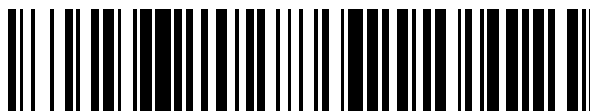


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 346**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2012** **PCT/GB2012/000434**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012** **WO12156666**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2012** **E 12726160 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016** **EP 2709660**

54 Título: **Anticuerpos contra la proteína priónica para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

18.05.2011 GB 201108490

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.05.2017

73 Titular/es:

D-GEN LIMITED (100.0%)
Box 118 Institute of Neurology, National Hospital
for Neurology & Neurosurgery, Queen Square
London WC1N 3BG, GB

72 Inventor/es:

COLLINGE, JOHN y
NICOLL, ANDREW J.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 611 346 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra la proteína priónica para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a las aplicaciones de ligandos que se fijan a una región específica de la proteína priónica (PrP) para el tratamiento de la toxicidad relacionada con la fijación del amiloide β oligomérico a la PrP y las afecciones médicas en las que interviene.

Antecedentes de la invención

- 10 La proteína priónica es una proteína bien caracterizada y estudiada. La proteína priónica (PrP) principal también se conoce como CD230 (grupo de diferenciación 230) es una proteína que está codificada en los humanos por el gen *PRNP* (por Proteína PRIónica). La proteína priónica principal se expresa en el cerebro y en otros tejidos diferentes. El gen *PRNP* de humano está localizado en el brazo corto (p) del cromosoma 20, entre el borde (extremo) del brazo y la posición 12, desde el par de bases 4.615.068 al par de bases 4.630.233. Se han identificado más de 20 mutaciones en el gen *PRNP* en las personas con enfermedades priónicas heredadas, que incluyen la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker y el insomnio familiar mortal.

- 15 La hélice 1 es una hélice α bien caracterizada dentro de la estructura de la forma PrP^C de la proteína priónica (forma celular/corriente de la proteína priónica). Se conocen los ligandos que se fijan a la hélice 1 de la PrP^C, por ejemplo, el anticuerpo ICSM-18, tal y como se describe en la solicitud de patente internacional WO2004/050120 y que comercializa D-Gen Limited, GB.

- 20 Las formas no fibrilares y solubles del amiloide β (A β) se ha visto que están implicadas en, y correlacionadas con, la progresión de la enfermedad en los modelos animales de la enfermedad de Alzheimer (EA) y en los pacientes con EA⁹. Se sabe que las concentraciones nanomolares bajas del A β sintético alteran la plasticidad sináptica *in vivo* e *in vitro*, pero sigue sin estar clara la conformación y el tamaño de las especies de A β responsables de la alteración¹⁰⁻¹³. Se ha descrito que la proteína priónica (PrP^C) puede actuar como un receptor celular para una preparación de A β sintéticos que se denomina ligandos difundibles derivados de A β (ADDL) y que la PrP^C es necesaria para la alteración de la plasticidad sináptica mediada por los ADDL¹. Se ha descrito la afinidad nanomolar de la fijación^{3,4,14} y que un único anticuerpo monoclonal anti-PrP con un epítipo en torno a los restos 95 a 105 bloqueaba la fijación de los ADDL y la toxicidad¹. En otros estudios, la genosupresión constitutiva de la expresión de la PrP^C revirtió varios fenotipos patológicos en un modelo murino de EA² al igual que lo hizo el tratamiento periférico del mismo modelo de ratón con un anticuerpo anti-PrP¹⁵. El trabajo previo, tal y como se describe en la solicitud de patente internacional WO2008/13034, se ha concentrado en el sitio donde los ADDL se fijan a la PrP^C, que se encuentra en los restos aminoácidos 95 a 105 de la PrP.

- 35 Tal fijación es de considerable importancia dado que se está investigando mucho sobre la acción selectiva sobre la PrP^C para los tratamientos contra las enfermedades priónicas¹⁶. En particular, la eliminación de la expresión neuronal de PrP en el sistema nervioso murino adulto no tiene consecuencias graves^{17,18} y se han estudiado ampliamente tanto los tratamientos con moléculas pequeñas¹⁶ como con anticuerpos monoclonales⁶. De hecho, se han caracterizado las interacciones moleculares terapéuticas con PrP^C y se han producido anticuerpos monoclonales anti-PrP totalmente humanizados para los estudios clínicos sobre la enfermedad priónica de humanos^{8,19}.

- 40 En la técnica anterior se ha actuado selectivamente sobre el sitio de fijación de la PrP a los ADDL mediante el uso de los materiales disponibles.

La presente invención busca solventar cualquier problema relacionado con la técnica anterior.

Compendio de la invención

- 45 El foco en la técnica ha estado sobre el sitio de fijación de la PrP a los ADDL. Esta es la sección de la molécula de PrP que se cree que interacciona con los ADDL. Por lo tanto, ha sido del máximo interés en el campo de la técnica. El sitio de fijación sobre la PrP se caracteriza por estar en los aminoácidos 95 a 105 de la PrP. El bloqueo de este sitio de la PrP bloquea la interacción con los ADDL y mejora la fijación.

A diferencia de la técnica anterior, los presentes inventores han actuado selectivamente sobre una parte diferente de la molécula de PrP. Los presentes inventores han actuado selectivamente sobre la región de 131 a 153 de la PrP. Esto incluye la región de la hélice 1 de la PrP.

- 50 Es sorprendente que resulte eficaz la acción selectiva sobre esta región. Primero, esta región está apartada del sitio de fijación establecido de PrP a los ADDL. Así pues, no se esperaría que fuera eficaz a la hora de interferir con la fijación a los ADDL.

Segundo, esta región se encuentra en un sitio espacial muy diferente en comparación con el sitio de fijación a los

ADDL. De hecho, esta región está situada en el lado opuesto de la molécula tridimensional de la PrP. Así pues, el sitio no sólo está separado en términos de restos aminoacídicos, sino que también está separado en el espacio tridimensional.

5 Por lo tanto, se puede observar que la presente invención proporciona un modo alternativo de alterar la fijación ADDL-PrP con diferentes características que lo realizado en la técnica y los métodos anteriores. Además, es en sí mismo sorprendente que funcione, ya que actúa selectivamente sobre una parte completamente diferente de la molécula lejos del sitio establecido para la fijación de los ADDL.

10 Así pues, en un aspecto, la invención da a conocer un ligando capaz de fijarse establemente a la PrP en un sitio entre los restos aminoacídicos 131 a 153 de PrP, para ser usado en el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer, en donde dicho ligando es un anticuerpo, scFv, Fab u otro fragmento de fijación a antígeno del mismo.

