-2-BSA	Exp. n.º 2 Antígeno DSE-2-BSA	Antígeno HT	Isotipo
Canada localizada en Winnipeg, Canadá el 22 de febrero de 2007.				

Ejemplo 4

Anticuerpos policlonales contra DSE1

5

Generación y purificación de anticuerpos

La síntesis de péptidos se realizó usando química basada en Fmoc convencional en un Perseptives Biosystems 9050 Plus Pepsynthesizer. Se sintetizó el péptido múltiple antigénico en una resina [Fmoc-Lys(Fmoc)]₄-Lys₂-Lys-Cys(Acm)-p-Ala-Wang (Advanced ChemTech, SM5104, Louisville, Kentucky) usando aminoácidos protegidos con Fmoc (Advanced ChemTech; Novabiochem, San Diego, California; Applied Biosystems, Foster City, California). La secuencia era Acetil-GGRLACGVIGIGGKG-; la composición y la secuencia se verificaron por análisis de aminoácidos y por análisis de absorbancia UV en línea del sintetizador de péptidos. Este péptido se escindió y purificó por diálisis frente a Tris 10 mM, acetato sódico 10 nM (Sigma); se realizó diálisis a pH 8,0 para permitir la formación de enlaces disulfuro entre hebras adyacentes del dendrímero peptídico. El antígeno MAP tenía un peso molecular de ~11 kDa y se usó sin conjugación con una proteína de vehículo. El antígeno se envió a Sigma-Genosys (Oakville, Ontario, Canadá) para la producción de antisuero de conejo ("paquete parcial" del fabricante). La producción de antisuero siguió el protocolo convencional (Sigma-Genosys) y estaba de acuerdo con el acta de bienestar de animales (EE. UU.).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

70

75

80

85

90

95

100

105

110

115

120

125

130

135

140

145

150

155

160

165

170

175

180

185

190

195

200

205

210

215

220

225

230

235

240

245

Se sintetizó un péptido lineal con secuencia idéntica al antígeno en una resina TentaGel-SH [no escindible] (Advanced ChemTech). Esta resina se desprotegió y compactó en columnas desechables (Evergreen Scientific, Los Ángeles, CA) para la purificación de antisuero. El antisuero se pre-aclaró por centrifugación (16.000 x g) y se diluyó 1:10 en solución salina tamponada con tris (TBS) antes de la purificación. El antisuero diluido se volvió a hacer circular sobre la columna de purificación por afinidad 3 x a un caudal de ~1 ml/min. a temperatura ambiente para la unión. La columna unida al anticuerpo se lavó con un mínimo de 100 ml de TBS (~1 ml/min.), hasta que el eluyente de lavado no tuvo proteína ($A_{280} = 0$). Las fracciones de anticuerpo se eluyeron con glicina 50 mM, pH 2,8 en 1/5 volúmenes de Tris 1,5 M enfriado en hielo, NaCl 150 mM, pH 8,0, se mezclaron y se colocaron inmediatamente en hielo. Estas fracciones se centrifugaron 16.000 x g y se determinó la concentración del anticuerpo en el sobrenadante usando un $\epsilon_{280} = 220.000$ y un peso molecular de IgG de 150.00 Da. La columna de purificación se regeneró por lavado en exceso con glicina 50 mM, pH 2,8, seguido por tratamiento con guanidina-HCl saturado, Tris 50 mM, pH 8,0. La columna se equilibró con TBS antes de la aplicación de antisuero. Se usó solamente el suero del tercer sangrado o posterior. En todos los casos, el anticuerpo se purificó inmediatamente antes de su uso y se almacenó con 2 mg/ml de BSA para estabilizar el anticuerpo.

SDS-PAGE y transferencia de Western

Se realizó SDS-PAGE usando el sistema de tampón Tris-glicina con geles de gradiente de poliacrilamida al 4-20 % pre-moldeados (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para geles parcialmente desnaturalizantes, la SOD1 de eritrocitos humanos (Sigma) se hirvió durante 15 minutos con betamercaptoetanol (Aldrich) al 4 % en tampón de SDS-carga o se mantuvo en hielo durante 15 minutos en tampón de SDS-carga. Se procesaron 1-5 μ g de SOD1 en cada carril con resultados equivalentes. Para transferencia de Western, los geles se transfirieron a membrana de PVDF, se bloquearon durante una noche en leche al 5 %-TBST (solución salina tamponada con Tris, Tween-20 al 0,05 %). Se usaron 0,2 μ g/ml (nota: hasta al menos 5 μ g/ml produjeron resultados equivalentes) de anticuerpo SEDI contra SOD (policlonal anti-DSE1) diluido en leche al 5 %-TBST como anticuerpo primario, y se usó dilución 1:5000 de anticuerpo anti-IgG de conejo-HRP (Stressgen, Victoria, Canadá) como anticuerpo secundario. Las transferencias de Western se revelaron usando ECL-Plus (Amersham, Buckinghamshire, R.U.) y se visualizaron en película Kodak. Para experimentos de competición de péptidos, se pre-incubó el anticuerpo SEDI contra SOD diluido con un exceso 500 x (molar) del péptido lineal libre con la misma secuencia que el antígeno a 4 °C durante una noche o durante 1 hora a temperatura ambiente antes de su uso.

Resultados

Diseño y validación de anticuerpos

55

60

65

70

75

80

85

90

95

100

105

110

115

120

125

La investigación de la conformación de proteínas *in vivo* es un problema desafiante. Una posible estrategia es diseñar un anticuerpo que reconozca conformaciones mal plegadas específicas, pero no la proteína nativa. Este enfoque dirigido por hipótesis se ha aplicado previamente a otros trastornos neurodegenerativos que implican la agregación de proteínas, pero estos diseños han dependido de información biofísica de baja resolución sobre la estructura de la proteína mal plegada. El enfoque de los inventores emplea el uso de datos de estructura cristalina de rayos X detallada para diseñar un anticuerpo contra SOD1 mal plegada SOD1 (6, 71). Se postuló la hipótesis de que un anticuerpo que reconoce un epítipo inaccesible en SOD1 dimerica nativa pero expuesto en agregados de SOD1 e intermedios de agregación, sería capaz de detectar selectivamente SOD1 mal plegada *in vivo*. El examen de la estructura de rayos X del dímero de SOD1 nativa (código pdb: 1SPD) (72) muestra que los restos 145-151

(ACGVIGI) están secuestrados en la superficie de contacto del dímero de SOD1 y están inaccesibles en SOD1 nativa. Se postula la hipótesis de que un anticuerpo creado contra este epítipo reconoce formas mal plegadas de SOD1 donde la superficie de contacto del dímero nativo está alterada y expuesta, tal como en monómeros y oligómeros no nativos. Por consiguiente, los inventores han llamado a este el anticuerpo contra la superficie de contacto del dímero de SOD1 (anticuerpo SEDI, también mencionado como anticuerpo policlonal anti-DSE1). Los inventores sintetizaron un péptido antigénico múltiple donde cada brazo del dendrímero tenía la secuencia ggRLACGVIGIggk; la secuencia en letras mayúsculas es parte de la secuencia de SOD1 (restos 143-151). Los restos de SOD1 143 y 144 se añadieron al péptido antigénico para aumentar su solubilidad; se añadieron enlazadores Gly/Lys N-terminales y C-terminales para contextualizar el epítipo en una secuencia interna, aumentar la solubilidad y aumentar el peso molecular para inmunogenicidad potenciada. El antisuero de conejo producido a partir de la inmunización con este antígeno se purificó por afinidad usando un péptido lineal inmovilizado con secuencia idéntica al antígeno. Se realizaron transferencias de Western para examinar si el anticuerpo podía discriminar entre SOD1 dimérica y SOD1 monomérica con el epítipo seleccionado expuesto. SOD1 nativa es suficientemente estable de modo que en condiciones no reductoras SOD1 se procesa principalmente como un dímero en SDS-PAGE. Cuando se reducen condiciones desnaturizantes, se procesan predominantemente como el monómero, pero con algún dímero aún detectable. En estos geles, el anticuerpo SEDI reacciona solamente con SOD1 monomérica y no con SOD1 dimérica nativa. Este anticuerpo, por tanto, reaccionará con confómeros de SOD1 donde el epítipo seleccionado está expuesto, pero no con SOD1 nativa. Esto contrasta con los anticuerpos disponibles en el mercado contra SOD1 que detectan SOD1 tanto nativa como mal plegada de forma indiscriminada. La competición con el péptido antigénico confirmó la especificidad del anticuerpo. El anticuerpo SEDI, por tanto, satisface los criterios de diseño y proporciona un inol selectivamente presentado o accesible para ensayar la hipótesis *in vivo*.

Ejemplo 5

Generación de anticuerpos monoclonales contra DSE1

Generación de anticuerpos monoclonales de ratón: se inmunizaron inicialmente 4 ratones BALB/c hembra por inyecciones intraperitoneales con 25 µg de antígeno proteico por ratón en adyuvante completo de Freund. Se administraron 4 refuerzos posteriores como anteriormente, espaciados a intervalos de 3 semanas, con adyuvante incompleto de Freund. Cuando el título del suero se había elevado más de 10 veces desde una muestra de suero preinmune, determinado por ELISA, los 2 mayores respondedores se reforzaron cada uno por vía intravenosa con 10 µg de antígeno proteico, en 100 µl de PBS estéril, pH 7,4. Tres días después los ratones donantes se sacrificaron y se recogieron y se combinaron las células esplénicas. La fusión de los esplenocitos con células de mieloma parentales SP2/0 BALB/c se realiza como se ha descrito previamente en el Ejemplo 1 anteriormente, excepto que se realiza selección de una etapa y clonación de los hibridomas en medio Clone EZ. Este medio semisólido permite la selección en HAT y la clonación en una única etapa y elimina el crecimiento excesivo de clones deseables de crecimiento más lento por hibridomas de crecimiento más rápido, quizá indeseables. Los clones se picaron 11 días después de la fusión y se resuspendieron en pocillos de placas de cultivo tisular de 96 pocillos en: 200 µl de medio DMEM (Invitrogen) que contenía suero bovino fetal al 20 %. Después de 4 días, los sobrenadantes se exploraron por ELISA indirecto para la actividad del anticuerpo en placas recubiertas con 1 µg/pocillo de antígeno proteico.

Condiciones de ELISA:

Para la exploración y el ensayo: Se recubre el antígeno DSE-1-BSA sobre la placa en dH₂O a 1 µg/pocillo y se seca durante una noche a 37 °C.

Para el ensayo sobre antígeno de control negativo: se recubren 0,5 µg/pocillo de antígeno HT (transferrina humana) sobre la placa en dH₂O a 50 µl/pocillo y se secan durante una noche a 37 °C.

Bloqueo: Las placas se bloquearon con leche desnatada en polvo al 3 % en PBS (pH 7,4) a 100 µl/pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

1^{er} anticuerpo: Se añadieron sobrenadante de cultivo tisular de hibridoma anti-DSE1 de ratón y controles monoclonales de ratón a 100 µl netos por pocillo para la exploración y el ensayo. Se añadieron suero inmune anti-DSE1a de ratón y suero preinmune de ratón diluido 1/800 en el sobrenadante de cultivo tisular SP2/0 a 100 µl/pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación.

2^o anticuerpo usado para exploración y ensayo: Se usó anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG de ratón conjugado con HRP 1/10000. El anticuerpo secundario se diluyó en PBS-Tween (pH 7,4), se añadió a 100 µl/pocillo y se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación.

Sustrato: Se añadió tampón TMB (BioF_x n.º cat. TMBW-1000-01) a 50 µl/pocillo y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 50 µl de HCl 1 M por pocillo después de 15 minutos y se leyó a DO₄₅₀ nm.

Ejemplo 6**Producción de anticuerpos contra DSE1a**

- 5 Se conjugó el péptido aislado correspondiente al epítipo DSE1a (GGRLAC*GVIGIGSG) con KLH para inmunización de ratones BALB/c, y con BSA para exploración ELISA.

10 Generación de anticuerpos monoclonales de ratón: se inmunizaron inicialmente 4 ratones BALB/c hembra por inyecciones intraperitoneales con 25 µg de antígeno proteico por ratón en adyuvante completo de Freund. Se administraron 4 refuerzos posteriores como anteriormente, espaciados a intervalos de 3 semanas, con adyuvante incompleto de Freund. Cuando el título del suero se había elevado más de 10 veces de una muestra de suero preinmune, determinado por ELISA, los 2 mayores respondedores se reforzaron cada uno por vía intravenosa con 10 µg de antígeno proteico, en 100 µl de PBS estéril, pH 7,4. Tres días después, los ratones donantes se sacrificaron y se recogieron y se combinaron las células esplénicas. La fusión de los esplenocitos con células de mieloma parentales SP2/0 BALB/c se realizó como se ha descrito previamente en el Ejemplo 1 anterior, excepto que se realiza selección de una etapa y clonación de los hibridomas en medio Clone EZ. Este medio semisólido permite la selección en HAT y la clonación en una única etapa y elimina el crecimiento excesivo de clones deseables de crecimiento más lento por hibridomas de crecimiento más rápido, quizá indeseables. Los clones se picaron 11 días después de la fusión y se resuspendieron en pocillos de placas de cultivo tisular de 96 pocillos en: 200 µl de medio DMEM (Invitrogen) que contenía suero bovino fetal al 20 %. Después de 4 días, los sobrenadantes se exploraron por ELISA indirecto para la actividad del anticuerpo en placas recubiertas con 1 µg/pocillo de antígeno proteico.

Condiciones de ELISA:

- 25 *Para la exploración y el ensayo:* Se recubrió el antígeno DSE-1-BSA sobre la placa en dH₂O a 1 µg/pocillo y se secó durante una noche a 37 °C.

30 *Para el ensayo sobre el antígeno de control negativo:* se recubrieron 0,5 µg/pocillo de antígeno HT (transferrina humana) sobre la placa en dH₂O a 50 µl/pocillo y se secó durante una noche a 37 °C.

Bloqueo: Las placas se bloquean con leche desnatada en polvo al 3 % en PBS (pH 7,4) a 100 µl/pocillo y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente.

35 *1^{er} anticuerpo:* Se añade sobrenadante de cultivo tisular de hibridoma anti-DSE1 de ratón y controles monoclonales de ratón a 100 µl netos por pocillo para la exploración y el ensayo. Se añaden suero inmune anti-DSE1a de ratón y suero preinmune de ratón diluido 1/800 en el sobrenadante de cultivo tisular SP2/0 a 100 µl/pocillo y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación.

40 *2^o anticuerpo usado para exploración y ensayo:* Se usa anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG de ratón conjugado con HRP 1/10000. El anticuerpo secundario se diluye en PBS-Tween (pH 7,4), se añade a 100 µl/pocillo y se incuba durante 1 hora a 37 °C con agitación.

45 *Sustrato:* Se añade tampón TMB (BioF_x n.º cat. TMBW-1000-01) a 50 µl/pocillo y se incuba en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detiene con 50 µl de HCl 1 M por pocillo después de 15 minutos y se lee a DO₄₅₀ nm.

50 La Tabla 4 muestra la exploración por ELISA de clones de hibridoma para anticuerpos dirigidos contra el péptido correspondiente al epítipo específico de enfermedad GGRLAC*GVIGIGSG (DSE1a). Los anticuerpos generados por los clones de hibridoma eran altamente específicos para el epítipo específico de enfermedad, y no reconocían de forma detectable el antígeno de control HT (transferrina humana). Estos resultados muestran que pueden producirse anticuerpos monoclonales contra péptidos correspondientes a epítipos identificados como presentados o accesibles en formas mal plegadas de SOD1.

Tabla 4: Exploración por ELISA de clones de hibridoma para anticuerpos dirigidos contra el epítipo GGRLAC*GVIGIGSG (DSE1a)

Clon	Exp. n.º 1 Antígeno DSE-1 a-BSA	Exp. n.º 2 Antígeno DSE-1a-BSA	Antígeno HT	Isotipo
3C1	0,484	0,265	0,105	IgG
3C11	0,702	0,186	0,093	IgG
3D2	1,542	1,035	0,058	IgG
3F1	3,072	2,143	0,080	IgG
4B5	0,506	0,238	0,065	IgG
4H6	1,244	0,957	0,085	IgG
5F6	0,862	0,663	0,089	IgG
6D8	2,690	2,186	0,089	IgG
9A4	2,538	2,313	0,071	IgG
9A8	1,489	0,884	0,100	IgG

Clon	Exp. n.º 1 Antígeno DSE-1 a-BSA	Exp. n.º 2 Antígeno DSE-1a-BSA	Antígeno HT	Isotipo
10C3	2,446	2,200	0,067	IgG
10C12	2,867	2,016	0,089	IgG

El clon de hibridoma 6D8 (número de acceso 220207-01) se depositó en la International Depository Authority of Canada localizada en Winnipeg, Canadá el 22 de febrero de 2007.

Se generaron anticuerpos contra DSE4, 6 y 7 usando técnicas similares.

Ejemplo 7

5

Anticuerpos dirigidos contra DSE1a no reconocen el péptido DSE1

Se comparó la capacidad del anticuerpo anti-DSE1a de reconocer su secuencia peptídica afín (DSE1a) con la capacidad del anticuerpo anti-DSE1a de reconocer el péptido no oxidado (DSE1).

10

Se recubrieron pocillos de placa de microtitulación con el péptido DSE1 o con el péptido DSE1a acoplado a BSA. Después se bloquearon los sitios libres de unión en cada uno con BSA, se añadieron sobrenadantes de cultivo tisular que contenían anticuerpos de los clones de hibridoma DSE1a, y se permitió que el anticuerpo se uniera a los péptidos acoplados a BSA. El anticuerpo unido entonces se detectó con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. La Figura 1 y la Tabla 5 muestran que todos los anticuerpos ensayados reconocen preferentemente DSE1a sobre DSE1.

15

Quando los ratones se inmunizaron con péptido DSE1, principalmente se formaron anticuerpos de isotipo IgM. Un anticuerpo IgM probablemente tiene una afinidad inferior por el epítipo que los anticuerpos contra DSE1a creados como se ha indicado anteriormente, que son del isotipo IgG. La modificación de DSE1 para que comprenda una cisteína oxidada provocó la producción de anticuerpos con avidez operativamente mayor.