Idóneamente, dicho ligando es para ser usado como se describe más arriba para el tratamiento o la prevención de la toxicidad de los oligómeros de A β en la enfermedad de Alzheimer, en donde dicho ligando es un anticuerpo, scFv, Fab u otro fragmento de fijación a antígeno del mismo.

15 Idóneamente, dicho ligando es para ser usado como se describe más arriba para el tratamiento o la prevención del deterioro de la plasticidad sináptica en la enfermedad de Alzheimer, en donde dicho ligando es un anticuerpo, scFv, Fab u otro fragmento de fijación a antígeno del mismo.

Idóneamente, dicho ligando se fija a la PrP en un sitio dentro de los restos aminoacídicos 131 a 153 de la PrP con un valor de afinidad de 100 nM o menor.

Idóneamente, los restos aminoacídicos 131 a 153 de la PrP tienen la secuencia GSAMSRPIIHFGSDYEDRYREN.

20 Idóneamente, dicho ligando comprende un anticuerpo, scFv, Fab u otro fragmento de fijación a antígeno del mismo que tiene al menos las secuencias determinantes de complementariedad (CDR) de las figuras 11 y 12.

Idóneamente, dicho ligando es un anticuerpo, scFv, Fab u otro fragmento de fijación a antígeno del mismo.

Idóneamente, dicho ligando comprende el anticuerpo ICSM-18.

Breve descripción de las figuras

25 Figura 1: Caracterización biofísica de las especies de A β presentes en la preparación de bADDL.

a: Cromatografía de exclusión por tamaños de dos lotes diferentes de ADDL y bADDL recién preparados que se eluyen en PBS, donde se muestra la proporción de A β oligomérico (izquierda) por monomérico (centro), así como el pico del tampón (derecha). b: Ultracentrifugación analítica de velocidad de los bADDL recién preparados en el medio F12 de Ham según se detectó por absorbancia a 280 nm y se representó mediante c(s), la distribución del coeficiente de sedimentación. Los componentes monoméricos (masa molecular calculada de 5.000 a 6.000) y oligoméricos (masa molecular calculada de 90.000 a 400.000) se han coloreado de azul y rojo, respectivamente. c: Microfotografía electrónica de transmisión teñida negativamente de (i) los bADDL y (ii) los ADDL, donde se muestra una mezcla de estructuras globulares y variloides de menos de 100 nm de longitud. La barra de escala mide 50 nm. d: SDS-PAGE de preparaciones de ADDL analizadas mediante (i) tinción con plata para estimar la cantidad de A β soluble presente en 3 preparaciones de ADDL diferentes, y (ii) análisis por transferencia Western con el extremo amino del anticuerpo anti-A β , 6E10, para identificar las especies de A β poco abundantes y estables en SDS. Se examinaron dos concentraciones diferentes de cada muestra problema (10 μ M y 20 μ M para la tinción con plata, y 1 μ M y 2 μ M para la transferencia Western).

Figura 2: Perfil de la cromatografía de exclusión por tamaños (CET) de ADDL y de bADDL

40 Los ADDL y los bADDL (1 ml de la solución madre a 100 μ M) se cromatografiaron en una columna Superdex 75 (10/30 HR) y se eluyeron con LCRA a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min. Los péptidos se detectaron por absorbancia a 220 nm. Las preparaciones de ADDL/bADDL produjeron dos picos, uno que eluía en el volumen de vacío después de 8 ml y el otro que eluía después de 14 ml de una manera muy parecida al péptido recién disuelto (véase la figura 1b). Los ADDL y los bADDL eluidos en el medio F12 de Ham produjeron un perfil muy parecido al mostrado más arriba y en la figura 1b.

Figura 3: Microfotografía electrónica de transmisión por tinción negativa de los ADDL

a: Vehículo solo. b: Los ADDL contienen una mezcla de estructuras globulares y protofibrillas flexibles de menos de 100 nm de longitud. La barra de escala utilizada es de 100 nm.

50 Figura 4: Se necesita la PrP^C para que los bADDL y los extractos de cerebro humano que contienen A β inhiban la PLP.

Se grabaron los PPEc de la región CA1 del hipocampo en todos los casos. Los insertos muestran señales de PPEc de ejemplo antes de la estimulación con ondas θ (TB, del inglés *theta-burst*; el artefacto del estímulo se retiró para mayor claridad) y 1 h después de la misma. a: Los registros extracelulares de los ratones FVB muestran PLP estables medidas hasta una hora después de la estimulación con TB (cuadrados, $184 \pm 15\%$, $n = 7$). El tratamiento previo de los cortes con bADDLS durante 30 min antes de las TB causó una inhibición significativa de la PLP (círculos, $109 \pm 10\%$, $P < 0,01$, $n = 6$). b: La PLP se indujo de manera fiable en los cortes de ratones sin PrP tratados con el control de vehículo (cuadrados, $151 \pm 8\%$, $n = 6$). Es significativo que la perfusión de los cortes de ratones sin PrP con la misma preparación de bADDL utilizada en a no deterioró la PLP (círculos, $149 \pm 11\%$, $n = 5$, $P > 0,05$). c: El análisis por IP/transferencia Western de extractos de cerebro reveló la presencia de una gran cantidad del monómero de A β y de su dímero estable en SDS en una muestra tomada de un cerebro con EA y la ausencia completa de A β en un extracto de un sujeto de control sin demencia (Ctrl). Las estimaciones de la concentración de A β indican la presencia de 14 ng/ml de monómero y de 3,2 ng/ml de dímero estable en SDS. NS indica las bandas inmunorreactivas inespecíficas detectadas cuando se inmunoprecipitó únicamente la solución salina tamponada con Tris (TBS, por su nombre en inglés). Los marcadores de masa molecular están a la izquierda. M y D señalan el monómero de A β y su dímero estable en SDS. d: La perfusión de los cortes procedentes de ratones FVB de tipo silvestre con cerebro con EA durante 30 min antes de TB deterioró significativamente la PLP (círculos, $116 \pm 9\%$, $n = 6$) en comparación con los cortes perfundidos con el extracto de cerebros de control (cuadrados, $153 \pm 8\%$, $n = 6$, $P < 0,05$). En cambio, el tratamiento de los cortes procedentes de ratones PrP^{-/-} con extractos de cerebro con EA no logró alterar la PLP (triángulos, $164 \pm 10\%$, $n = 6$, $P > 0,05$). * se refiere a cuando se comenzó la perfusión de bADDL/extracto de cerebro con EA, y la flecha señala la aplicación de TB (4 pulsos @ 100 Hz administrados 10 veces con un intervalo de entre ráfagas de 200 ms). Los números sobre las muestras de PPE corresponden al tiempo durante el experimento del cual se originan. Todos los valores son media $\pm$ EEM. La barra de escala de los insertos señala 1 mV, 5 ms.

Figura 5: Los ADDL y los bADDL posiblemente inhiban la PLP del hipocampo

El tratamiento de ratones C57BL/6J con bADDL a 500 nM (triángulos, $94 \pm 13\%$, $n = 5$) y ADDL (círculos, $115 \pm 7\%$, $n = 6$) produjo una disminución significativa de la PLP en comparación con los controles (cuadrados, $154 \pm 6\%$, $n = 10$, $P < 0,01$). Los bADDL tienden a ocasionar una disminución más grande que los ADDL. Esta tendencia podría estar relacionada con el hecho de que las preparaciones de bADDL tendían a tener una mayor cantidad de especies de A β de masa molecular elevada que las de ADDL (figura 1b y figura 2). * señala la perfusión de ADDL/bADDL, la flecha señala la estimulación con ondas θ .

Figura 6: Los bADDL se fijan con avidez a la PrP de una manera que se puede bloquear con determinados anticuerpos anti-PrP

a: Las curvas de respuesta a la dosis de ADDL (cuadrados rellenos) y bADDL (círculos rellenos) con respecto a la PrP de completa unida a la placa muestran que ambas preparaciones se fijan a la PrP de humano con constantes de disociación aparentes de aproximadamente 100 nM. Los pocillos revestidos con SAB para control del ruido de fondo muestran que la interacción se hace inespecífica en el margen micromolar (verde claro para ADDL y rojo para bADDL). b: A la concentración nominal de A β de 100 nM, se fija una cantidad similar de bADDL a la huPrP₂₃₋₂₃₁ y a la huPrP₉₁₋₂₃₁, y se fija una cantidad basal a la huPrP₁₁₉₋₂₃₁, lo que sugiere la existencia de un sitio de fijación único en los restos 91 a 119. c: La competición que hacen diferentes construcciones de PrP por la fijación de los bADDL a la huPrP₂₃₋₂₃₁ fijada a la superficie muestra que la huPrP₂₃₋₂₃₁ se fija 100 veces más fuerte a los bADDL en la solución que la huPrP₉₁₋₂₃₁. d: La preincubación de la huPrP₂₃₋₂₃₁ fijada a la superficie con ICSM-35 bloquea la posterior fijación de los bADDL de una manera dependiente de la dosis, con una CI_{50} de $10,4 \pm 1,7 \mu M$. e: La criba del panel de anticuerpos de ICSM mediante un ensayo DELFIA® de alto rendimiento muestra que todos los anticuerpos que se fijan a la PrP bloquean la fijación de los bADDL, y que los que reconocen un epítipo en la región de 95 a 105 (cuadrados rellenos) inhiben más la fijación de los bADDL que los que reconocen un epítipo en la región de 131 a 153 (diamantes rellenos) o los que se fijan a la región estructurada (triángulos rellenos) o a epítipos sin definir (círculos rellenos). La huPrP₂₃₋₂₃₁ fijada a la superficie se incubó previamente durante 1 h con anticuerpos a 10 nM y a continuación se incubó durante 1 h con o sin los bADDL a 100 nM antes de la detección con estreptavidina Eu-N1 o con anticuerpo antirratón Eu-N1. f: (i) Modelo del complejo PrP:ICSM-18 basado en la estructura cristalizada publicada y en la que se ha destacado la extensión de anticuerpos construida con PrP y el epítipo de ICSM-18 (amarillo); (ii) estructura modelada de la interacción PrP:A β con esferoides de A β (verde), PrP (magenta), el epítipo de ICSM-18 (amarillo) y el epítipo sin estructura de ICSM-35 (rojo) incorporados, lo que destaca la enorme distancia entre el sitio de fijación de A β y el epítipo de ICSM-18. Todos los gráficos muestran la media $\pm$ desviación estándar y son una promedia de al menos tres datos puntuales.

Figura 7: Fijación de los bADDL a la huPrP₂₃₋₂₃₁ en presencia de diferentes concentraciones de EDTA

Esto demuestra que la interacción observada entre PrP y A β no está ocasionada por la coordinación de cobre a menos que la constante de disociación sea más fuerte que 10-22 M. La fijación se muestra con respecto a la fijación en ausencia de EDTA.

Figura 8: Cuando se administran solos, ni ICSM-35 ni ICSM-18 alteran la PLP

a: La estimulación condicionante con TB en los ratones C57/B6 tratados con ICSM-35 a 2 µg/ml (círculos) indujeron una PLP ($157 \pm 17\%$, $n = 4$) de una magnitud similar a la PLP inducida en los controles (cuadrados) ($153 \pm 7\%$, $n = 6$). b: De igual forma, la estimulación condicionante con TB en los ratones C57BL/6J tratados con ICSM-18 a 2 µg/ml (triángulos) indujeron una PLP ($150 \pm 13\%$, $n = 3$) que no era significativamente diferente de la PLP inducida en los controles (cuadrados) ($153 \pm 7\%$). c: Inyección i.c.v. de ICSM-18 (círculos) o de un anticuerpo de control de isotipo IgG1 (triángulos) (#, ambos a 30 µg en 10 µl) 30 min antes de la inyección del vehículo (*, 5 µl i.c.v.) no afectó significativamente la PLP inducida con EAF en la rata anestesiada ($131 \pm 9\%$ y $133 \pm 7\%$, respectivamente; $P > 0,05$ en comparación con los animales que recibieron dos inyecciones de vehículo (cuadrados), $136 \pm 12\%$, $n = 3$ por grupo, prueba de la *U* de Mann-Whitney). La flecha señala el momento de aplicación de la estimulación condicionante.