20

Tabla 5. ELISA que muestra que los clones de anticuerpo anti-DSE1a reconocen preferentemente el péptido DSE1a oxidado

Clon	Péptido DSE1a	Péptido DSE1	Clon	Péptido DSE1a	Péptido DSE1
3C1	1,141	0,243	4H6	0,674	0,233
	1,405	0,234		0,685	0,29
Des. Rel.	1,273	0,2385	Des. Rel.	0,6795	0,2615
Promedio	14,66 %	2,67 %	Promedio	1,14%	15,41%
	DSE1a	DSE1		DSE1a	DSE1
3C11	1,165	0,197	6D8	2,303	0,366
	0,732	0,216		2,168	0,242
Des. Rel.	0,9485	0,2065	Des. Rel.	2,2355	0,304
Promedio	32,28 %	6,51 %	Promedio	4,27 %	28,84 %
	DSE1a	DSE1		DSE1a	DSE1
3D2	1,073	0,219	9A4	1,006	0,203
	0,93	0,209		0,687	0,343
Des. Rel.	1,0015	0,214	Des. Rel.	0,8465	0,273
Promedio	10,10 %	3,30 %	Promedio	26,65 %	36,26 %
	DSE1a	DSE1		DSE1a	DSE1
3D9	0,195	0,223	9A8	2,101	0,21
	0,164	0,195		2,194	0,276
Des. Rel.	0,1795	0,209	Des. Rel.	2,1475	0,243
Promedio	12,21 %	9,47 %	Promedio	3,06 %	19,21 %
	DSE1a	DSE1		DSE1a	DSE1
3F1	2,948	0,247	10C3	2,227	0,233
	3,005	0,269		2,087	0,22
Des. Rel.	2,9765	0,258	Des. Rel.	2,157	0,2265
Promedio	1,35 %	6,03 %	Promedio	4,59 %	4,06 %
	DSE1a	DSE1		DSE1a	DSE1
4B5	0,671	0,185	PBST	0,199	0,192
	0,481	0,169		0,194	0,166
Des. Rel.	0,576	0,177	Des. Rel.	0,1965	0,179
Promedio	23,32 %	6,39 %	Promedio	1,80 %	10,27 %

25

Ejemplo 8

Producción de anticuerpos contra DSE5

30 Generación de anticuerpos monoclonales de ratón: se inmunizaron inicialmente 4 ratones BALB/c hembra por

inyecciones intraperitoneales con 25 µg de inmunógeno que comprende el péptido (IKGLTEGLHGF) correspondiente a DSE5 acoplado a KLH por formación de disulfuro con una cisteína que se añadió a la N por ratón en adyuvante completo de Freund. Se administraron 4 refuerzos posteriores como anteriormente, espaciados a intervalos de 3 semanas, con adyuvante incompleto de Freund. Cuando el título de anticuerpo se había elevado más de 10 veces desde una muestra de suero preinmune, determinado por ELISA, los 2 mayores respondedores se reforzaron cada uno por vía intravenosa con 10 µg de antígeno proteico, en 100 µl de PBS estéril, pH 7,4. Tres días después los ratones donantes se sacrificaron y se recogieron y se combinaron las células esplénicas. La fusión de los esplenocitos con células de mieloma parentales SP2/0 BALB/c se realiza como se ha descrito previamente en el Ejemplo 1 anteriormente, excepto que se realiza selección de una etapa y clonación de los hibridomas en medio Clon EZ. Este medio semisólido permite la selección en HAT y la clonación en una única etapa y elimina el crecimiento excesivo de clones deseables de crecimiento más lento por hibridomas de crecimiento más rápido, quizá indeseables. Los clones se picaron 11 días después de la fusión y se resuspendieron en pocillos de placas de cultivo tisular de 96 pocillos en: 200 µl de medio DMEM (Invitrogen) que contenía suero bovino fetal al 20 %. Después de 4 días, los sobrenadantes se exploraron por ELISA indirecto para la actividad del anticuerpo en placas recubiertas con 1 µg/pocillo de antígeno proteico.

Condiciones de ELISA:

Para la exploración y el ensayo: Se recubrió el antígeno DSE5-BSA sobre la placa en dH₂O a 1 µg/pocillo y se secó durante una noche a 37 °C.

Para el ensayo sobre antígeno de control negativo: se recubrieron 0,5 µg/pocillo de antígeno HT (transferrina humana) sobre la placa en dH₂O a 50 µl/pocillo y se secaron durante una noche a 37 °C.

Bloqueo: Las placas se bloquearon con leche desnatada en polvo al 3 % en PBS (pH 7,4) a 100 µl/pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

1^{er} anticuerpo: Se añadieron sobrenadante de cultivo tisular de hibridoma anti-DSE5 de ratón y controles monoclonales de ratón a 100 µl netos por pocillo para la exploración y el ensayo. Se añadieron suero inmune anti-DSE1a de ratón y suero preinmune de ratón diluido 1/800 en el sobrenadante de cultivo tisular SP2/0 a 100 µl/pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación.

2^o anticuerpo usado para exploración y ensayo: Se usó anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG de ratón conjugado con HRP 1/10000. El anticuerpo secundario se diluyó en PBS-Tween (pH 7,4), se añadió a 100 µl/pocillo y se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación.

Sustrato: Se añadió tampón TMB (BioF_x n.º cat. TMBW-1000-01) a 50 µl/pocillo y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 50 µl de HCl 1 M por pocillo después de 15 minutos y se leyó a DO₄₅₀ nm.

La Tabla 6 muestra la exploración por ELISA de clones de hibridoma para anticuerpos dirigidos contra el epítipo específico de enfermedad (IKGLTEGLHGF). Los anticuerpos generados por varios clones de hibridoma eran altamente específicos para el péptido correspondiente al epítipo, y no reconocían de forma detectable el antígeno de control HT (transferrina humana). Estos resultados muestran que pueden producirse anticuerpos monoclonales contra péptidos correspondientes a epítipos identificados como selectivamente presentados o accesibles en formas mal plegadas de SOD1.

Tabla 6: Exploración por ELISA de clones de hibridoma para anticuerpos dirigidos contra el epítipo IKGLTEGLHGF (DSE5)

Clon	Exp. n.º 1 antígeno DSE-5-BSA	Exp. n.º 2 antígeno DSE-5-BSA	Antígeno HT	Isotipo
5C6	2,779	1,787	0,079	IgG
El clon de hibridoma 5C6 (número de acceso 280207-01) se depositó en la International Depository Authority of Canada localizada en Winnipeg, Canadá el 28 de febrero de 2007.				

Ejemplo 9

Producción de anticuerpos contra epítipos específicos de enfermedad (DSE) y/o determinantes antigénicos DSE

Un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 se conjuga con KLH para inmunización de ratones BALB/c para generar células B reactivas contra el epítipo. El epítipo para la inmunización se selecciona del grupo de péptidos que consiste en: GGGRLACGVIGIGSG (DSE1); GGGRLAC*GVIGIGSG (DSE1a); CDLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2); CNPLSRKHGGPKDEE (DSE3); CIKGLTEGLHGF (DSE5); GSGKAVCVLK (DSE4); y CGLHGFHVH (DSE7). Como alternativa, se conjuga una parte de cualquiera de los péptidos mencionados anteriormente que comprende uno o más determinantes antigénicos con KLH, que comprenden de forma mínima 3 o 5 aminoácidos contiguos de cualquiera de las secuencias peptídicas que son inmunogénicas en solitario o cuando se acoplan a KLH.

Generación de anticuerpos monoclonales de ratón: se inmunizan inicialmente 4 ratones BALB/c hembra por inyecciones intraperitoneales con 25 µg de antígeno proteico por ratón en adyuvante completo de Freund. Se administran 4 refuerzos posteriores como anteriormente, espaciados a intervalos de 3 semanas, con adyuvante incompleto de Freund. Cuando el título de anticuerpo se había elevado más de 10 veces a partir una muestra de suero preinmune, determinado por ELISA, los 2 mayores respondedores se refuerzan cada uno por vía intravenosa con 10 µg de antígeno proteico, en 100 µl de PBS estéril, pH 7,4. Tres días después los ratones donantes se sacrifican y se recogen y se combinan las células esplénicas. La fusión de los esplenocitos con células de mieloma parentales SP2/0 BALB/c se realiza como se ha descrito previamente en el Ejemplo 1 anteriormente, excepto que se realiza selección de una etapa y clonación de los hibridomas en medio Clone EZ. Este medio semisólido permite la selección en HAT y la clonación en una única etapa y elimina el crecimiento excesivo de clones deseables de crecimiento más lento por hibridomas de crecimiento más rápido, quizá indeseables. Los clones se pican 11 días después de la fusión y se resuspenden en pocillos de placas de cultivo tisular de 96 pocillos en: 200 µl de medio DMEM (Invitrogen) que contiene suero bovino fetal al 20 %. Después de 4 días, los sobrenadantes se exploran por ELISA indirecto para la actividad de los anticuerpos en placas recubiertas con 1 µg/pocillo de antígeno proteico.

Condiciones de ELISA:

Para la exploración y el ensayo: Se recubre el antígeno DSE-BSA en la placa en dH₂O a 1 µg/pocillo y se seca durante una noche a 37 °C.

Para el ensayo sobre antígeno de control negativo: se recubren 0,5 µg/pocillo de antígeno HT (transferrina humana) en la placa en dH₂O a 50 µl/pocillo y se secan durante una noche a 37 °C.

Bloqueo: Las placas se bloquean con leche desnatada en polvo al 3 % en PBS (pH 7,4) a 100 µl/pocillo y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente.

1^{er} anticuerpo: Se añaden sobrenadante de cultivo tisular de hibridoma anti-DSE de ratón y controles monoclonales de ratón a 100 µl netos por pocillo para la exploración y el ensayo. Se añaden suero inmune anti-DSE1a de ratón y suero preinmune de ratón diluido 1/800 en el sobrenadante de cultivo tisular SP2/0 a 100 µl/pocillo y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación.

2^o anticuerpo usado para exploración y ensayo: Se usa anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG de ratón conjugado con HRP 1/10000. El anticuerpo secundario se diluye en PBS-Tween (pH 7,4), se añade a 100 µl/pocillo y se incuba durante 1 hora a 37 °C con agitación.

Sustrato: Se añade tampón TMB (BioF_x n.º cat. TMBW-1000-01) a 50 µl/pocillo y se incuba en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detiene con 50 µl de HCl 1 M por pocillo después de 15 minutos y se lee a DO₄₅₀ nm.

Ejemplo 10

Ensayo de ELISA de anticuerpos dirigidos contra DSE1a por afinidad a SOD1 desnaturalizada

Se exploraron los clones de hibridoma que producen anticuerpos dirigidos contra DSE1a (GGRLAC*GVIGIGSG) por ELISA para la reactividad específica a SOD1 plegada de forma nativa (SOD1 en PBS) desnaturalizada o SOD1 mal plegada (SOD1 en tampón de desnaturalización con GdnHCl 6 M), o control de BSA plegado de forma nativa y mal plegado.

La Tabla 7 muestra la afinidad de clones de hibridoma por SOD1 plegada de forma nativa y mal plegada. Se detectó la absorbancia de cada muestra a 450 nm (columnas 2 - 5). Cada muestra se ensayó por duplicado. Los valores de las columnas 6 - 7 proporcionan los valores promedio de la afinidad de cada clon y el porcentaje de diferencia entre las dos muestras. La columna 10 representa la afinidad específica del anticuerpo por la SOD1 plegada de forma nativa (es decir, la afinidad del anticuerpo por SOD1 menos la unión no específica a la proteína BSA irrelevante). La columna 11 representa la afinidad específica del anticuerpo por la SOD1 no plegada (es decir, la afinidad del anticuerpo por SOD1 menos la unión no específica para BSA). La columna 12 proporciona el aumento factorial de la afinidad específica por SOD1 mal plegada sobre SOD1 plegada de forma nativa. Estos resultados demuestran la afinidad específica de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el epítipo DSE1a por SOD1 y que los anticuerpos preferiblemente están dirigidos a formas mal plegadas de SOD1 con una afinidad 2 - 4 veces mayor que por la forma plegada de forma nativa.

Se seleccionaron los clones 4H6, 6D8, 10C3 para producción a gran escala.

Tabla 7: Ensayo de ELISA de clones de hibridoma DSE1a para SOD1 desnaturalizada

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	SOD1		BSA		SOD1		BSA				
	PBS	Gdn HCl	PBS	Gdn HCl	PBS	Gdn HCl	PBS	Gdn HCl	S-N (F)	S-N (U)	U/F
Clon											
3C1	0,423	0,712	0,144	0,170	0,417	0,662	0,145	0,178	0,256	0,501	1,961
	0,410	0,612	0,145	0,185	2 %	11 %	0 %	6 %			
3C11	0,352	0,693	0,153	0,155	0,355	0,668	0,154	0,150	0,203	0,516	2,544
	0,357	0,642	0,155	0,144	1 %	5 %	1 %	5 %			
3D2	0,364	0,727	0,134	0,130	0,357	0,690	0,127	0,125	0,231	0,564	2,442
	0,349	0,652	0,119	0,119	3 %	8 %	8 %	6 %			
3D9	0,304	0,661	0,121	0,124	0,314	0,674	0,137	0,115	0,188	0,548	2,920
	0,323	0,687	0,152	0,106	4 %	3 %	16 %	11 %			
3F1	0,354	0,585	0,140	0,146	0,327	0,577	0,133	0,131	0,195	0,445	2,284
	0,299	0,568	0,125	0,116	12 %	2 %	8 %	16 %			
4B5	0,352	0,643	0,145	0,140	0,338	0,637	0,137	0,137	0,201	0,500	2,491
	0,323	0,630	0,129	0,134	6 %	1 %	8 %	3 %			
4H6	0,334	0,615	0,156	0,122	0,332	0,626	0,135	0,122	0,203	0,498	2,451
	0,329	0,637	0,114	0,122	1 %	2 %	22 %	0 %			
6D8	0,380	0,788	0,148	0,139	0,385	0,732	0,145	0,134	0,246	0,593	2,413
	0,390	0,676	0,142	0,129	2 %	11 %	3 %	5 %			
9A4	0,305	0,634	0,144	0,127	0,302	0,604	0,133	0,125	0,173	0,475	2,740
	0,299	0,573	0,122	0,122	1 %	7 %	12 %	3 %			
9A8	0,253	0,601	0,150	0,115	0,259	0,593	0,139	0,119	0,130	0,464	3,578
	0,264	0,585	0,127	0,123	3 %	2 %	12 %	5 %			
10C3	0,284	0,609	0,153	0,117	0,282	0,628	0,229	0,112	0,112	0,458	4,085
	0,280	0,646	0,304	0,106	1 %	4 %	47 %	7 %			
10C12	0,326	0,562	0,121	0,115	0,313	0,551	0,121	0,122	0,191	0,429	2,244
	0,299	0,539	0,121	0,128	6 %	3 %	0 %	8 %			
Bkg	0,112	0,142	0,117	0,151	0,122	0,143	0,118	0,147			
	0,132	0,144	0,118	0,143	12 %	1 %	1 %	4 %			

S = señal, N = ruido, F= plegada de forma nativa, U = no plegada/mal plegada

Ejemplo 11

5 Ensayo de ELISA de anticuerpos dirigidos contra DSE2 para la afinidad por SOD1 desnaturalizada

Se exploraron clones de hibridoma que producen anticuerpos dirigidos contra DSE2 (DLGKGGNEESTKTGNAGS) por ELISA para la reactividad específica contra SOD1 plegada de forma nativa (SOD1 en PBS) desnaturalizada o SOD1 mal plegada (SOD1 en tampón de desnaturalización con GdnHCl 6 M), o control de BSA plegada de forma nativa y mal plegada.

La Tabla 8 muestra la afinidad de clones de hibridoma por SOD1 plegada de forma nativa y no plegada. Se detectó la absorbancia de cada muestra a 450 nm (columnas 2 - 5). Cada muestra se ensayó por duplicado. Los valores de las columnas 6 - 9 proporcionan los valores promedio de la afinidad de cada clon y el porcentaje de diferencia entre las dos muestras. La columna 10 representa la afinidad específica del anticuerpo por la SOD1 plegada de forma nativa (es decir, la afinidad del anticuerpo por SOD1 menos la unión no específica a BSA). La columna 11 representa la afinidad específica del anticuerpo por la SOD1 mal plegada (es decir, la afinidad del anticuerpo de SOD1 menos la unión no específica para BSA). La columna 12 proporciona el aumento factorial de la afinidad específica por SOD1 mal plegada sobre SOD1 plegada de forma nativa. Estos resultados demuestran la afinidad específica de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el epítipo DSE2 por SOD1 y que los anticuerpos preferiblemente están dirigidos a formas mal plegadas de SOD1.

Se seleccionaron los clones 3H1, 5G5 y 8D1 para producción a gran escala.