Figura 9: La inhibición de la PLP por los ADDL o el extracto de cerebro con EA que contiene Aβ se mejora con los anticuerpos anti-PrP^C ICSM-35 e ICSM-18.

a: La estimulación condicionante en los cortes de hipocampo de ratones C57/B6J tratados con la solución de vehículo indujo una PLP robusta (cuadrados negros, $152 \pm 7\%$, $n = 6$), mientras que el tratamiento previo (30 min) con los ADDL disminuyó significativamente la PLP (círculos rojos, $115 \pm 5\%$, $n = 8$, $P < 0,01$). En cambio, la perfusión de los cortes con el anticuerpo anti-PrP, ICSM-35 (que reconoce un epítipo entre los restos 93 y 102) (2 µg/ml), 20 min antes de la aplicación de los ADDL, impidió el deterioro de la PLP ocasionada por los ADDL (triángulos grises, $151 \pm 9\%$, $n = 6$, $P > 0,05$). b: Como en a, más arriba, pero se utilizó el ICSM-18 (que reconoce un epítipo entre los restos 143 y 153 de la PrP) en lugar del ICSM-35. Al igual que el ICSM-35, el ICSM-18 (triángulos grises, $157 \pm 9\%$, $n = 6$) mejoró completamente la actividad inhibidora de los ADDL ($P < 0,01$). # se refiere a la perfusión de ICSM-18/ICSM-35, * se refiere a la perfusión de los ADDL, la flecha señala la estimulación con TB. Recuadro de calibración: 1 mV, 5 ms, se retiró el artefacto del estímulo para mayor claridad. c: Los potenciales de campo sinápticos se registraron *in vivo* del área CA1 de las ratas Wistar macho anestesiadas. En las ratas en las que se inyectó el vehículo (#, primera inyección i.c.v. de 10 µl; *, segunda inyección de 5 µl, 30 min después), la estimulación de alta frecuencia (EAF) desencadenó una PLP persistente y estable (cuadrados negros, $136 \pm 7\%$ a las 3 h posteriores al tétanos, $n = 5$). En cambio, la inyección de 5 µl de extracto de cerebro que contiene Aβ 15 min antes de la EAF, en los animales en los que ya se había inyectado un anticuerpo de control de isotipo IgG1 (30 µg), inhibió significativamente la PLP (círculos rojos, $106 \pm 4\%$, $n = 5$, $P < 0,05$). Es importante señalar que la inyección del anticuerpo anti-PrP^C ICSM-18 30 min antes de la inyección de extracto en TBS de cerebro con EA que contiene Aβ (15 min antes de la EAF) impidió la inhibición de la PLP (triángulos grises, $136 \pm 5\%$, $n = 5$). Calibración: 2 mV, 10 ms. # se refiere a la inyección del ICSM-18, * se refiere a la inyección del extracto en TBS del Aβ derivado de humano, la flecha señala la EAF. Los insertos muestran las señales electrofisiológicas representativas en los tiempos indicados antes (1, 3, 5) y después (2, 4, 6) de la estimulación condicionante.

Figura 10: Caracterización del extracto de cerebro con EA utilizado para la electrofisiología *in vivo*.

El análisis por IP/transferencia Western de los extractos de cerebro reveló la presencia de gran cantidad de monómero de Aβ y de su dímero estable en SDS en el cerebro de una mujer de 80 años diagnosticada con la enfermedad de Alzheimer (EA) y la completa ausencia de Aβ en una muestra inmunodeprimida (ID) del mismo cerebro. NS indica las bandas inmunorreactivas inespecíficas detectadas cuando se inmunoprecipitó solo la solución salina tamponada con Tris (TBS). Los marcadores de masa molecular están a la izquierda. M y D señalan el monómero Aβ y su dímero estable en SDS. -ve se refiere al control de TBS.

Tanto la figura 11 como la figura 12 muestran las secuencias anotadas de los anticuerpos. Nota: los restos amarillos (recuadrados) son las CDR; está sombreado en gris (sin recuadro, negrita) el comienzo de la región constante; las regiones que no son secuencia líder, región constante ni CDR se definen como región flanqueante.

Figura 13: El modo de inhibición inducida por anticuerpo de la fijación de los ADDL a la huPrP₂₃₋₂₃₁. a: Fijación relativa de Aβ₁₋₄₂ monoméricos (▲) y oligoméricos (■) a la huPrP₂₃₋₂₃₁ unida a superficie, que se detectó con los anticuerpos antirratón 6E10 y DELFIA® Eu-N1. b: La fijación de ICSM-18 (■) e ICSM-35 (●) a la huPrP₂₃₋₂₃₁ unida a superficie se detectó con los anticuerpos antirratón 6E10 y DELFIA® Eu-N1. c: Inhibición de la fijación de los bADDL a la huPrP₂₃₋₂₃₁ fijada a la superficie debida al ICSM-18 (■) y al ICSM-35 (●), y se detectó con estreptavidina DELFIA® Eu-N1. Las barras de error muestran desviaciones estándares y son la media de al menos tres réplicas.

La figura 14 muestra un gráfico. Los potenciales del campo sinápticos se grabaron *in vivo* en el área CA1 de las ratas Wistar macho anestesiadas. En las ratas a las que se inyectó el vehículo (#, primera inyección i.c.v. de 10 µl; *, segunda inyección de 5 µl 30 min después), la estimulación de alta frecuencia (EAF) desencadenó una PLP persistente y estable (cuadrados negros, al cabo de 3 h del tétanos). En cambio, la inyección de 5 µl del extracto de cerebro que contiene Aβ 15 min antes de la EAF en los animales a los que ya se había inyectado un anticuerpo de control de isotipo IgG4 (30 µg) inhibió significativamente la PLP (círculos rosa) al igual que lo hizo únicamente el extracto de cerebro que contiene Aβ (círculos rojos). Es importante señalar que la inyección del anticuerpo anti-PrP^C, PRN100, 30 min antes de la inyección del extracto en TBS de cerebro con EA que contiene Aβ (15 min antes de la EAF) impidió la inhibición de la PLP (triángulos grises). # se refiere a la inyección del PRN100 o del control de IgG4, * se refiere a la inyección del extracto en TBS de Aβ derivado de humano, y la flecha señala la aplicación de la EAF.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

- 5 El término 'comprende' (comprender, que comprende) se debería saber que tiene su significado normal en la técnica, a saber, que el rasgo o grupo de rasgos mencionados está incluido, pero que el término no excluye que esté también presente cualquier otro rasgo o grupo de rasgos.

Proteína priónica (PrP)

- 10 Cuando los restos aminoacídicos concretos se citan mediante posiciones numéricas, el número se toma de la secuencia aminoacídica de la proteína priónica de humano como secuencia de referencia. Esto se debe utilizar, como se sabe bien en la técnica, para localizar el resto de interés. Esto no es siempre un ejercicio de recuento estricto: hay que prestar atención al contexto. Por ejemplo, si la proteína de interés, tal como la PrP de humano, tiene una longitud ligeramente diferente, entonces la localización del resto correcto en la secuencia humana que corresponde a (por ejemplo) el resto 131 requeriría el alineamiento de las secuencias y que se escoja el resto equivalente o correspondiente, y no simplemente que se tome el resto 131.º de la secuencia de interés. Esto está perfectamente incluido en el ámbito del lector experto.

- 15 La secuencia de referencia es idóneamente la secuencia aminoacídica desde el resto 23 al 231 de la PrP de humano:

23KKRPPKGG WNTGGSRYPG QGSPGGNRYP PQGGGGWGQP
 HGGGWGQPHG GGWGQPHGGG WGQPHGGGWG QGGGTHSQWN
 KPSKPKTNMK HMAGAAAAGA VVGGLGGYML GSAMSRPIIH **FGSDYEDRY**
RENM HRYPNQ VYYRPMDEYS NQNNFVHDCV NITIKQHTVT TTTKGENFTE
 TDVKMMERVV EQMCITQYER ESQAYYQRGS 231S

La secuencia diana está marcada con subrayado o negrita. El área de bucle S1-H1 está destacada con subrayado. La hélice 1 de la PrP está destacada en negrita. Esta secuencia diana está bien conservada entre las especies.

- 20 La proteína priónica (PrP) ya se había caracterizado bien. La secuencia de la proteína priónica podría proceder del gen *PRNP* de humano. Más idóneamente, la secuencia de la proteína es la secuencia entre los restos aminoacídicos 23 y 231, tal y como se muestra más arriba.

Idóneamente, la proteína priónica a la que se fija el ligando tiene la conformación PrP^C (forma celular/corriente de la proteína priónica).

- 25 Región diana de la PrP

La región diana de la PrP de interés máximo es el bucle de la lámina 1 y la hélice 1 (el bucle S1H1). Esta región diana comprende idóneamente la hélice 1 más un segmento de secuencia sin estructura. Esto a veces se denomina hélice 1 más el bucle entre la hoja β 1 y la hélice α 1.

- 30 Más idóneamente, la región diana comprende la hélice 1 de la PrP. La hélice 1 a veces se define con la inclusión de los aminoácidos 143 a 156 de la PrP^C. Más idóneamente, la región diana incluye los aminoácidos de 143 a 153 o la hélice 1.

La región diana comprende los aminoácidos de 131 a 153 de la PrP.

Más idóneamente, la región diana comprendería los aminoácidos de 131 a 150 de la PrP, más idóneamente los aminoácidos de 142 a 153 de la PrP, más idóneamente los aminoácidos de 136 a 143 de la PrP.

- 35 Idóneamente, la PrP es la PrP^C.

La PrP podría ser de cualquier especie de mamífero, tal como vaca, cabra, ratón, hámster, humano u otro mamífero. Idóneamente, la PrP es la PrP bovina o de humano. Idóneamente, la PrP es la PrP de humano.

- 40 Idóneamente, la región diana excluye el sitio de unión de los ADDL en los aminoácidos de 95 a 105 de la PrP, que se ya había descrito en la técnica, tal y como se agradece en la presente memoria. La invención se diferencia de esto en que, en la presente memoria, se actúa selectivamente sobre un sitio diana separado e independiente del sitio de fijación a los ADDL. Idóneamente, el sitio diana no comprende los aminoácidos de 95 a 105 de la PrP. Idóneamente, el sitio diana no se solapa con los aminoácidos de 95 a 105 de la PrP.

Mutación

La mutación tiene su significado normal en la técnica y podría hacer referencia a la sustitución o al truncamiento o a la delección del resto, motivo o dominio al que se hace referencia. La mutación podría ser efectiva en el polipéptido, p. ej., mediante la síntesis de un polipéptido que tiene la secuencia mutada, o podría ser efectiva desde los nucleótidos, p. ej., al fabricar un ácido nucleico que codifica la secuencia mutada, donde dicho ácido nucleico se podría traducir posteriormente para producir el polipéptido mutado. Cuando no se especifica ningún aminoácido como aminoácido de reemplazo para un sitio de mutación dado, se utiliza idóneamente la alanina (A).

Se podrían realizar sustituciones conservativas, por ejemplo, de acuerdo con la tabla que viene a continuación. Los aminoácidos del mismo bloque de la segunda columna, y preferiblemente en la misma línea de la tercera columna, se podrían sustituir unos por otros:

ALIFÁTICO	Apolar	G A P M
		I L V
	Polar, sin carga	C S T
		N Q
	Polar, cargado	D E
		K R
AROMÁTICO		H F W Y

Fragmento

Un fragmento tiene idóneamente al menos 10 aminoácidos de longitud, idóneamente al menos 25 aminoácidos, idóneamente al menos 50 aminoácidos, idóneamente al menos 100 aminoácidos, idóneamente al menos 200 aminoácidos, idóneamente la mayoría del polipéptido de interés. Idóneamente, un fragmento comprende un motivo entero o un dominio entero del polipéptido de interés.

Homología o identidad de secuencia

Aunque la homología de secuencia también se puede considerar en términos de similitud funcional (a saber, los restos aminoacídicos que tienen funciones o propiedades químicas parecidas), en el contexto del presente documento se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Las comparaciones de secuencias se pueden realizar a simple vista o, con más frecuencia, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fáciles de conseguir. Estos programas informáticos públicos y comerciales pueden calcular el porcentaje de homología (tal como el porcentaje de identidad) entre dos o más secuencias.

El porcentaje de identidad se podría calcular sobre las secuencias contiguas, a saber, una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido de una secuencia se compara directamente con el correspondiente aminoácido de la otra secuencia, de uno en uno. Esto se denomina un alineamiento «sin huecos». Típicamente, tales alineamientos sin huecos se realizan sólo sobre un número relativamente pequeño de restos (por ejemplo, menos de 50 aminoácidos contiguos).

Aunque este es un método muy simple y sólido, no tiene en cuenta que, por ejemplo, en una pareja de secuencias por lo demás idénticas, una inserción o delección provocará que los siguientes restos aminoacídicos no queden alineados, con lo que se podría dar lugar a una gran reducción del porcentaje de homología (porcentaje de identidad) cuando se realiza un alineamiento global (un alineamiento por toda la secuencia). Por consiguiente, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineamientos óptimos que tengan en cuenta las posibles inserciones y delecciones sin penalizar indebidamente la puntuación de la homología (identidad) global. Esto se consigue con la inserción de «huecos» en el alineamiento de secuencias con los que se intenta elevar al máximo la homología o identidad local.