Tabla 8: Ensayo de ELISA de clones de hibridoma DSE2 para SOD1 desnaturalizada

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	SOD1		BSA		SOD1		BSA				
	PBS	GdnHCl	PBS	GdnH Cl	PBS	GdnH Cl	PBS	GdnH Cl	S-N (F)	S-N (U)	U/F
2A9	0,321	0,593	0,125	0,137	0,316	0,589	0,116	0,141	0,187	0,460	2,460
	0,31	0,584	0,107	0,145	2 %	1 %	11 %	4 %			
2A11	0,345	0,71	0,119	0,124	0,347	0,719	0,114	0,140	0,220	0,592	2,693
	0,348	0,727	0,108	0,156	1 %	2 %	7 %	16 %			
3H1	0,257	2,189	0,161	0,165	0,410	2,145	0,156	0,164	0,251	1,986	7,926

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	SOD1		BSA		SOD1		BSA				
	PBS	GdnHCl	PBS	GdnH Cl	PBS	GdnH Cl	PBS	GdnH Cl	S-N (F)	S-N (U)	U/F
5G5	0,563 0,308 0,306	2,101 1,032 0,725	0,15 0,22 0,122	0,162 0,145 0,152	53 % 0,307 0 %	3 % 0,879 25 %	5 % 0,171 41 %	1 % 0,149 3 %	0,147	0,719	4,881
5G12	0,346 0,272	0,604 0,562	0,124 0,145	0,131 0,113	0,309 17 %	0,583 5 %	0,135 11 %	0,122 10 %	0,181	0,455	2,516
6C3	0,325 0,309	0,67 0,676	0,129 0,122	0,126 0,145	0,317 4 %	0,673 1 %	0,126 4 %	0,136 10 %	0,187	0,543	2,909
6G12	0,29 0,295	0,414 0,701	0,125 0,099	0,114 0,107	0,293 1 %	0,558 36 %	0,112 16 %	0,111 4 %	0,181	0,446	2,462
7E10	0,34 0,321	0,787 0,735	0,199 0,142	0,179 0,137	0,331 4 %	0,761 5 %	0,171 24 %	0,158 19 %	0,166	0,597	3,589
7F8	0,366 0,288	0,605 0,619	0,131 0,138	0,121 0,121	0,327 17 %	0,612 2 %	0,135 4 %	0,121 0 %	0,199	0,484	2,430
8C9	0,354 0,339	0,701 0,724	0,131 0,113	0,132 0,138	0,347 3 %	0,713 2 %	0,122 10 %	0,135 3 %	0,218	0,584	2,679
8D1	0,516 0,413	1,626 1,909	0,185 0,161	0,167 0,192	0,465 16 %	1,768 11 %	0,173 10 %	0,180 10 %	0,288	1,591	5,520
10F2	0,263 0,563	0,632 0,689	0,119 0,116	0,172 0,175	0,413 51 %	0,661 6 %	0,118 2 %	0,174 1 %	0,268	0,515	1,925
Bkg	0,112 0,132	0,142 0,144	0,117 0,118	0,151 0,143	0,122 12 %	0,143 1 %	0,118 1 %	0,147 4 %			

S = señal, N = ruido, F= plegada de forma nativa, U = no plegada/mal plegada

Ejemplo 9

Ensayo de ELISA de anticuerpos dirigidos contra DSE5 para la afinidad por SOD1 desnaturalizada

5 Se exploraron clones de hibridoma que producen anticuerpos dirigidos contra DSE5 (IKGLTEGLHGF) por ELISA para la reactividad específica contra SOD1 plegada de forma nativa (SOD1 en PBS) desnaturalizada o SOD1 mal plegada (SOD1 en tampón de desnaturalización con GdnHCl 6 M), o control de BSA plegada de forma nativa y mal plegada.

10 La Tabla 9 muestra la afinidad de clones de hibridoma por SOD1 plegada de forma nativa y mal plegada. Se detectó la absorbancia de cada muestra a 450 nm (columnas 2 - 5). Cada muestra se ensayó por duplicado. Los valores de las columnas 6 - 9 proporcionan los valores promedio de la afinidad de cada clon y el porcentaje de diferencia entre las dos muestras. La columna 10 representa la afinidad específica del anticuerpo por la SOD1 plegada de forma nativa (es decir, la afinidad del anticuerpo por SOD1 menos la afinidad no específica por BSA). La columna 11 representa la afinidad específica del anticuerpo por la SOD1 mal plegada (es decir, la afinidad del anticuerpo por SOD1 menos la afinidad no específica para BSA). La columna 12 proporciona el aumento factorial de la afinidad específica de SOD1 mal plegada sobre SOD1 plegada de forma nativa. Estos resultados demuestran la afinidad específica de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el epítipo DSE5 por SOD1 y que los anticuerpos

20 preferiblemente están dirigidos a formas mal plegadas de SOD1.

Tabla 9: Ensayo de ELISA de clones de hibridoma para SOD1 desnaturalizada

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	SOD1		BSA		SOD1		BSA				
	PBS	Gdn HCl	PBS	Gdn HCl	PBS	Gdn HCl	PBS	Gdn HCl	S-N (F)	S-N (U)	U/F
DSE									0,14		
5	0,272 0,286	0,622 0,629	0,122 0,104	0,188 0,138	0,279 4 %	0,626 1 %	0,113 11 %	0,163 22 %	1	0,488	3,457
Bkg	0,112 0,132	0,142 0,144	0,117 0,118	0,132 0,143	0,151 12 %	0,122 1 %	0,143 1 %	0,118 4 %	0,147		

S = señal, N = ruido, F= plegada de forma nativa, U = no plegada/mal plegada

Ejemplo 13

Reconocimiento de SOD1 oxidada por anticuerpos dirigidos contra DSE2

25 Sucede daño oxidativo de las enzimas en enfermedades neurodegenerativas, y el daño oxidativo a SOD1 provoca mal plegamiento y formación de SOD1 agregada. Los inventores demostraron que anticuerpos dirigidos contra el epítipo DSE2 (clones de hibridoma 10E11C11 y 3H1) reconocen dicha SOD1 modificada de forma oxidativa

30

incubando SOD1 purificada con 100 μ M a 10 mM de H₂O₂ o con una mezcla de ascorbato y cloruro de cobre. Se sabe que estos dos tratamientos oxidan los aminoácidos en SOD1. Posteriormente, se permitió que esta SOD1 oxidada se uniera a pocillos de placa de microtitulación y se añadió uno de dos anticuerpos anti-DSE2 diferentes. Para comparación, los pocillos de microtitulación se recubrieron con SOD1 no tratada y plegada normalmente en tampón, o con SOD1 que se desnaturalizó con una solución de un agente caotrópico (cloruro de guanidinio, GdnHCl). Como se muestra en la Figura 2, los anticuerpos anti-DSE2 se unen preferentemente a SOD1 mal plegada en GdnHCl pero mucho menos bien que a SOD1 plegada de forma nativa en tampón. Sin embargo, después de la oxidación, SOD1 se reconoce de forma eficaz por los anticuerpos anti-DSE2. Esto demuestra que los anticuerpos anti-DSE2 (tanto 10E11C11 como 3H1) reconocen el tipo de SOD1 modificada de forma oxidativa que sucede en pacientes con enfermedades neurodegenerativas. Estos resultados se presentan en la Tabla 10 a continuación.

Tabla 10. Reconocimiento de SOD1 oxidada por anticuerpos dirigidos contra DSE2

Tratamiento	Clones			Tratamiento	Clones		
	PBST	10E11C11	3H1		PBST	10E11C11	3H1
SOD-PBS	0,088	0,357	0,34	SOD-Gnd	0,118	1,243	2,29
	0,094	0,362	0,335		0,092	1,254	2,295
	0,082	0,389			0,086	1,225	
Promedio	0,088	0,36933333	0,3375	Promedio	0,098666667	1,240666667	2,2925
Des. Tip. Rel.	6,82 %	4,66 %	1,05 %	Des. Tip. Rel.	17,24 %	1,18 %	0,15 %
CuCl 6 h	0,082	1,044	1,379	CuCl 3 h	0,087	1,061	1,717
	0,093	0,987	1,489		0,101	1,06	1,621
	0,089	1,042			0,088	1,076	
Promedio	0,088	1,02433333	1,434	Promedio	0,092	1,065666667	1,669
Des. Tip. Rel.	6,33 %	3,16 %	5,42 %	Des. Tip. Rel.	8,49 %	0,84 %	4,07 %
CuCl 1 h	0,075	1,023	1,592	CuCl 0 h	0,073	0,67	0,527
	0,083	1,035	1,435		0,087	0,669	0,59
	0,072	1,026			0,071	0,664	
Promedio	0,076666667	1,028	1,5135	Promedio	0,077	0,667666667	0,5585
Des. Tip. Rel.	7,42 %	0,61 %	7,34 %	Des. Tip. Rel.	11,32 %	0,48 %	7,98 %
BSA-PBS	0,073	0,12	0,078	H2O2 100 μ M	0,071	0,489	0,436
	0,083	0,098	0,076		0,086	0,476	0,425
	0,073	0,091			0,107	0,453	
Promedio	0,076333333	0,103	0,077	Promedio	0,088	0,472666667	0,4305
H2O2 1 mM	0,074	0,776	0,744	H2O2 100 mM	0,078	0,836	0,763
	0,081	0,752	0,717		0,092	0,84	0,726
	0,074	0,781			0,083	0,878	
Promedio	0,076333333	0,769666667	0,7305	Promedio	0,084333333	0,851333333	0,7445
Des. Tip. Rel.	5,29 %	2,01 %	2,61	Des. Tip. Rel.	8,41 %	2,72 %	3,51 %

Ejemplo 14**Predicción, síntesis y refinamiento de epítomos específicos de ALS**

5 Los epítomos presentados por SOD1 mal plegada y no presentados por SOD1 nativa pueden determinarse analizando la estructura de SOD1 nativa para regiones de secuencia que están ocultas por la conformación nativa plegada normalmente de SOD1. Por ejemplo, los bucles DSE2 y DSE3 están inaccesibles para la unión al anticuerpo en la estructura nativa de SOD1, pero se demostró que se estruían del sitio activo de SOD1 en fibrillas amiloides y estructuras de nanotubos (84). Por tanto, la exposición de estos bucles puede ser un marcador del mal plegamiento de SOD1, pero también constituyen "dominios de reclutamiento" de SOD1 que están implicados en el mal plegamiento dirigido por molde de SOD1. Los inventores identificaron DSE1, DSE4 y DSE7 como secuencias putativamente ocultas que podrían quedar accesibles tras el mal plegamiento de SOD1.

15 Los epítomos presentados por SOD1 mal plegada y no presentados por SOD1 nativa pueden predecirse analizando regiones de secuencia que tienen estructura restringida. Las estructuras restringidas son menos capaces de acomodar cualquier cambio en el plegamiento resultante en cambios conformacionales en la región de secuencia y en la presentación de epítomos accesibles no presentes en la estructura restringida. Los epítomos DSE2, 3, 5 y 6 se predijeron sobre esta base.

20 Las dianas peptídicas para SOD1 agregada mal plegada proporcionan inmunógenos para el desarrollo de anticuerpos monoclonales de ratón para caracterización bioquímica de exposición de epítomos que se sintetizaron y caracterizaron. Estas dianas incluyen la secuencia:

25 RLACGVIGI (DSE1);
DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2);
NPLSRKHGGPKDEE (DSE 3);
IKGLTEGLHGF (DSE5);
HCIIGRTLTVH (DSE6);
GSGKAVCVLK (DSE4); y
30 CGLHGFHVH (DSE7).

Los péptidos DSE se sintetizaron y conjugaron con KLH (hemocianina de lapa californiana). Los péptidos DSE que tienen una cisteína endógena (DSE1, DSE1a, DSE4 y DSE6) se conjugaron con KLH usando el método DMS (reactivo y método de Pierce) para conjugación amino. Los péptidos DSE que no tienen un resto de cisteína endógeno (DSE2, DSE3, DSE5 y DSE7) se conjugaron con KLH usando el método de sulfo-MBS (reactivo y método de Pierce) para conjugación de grupos tiol.

Se sintetiza opcionalmente y se caracteriza un epítomo "de control" expuesto sobre la superficie molecular de SOD1 normal nativa. Un epítomo de control es opcionalmente un epítomo que se presenta tanto en SOD1 plegada de forma nativa como mal plegada.

Los epítomos identificados pueden tener múltiples determinantes antigénicos. Los epítomos se analizan adicionalmente para determinar sub-partes de los péptidos (por ejemplo, epítomos concretos) que son inmunogénicos. El análisis de inmunogenicidad de SOD1, incluyendo el diagrama de antigenicidad, se usa para identificar epítomos concretos, péptidos aislados correspondientes a estos epítomos concretos, que se sintetizan y un inmunógeno que comprende el péptido aislado correspondiente a uno o más de estos epítomos concretos se usa para generar anticuerpos. Se generan y ensayan anticuerpos como se describe en otros Ejemplos.

Un ejemplo de un diagrama de antigenicidad se proporciona en la Figura 3. La secuencia de aminoácidos de SOD1 se sometió al método informatizado de Hopps y Woods disponible al público para predecir las localizaciones de determinantes antigénicos proteicos (Figura 3A). Además, la secuencia de SOD1 se sometió al método de Kolaskar y Tongaonkar (85) de predicción de determinantes antigénicos (Figura 3B). Este último método identificó los aminoácidos 4-11 (AVCVLKGD), los aminoácidos 27-33 (GPVKVWG), los aminoácidos 42-48 (LHGFHVH), los aminoácidos 93-121 GVADVSIEDSVISLGDHCCIIGRTLTVH y los aminoácidos 142-149 (SRLACGVI) de SOD1 (SEQ ID NO: 15) como antigénicos.

Se hacen modificaciones adicionales a las secuencias peptídicas aisladas correspondientes a los epítomos descritos o a los epítomos concretos identificados para potenciar la inmunogenicidad. Por ejemplo, puede oxidarse un resto de cisteína dentro del péptido aislado en ácido cisteico. Un ejemplo es DSE1a donde la cisteína presente en DSE1 se reemplaza con cisteína oxidada en forma de ácido cisteico y se usa para crear anticuerpos.

Ejemplo 15**Epítomos análogos**

65 Se sintetizan péptidos de epítomos análogos incorporando uno o más aminoácidos oxidados o nitrados de acuerdo

con la siguiente lista. El resto de cisteína (C) en DSE1 se oxida en ácido sulfínico de cisteína o ácido cisteico (es decir, DSE1a). El resto de lisina (K) en DSE2 se oxida en un grupo carbonilo. Uno o más de los restos de arginina (R), lisina (K) e histidina (H) en DSE3 se oxidan para formar un grupo carbonilo. En DSE4, la lisina (K) se oxida en un grupo carbonilo y/o la cisteína (C) se oxida en ácido sulfínico de cisteína o ácido cisteico. En DSE5 uno o más de K y H se oxidan en un grupo carbonilo y/o la fenilalanina se nitra en nitrotriptófano. En DSE6, uno o más de H o R se oxida en un grupo carbonilo y/o C se oxida en ácido sulfínico de cisteína o ácido cisteico. En DSE7, H se oxida en un grupo carbonilo y/o F se nitra a nitrotriptófano.

DSE1: 145-151, RLACGVIGI: C

DSE2: 125-142, DLGKGGNEESTKTGNAGS: K

DSE3: 65-78, NPLSRKHGGPKDEE: R, K, H

DSE4: 3-9, KAVCVLK: K, C

DSE5: 35-45, IKGLTEGLHGF: K, H, F

DSE6: 110-120, HCIIGRTLTVH: H, C, R

DSE7: 41-48, GLHGFHVH: H, F

C: cisteína, se oxida en ácido sulfínico de cisteína, y adicionalmente se oxida en ácido cisteico.

H, R, K: formación de carbonilo

M: oxidación, sulfóxido de metiona

F: nitración, nitrotriptófano

Se usan análogos peptídicos sintetizados como inmunógenos para crear anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales y para tratar a individuos que tienen una enfermedad mediada por SOD1 mal plegada tal como ALS, AD y/o PD. Los anticuerpos se exploran frente al análogo peptídico humanizante para la especificidad. Los clones positivos se ensayan adicionalmente para su capacidad de reconocer SOD1 mal plegada. Los anticuerpos que reconocen específicamente SOD1 se humanizan y usan para tratar a individuos que tienen una enfermedad mediada por SOD1 mal plegada tal como ALS, AD y/o PD.

Ejemplo 16

30 Inmunoprecipitación de tejido cerebral

Se obtiene tejido cerebral de pacientes diagnosticados con enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o ALS, y controles coincidentes. Las muestras se congelan inmediatamente en hielo seco y se pesan. El tejido congelado se corta en trozos más pequeños y se homogeneiza (10 % p/v) en tampón de lisis (NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, Tris 10 mM, desoxicolato al 0,5 %, NP-40 al 0,5 %, pH 7,4) y solución de inhibidor completo de proteasa libre de EDTA Roche 1 x (Roche) con un homogeneizador con mano de mortero de sedimentación. Este homogeneizado se centrifuga a 2000 x g; el sobrenadante se menciona como la "fracción soluble" y la fracción sedimentada se menciona como la "fracción insoluble". Los homogeneizados tisulares se dividen en alícuotas inmediatamente y se congelan a -80 °C antes de su uso. Para experimentos con la fracción insoluble, el sedimento se resuspende en tampón de lisis. La concentración de proteínas se determina usando el ensayo de proteína BCA (Pierce). Se inmunoprecipitan 100 µg de proteína, diluida a 1 ml con PBS que contenía inhibidores de proteasa 1 x, con 5-10 µg de un anticuerpo monoclonal que se une a epítomos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 acoplada a perlas magnéticas activadas con tosilo Dynabeads M-280 (DynaL Biotech, Oslo, Noruega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los anticuerpos que se unen a epítomos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 incluyen SEDI SOD (anti-DSE1) descrito en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 60/741.462. Este anticuerpo es específico para el epítomo que comprende la secuencia RLACGVIGI.

En resumen, se dializan 100 µg de IgG SEDI SOD frente a 3 cambios de PBS. Esto se incuba con 300 µl de perlas magnéticas de reserva pre-lavadas en PBS a 4 °C durante un mínimo de 96 h. Esto va seguido por bloqueo con BSA al 0,1 % en Tris 0,2 M, pH 8,5 durante 24 h a 4 °C. En un protocolo alternativo, se usan perlas de proteína G sepharose (Sigma) para precipitar IgG SEDI SOD.

En un protocolo alternativo, se usan otros anticuerpos que se unen a epítomos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 en los experimentos de inmunoprecipitación, incluyendo los epítomos descritos en el documento WO 2005/019828 (DLGKGGNEESTKTGNAGS y NPLSRKHGGPKDEE), y anticuerpos contra los mismos, creados, por ejemplo, como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 60/778.379, presentada el 3 de marzo de 2006, y los epítomos descritos en Khare et al. (8) (IKGLTEGLHGF y HCIIGRTLTVH).