Estos métodos más complejos asignan «penalización por huecos» a cada hueco que se produce en el alineamiento para que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, un alineamiento de secuencias con la menor cantidad posible de huecos (lo que refleja una mayor relación entre las dos secuencias comparadas) conseguirá una puntuación más elevada que uno con muchos huecos. Los «costes de huecos afines» se utilizan típicamente para cargar un coste relativamente elevado por la existencia de un hueco y una penalización más pequeña por cada resto posterior en el hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos utilizado con más frecuencia. La elevada penalización por hueco producirá, por supuesto, alineamientos optimizados con menos huecos. La mayoría de programas de alineamiento permiten modificar las penalizaciones de los huecos. Sin embargo, se prefiere utilizar los

valores por defecto cuando se utiliza tal programa informático para las comparaciones de secuencias. Por ejemplo, cuando se utiliza Bestfit del paquete del GCG de Wisconsin (véase a continuación), la penalización del hueco por defecto para las secuencias de aminoácidos es de -12 para un hueco y -4 para cada extensión.

El cálculo del porcentaje de homología máxima necesita, en primer lugar, la producción de un alineamiento óptimo que tenga en cuenta la penalización por huecos. Un programa informático idóneo para llevar a cabo tal alineamiento es Bestfit del paquete del GCG de Wisconsin (Universidad de Wisconsin, EE. UU.; Devereux et al., 1984, *Nucleic Acids Research* 12: 387). Otros programas de ejemplo que pueden comparar secuencias incluyen, pero sin limitarse a ellos, el paquete BLAST, FASTA (Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410) y la *suite* GENWORKS de herramientas de comparación.

Aunque el porcentaje final de homología se puede medir en términos de identidad, el proceso del alineamiento en sí mismo no se basa típicamente en una comparación por parejas de todo o nada. En su lugar, se suele utilizar una matriz de ponderación por escala de similitud que asigna puntuaciones a cada pareja comparada basándose en su parecido químico o en la distancia evolutiva. Un ejemplo de tal matriz de uso frecuente es la matriz BLOSUM62, la matriz por defecto para la *suite* de programas de BLAST. Los programas del GCG de Wisconsin utilizan por lo general tanto los valores públicos por defecto como una tabla de comparación simbólica hecha a medida, si se aporta. Se prefiere el uso de los valores públicos por defecto para el paquete del GCG, o en el caso de otros programas, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62. Una vez que el programa ha generado un alineamiento óptimo, se puede calcular el porcentaje de homología, preferiblemente el porcentaje de identidad de secuencia. El programa informático realiza típicamente esto como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

En el contexto del presente documento, se considera homóloga una secuencia aminoacídica que incluya una secuencia aminoacídica que es al menos idéntica al 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90%, preferiblemente idéntica al menos al 95 o 98%, a nivel de aminoácidos. Idóneamente, dicha comparación se realiza sobre al menos 50 o 100, preferiblemente 200, 300, 400 o 500 aminoácidos, con cualquiera de las secuencias polipeptídicas relevantes descritas en la presente memoria, lo más idóneamente a lo largo de toda la longitud del polipéptido de interés. Idóneamente, se debe considerar la homología con respecto a una o varias de las regiones de la secuencia que se sabe que son esenciales para la función de la proteína, y no de las secuencias vecinas que no son esenciales. Esto es especialmente importante cuando se consideran secuencias homólogas de organismos con relaciones lejanas.

Las mismas consideraciones se aplican a la secuencia de nucleótidos de los ácidos nucleicos.

El término «derivado de» tiene su significado normal en la técnica, en donde una sustancia se considera que «deriva de» una primera sustancia cuando parte de la sustancia se ha creado o construido a través de una cadena de acontecimientos que incorpora toda o parte de la primera sustancia en la sustancia en cuestión. La naturaleza de las dos sustancias probablemente difiera, p. ej., por la mutación, adición o delección o una modificación similar, pero si la sustancia en cuestión tiene características heredadas de la primera sustancia, entonces deriva de ella. En particular, cuando se utiliza junto con biopolímeros, tal como uno o varios polinucleótidos o uno o varios polipéptidos, se considera que una sustancia deriva de una primera sustancia cuando posee suficiente identidad de secuencia para que se reconozca que está relacionada con la primera sustancia. En este contexto, si una sustancia procede de una primera sustancia, entonces dicha sustancia tiene preferiblemente al menos 10 restos contiguos que poseen al menos una identidad de al menos el 25% con la primera sustancia, preferiblemente una identidad del 30%, preferiblemente una identidad del 40%, preferiblemente una identidad del 50%, preferiblemente una identidad del 60%, preferiblemente una identidad del 70%, preferiblemente una identidad del 80%, preferiblemente una identidad del 90%, preferiblemente una identidad del 95%, preferiblemente una identidad del 96%, preferiblemente una identidad del 97%, preferiblemente una identidad del 98%, preferiblemente una identidad del 99%, o incluso más. Preferiblemente dicha sustancia tiene al menos 15 restos contiguos con dicha identidad, preferiblemente al menos 20 restos, preferiblemente al menos 30 restos, preferiblemente al menos 50 restos, preferiblemente al menos 100 restos, preferiblemente al menos 200 restos, o incluso más. Para las entidades multiméricas, el término se podría aplicar al complejo y/o a cada uno de los componentes como resultará evidente a partir del contexto. Por lo general, será suficiente si una de las subunidades deriva de la entidad dada.

Aβ

La oligomerización de Aβ puede tener efectos perjudiciales. La oligomerización de Aβ interviene en distintas afecciones médicas, y los usos y los métodos descritos contrarrestan ventajosamente tales afecciones.

Se describe el tratamiento y/o la prevención de una o varias afecciones médicas relacionadas con la oligomerización de Aβ. Los ejemplos de esto incluyen la demencia con cuerpos de Lewy y la miositis con cuerpos de inclusión. La oligomerización de Aβ puede tomar la forma de la formación de placas. Una afección médica importante que implica la formación de placas es la enfermedad de Alzheimer (EA).

Los ligandos difundibles derivados de Aβ (ADDL) son formas no fibrilares, oligoméricas, solubles, y sintéticas, de Aβ (monómero) que se pueden utilizar para estudiar la oligomerización de Aβ. Los ADDL inhiben la potenciación a largo

plazo (PLP). La PLP está conectada con la plasticidad sináptica. Así pues, la invención encuentra aplicación en las afecciones médicas que manifiestan una plasticidad sináptica anormal, tal como el deterioro de la plasticidad sináptica. La plasticidad sináptica es la capacidad que tiene la sinapsis entre las neuronas para cambiar su resistencia en respuesta a su uso o difundir la transmisión por las rutas sinápticas. Las afecciones médicas que manifiestan una plasticidad sináptica anormal incluyen enfermedades cognitivas tales como la enfermedad de Alzheimer.