Ejemplo 17

65 Inmunoprecipitación y detección de SOD1 mal plegada a partir de tejido cerebral

Se obtienen tejidos cerebrales de un paciente humano normal, de un ratón de tipo silvestre, de un ratón transgénico

que sobreexpresa SOD1 humana de tipo silvestre y de un ratón modelo G93A para ALS, que expresa una forma mal plegada de SOD1. Las muestras se congelaron inmediatamente en hielo seco y se pesaron. El tejido congelado se cortó en trozos más pequeños y se homogeneizó (10 % p/v) en tampón de lisis (NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, Tris 10 mM, desoxicolato al 0,5 %, NP-40 al 0,5 %, pH 7,4) y solución de inhibidor completo de proteasa libre de EDRA Roche 1 x (Roche) con un homogeneizador con mano de mortero de sedimentación. Este homogeneizado se centrifugó a 2000 x g; el sobrenadante se mencionó como la "fracción soluble" y la fracción sedimentada se menciona como la "fracción insoluble". Los homogeneizados tisulares se dividieron en alícuotas inmediatamente y se congelaron a -80 °C antes de su uso. Para experimentos con la fracción insoluble, el sedimento se resuspendió en tampón de lisis. Se determinó la concentración de proteínas usando el ensayo de proteína BCA (Pierce). Se inmunoprecipitaron 100 µg de proteína, diluida a 1 ml con PBS que contenía inhibidores de proteasa 1 x, con 5-10 µg de un anticuerpo monoclonal que se unía a DLGKGGNEESTKTGNAGS, un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1, acoplado a perlas magnéticas activadas con tosilo Dynabeads M-280 (DynaL Biotech, Oslo, Noruega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15 Para la inmunotransferencia, se usó un anticuerpo dirigido contra DLGKGGNEESTKTGNAGS para detectar SOD1 a partir de proteínas celulares de muestras de tejido cerebral que se habían resuelto por electroforesis en gel.

20 Como se demuestra en la Figura 4, un anticuerpo dirigido contra DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) inmunoprecipitaba con una forma mal plegada de SOD1 en tejidos cerebrales de ratones mutantes G93A, y a un grado mucho menor SOD1 humana de tipo silvestre sobreexpresada. Este anticuerpo no inmunoprecipitaba formas nativas de SOD1 de ratón o humana. Sin embargo, el anticuerpo dirigido contra DSE2 reconocía SOD1 humana y de ratón desnaturalizada por inmunotransferencia directa.

25 En un protocolo alternativo, se usan otros anticuerpos que se unen a epítopos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 en los experimentos de inmunoprecipitación, incluyendo los epítopos descritos en el documento WO 2005/019828 (NPLSRKHGGPKDEE), y anticuerpos contra los mismos, creados, por ejemplo, como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 60/778.379, presentada el 3 de marzo de 2006, y los epítopos descritos en Khare et al. (8) (IKGLTEGLHGF y HCIIGRTLVVH).

30 **Ejemplo 18**

Inmunohistoquímica de tejido cerebral

35 Se obtiene tejido cerebral de pacientes diagnosticados con enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o ALS, y controles coincidentes. Las muestras se incuban con formalina tamponada con fosfato libre de metanol al 10 % (Fisher Scientific). Las muestras tisulares se diseccionan, incrustan en parafina y se cortan secciones de 6 µm de forma longitudinal o transversal usando un micrótopo rotatorio. Todas las secciones para inmunohistoquímica se tratan con H₂O₂ al 3 % (v/v) y tampón citrato sódico 10 mM, pH 6,0 antes del marcaje. Se usan anticuerpos que se unen a epítopos presentados selectivamente o accesibles a formas no nativas de SOD1. En todos los casos, los anticuerpos primarios se dejan reaccionar durante una noche a 4 °C. Las secciones se revelan usando el sistema DakoCytomation Envision™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando 3,3'-diaminobencidina (DAB) como cromógeno. Para marcaje doble, se usa el kit de tinción doble DakoCytomation Envision™ DoubleStain con nitro-azul de tetrazolio (NBT) como cromógeno. Las secciones teñidas se visualizan usando un microscopio Leica DM 6000 y se obtienen imágenes digitales con una cámara digital a color Micropublisher 3.3 RTV (Qimaging).

45 **Ejemplo 19**

Inmunohistoquímica de tejido cerebral de enfermedad de Alzheimer

50 Los tejidos se prepararon por fijación en formalina y se incrustaron en parafina. Los tejidos se seccionaron (4 micrómetros), se montaron en portaobjetos de microscopio cargados y se calentaron en un horno de secado de tejidos durante 45 minutos a 60 °C. Los portaobjetos se desparafinizaron lavando los portaobjetos en xileno (3 x 5 min.) y se rehidrataron lavando los portaobjetos en concentraciones decrecientes de alcohol (3 x 3 min. usando alcohol al 100 %; 2 x 3 min. usando alcohol al 95 %; 1 x 3 min. usando alcohol al 80 %) y agua destilada. Los portaobjetos se vaporizaron en tampón citrato sódico 0,01 M, pH 6,0 a 99-100 °C durante 20 minutos y se incubaron a TA durante 20 minutos. Los portaobjetos se aclararon en TBS 1 x con Tween (TBST) durante 1 minuto a TA.

60 Los portaobjetos se incubaron con un bloqueo de proteínas durante 20 minutos, se sondearon con anticuerpo primario durante 45 minutos y se aclararon con TBST. Los portaobjetos se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado durante 30 minutos y después se aclararon con TBST. Los portaobjetos a continuación se incubaron en estreptavidina con fosfatasa alcalina durante 30 minutos, se aclararon en TBST y se incubaron con sustrato durante 30 minutos. Después de aclarar en agua destilada, los portaobjetos se examinaron por microscopía.

65 Se obtuvo tejido cerebral del hipocampo de la autopsia de una mujer de 78 años de edad diagnosticada con enfermedad de Alzheimer y tejido normal de hipocampo de control de una mujer de 52 años de edad. Las muestras se incubaron con formalina tamponada con fosfato libre de metanol al 10 % (Fisher Scientific). Las muestras

tisulares se diseccionaron, incrustaron en parafina y se cortaron en secciones de 6 µm de forma longitudinal o transversal usando un micrótopo rotatorio. Todas las secciones para inmunohistoquímica se trataron con H₂O₂ al 3 % (v/v) y tampón citrato sódico 10 mM, pH 6,0 antes del marcaje. Se usó un anticuerpo específico para el epítipo específico de enfermedad de Alzheimer DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) como anticuerpo primario para teñir las secciones tisulares a una concentración de 5 µg/ml (Figura 5). Los anticuerpos se dejaron reaccionar durante una noche a 4 °C. Las secciones se revelaron usando el sistema DakoCytomation Envision™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando 3,3'-diaminobencidina (DAB) como cromógeno. Para marcaje doble, se usa el kit de tinción doble DakoCytomation Envision™ DoubleStain con nitro-azul de tetrazolio (NBT) como cromógeno. Las secciones teñidas se visualizaron usando un microscopio Leica DM 6000 y se obtuvieron imágenes digitales con una cámara digital a color Micropublisher 3.3 RTV (Qimaging). La sección del hipocampo obtenida de la mujer de 78 años de edad con enfermedad de Alzheimer en fase tardía mostró fuerte tinción de placas seniles en el cerebro con enfermedad de Alzheimer con el anticuerpo dirigido contra DSE2 (Figura 5B, panel de la izquierda), así como tinción aumentada con subconjuntos de neuronas en la sección del hipocampo con enfermedad de Alzheimer (Figura 5B, panel de la derecha) en comparación con el hipocampo normal (Figura 5A).

Estos datos demuestran que SOD1 mal plegada está presente de forma intracelular y extracelular en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer y que el anticuerpo dirigido contra el epítipo DSE2 CDLGKGGNEESTKTGNAGS reconoce proteínas SOD1 mal plegadas encontradas en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo 20

Inmunohistoquímica de tejido cerebral de enfermedad de Parkinson

Los tejidos se prepararon por fijación en formalina y se incrustaron en parafina. Los tejidos se seccionaron (4 micrómetros), se montaron en portaobjetos de microscopio cargados y se calentaron en un horno de secado de tejidos durante 45 minutos a 60 °C. Los portaobjetos se desparafinizaron lavando los portaobjetos en xileno (3 x 5 min.) y se rehidrataron lavando los portaobjetos en concentraciones decrecientes de alcohol (3 x 3 min. usando alcohol al 100 %; 2 x 3 min. usando alcohol al 95 %; 1 x 3 min. usando alcohol al 80 %) y agua destilada. Los portaobjetos se vaporizaron en tampón citrato sódico 0,01 M, pH 6,0 a 99-100 °C durante 20 minutos y se incubaron a TA durante 20 minutos. Los portaobjetos se aclararon en TBS 1 x con Tween (TBST) durante 1 minuto a TA.

Los portaobjetos se incubaron con un bloqueo de proteínas durante 20 minutos, se sondearon con anticuerpo primario durante 45 minutos y se aclararon con TBST. Los portaobjetos se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado durante 30 minutos y después se aclararon con TBST. Los portaobjetos a continuación se incubaron en estreptavidina con fosfatasa alcalina durante 30 minutos, se aclararon en TBST y se incubaron con sustrato durante 30 minutos. Después de aclarar en agua destilada, los portaobjetos se examinaron por microscopia.

Se obtuvo una muestra de cerebro de una mujer de 79 años de edad con demencia. La sección teñida con H y E (Figura 6, panel A) mostró sustancia negra con neuronas dopaminérgicas que mostraban cuerpos de Lewy ocasionales coherentes con enfermedad de Parkinson. El anticuerpo anti-DSE2 mostró tinción débil principalmente negativa a inusual en neuronas pigmentadas y no pigmentadas dentro de la sustancia negra (Figura 6, panel B, C, D y E). Los cuerpos de Lewy fueron negativos (Figura 6, panel B). El neurópilo adyacente fue escasamente positivo, y los astrocitos eran de escasamente a ocasionalmente moderadamente positivos. Los cuerpos amiláceos fueron fuertemente positivos. Esta muestra demostró placas seniles inusuales en la materia gris adyacente que era fuertemente positiva (Figura 6, panel F). Se evaluaron secciones en serie adyacentes en ausencia de anticuerpo primario como control y todas fueron negativas.

Estos datos demuestran que SOD1 mal plegada está presente en cerebros de pacientes con enfermedad de Parkinson y que el anticuerpo dirigido contra el epítipo DSE2 DLGKGGNEESTKTGNAGS reconoce proteínas SOD1 mal plegadas encontradas en los cerebros de pacientes con enfermedad de Parkinson.

Ejemplo 21

Inmunorreactividad de DSE2 de SOD1 en enfermedad

Los inventores han detectado inmunorreactividad de DSE2 en todos los tipos de ALS (formas esporádicas, así como ALS familiar de SOD1 y ALS familiar sin mutaciones de SOD1). La inmunorreactividad es detectable como depósitos densos concretos dentro de algunas neuronas motoras de la médula espinal, incluyendo axones motores en la raíz ventral, así como depósitos marcados extracelulares dentro de las astas anteriores de la médula espinal, y dentro de los axones del tracto motor. Además, la inmunorreactividad de DSE2 es detectable de forma intracelular en neuronas del hipocampo en AD, pero no en individuos normales de edad coincidente. Además, la inmunorreactividad de DSE2 también se aprecia en forma regionalmente difusa en placas seniles y depósitos marcados de forma extracelular en el hipocampo. SOD1 mal plegada extracelular en enfermedades neurodegenerativas es claramente una diana para inmunoterapia, que puede "neutralizar" la actividad tóxica de las especies mal plegadas acelerando la degradación por la microglía, y/o por bloqueo de la actividad enzimática

anormal de esta proteína mal plegada.

Ejemplo 22

5 Inmunización con epítipo específico de ALS de ratones de modelo de ALS

Este estudio muestra que la vacunación con secuencias peptídicas específicas de la enzima superóxido dismutasa uno (SOD1) previene la enfermedad neurodegenerativa esclerosis lateral amiotrófica (ALS).

10 Se inmunizan IP ratones transgénicos que expresan SOD1 mutante humana G93A y G37R con epítipo específico de esclerosis lateral amiotrófica acoplado a KLH y péptidos de control cada mes antes de la aparición de la enfermedad de neurona motoras (4 meses y 6 meses, respectivamente). El retardo o la anulación de la agregación de SOD y la aparición de la enfermedad sucede para epítipos terapéuticamente activos, y se controlan las manifestaciones autoinmunitarias potenciales para los epítipos específicos de esclerosis lateral amiotrófica y para los epítipos de control.

15 Estos métodos se usan con los ratones de modelo G93A y G37R. Los ratones de modelo G93A y G37R expresan ciertas formas mutantes de la proteína SOD1 humana y desarrollan una enfermedad tipo ALS de forma clínica y neuropatológica. Se usan setenta y dos de cada ratón modelo para este estudio. Se ensayan siete diferentes epítipos peptídicos específicos de ALS para formas no nativas de SOD1 y se comparan con dos grupos de control (uno no tratado y uno tratado con adyuvante en solitario). Cada grupo consistía en 8 animales.

20 Se asignaron aleatoriamente ratones transgénicos hemicigóticos de cuatro semanas de edad (transgén y número de copias confirmados por PCR y transferencia de Southern) en uno de nueve grupos para inmunización: sin inmunización (NI); hemocianina de lapa californiana (KLH) en solitario más adyuvante; o una de siete secuencias peptídicas DSE de SOD1. Todos los péptidos se sintetizan, purifican y acoplan a KLH usando SMCC-Sulfolink. Todos los ratones se inmunizan inicialmente a través de inyección intraperitoneal (IP) con 100 µg de péptido acoplado a KLH o KLH en solitario, emulsionado 1:1 en adyuvante completo de Freund (FCA), en un volumen total inyectado de 100 µl. Tres semanas después, se da a los ratones una inyección subcutánea de péptido acoplado a KLH emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (IFA). Después de ello, se da a los ratones inyecciones subcutáneas mensuales de péptido acoplado a KLH emulsionado en IFA. Después de cuatro inmunizaciones, se recogen 100 µl de sangre de la vena safena, y se determinan los títulos de anticuerpo en plasma.

25 Los animales se pesan 2-3 veces por semana. Se evalúa el reflejo de extensión de la pata cuando los animales se levantan por la base de la cola y se retiran de su jaula para pesarlos. La reducción en la extensión de la pata es un déficit prematuro observado en ratones transgénicos de SOD1 mutante. El comportamiento de los ratones se controla semanalmente usando el ensayo de campo abierto (EthoVision, Noldus Information Technology, Leesburg, VA, EE. UU.) y se hace el análisis de la forma de caminar semanalmente usando DigiGait. Las evaluaciones del comportamiento inicial y la forma de caminar se completan justo antes de la primera inmunización y sirven como datos basales.

30 Se analizan los sistemas de cerebro, médula espinal y otros órganos no del SNC postmortem para los índices morfológicos y bioquímicos de neurodegeneración.

35 Los animales se pesan y controlan regularmente para los efectos adversos tales como signos de dolor y sufrimiento que podrían ser un resultado de las inmunizaciones. También se controla la autoinmunidad.

40 La vacunación con epítipos peptídicos específicos de ALS previene la enfermedad neurodegenerativa esclerosis lateral amiotrófica (ALS). El retardo o anulación de la agregación de SOD y la aparición de la enfermedad suceden para epítipos terapéuticamente activos, y no para los controles.

Ejemplo 23

55 Inmunización con epítipo específico de ALS para ratones de modelo de ALS

60 Se asignaron aleatoriamente ratones de modelo G93A o G37R de cuatro semanas de edad en uno de siete grupos para inmunización: solución salina; hemocianina de lapa californiana (KLH); DSE1; DSE1a; DSE2; DSE5; y DSE1a + DSE2 + DSE5. Todos los péptidos se conjugan con KLH. Todas las inmunizaciones se administran junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

65 Los animales se evalúan para cambios en el reflejo de extensión de la pata, el comportamiento y la forma de caminar. Se analizan los sistemas de cerebro, médula espinal y otros órganos no del SNC postmortem para índices morfológicos y bioquímicos de neurodegeneración.

La vacunación con un ácido nucleico que codifica un epítipo específico de ALS previene la enfermedad neurodegenerativa esclerosis lateral amiotrófica (ALS). El retardo o anulación de la agregación de SOD y la

aparición de la enfermedad suceden para epítomos terapéuticamente activos, y no para los controles.

Ejemplo 24

5 Inmunización de ratones del modelo de ALS con ácido nucleico

Se asignan aleatoriamente ratones de modelo G93A o G37R de cuatro semanas de edad para inmunización con un ácido nucleico que codifica un epítomo específico de ALS y un ácido nucleico de control no relacionado. Todos los ácidos nucleicos se administran con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 Los animales se evalúan para cambios en el reflejo de extensión de la pata, el comportamiento y la forma de caminar. Se evalúan los sistemas de cerebro, médula espinal y otros órganos no del SNC postmortem para los índices morfológicos y bioquímicos de neurodegeneración.

15 La vacunación con un ácido nucleico que codifica un epítomo específico de ALS previene la enfermedad neurodegenerativa esclerosis lateral amiotrófica (ALS). El retardo o anulación de la agregación de SOD y la aparición de la enfermedad suceden para epítomos terapéuticamente activos, y no para los controles.

Ejemplo 25

20 Infusión de anticuerpo contra epítomo específico de ALS de ratones de modelo de ALS

25 A ratones G93A y G37R se les infundió por vía intravenosa (IV) anticuerpos monoclonales dirigidos contra los epítomos específicos de esclerosis lateral amiotrófica tras la aparición de la enfermedad, para un modelo más cercano de inmunoterapia de ALS. La ralentización o detención de la agregación de SOD y la progresión de la enfermedad sucede para anticuerpos terapéuticamente activos, sin efecto por los anticuerpos de control de isotipo. Se controla la autoinmunidad para el epítomo específico de esclerosis lateral amiotrófica y para anticuerpos de control, incluyendo epítomo expuesto nativo.

30 Los ratones de modelo G93A y G37R expresan ciertas formas mutantes de la proteína SOD1 humana y desarrollan una enfermedad tipo ALS de forma clínica y neuropatológica. Se usan treinta y dos ratones de cada cepa para este estudio, con 8 ratones asignados aleatoriamente a cada uno de dos grupos de tratamiento con anticuerpos dirigidos contra un epítomo presentado selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 y dos grupos de control. Se asignan aleatoriamente ratones de 8 semanas de edad en uno de 4 grupos: 1. Un anticuerpo dirigido contra un epítomo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 inyectado por vía intraperitoneal (IP); 35 2. Un anticuerpo dirigido contra un epítomo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 infundido por vía intracerebroventricular (ICV); 3. PBS inyectada IP (control); y 4. Solución salina tamponada con fosfato (PBS) infundida ICV (control).

40 Los ratones reciben inyecciones IP semanalmente de 1 ml de anticuerpo purificado en PBS (250 µl/ml) o PBS en solitario. Para infusión ICV, los ratones se anestesian con gas isoflurano suministrado por una mascarilla, y se les implanta bombas mini-osmóticas (Alzet modelo n.º 2004; longitud: 3 cm, volumen total: 200 ul, caudal: 0,25 ul/h). Esta bomba proporciona infusión constante de 0,125 ug/h (un total de 25 ug por semana) durante al menos 4 semanas. Las bombas que contienen anticuerpo contra DSE2 purificado o PBS se instalan en un kit de infusión cerebral (kit 3 de infusión cerebral Alzet), usando una cánula colocada en el tercer ventrículo. Las bombas se 45 reemplazan después de 4 semanas de uso.

Los ratones se pesan y evalúan para la función motora y el comportamiento antes de las inyecciones IP o del implante de las bombas para que sirvan como datos basales. Después de ello, se realizan estos ensayos una vez 50 por semana. Los ensayos incluyen:

a.) Reflejo de extensión de la extremidad posterior: Reducción en la extensión de la extremidad posterior cuando los animales se levantan por la cola como un déficit prematuro observado en ratones transgénicos de SOD1 mutante. Los animales se levantan por la base de la cola y se valoran los reflejos de extensión y postural de la 55 extremidad posterior. El valor 3 indica extensión completa y reflejo postural normal. El valor 2 indica extensión moderada y reflejo postural normal. El valor 1 indica mala extensión y reflejo postural. El valor 0 indica ausencia de movimiento de la extremidad posterior.

b.) Ensayo de campo abierto: El ensayo de campo abierto se hace semanalmente usando EthoVision Pro Versión 3.1 (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, EE. UU.). Los animales se colocan en un área circular cerrada (50 cm de diámetro) con una parte superior abierta y se registran durante aproximadamente 5 minutos con una videocámara digital suspendida. Se cuantifican fuera de línea varios parámetros de comportamiento. Se controlan cuatro animales simultáneamente en áreas separadas.

c.) Análisis de la forma de caminar: el análisis de la forma de caminar se hace semanalmente usando DigiGait (Mouse Specifics, Boston, MA, EE. UU.). Se presentan cambios en la colocación de la pata y en la longitud de zancada como los cambios funcionales más prematuros observados en ratones transgénicos B6.Cg-Tg SOD1 G93A, evaluados usando DigiGait. 65

A las 12 semanas de edad, se recogen 100 µl de sangre de los ratones a través de la vena safena y se determinan los títulos de anticuerpo en plasma. Para ratones tratados ICV, la sangre se recoge con anestesia cuando se reemplazan las bombas. Los ratones tratados IP también se anestesian con isoflurano para facilitar la recogida de sangre.

5 Los animales se pesan y controlan regularmente para los efectos adversos tales como signos de dolor y sufrimiento mientras dura el estudio. A los animales que parecen tener dolor se les administra Buprenorfina.

10 Se analizan los sistemas de cerebro, médula espinal y otros órganos no del SNC postmortem para los índices morfológicos y bioquímicos de neurodegeneración.

15 La inyección o infusión de anticuerpos dirigidos contra un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 es eficaz en el tratamiento de la enfermedad neurodegenerativa esclerosis lateral amiotrófica (ALS). El tratamiento de ratones de modelo G93A y G37R a través de inyección o infusión de anticuerpos dirigidos contra un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1: ha neutralizado y eliminado SOD1 mutante; a prevenido la formación de agregados de SOD1; ha retardado la aparición de la enfermedad; y/o ha ralentizado la progresión de la enfermedad.

20 Ejemplo 26

Tratamiento de ratones G93A con anticuerpo contra DSE2

25 A ratones de modelo G93A se les infundió anticuerpos monoclonales dirigidos contra la secuencia peptídica DSE2. Los ratones de modelo G93A expresan formas mutantes de la proteína SOD1 humana y desarrollan una enfermedad tipo ALS de forma clínica y neuropatológica. El anticuerpo se administró por infusión intracerebroventricular (ICV), usando un catéter cerebral (catéteres Alzet®) y una bomba implantada por vía subcutánea (bombas osmóticas Alzet®) o por inyección intraperitoneal de anticuerpo anti-DSE2.

30 Para infusión ICV, se asignaron aleatoriamente 8 ratones a cualquier grupo de tratamiento (4 animales) o al grupo de control (4 animales). Para el tratamiento, se llenaron las bombas Alzet con 200 µl de solución de anticuerpo (de 0,5 a 0,6 mg/ml) en solución salina, o en solución salina en solitario para el control. El anticuerpo se suministró a un caudal de 0,125 µg/h durante 4 semanas. A 2 ratones adicionales se les infundió por inyección intraperitoneal (IP) 1 mg de anticuerpo anti-DSE2, seguido por 3 inyecciones adicionales de 1 mg de anticuerpo anti-DSE2 en solución salina a intervalos semanales. A 2 ratones se les inyectó el control con solución salina sin anticuerpo.

35 Se controló la progresión de la enfermedad en ratones tratados y no tratados usando el análisis de la forma de caminar (DigiGait, Mouse Specifics Inc, Boston, MA). El análisis Digigait permite una medición muy precisa de los cambios en los parámetros de la forma de caminar en este modelo de ratón que permite una evaluación muy precisa y objetiva de la progresión de la enfermedad (Wooley CM, Sher RB, Kale A, Frankel WN, Cox GA, Seburn KL.; Gait analysis detects early changes in transgenic SOD1 (G93A) mice. Muscle Nerve. Julio de 2005;32(1):43-50). Según progresa la enfermedad, aumenta el tiempo de zancada. Los inventores han descubierto que el tiempo de zancada es un parámetro sensible para medir la progresión de la enfermedad.

45 La Tabla 11 muestra los resultados de las mediciones del tiempo de zancada usando análisis Digigait de animales tratados después de 25 días de tratamiento (inyección IP) y de 28 a 35 días de tratamiento (infusión ICV). El tiempo de zancada se mide en segundos y se promedia sobre la longitud del estudio y las cuatro patas. El tiempo de zancada promedio 0,3238 segundos en el control infundido ICV. La progresión de la enfermedad, medida por el tiempo de zancada, se retarda significativamente después de 35 días de tratamiento. El tiempo de zancada es menor en animales tratados y se reduce hasta 0,2988 segundos. El tiempo de zancada también se mejora en ratones inyectados IP. El tiempo de zancada promedio 0,3366 segundos para animales de control y mejoró hasta 0,3206 segundos después de 28 días de tratamiento.

50 Para la comparación y para demostrar el efecto de la progresión de la enfermedad, se determinó el tiempo de zancada para ratones no tratados en un promedio de 66 y 122 días de edad (edad del animal en el mismo intervalo que los grupos de tratamiento). A los 66 días, los ratones no tratados tienen un tiempo de zancada promedio de 0,3254 segundos (DES.TIP. 0,0313). A los 122 días, el tiempo de zancada ha aumentado hasta 0,3492 segundos (DES.TIP. 0,0288). Claramente, en ausencia de tratamiento, este parámetro aumenta con alta significancia estadística. Los inventores descubrieron que ambos métodos de tratamiento revierten el alargamiento del tiempo de zancada que se observas en los animales no tratados con el tiempo. Esto demuestra la eficacia de este tratamiento de anticuerpo para revertir la enfermedad asociada al fenotipo del modelo de ratón de ALS.

Tabla 11. Retardo en la progresión de la enfermedad: Tiempo de zancada de animales tratados con anticuerpos contra SOD1 específica de enfermedad

Estudio	Grupo		Tiempo de zancada	
Infusión ICV	Tratamiento	Promedio	0,2988 s	
		DES.TIP.	0,0044	
	Control	Promedio	0,3238 s	
		DES.TIP.	0,0449	
		Valor P	4,30E-02	
Inyección IP	Tratamiento	Promedio	0,3206 s	
		DES.TIP.	0,0044	
	Control	Promedio	0,3366 s	
		DES.TIP.	0,0148	
		Valor P	1,82E-02	
Progresión de la enfermedad	66 días	Promedio	0,3254 s	
		DES.TIP.	0,0313	
	122 días	Promedio	0,3492 s	
		DES.TIP.	0,0288	
		Valor P		1,04E-05

Ejemplo 27

5

Inmunización de ratones transgénicos TgCRND8

10 El ratón TgCRND8 es un modelo murino de enfermedad de Alzheimer. Estos ratones expresan un transgén β APP695 humano mutante (K670N/M671L y V717F) bajo la regulación del promotor del prion de hámster sirio en el fondo de la cepa C3H/B6. Estos ratones tienen defectos de aprendizaje espacial a los 3 meses de edad que están acompañados por niveles crecientes de A β soluble en SDS y también de cantidades crecientes de placas amiloides que contienen A β en el cerebro. Véase Janus C et al. (65).

15 A los ratones TgCRND8 se inmunizan IP con KLH acoplada a un epítipo presentado selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 o a un péptido de control a las 6, 8, 12, 16 y 20 semanas.

Los ratones se ensayan en una versión de memoria de referencia del ensayo de laberinto de agua de Morris a las 11, 15, 19 y 23 semanas (véase, Janus C et al. (65); Janus C (66); Gass P et al. (67); y Wehner JM (6B)).

20 El retardo o la anulación de la agregación de SOD1 y la aparición de la enfermedad sucede para el epítipo terapéuticamente activo, y se controlan las manifestaciones autoinmunitarias. Además de la agregación de SOD1, se evalúa la deposición de A β fibrilar cerebral (véase, Janus C et al. (65)).

Ejemplo 28

25

Infusión de anticuerpos de ratones transgénicos TgCRND8

30 A ratones TgCRND8 se les infunden anticuerpos que se unen a epítopos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 o a anticuerpos de control de isotipo. Como se ha descrito anteriormente, los ratones se ensayan en una versión de memoria de referencia del ensayo de laberinto de agua de Morris.

La ralentización o detención de la agregación de SOD1 y la progresión de la enfermedad sucede para anticuerpos terapéuticamente activos, sin efecto de los anticuerpos de control de isotipo. Se controla la autoinmunidad.

35 Además de la agregación de SOD1, se evalúa la deposición de A β fibrilar cerebral (véase, Janus C et al. (65)).

Ejemplo 29

40

Inmunización de ratones transgénicos TgCRND8 con ácido nucleico

45 El ratón TgCRND8 es un modelo murino de enfermedad de Alzheimer. Estos ratones expresan un transgén β APP695 humano mutante (K670N/M671L y V717F) bajo la regulación del promotor del prion de hámster sirio en el fondo de la cepa C3H/B6. Estos ratones tienen defectos de aprendizaje espacial a los 3 meses de edad que están acompañados por niveles crecientes de A β soluble en SDS y también de cantidades crecientes de placas amiloides que contienen A β en el cerebro. Véase Janus C et al. (65).

A los ratones TgCRND8 se inmunizan IP con KLH acoplada a un ácido nucleico que codifica un epítipo presentado selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 o a un ácido nucleico de control a las 6, 8, 12, 16 y 20 semanas.

50

Los ratones se ensayan en una versión de memoria de referencia del ensayo de laberinto de agua de Morris a las 11, 15, 19 y 23 semanas (véase, Janus C et al. (65); Janus C (66); Gass P et al. (67); y Wehner JM (6B)). Además de la agregación de SOD1 se puede evaluar la deposición de A β fibrilar cerebral (véase, Janus C et al. (65)).

- 5 La vacunación con un ácido nucleico que codifica un epítipo presentado selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 previene la enfermedad de Alzheimer. El retardo o anulación de la agregación de SOD y la aparición de la enfermedad sucede para el ácido nucleico terapéuticamente activo, y no para los controles.

Ejemplo 30

10

Inmunización de ratones H α -Syn Tg

Se usan ratones transgénicos heterocigóticos que expresan **h α -syn** bajo el control regulador del promotor del factor β de crecimiento derivado de plaquetas (Masliah E et al. (69)). Estos animales se usan porque son un modelo para la enfermedad de Parkinson y para la enfermedad con cuerpos de Lewy (Masliah E et al. (70)).

15

Los ratones transgénicos h α -syn tg se inmunizan IP con KLH acoplada a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 o a un péptido de control a las 2, 6, 8, 12, 16 y 20 semanas.

20

El retardo o anulación de la agregación de SOD y la aparición de la enfermedad sucede para el epítipo terapéuticamente activo, y se controlan las manifestaciones autoinmunitarias.

La progresión de la enfermedad se evalúa controlando la acumulación de h α -syn en el cerebro de los ratones y las características clínicas de implicación neurológica (véase, Masliah E et al. (70)).

25

Ejemplo 31

Inmunización de ratones H α -Syn Tg son ácido nucleico

30

Se usan ratones transgénicos heterocigóticos que expresan **h α -syn** bajo el control regulador del promotor del factor β de crecimiento derivado de plaquetas (Masliah E et al. (69)). Estos animales se usan porque son un modelo para la enfermedad de Parkinson y para la enfermedad con cuerpos de Lewy (Masliah E et al. (70)).

35

Los ratones transgénicos h α -syn tg se inmunizan IP con un ácido nucleico que codifica a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 o a un ácido nucleico de control a las 2, 6, 8, 12, 16 y 20 semanas.

La progresión de la enfermedad se evalúa controlando la acumulación de h α -syn en el cerebro de los ratones y las características clínicas de implicación neurológica (véase, Masliah E et al. (70)).

40

La vacunación con un ácido nucleico que codifica un epítipo presentado selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 previene la enfermedad de Parkinson. El retardo o anulación de la agregación de SOD y la aparición de la enfermedad sucede para el ácido nucleico terapéuticamente activo, y no para los controles.

45

Ejemplo 32

Infusión de anticuerpos de ratones H α -Syn Tg

50

Los ratones h α -syn tg se infunden con anticuerpos que se unen a epítipos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 o a anticuerpos de control de isotipo.

La ralentización o detención de la agregación de SOD1 y la progresión de la enfermedad sucede para anticuerpos terapéuticamente activos, sin efecto de los anticuerpos de control de isotipo. Se controla la autoinmunidad.

55

La progresión de la enfermedad se evalúa controlando la acumulación de h α -syn en el cerebro de los ratones y las características clínicas de implicación neurológica (véase, Masliah E et al. (70)).

Ejemplo 33

60

Administración de péptidos aislados a pacientes con ALS

Se administran las composiciones que comprenden epítipos específicos de ALS tales como GGGRLAC*GVVIGSG (DSE1a), DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) y IKGLTEGLHGF (DSE5) a pacientes humanos con ALS. Las composiciones se administran a pacientes con ALS.

65

Los pacientes se controlan para indicaciones de ralentización o detención de la agregación de SOD y progresión de

la enfermedad.

Los sujetos se controlan de forma regular para los efectos adversos tales como signos de dolor y sufrimiento que podrían ser un resultado de las inmunizaciones. Se controlan las manifestaciones autoinmunitarias.

5 La administración de los epítomos específicos de ALS GGGRLAC*GVIGIGSG (DSE1a), DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) y IKGLTEGLHGF (DSE5) ralentiza la progresión de ALS. La ralentización o detención de la agregación de SOD1 o la anulación de la progresión de la enfermedad sucede para epítomos terapéuticamente activos.

10 **Ejemplo 34**

Administración a pacientes con ALS: anticuerpos

15 Se administran anticuerpos dirigidos contra los epítomos específicos de ALS que comprenden GGGRLAC*GVIGIGSG (DSE1a), DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) y IKGLTEGLHGF (DSE5) a pacientes humanos con ALS. Los anticuerpos se administran a los sujetos a las 2, 6, 8, 12, 16 y 20 semanas.

20 Los pacientes se controlan para indicaciones de ralentización o detención de la agregación de SOD y progresión de la enfermedad. También se controlan las manifestaciones autoinmunitarias.

Los sujetos se controlan de forma regular para los efectos adversos tales como signos de dolor y sufrimiento que podrían ser un resultado de las inmunizaciones. Se controlan las manifestaciones autoinmunitarias.

25 La administración de anticuerpos dirigidos contra los epítomos específicos de ALS GGGRLAC*GVIGIGSG (DSE1a), DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) y IKGLTEGLHGF (DSE5) ralentiza la progresión de ALS. La ralentización o detención de la agregación de SOD1 o la anulación de la progresión de la enfermedad sucede para epítomos terapéuticamente activos.

30 **Ejemplo 35**

Administración de anticuerpos humanizados a pacientes con ALS

35 Se administran directamente anticuerpos humanizados dirigidos contra epítomos específicos de esclerosis lateral amiotrófica a pacientes humanos con ALS. Los pacientes se controlan para indicaciones de ralentización o detención de la agregación de SOD y la progresión de la enfermedad. La administración de un anticuerpo humanizado dirigido contra un epítomo específico de la enfermedad ALS ralentiza la progresión de la enfermedad ALS en los pacientes. La ralentización o detención de la agregación de SOD1 o la anulación de la progresión de la enfermedad sucede para anticuerpos terapéuticamente activos.