Idóneamente, el ligando de acuerdo con la invención es para ser usado en la prevención o tratamiento de las afecciones médicas relacionadas con la oligomerización de A β , en donde la afección médica es la enfermedad de Alzheimer (EA).

La EA es una enfermedad heterogénea y se puede considerar un síndrome clinicopatológico. Como tal, una serie de estudios han descrito efectos perjudiciales del A β que no requieren la expresión de la PrP³⁻⁵. En este contexto, es importante reconocer que se han utilizado un abanico de preparaciones diferentes de A β y que esto puede en parte explicar algunos de los resultados conflictivos. Además, se tienen que anticipar las discrepancias entre los modelos de EA de animales, de tejido, celulares y bioquímicos con respecto a una posible función para PrP^C. Incluso dado de que la PrP^C es un receptor importante para las especies de A β tóxicas, no se esperaría que la eliminación de PrP^C rescate todos los aspectos de la enfermedad en cada modelo. Además, dado que en los estudios no siempre se conoce la concentración de las especies activas que causan la enfermedad, y que podría diferir entre los estudios con diferentes grupos, algunos efectos se podrían deber a que las concentraciones más altas de A β podían desencadenar efectos tóxicos inespecíficos. Sin el deseo de comprometerse con la teoría, idóneamente, cuando la invención se aplica a la EA o a la toxicidad por A β , la EA o la toxicidad por A β es la EA o la toxicidad por A β mediadas por la PrP.

Ligandos

Los ligandos que se fijan a la PrP son idóneamente ligandos que se fijan a la región diana de PrP tal y como está descrito, idóneamente se fijan a la región diana de la PrP^C tal y como está descrito.

El ligando podría ser una entidad única o podría ser una combinación de entidades. Idóneamente es una entidad única.

El ligando podría ser un compuesto orgánico u otra sustancia química, bien natural o artificial. El ligando podría ser una molécula aminoacídica, un polipeptídico o un derivado químico del mismo, o una combinación de los mismos.

El ligando se podría diseñar u obtener de una colección de compuestos que podrían comprender péptidos, así como otros compuestos, tales como moléculas orgánicas pequeñas. A modo de ejemplo, el ligando podría ser una sustancia natural, una macromolécula biológica o un extracto hecho de materiales biológicos, tales como bacterias, hongos, o células o tejidos animales (en particular de mamífero), una molécula orgánica o inorgánica, un agente sintético, un agente semisintético, un mimético estructural o funcional, un péptido, un peptidomimético, un agente obtenido por derivación, un péptido escindido de una proteína completa, o un péptido sintetizado de manera sintética (tal como, a modo de ejemplo, mediante un sintetizador de péptidos o bien mediante técnicas recombinantes, o combinaciones de las mismas, un ligando recombinante, un anticuerpo, un ligando natural o no natural, una proteína de fusión o un equivalente de la misma y mutantes, derivados o combinaciones de los mismos).

En la técnica se conocen los ligandos que se fijan a la región diana de la PrP.

El ligando puede ser una proteína. Un ejemplo de tal ligando es la tetraspanina-7.

Idóneamente, el ligando puede ser un anticuerpo, o un derivado de anticuerpo tal como un scFv o Fab. El término «anticuerpo», tal y como se utiliza en la presente memoria, también pretende abarcar anticuerpos, fragmentos de digestión, porciones o variantes de los mismos, entre ellos miméticos de anticuerpos, o que comprenden porciones de anticuerpos que imitan la estructura y/o función de un anticuerpo o fragmento o porción del mismo, que incluyen anticuerpos monocatenarios y fragmentos de los mismos. La función importante a conservar en cada caso es el reconocimiento de (a saber, la fijación eficaz a) la región diana de PrP. Típicamente, este reconocimiento o función de fijación está mediado por las regiones determinantes de complementariedad (CDR, por su nombre en inglés) del anticuerpo. Así pues, idóneamente, el ligando o fragmento del mismo comprende las CDR que reconocen la región diana de la PrP. Los fragmentos funcionales incluyen fragmentos de fijación al antígeno que se fijan a la región diana de la PrP^C. Por ejemplo, quedan abarcados por la presente invención los fragmentos de anticuerpo capaces de llevar a cabo la fijación que incluyen, pero sin limitarse a ellos, Fab (p. ej., por digestión con papaína), facb (p. ej., por digestión con plasmina), pFc' (p. ej., por digestión con pepsina o plasmina), Fd (p. ej., por digestión con pepsina, reducción parcial y reagregación), fragmentos Fv o scFv (p. ej., por técnicas de biología molecular). También se pretende que los fragmentos de anticuerpos incluyan, p. ej., anticuerpos con dominios eliminados, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos formados con fragmentos de anticuerpos.

Se conocen en la técnica ejemplos de anticuerpos que se fijan a la región diana de PrP. Los ejemplos incluyen

ICSM-17 (para los restos aminoacídicos de 131 a 150; disponibles de D-Gen Ltd, GB). ICSM-18 (para los restos aminoacídicos de 142 a 153; disponible de D-Gen Ltd, GB), ICSM-30 (para los restos aminoacídicos de 136 a 143; disponible de D-Gen Ltd, GB) e ICSM-31 (para los restos aminoacídicos de 136 a 143; disponible de D-Gen Ltd, GB).

- 5 El ICSM-32 (131 a 150; disponible de D-Gen Ltd, GB) también abarca la región diana.

El anticuerpo Sha31 (Medicorp Inc; Alier et al. 2011, *J. Neurosci*, vol. 31. páginas 16292-16297) se fija a los restos 145 a 152 de la PrP y, por lo tanto, también se fija dentro de la región diana. El anticuerpo Sha31 está disponible de Berlin Pharma (subsidiaria de Berlin Technologies), Francia, como número de producto A03213.

- 10 Otros anticuerpos conocidos de fijación a la hélice 1 (por ejemplo, 6H4 [p. ej., de Prionics AG, Wagistrasse 27a, CH-8952 Schlieren-Zurich, Suiza]; E12/2 [p. ej., tal y como se publicó en Cernilec et al., 2007, *Immunol Lett*. 31 de octubre; vol 113 (1), páginas 29-39. Epub de 20 de agosto de 2007]; D18, [p. ej., tal y como se publicó en Peretz et al. 2001, *Nature*, vol. 412, páginas 739-743] se pueden aplicar en la invención.

Un ejemplo preferido de tal anticuerpo es ICSM-18, tal y como se utiliza en los ejemplos que vienen a continuación. Más idóneamente, tal anticuerpo es una versión humanizada del ICSM-18, tal como PRN100.