40 Se administran anticuerpos humanizados dirigidos contra los epítomos específicos de ALS que comprenden los péptidos GGGRLAC*GVIGIGSG (DSE1a), DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) y IKGLTEGLHGF (DSE5) a pacientes humanos con ALS. Se administra una composición farmacéutica que comprende 1-140 gramos (hasta 2 gramos/kilogramo) de los anticuerpos humanizados por infusión intravenosa para producir una concentración local que varía de 1 a 10 microgramos por ml en el SNC. En un régimen, la formulación comprende un anticuerpo dirigido
45 contra un epítomo específico de ALS. En otro régimen, la formulación comprende dos o más anticuerpos humanizados, cada uno dirigido contra un epítomo diferente específico de ALS. El régimen de dosificación variará con el estado fisiológico de los pacientes y con la respuesta del paciente al tratamiento. En un régimen de dosificación, la dosificación es una vez cada 3 o 4 semanas. En otros regímenes, la dosificación es una vez por semana, dos veces por semana, tres veces por semana o una vez cada 2 semanas.

50

Ejemplo 36

Administración intraventricular o intratecal de anticuerpos humanizados a pacientes con ALS

55 Se administran directamente anticuerpos humanizados contra epítomos específicos de ALS al SNC de pacientes con ALS por infusión intraventricular o intratecal usando una bomba de infusión tal como las bombas de infusión producidas por MedTronics (Minneapolis, MN, EE. UU.). A los pacientes con ALS se les infunden de 0,5 a 5 mg por día de anticuerpo humanizado para obtener una concentración final de 1 - 10 microgramos por ml en el SNC
60 infundidos a una tasa máxima de 1 ml/h. En un régimen, la formulación comprende un anticuerpo dirigido contra un epítomo específico de ALS. En otro régimen, la formulación comprende dos o más anticuerpos humanizados, cada uno dirigido contra un epítomo diferente específico de ALS.

65 Cuando los anticuerpos humanizados se administran a pacientes con ALS por inyección intratecal, se extrae un volumen igual de fluido cefalorraquídeo a través de la misma aguja usada para la inyección para evitar un aumento en la presión debido al volumen de inyección. Se da a los sujetos una dosis que varía del 1 % al 10 % de la dosis sistémica correspondiente. Los sujetos reciben una única dosis de la formulación de anticuerpo humanizado. Como

alternativa, los sujetos reciben múltiples dosis de la formulación de anticuerpo humanizado. En un régimen, la formulación comprende un anticuerpo dirigido contra un epítipo específico de ALS. En otro régimen, la formulación comprende dos o más anticuerpos humanizados, cada uno dirigido contra un epítipo diferente específico de ALS. En regímenes alternativos, la dosificación es una vez por semana, dos veces por semana, tres veces por semana o una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas o una vez al mes. En otro régimen, la dosificación varía dependiendo del estado fisiológico del sujeto y de la respuesta del sujeto al tratamiento.

Los pacientes se controlan para indicaciones de ralentización o detención de la agregación de SOD y progresión de la enfermedad. La administración del anticuerpo humanizado dirigido contra un epítipo específico de la enfermedad ALS ralentiza la progresión de la enfermedad ALS en los pacientes. La ralentización o detención de la agregación de SOD1 o la anulación de la progresión de la enfermedad sucede para anticuerpos terapéuticamente activos.

Ejemplo 37

15 Administración a pacientes con enfermedad de Alzheimer: epítipos

El epítipo específico de enfermedad de Alzheimer DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) se administra a seres humanos con enfermedad de Alzheimer. Los epítipos se administran.

20 Los pacientes se controlan para indicaciones de ralentización o detención de la agregación de SOD y la progresión de la enfermedad. En particular, se ensaya la memoria de los sujetos y se controla su comportamiento. También se controlan las manifestaciones autoinmunitarias.

25 Los sujetos se controlan de forma regular para los efectos adversos tales como signos de dolor y sufrimiento que podrían ser un resultado de las inmunizaciones. También se controlan las manifestaciones autoinmunitarias.

La administración del epítipo específico de enfermedad de Alzheimer DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) ralentiza la progresión de la enfermedad de Alzheimer. La ralentización o detención de la agregación de SOD1 o la anulación de la progresión de la enfermedad sucede para epítipos terapéuticamente activos.

30

Ejemplo 38

Administración a pacientes con enfermedad de Alzheimer: anticuerpos

35 Se administra un anticuerpo dirigido contra el epítipo específico de enfermedad de Alzheimer DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) a pacientes humanos con enfermedad de Alzheimer.

40 Los pacientes se controlan para indicaciones de ralentización o detención de la agregación de SOD y la progresión de la enfermedad. En particular, se ensaya la memoria de los sujetos y se controla su comportamiento. También se controlan las manifestaciones autoinmunitarias.

Los sujetos se controlan de forma regular para los efectos adversos tales como signos de dolor y sufrimiento que podrían ser un resultado de las inmunizaciones. También se controlan las manifestaciones autoinmunitarias.

45 La administración de un anticuerpo dirigido contra el epítipo específico de enfermedad de Alzheimer DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) ralentiza la progresión de la enfermedad de Alzheimer. La ralentización o detención de la agregación de SOD1 o la anulación de la progresión de la enfermedad sucede para anticuerpos terapéuticamente activos.

50 Ejemplo 39

Administración de anticuerpos humanizados a pacientes con enfermedad de Alzheimer

55 Se administran directamente anticuerpos humanizados dirigidos contra epítipos específicos de enfermedad de Alzheimer a pacientes humanos con enfermedad de Alzheimer. Los anticuerpos humanizados se administran por infusión intravenosa a una concentración que varía de 1 a 10 microgramos por ml de concentración local en el SNC. En un régimen, la formulación comprende un anticuerpo dirigido contra un epítipo específico de enfermedad de Alzheimer. En otro régimen, la formulación comprende dos o más anticuerpos humanizados, cada uno dirigido contra un epítipo diferente específico de enfermedad de Alzheimer. En un régimen de dosificación, la dosificación es una vez cada 3 semanas. En otros regímenes, la dosificación es una vez por semana, dos veces por semana, tres veces a la semana o una vez cada 2 semanas. Como alternativa, la dosificación varía dependiendo del estado fisiológico de los pacientes y de la respuesta del paciente al tratamiento.

65 Como alternativa, se administran directamente anticuerpos humanizados contra el epítipo específico de enfermedad de Alzheimer en el SNC de pacientes con enfermedad de Alzheimer por infusión intraventricular o intratecal. MedTronics (Minneapolis, MN, EE. UU.) proporciona dispositivos médicos para su uso en este ejemplo. La

concentración final de 1-10 microgramos por ml se consigue por infusión de como mucho 5 mg del anticuerpo humanizado por día a una tasa máxima de 1 ml/h. En un régimen, la formulación comprende un anticuerpo dirigido contra un epítipo específico de enfermedad de Alzheimer. En otro régimen, la formulación comprende dos o más anticuerpos humanizados, cada uno dirigido contra un epítipo diferente específico de enfermedad de Alzheimer. Los anticuerpos humanizados se administran a pacientes con enfermedad de Alzheimer por inyección intratecal. Para evitar un aumento en la presión debido al volumen de inyección, se extrae un volumen igual de fluido cefalorraquídeo a través de la misma aguja usada para la inyección. Se da a los sujetos una dosis que varía del 1 % al 10 % de la dosis sistémica correspondiente. Los sujetos reciben una única dosis de la formulación de anticuerpo humanizado. Como alternativa, los sujetos reciben múltiples dosis de la formulación de anticuerpo humanizado. En un régimen, la formulación comprende un anticuerpo dirigido contra un epítipo específico de enfermedad de Alzheimer. En otro régimen, la formulación comprende dos o más anticuerpos humanizados, cada uno dirigido contra un epítipo diferente específico de enfermedad de Alzheimer. En regímenes alternativos, la dosificación es una vez por semana, dos veces por semana, tres veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez al mes. En otro régimen, la dosificación varía dependiendo del estado fisiológico del sujeto y de la respuesta del sujeto al tratamiento.

Los pacientes se controlan para indicaciones de ralentización o detención de la agregación de SOD y la progresión de la enfermedad. La administración de un anticuerpo humanizado dirigido contra un epítipo específico de enfermedad de Alzheimer ralentiza la progresión de la enfermedad de Alzheimer en los pacientes. La ralentización o detención de la agregación de SOD1 o la anulación de la progresión de la enfermedad sucede para anticuerpos terapéuticamente activos.

Ejemplo 40

25 Administración a pacientes con enfermedad de Parkinson: epítipos

Se administra un epítipo específico de enfermedad de Parkinson a pacientes humanos con enfermedad de Parkinson.

30 Los pacientes se controlan para indicaciones de ralentización o detención de la agregación de SOD y la progresión de la enfermedad. En particular, se controla la forma de caminar, reflejo y comportamiento de los sujetos. También se controlan las manifestaciones autoinmunitarias.

Los sujetos se controlan de forma regular para los efectos adversos tales como signos de dolor y sufrimiento que podrían ser un resultado de las inmunizaciones.

La administración de un epítipo específico de enfermedad de Parkinson ralentiza la progresión de la enfermedad de Parkinson. La ralentización o detención de la agregación de SOD1 o la anulación de la progresión de la enfermedad sucede para epítipos terapéuticamente activos.

40

Ejemplo 41

Administración a pacientes con enfermedad de Parkinson: anticuerpos

45 Se administra un anticuerpo dirigido contra el epítipo específico de enfermedad de Parkinson a pacientes humanos con enfermedad de Parkinson.

Los pacientes se controlan para indicaciones de ralentización o detención de la agregación de SOD y la progresión de la enfermedad. En particular, se controla la forma de caminar, reflejo y comportamiento de los sujetos. También se controlan las manifestaciones autoinmunitarias.

50

Los sujetos se controlan de forma regular para los efectos adversos tales como signos de dolor y sufrimiento que podrían ser un resultado de las inmunizaciones. La administración de un compuesto dirigido contra un epítipo específico de enfermedad de Parkinson ralentiza la progresión de la enfermedad de Parkinson en los pacientes. La ralentización o detención de la agregación de SOD1 o la anulación de la progresión de la enfermedad sucede para anticuerpos terapéuticamente activos.

55

Ejemplo 42

60 Administración de anticuerpos humanizados a pacientes con enfermedad de Parkinson.

Se administran directamente anticuerpos humanizados dirigidos contra epítipos específicos de enfermedad de Parkinson a pacientes humanos con enfermedad de Parkinson. Los anticuerpos humanizados se administran por infusión intravenosa a una concentración que varía de 1 a 10 microgramos por ml de concentración local en el SNC. En un régimen, la formulación comprende un anticuerpo dirigido contra un epítipo específico de enfermedad de Parkinson. En otro régimen, la formulación comprende dos o más anticuerpos humanizados, cada uno dirigido

65

contra un epítipo diferente específico de enfermedad de Parkinson. En un régimen de dosificación, la dosificación es una vez cada 3 semanas. En otros regímenes, la dosificación es una vez por semana, dos veces por semana, tres veces a la semana o una vez cada 2 semanas. Como alternativa, la dosificación varía dependiendo del estado fisiológico de los pacientes y de la respuesta del paciente al tratamiento.

5 Como alternativa, se administran directamente anticuerpos humanizados contra epítipos específicos de enfermedad de Parkinson al SNC de pacientes con enfermedad de Parkinson por infusión intraventricular o intratecal. MedTronics (Minneapolis, MN, EE. UU.) proporciona dispositivos médicos para su uso en este ejemplo. La concentración final de 1-10 microgramos por ml se consigue por infusión de como mucho 5 mg del anticuerpo humanizado por día a una tasa máxima de 1 ml/h. En un régimen, la formulación comprende un anticuerpo dirigido
10 contra un epítipo específico de enfermedad de Parkinson. En otro régimen, la formulación comprende dos o más anticuerpos humanizados, cada uno dirigido contra un epítipo diferente específico de enfermedad de Parkinson.

15 Los anticuerpos humanizados contra epítipos específicos de enfermedad de Parkinson se administran a pacientes con enfermedad de Parkinson por inyección intratecal. Para evitar un aumento en la presión debido al volumen de inyección, se extrae un volumen igual de fluido cefalorraquídeo a través de la misma aguja usada para la inyección. Se da a los sujetos una dosis que varía del 1 % al 10 % de la dosis sistémica correspondiente. Los sujetos reciben una única dosis de la formulación de anticuerpo humanizado. Como alternativa, los sujetos reciben múltiples dosis de la formulación de anticuerpo humanizado. En un régimen, la formulación comprende un anticuerpo dirigido contra
20 un epítipo específico de enfermedad de Parkinson. En otro régimen, la formulación comprende dos o más anticuerpos humanizados, cada uno dirigido contra un epítipo diferente específico de enfermedad de Parkinson. En regímenes alternativos, la dosificación es una vez por semana, dos veces por semana, tres veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez al mes. En otro régimen, la dosificación varía dependiendo del estado fisiológico del sujeto y de la respuesta del sujeto al tratamiento.

25 Los pacientes se controlan para indicaciones de ralentización o detención de la agregación de SOD y la progresión de la enfermedad. La administración de un anticuerpo humanizado dirigido contra un epítipo específico de enfermedad de Parkinson ralentiza la progresión de la enfermedad de Parkinson en los pacientes. La ralentización o detención de la agregación de SOD1 o la anulación de la progresión de la enfermedad sucede para anticuerpos
30 terapéuticamente activos.

Ejemplo 43

Reproducción de los modelos de ratón de ALS G93A y G37R

35 Se cruzaron animales G93A y G37R macho hemicigóticos fundadores con ratones hembra de tipo silvestre de la misma cepa de fondo (C57BL/6). Las hembras no se cruzaron más de 6 veces. Los machos G93A heterocigóticos se retiraron como reproductores a los 3 meses de edad, los ratones G37R heterocigóticos se retiraron como reproductores a los 6 meses de edad.

40 Quince ratones macho G93A (o G37R) hemicigóticos y 30 ratones hembra C57BL/6 formaron 15 tríos de reproducción. Dos ratones hembra se alojaron inicialmente juntas, y se les indujo el celo exponiendo las hembras al lecho sucio de su compañero (efecto Whitten). Al siguiente día, las hembras se introdujeron en las jaulas de los machos (2 hembras por macho). Las hembras se comprobaron cada mañana para los taponos.

45 La descendencia se identificó con perforación en la oreja a las 3 semanas de edad, y el tejido perforado se usó para genotipado y para determinar el número de copias del transgén. Si las perforaciones en la oreja no proporcionaban suficiente material para el genotipado y ensayo para el número de copias del transgén, se realizaba entonces un recorte de la cola.

50 El destete tuvo lugar cuando la descendencia era de 3 semanas de edad, y los ratones hemicigóticos se asignaron aleatoriamente a grupos de tratamiento experimentales. Después del destete, los animales se mantuvieron 4 por jaula.

55 Se usó un programa de reproducción similar para ambas cepas, con ajustes apropiados para la supervivencia de los animales hemicigóticos que desarrollaban fenotipos de enfermedad (supervivencia de G93A - 145 días, supervivencia de G37R - 335 días).

60 Los ratones heterocigóticos G93A desarrollaban debilidad predominantes en las extremidades posteriores en aproximadamente 100 días de edad. La debilidad progresaba hasta un punto de parálisis de las extremidades posteriores, y los animales no eran capaces de alimentarse o de beber (es decir, incapaces de alcanzar su alimento y el agua). Este punto se observó en aproximadamente 145 días. En este punto, los animales se sacrificaron por eutanasia. Los animales se sacrificaron por eutanasia de forma prematura si el peso corporal disminuía en un 20 % o si presentaban otros signos de morbilidad grave.

65

El transgén G37R causaba signos clínicos similares que al transgén G93A, sin embargo, la edad de aparición de la debilidad en los heterocigotos era de aproximadamente 300 días, punto desde el cual la debilidad progresaba hasta parálisis de las extremidades posteriores. Los puntos finales fueron los mismos que para los ratones G93A, sin embargo, los puntos finales habitualmente se cumplieron en aproximadamente 335 días en el transgénico G37R (línea 29).

Los ratones reproductores se pesaron semanalmente y se sacrificaron por eutanasia si perdían el 15 % o más de su peso corporal. Sin embargo, una pérdida de peso menor del 15 % combinada con otros signos de morbilidad grave, es decir, arrugamiento de la piel, aspecto encorvado, deshidratación obvia, etc., se consideraron un punto final humanitario para estos animales.

Ejemplo 44

Desarrollo de modelos de propagación de ALS

En ALS, como en enfermedad por priones, la muerte neuronal se "propaga" por todo el neuroeje, implicando un mecanismo patológico para la propagación del proceso patológico de una célula a otra. Se desarrolla un modelo de propagación del mal plegamiento de SOD1 en sistemas sin células, en ensayos celulares *in vitro* y en animales basados en sistemas modelo similares en enfermedad de priones. Estos modelos proporcionan sistemas más "relevantes para la enfermedad" para ensayar inmunoterapias, y evitarán los potenciales resultados falsos negativos y falsos positivos de los modelos actuales.

Los depósitos biológicos de las líneas celulares de hibridomas se hicieron de acuerdo con el Tratado de Budapest y están disponibles en la International Depository Authority of Canada 1015 Arlington Street, Winnipeg, Canadá R3E 3R2.

Citas completas para referencias mencionadas en la memoria descriptiva

1. Urushitani M, Sik A, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Julien JP. Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci*. Enero de 2006;9(1):108-18.
2. Turner BJ, Atkin JD, Farg MA, Zang da W, Rembach A, Lopes EC, Patch JD, Hill AF, Cheema SS Impaired extracellular secretion of mutant superoxide dismutase 1 associates with neurotoxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis *J Neurosci*. 5 de enero de 2005;25(1):108-17.
3. Cashman NR, Griffin JK, Zou W-Q, Allele-selective recruitment and disease progression in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 2002.
4. Cashman NR y Caughey B. Prion diseases--close to effective therapy? *Nature Reviews in Drug Discovery*. Octubre de 2004;3(10):874-84.
5. Rakhit R, Robertson J, Vande Velde C, Horne P, Ruth DM, Griffin J, Cleveland DW, Cashman NR, Chakrabarty A. An immunological epitopespecific for pathological monomer/misfolded SOD1 in ALS. *Nature Medicine*, 2007 (en impresión)
6. Paramithiotis E, Pinard M, Lawton T, LaBoissiere S, Leathers VL, Zou W-Q, Estey LA., Kondejewski LH, Francoeur GP, Papadopoulos M, Haghghat A, Spatz SJ, Tonelli Q, Ledebur HC, Chakrabarty A, Cashman NR. A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation. *Nature Medicine* 9:893-9, 2003.
7. Lehto, M. T., Ashman, D. A. y Cashman, N. R. Treatment of ScN2a cells with prion-specific YYR antibodies. *Proc. First Intl Conf. Network Excellence: Neuroprion* (París, 2004).
8. Khare et al., *PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics*, 61:617-632 (2005).
9. Thompson, JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994, *Nucleic Acids Res*. 22(22): 4673-4680.
10. Henikoff S. y Henikoff J.G., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919.
11. Needleman y Wunsch. *J. Mol. Biol.*, 1970, 48:443.
12. Smith y Waterman. *Adv. Appl. Math.* 1981,2:482.
13. Carillo y Lipton *SIAM J. Applied Math.* 1988, 48:1073.
14. *Computational Molecular Biology*, Lesk, e.d. Oxford University Press, Nueva York, 1988, *Biocomputing: Informatics and Genomics Projects*.

15. Devereux et al., *Nucleic Acids Res.*, 1984, 12:387.
16. Altschul et al., *J. Molec. Biol.*, 1990: 215:403.
- 5 17. Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 20^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., EE. UU., 2000.
18. Merrifield, *J. Am. Chem. Assoc.* 85:2149-2154 (1964).
19. Houbenweyl, *Methods of Organic Chemistry*, ed. E. Wansch, Vol. 15, pts. I y II, Thieme, Stuttgart (1987).
- 10 20. Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA 1990.
21. Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a Edición, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989).
- 15 22. Chang et al., *Nature* 275:615 (1978).
23. Nichols y Yanofsky, *Meth. in Enzymology* 101:155, 1983.
- 20 24. Russell et al., *Gene* 20: 231, 1982.
25. Bolivar et al., *Gene* 2:9S, 1977.
26. Messing, *Meth in Enzymology* 101:20-77, 1983.
- 25 27. Vieira y Messing, *Gene* 19:259-268 (1982).
28. Amann et al., *Gene* 69:301-315 (1988).
- 30 29. Studier et al., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California, 60-89 (1990).
30. Baldari et al., *Embo J.* 6:229-234 (1987).
- 35 31. Kurjan y Herskowitz, *Cell* 30:933-943 (1982).
32. Schultz et al., *Gene* 54:113-123 (1987).
- 40 33. Hinnen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929 (1978).
34. Itoh et al., *J. Bacteriology* 153:163 (1983).
35. Cullen et al. *Bio/Technology* 5:369 (1987).
- 45 36. Seed, B., *Nature* 329:840 (1987).
37. Kaufman et al., *EMBO J.* 6:187-195 (1987).
- 50 38. Sinkar et al., *J. Biosci (Bangalore)* 11:47-58 (1987).
39. Zambryski et al., *Genetic Engineering, Principles and Methods*, Hollaender and Setlow (eds.), Vol. VI, pág. 253-278, Plenum Press, Nueva York (1984).
- 55 40. Smith et al., *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165 (1983).
41. Lucklow, V.A., y Summers, M.D., *Virology* 170:31-39 (1989).
42. Kohler y Milstein *Nature* 256:495-497 (1975).
- 60 43. Kozbor et al., *Immunol. Today* 4:72 (1983).
44. Cole et al., *Methods Enzymol*, 121:140-67 (1986).
- 65 45. Huse et al., *Science* 246:1275 (1989).
46. Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989).

47. McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990).
48. Dobson CM. (2004) Experimental investigation of protein folding and misfolding. *Methods*. 34(1):4-14. Revisión.
- 5 49. Prusiner SB. (2001) Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions. *N Engl J Med*. 344:1516-26.
50. Selkoe DJ, Schenk D. (2003) Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 43:545-84.
- 10 51. St George-Hyslop PH, Petit A. (2005) Molecular biology and genetics of Alzheimer's disease. *C R Biol*. 328(2):119-30.
52. Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM. (2003) Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci*. 6:345-51.
- 15 53. Mehta PD, Pirttila T, Mehta SP. (2000) Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid beta proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 57:100-5.
- 20 54. Clark CM, Xie S, Chittams J et al. (2003) Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid: how well do these biomarkers reflect autopsy-confirmed dementia diagnoses? *Arch Neurol*. 60:1696-702.
55. Green AJ. (2002) Cerebrospinal fluid brain-derived proteins in the diagnosis of Alzheimer's disease and Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 28:427-40.
- 25 56. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P. (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*. 400(6740): 173-7.
- 30 57. Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC, Eisner L, Kirby L, Rovira MB, Forette F, Orgogozo JM; AN1792(QS-21)-201 Study Team. (2005) Clinical effects of Abeta immunization (AN 1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology*. 64(9):1553-62.
- 35 58. Fox NC, Black RS, Gilman S, Rossor MN, Griffith SG, Jenkins L, Koller M; AN1792(QS-21)-201 Study Team. (2005) Effects of Abeta immunization (AN1792) on MRI measures of cerebral volume in Alzheimer disease. *Neurology*. 64(9):1563-72.
- 40 59. Olanow CW. (2004) The scientific basis for the current treatment of Parkinson's disease. *Annu Rev Med* 55:41-60.
60. Iwatsubo T. (2003) Aggregation of alpha-synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurol* 250 Supl 3:11111-4.
- 45 61. Eriksen JL, Dawson TM, Dickson DW, Petrucelli L. (2003) Caught in the act: alpha-synuclein is the culprit in Parkinson's disease. *Neuron* 40:453-6.
62. McKeith I, Mintzer J, Aarsland D et al. (2004) Dementia with Lewy bodies. *Lancet Neurol* 3:19-28.
- 50 63. Masliah E, Rockenstein E, Adame A, Alford M, Crews L, Hashimoto M, Seubert P, Lee M, Goldstein J, Chilcote T, Games D, Schenk D. (2005) Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron*. 46(6):857-68.
64. Choi J, Rees HD, Weintraub ST, et al. (2005) Oxidative modifications and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson diseases. *J. Bio. Chem.*; 280(12): 11648-11655.
- 55 65. Janus, C. et al. (2000) *Nature* 408:979-982.
66. Janus, C. (2000) *Neurobiology of Aging* 21: 541-549.
- 60 67. Gass, P. et al. (1998) *Learn Mem*. 5:274-288.
68. Wehner, J. M. (1990) *Brain Research* 523: 181-187).
- 65 69. Masliah, E. et al. (2000) *Science* 287:1265-1269.

70. Masliah, E. et al. (2005) *Neuron* 46:857-868.

71. Kaye, R. et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300, 486-9 (2003).

5 72. Deng, H. X. et al. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* 261, 1047-51 (1993).

10 73. Andersen PM. Genetics of sporadic ALS. *Amyotroph Lateral Schler Other Motor Neuron Disord. Supl1:S37-41* (2001).

74. Trojanowski et al 2000 *Ann NY Acad Sci* 924:62-7.

75. Calne et al 1989; *Can J Neurol Sci* 16:547-50.

15 76. Shaw et al., 2002. *Cell Mol Bioll* 48:127-36.

77. Olivieri et al 2001. *J Neurochem* 76:224-33.

20 78. Shimohama et al 1999. *Rinsho Shinkeigaku* 39:4-6.

79. Keller et al 1998. *Rev Neurosci* 9:105-16.

80. Simonian et al 1996. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:83-106.

25 81. Imam et al 2001. *Ann NY Acad Sci* 939:366-80).

82. Lazoura, E y Apostolopoulos, V. Rational Peptide-based vaccine design for cancer immunotherapeutic applications *Curr Med Chem.* (2005) 12:629-39.

30 83. Hensley K, Carney JM, Mattson MP, Aksenova M, Harris M, Wu JF, Floyd RA, Butterfield DA. A model for b-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: Relevance to Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3270-3274 (1994).

35 84. Elam JS, Taylor AB, Strange R, Antonyuk S, Doucette PA, Rodriguez JA, Hasnain SS, Hayward LJ, Valentine JS, Yeates TO, Hart PJ *Nat Struct Biol* (2003) 10:461-7.

85. Kolaskar, AS y Tongaonkar PC, *FEBS Lett.* (1990) 276:172-4

40 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Amorfix Life Sciences Ltd University Health Network

<120> Métodos y Composiciones para Tratar y Detectar Enfermedades Mediadas por SOD1 Mal Plegada

45 <130> 1.10.98336/04

<150> US 60/798.727

50 <151> 09-05-2006

<150> US 60/798.728

<151> 09-05-2006

<150> US 60/778.379

55 <151> 03-03-2006

<150> US 11/367.609

<151> 03-03-2006

60 <150> US 11/565.967

<151> 01-12-2006

<160> 31

65 <170> PatentIn versión 3.3

ES 2 608 002 T3

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5
<400> 1

Arg Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile
1 5

10
<210> 2
<211> 18
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15
<400> 2

Asp Leu Gly Lys Gly Gly Asn Glu Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn Ala
1 5 10 15

Gly Ser

20
<210> 3
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25
<400> 3

Asn Pro Leu Ser Arg Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu
1 5 10

30
<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35
<400> 4

Lys Ala Val Cys Val Leu Lys
1 5

40
<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45
<400> 5

Ile Lys Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe
1 5 10

50
<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

ES 2 608 002 T3

His Cys Ile Ile Gly Arg Thr Leu Val Val His
 1 5 10

5 <210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 7

Gly Leu His Gly phe His Val His
 1 5

10 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Cisteína oxidada a ácido cisteico
 20 <400> 8

Arg Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile
 1 5

25 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 9

Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile
 1 5

35 <210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

45 <400> 10

Gly Gly Arg Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Gly Gly Lys Gly
 1 5 10

50 <210> 11
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 55 <400> 11

ES 2 608 002 T3

Cys Asp Leu Gly Lys Gly Gly Asn Glu Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn
1 5 10 15

Ala Gly Ser

5 <210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

10 Cys Asn Pro Leu Ser Arg Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu
1 5 10 15

15 <210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Cisteína oxidada a ácido cisteico

<400> 13

Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile
1 5

25 <210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 14

Cys Ile Lys Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe
1 5 10

35 <210> 15
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Cisteína oxidada a ácido cisteico

45 <400> 15

Cys Gly Gly Gly Arg Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile Gly Ser Gly
1 5 10 15

50 <210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 608 002 T3

<400> 16

Gly Ser Gly Lys Ala Val Cys Leu Lys
 1 5

5 <210> 17
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 17

Met Ala Thr Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln
 1 5 10 15

Gly Ile Ile Asn Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val
 20 25 30

Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Val
 35 40 45

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

Phe Asn Pro Leu Ser Arg Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu Arg
 65 70 75 80

His Val Gly Asp Leu Gly Asn Val Thr Ala Asp Lys Asp Gly Val Ala
 85 90 95

Asp Val Ser Ile Glu Asp Ser Val Ile Ser Leu Ser Gly Asp His Cys
 100 105 110

Ile Ile Gly Arg Thr Leu Val Val His Glu Lys Ala Asp Asp Leu Gly
 115 120 125

Lys Gly Gly Asn Glu Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn Ala Gly Ser Arg
 130 135 140

Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile Ala Gln
 145 150

15 <210> 18
 <211> 981
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 18

ES 2 608 002 T3

gtttggggcc agagtgggcg aggcgcggag gtctggccta taaagtagtc gcggagacgg 60
 ggtgctgggt tgcgtcgtag tctcctgcag cgtctggggt ttccgttgca gtcctcggaa 120
 ccaggacctc ggcgtggcct agcgagttat ggcgacgaag gccgtgtgcg tgctgaaggg 180
 cgacggccca gtgcagggca tcatcaattht cgagcagaag gaaagtaatg gaccagtгаа 240
 ggtgtgggga agcattaaag gactgactga aggcctgcat ggattccatg ttcatgagtt 300
 tggagataat acagcaggct gtaccagtgc aggtcctcac tttaatcctc tatccagaaa 360
 acacgggtggg ccaaaggatg aagagaggca tgttgggagac ttgggcaatg tgactgctga 420
 caaagatggt gtggccgatg tgtctattga agattctgtg atctcactct caggagacca 480
 ttgcatcatt ggccgcacac tgggtgtcca tgaaaaagca gatgacttgg gcaaagggtgg 540
 aatgaagaa agtacaaaга caggaaacgc tggaagtcgt ttggcttgtg gtgtaattgg 600
 gatgcccгаа taaacattcc cttggatgta gtctgaggcc ccttaactca tctgttatcc 660
 tgctagctgt agaaatgtat cctgataaac attaaact gtaatcttaa aagtgtaatt 720
 gtgtgacttt ttcagagttg ctttaaagta cctgtagtga gaaactgatt tatgatcact 780
 tggagatttt gtatagtttt ataaaactca gttaaatgt ctgtttcaat gacctgtatt 840
 ttgccagact taaatcacag atgggtatta aacttgtcag aatttctttg tcattcaagc 900
 ctgtgaataa aaaccctgta tggcacttat tatgaggcta ttaaaagaat ccaaattcaa 960
 actaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 981

5 <210> 19
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 19
 agguuagcuu gugguguuau agguaua 27

15 <210> 20
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 20
 gauuuaggua aaggugguaa ugaagaaagu acuaaaacug guaaugcugg uagu 54

20 <210> 21
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 21
 aauccuuuaa gucguaaaca cggaggaccg aaggacgagg ag 42

30 <210> 22
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 22
 auaaaagggga aaacagaagg acuccacggc uuu 33

35 <210> 23
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 608 002 T3

<400> 23
 cacuguaaua uuggcaggac ccucguuguu cac 33

5 <210> 24
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 24
 cguuuggcuu gugguguaau uggauc 27

15 <210> 25
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 25
 gcuuggug uauugggau c 21

25 <210> 26
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 26
 gacuuggca aagguggaaa ugaagaaagu acaaagacag gaaacgcugg aagu 54

35 <210> 27
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 27
 aauccucuau ccagaaaaca cggugggcca aaggaugaag ag 42

45 <210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 28
 aaggccgugu gcgugcugaa g 21

55 <210> 29
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

60 <400> 29
 auuaaaggac ugacugaagg ccugcaugga uuc 33

65 <210> 30
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 30
 cauugcauca uggccgcac acuggugguc cau 33

60 <210> 31
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

65 <400> 31
 ggccugcaug gauuccaugu ucau 24

REIVINDICACIONES

1. Una composición adecuada para tratar la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), comprendiendo dicha composición un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente seleccionado de:
- 5 (1) un anticuerpo exógeno o un fragmento del mismo que se une selectivamente a un epítipo que consiste en:
- (a) IKGLTEGLHGF [DSE5];
 (b) GLHGFHVH [DSE7]; o
 10 (c) un análogo que consiste en IKGLTEGLHGF [DSE5] o GLHGFHVH [DSE7], comprendiendo el análogo una modificación de un aminoácido por oxidación o nitración; y
- (2) un inmunógeno que comprende un péptido de menos de 20 restos de SOD1 que comprende:
- 15 a) IKGLTEGLHGF [DSE5]; o
 b) GLHGFHVH [DSE7]; o
 c) un análogo de a) o b), comprendiendo el análogo una modificación de un aminoácido por oxidación o nitración.
- 20 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el agente es un anticuerpo monoclonal, policlonal, quimérico o humanizado.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el agente es dicho inmunógeno.
- 25 4. Un anticuerpo aislado que se une selectivamente a un epítipo que consiste en:
- a) IKGLTEGLHGF [DSE5] o GLHGFHVH [DSE7]; o
 b) un análogo que consiste en IKGLTEGLHGF [DSE5] o GLHGFHVH [DSE7], comprendiendo el análogo una modificación de un aminoácido por oxidación o nitración.
- 30 5. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el anticuerpo se produce por el hibridoma denominado 5C6 depositado con el número de acceso 280207-01 en la International Depository Authority of Canada.
- 35 6. Un inmunógeno que comprende un péptido de menos de 20 restos de SOD1 que comprende:
- a) IKGLTEGLHGF [DSE5] o GLHGFHVH [DSE7]; o
 b) un análogo que consiste en IKGLTEGLHGF [DSE5] o GLHGFHVH [DSE7], comprendiendo el análogo una modificación de un aminoácido por oxidación o nitración.
- 40 7. El inmunógeno de la reivindicación 6, o la composición de la reivindicación 1 o de la reivindicación 3, en el que dicho inmunógeno comprende adicionalmente una molécula que potencia la inmunogenicidad preferiblemente en el que la molécula es hemocianina de lapa californiana.
- 45 8. La composición, el anticuerpo aislado o el inmunógeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el epítipo o péptido consiste en:
- a) IKGLTEGLHGF [DSE5]; o
 b) un análogo que consiste en IKGLTEGLHGF [DSE5], comprendiendo el análogo una modificación de un aminoácido por oxidación o nitración.
- 50 9. La composición, el anticuerpo aislado o el inmunógeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicho epítipo o péptido consiste en:
- a) GLHGFHVH [DSE7]; o
 55 b) un análogo que consiste en GLHGFHVH [DSE7], comprendiendo el análogo una modificación de un aminoácido por oxidación o nitración.
- 60 10. La composición, el anticuerpo aislado o el inmunógeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ALS).
- 65 11. La composición, el anticuerpo aislado o el inmunógeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la ALS es ALS familiar.
12. La composición, el anticuerpo aislado o el inmunógeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la ALS es ALS esporádica.

13. Un método para obtener un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende cultivar dicho hibridoma y aislar dicho anticuerpo.

5 14. El hibridoma denominado 5C6 depositado con el número de acceso 280207-01 en la International Depository Authority of Canada.

15. Un kit para diagnosticar a un sujeto que tiene esclerosis lateral amiotrófica (ALS), comprendiendo dicho kit un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 4, 5, 8 o 9 e instrucciones para su uso.

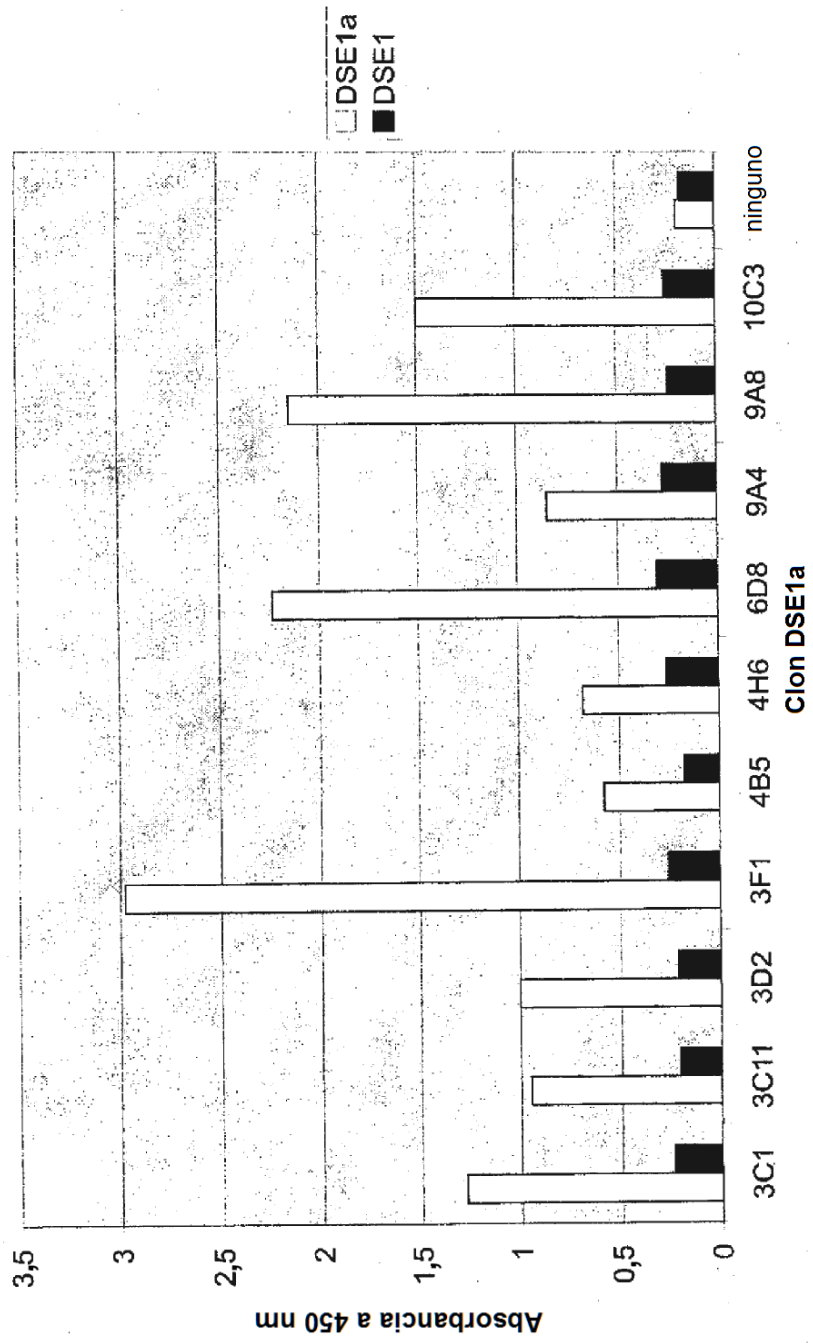


Figura 1

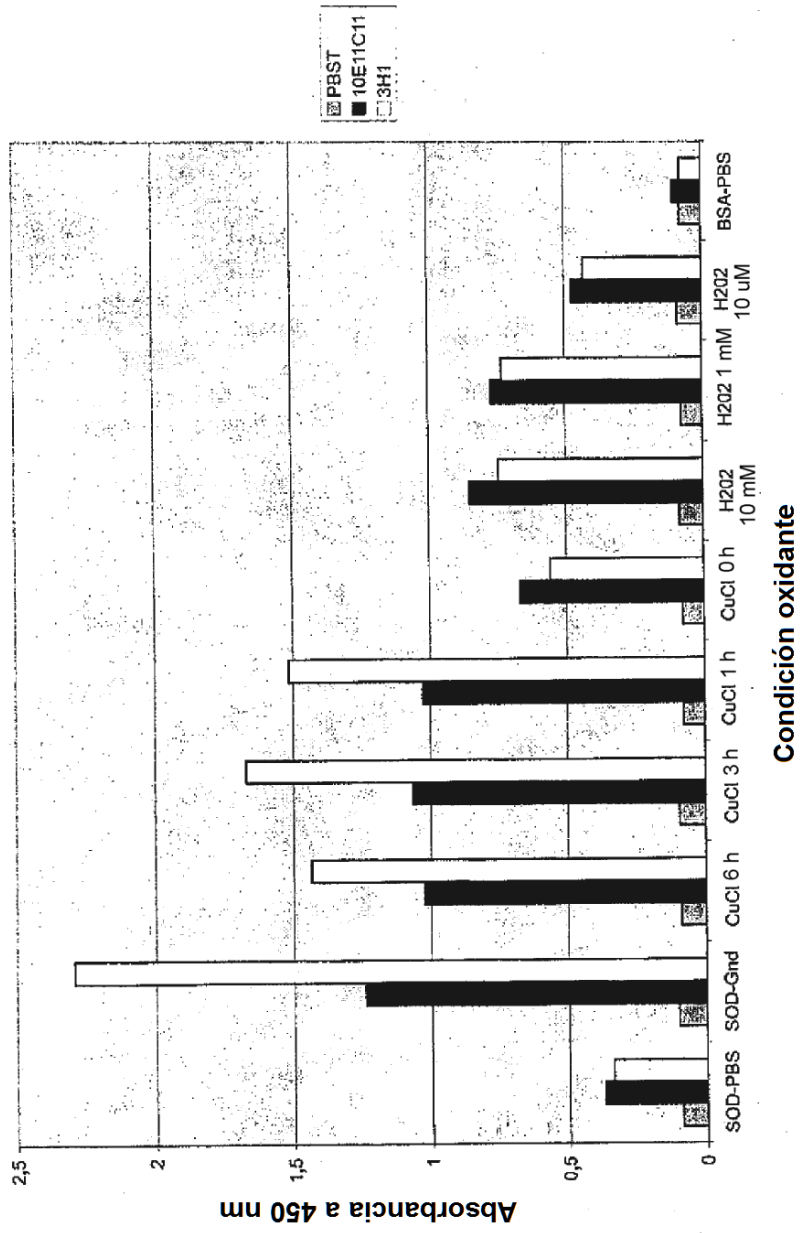


Figura 2

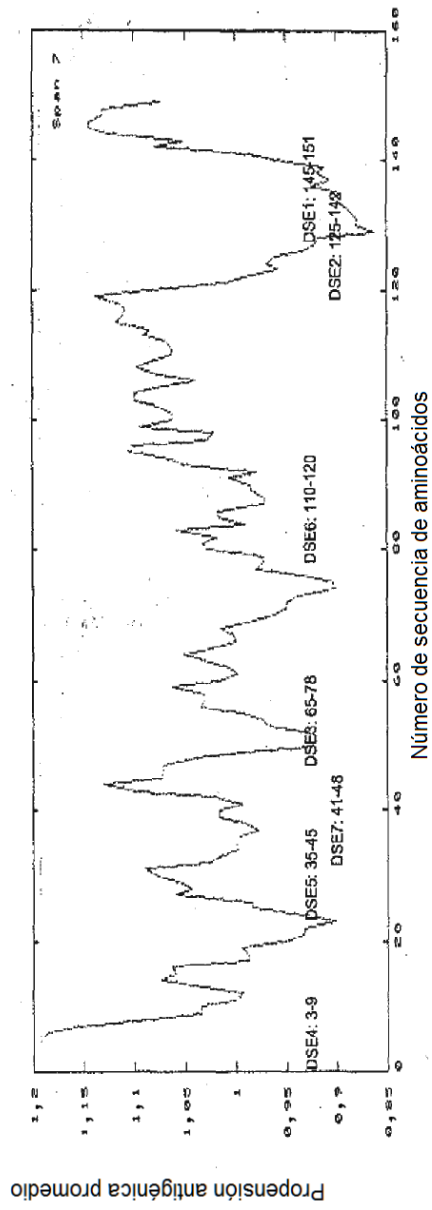
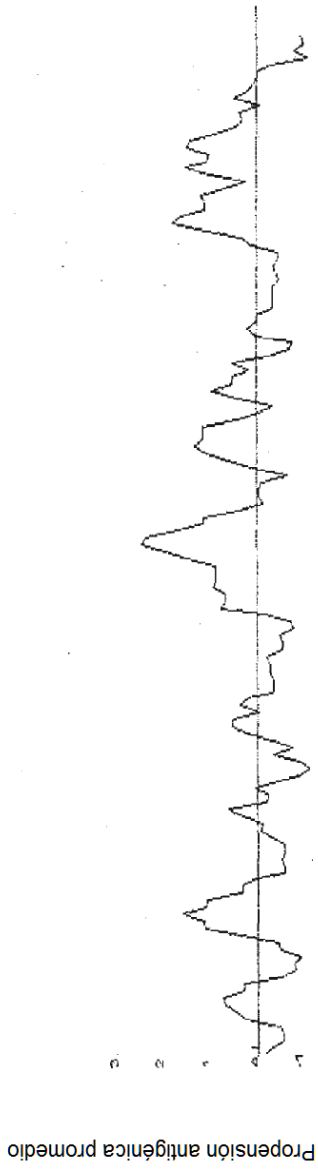


Figura 3

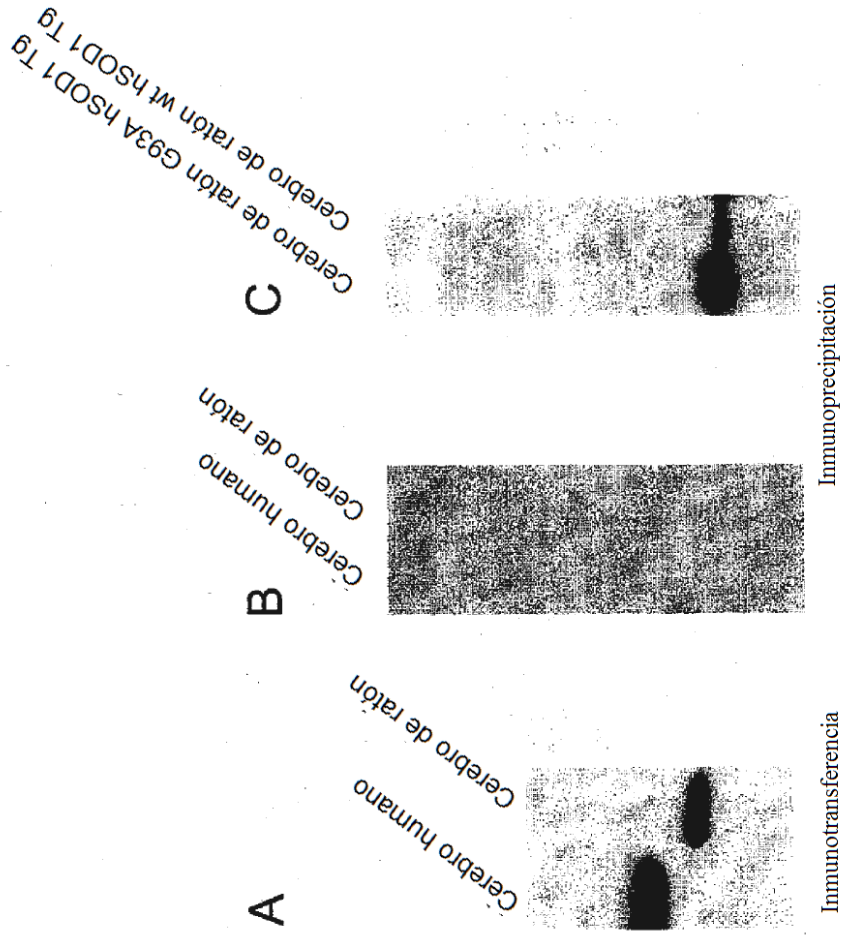
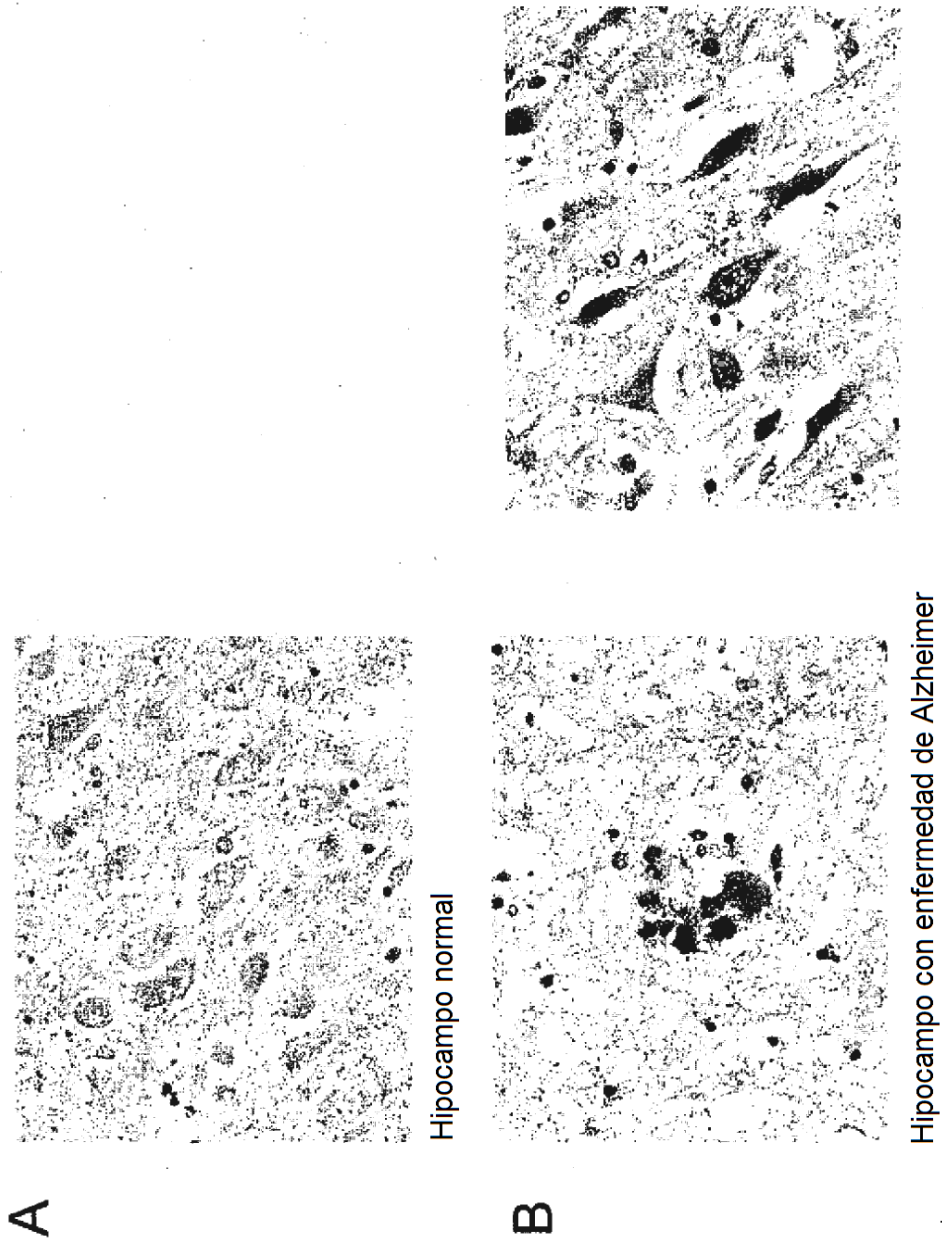


Figura 4



Hipocampo normal

Hipocampo con enfermedad de Alzheimer

Figura 5

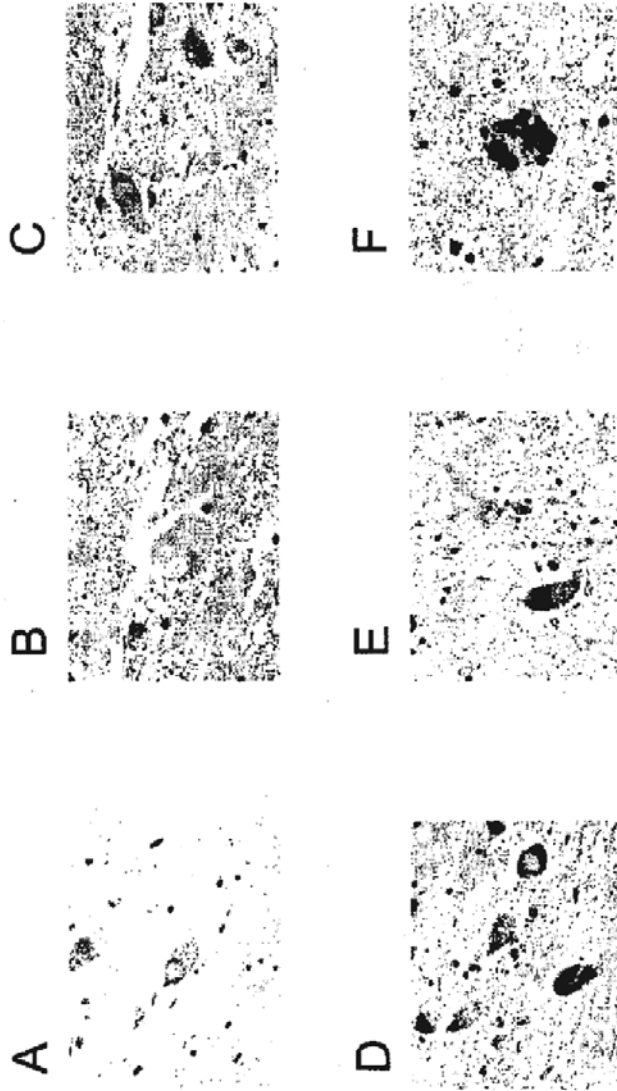


Figura 6