- 15 Los anticuerpos pueden estar en cualquier forma idónea conocida en la técnica para el uso terapéutico. Los anticuerpos pueden estar completos o ser fragmentos de los mismos.

- Con más detalle, idóneamente, el ligando podría ser un anticuerpo o un derivado de anticuerpo, tal como un scFv o Fab. El término «anticuerpo», tal y como se utiliza en la presente memoria, pretende englobar «inmunoglobulinas» y derivados de las mismas. Las inmunoglobulinas comprenden clases amplias y variadas de polipéptidos que se pueden diferenciar desde el punto de vista bioquímico. En muchos ejemplos, las inmunoglobulinas consisten en una combinación de cadenas pesadas y de cadenas ligeras. Todas las clases de inmunoglobulinas, que incluyen IgM, IgA, IgD, IgE, IgG e IgY y, cuando sea apropiado, sus subclases, están claramente dentro del alcance de la presente invención. La siguiente explicación se centrará de forma general en la clase de moléculas de inmunoglobulina de las IgG. Con respecto a IgG, una molécula de inmunoglobulina estándar comprende dos cadenas polipeptídicas ligeras idénticas de masa molecular aproximada de 25 kDa y dos cadenas polipeptídicas pesadas idénticas de una masa molecular aproximada de 50 kDa. La molécula resultante, que se denomina por convención un «monómero» de IgG, consiste en mitades idénticas, y las cuatro cadenas están típicamente unidas por puentes disulfuro en una configuración en forma de «Y», en donde las cadenas ligeras se unen a las cadenas pesadas desde el comienzo de la boca de la «Y» y continúan a lo largo de la región o dominio variable. Los expertos en la técnica saben bien que las inmunoglobulinas se pueden caracterizar en términos de dominios variables y constantes. En este sentido, se apreciará que los dominios variables de las porciones de la cadena ligera (VL) así como de la pesada (VH) determinan el reconocimiento del antígeno y la especificidad por él. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y de la cadena pesada (que normalmente consisten en los dominios CH1, CH2 o CH3) confieren las propiedades biológicas importantes, tales como la secreción, la movilidad transplacentaria, la fijación al receptor de Fc, la fijación del complemento y similares. Tal y como se indica más arriba, la región variable permite que el anticuerpo reconozca selectivamente y se fije específicamente a los epítomos de los antígenos. Es decir, el dominio VL y el dominio VH de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio tridimensional de fijación al antígeno, y que dicho sitio también se denomina «receptor de antígeno». Esta estructura del anticuerpo forma el sitio de fijación al antígeno o receptor del antígeno presente en el extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de fijación al antígeno se define mediante tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) en cada una de las cadenas VH y VL. Así pues, dentro de la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de un anticuerpo hay tres CDR (denominadas CDR1, CDR2 y CDR3). Ya que la mayor parte de la variación de secuencia asociada a las inmunoglobulinas se encuentra en las CDR, estas regiones a veces se denominan «regiones hipervariables», y entre estas CDR, la CDR3 muestra la variabilidad más grande. Ya que los sitios de fijación al antígeno están formados típicamente por dos dominios variables (sobre dos cadenas polipeptídicas diferentes que son la cadena pesada y la cadena ligera), hay seis CDR para cada receptor de antígeno que pueden entrar en contacto de forma colectiva con el antígeno. Así pues, una única molécula de IgG tiene dos receptores de antígeno y, por lo tanto, consiste en doce CDR. Las CDR también se pueden denominar «idiotipos». En algunos casos, por ejemplo, determinadas moléculas de inmunoglobulina procedentes de las especies de camélidos o las moléculas manipuladas genéticamente basadas en las inmunoglobulinas de camélidos, una molécula de inmunoglobulina completa podría consistir únicamente en cadenas pesadas, sin ninguna cadena ligera. Véase, p. ej., Hamers Casterman et al. *Nature* 363: 446-448 (1993).

- El ligando podría ser una molécula de fijación a antígeno, tal como en una realización, una molécula de fijación a antígeno de la invención comprende al menos una CDR de cadena ligera o pesada de una molécula de anticuerpo. En otra realización, una molécula de fijación a antígeno de la invención comprende al menos dos CDR de una o varias moléculas de anticuerpo. En otra realización, una molécula de fijación a antígeno de la invención comprende al menos tres CDR de una o varias moléculas de anticuerpo. En otra realización, una molécula de fijación a antígeno de la invención comprende al menos cuatro CDR de una o varias moléculas de anticuerpo. En otra realización, una molécula de fijación a antígeno de la invención comprende al menos cinco CDR de una o varias moléculas de

anticuerpo. En otra realización, una molécula de fijación a antígeno de la invención comprende al menos seis CDR de una o varias moléculas de anticuerpo. Los anticuerpos o fragmentos inmunoespecíficos de los mismos para ser usados en los métodos de la invención incluyen, pero sin limitarse a ellos, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos de fijación a epítomos, p. ej., Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fv unidos por puentes disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden un dominio VL o bien uno VH, fragmentos producidos por una genoteca de expresión de Fab, y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (entre ellos, p. ej., anticuerpos anti-Id que se fijan a las moléculas descritas en la presente memoria). Las moléculas de scFv se conocen en la técnica y se producen con el uso de la tecnología de ADN recombinante, tal y como se describe en la patente de Winter (ref.). Las moléculas de inmunoglobulina o de anticuerpo de la invención pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. El término «anticuerpo» tal como se utiliza en la presente memoria también pretende englobar los anticuerpos, fragmentos de digestión, porciones específicas y variantes de las mismas, que incluyen miméticos de anticuerpos o que comprenden porciones de anticuerpos que imitan la estructura y/o función de un anticuerpo o fragmento específico o porción del mismo, entre ellos anticuerpos monocatenarios y fragmentos de los mismos; en donde cada uno contiene al menos una CDR. Véase Qiu et al., *Nature Biotechnology* 25: 921-929 (2007). Los fragmentos funcionales incluyen fragmentos de fijación al antígeno que se fijan a un antígeno de PrP^C. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo capaces de fijarse a la PrP o una porción de la misma, incluidos, pero sin limitarse a ellos, Fab (p. ej., por digestión con papaína), fabc (p. ej., por digestión con plasmina), pFc' (p. ej., por digestión con pepsina o plasmina), Fd (p. ej., por digestión con pepsina, reducción parcial y reagregación), fragmentos Fv o scFv (p. ej., por técnicas de biología molecular), están abarcados por la presente invención. También se pretende que los fragmentos de anticuerpo incluyan, por ejemplo, anticuerpos con delección de dominio, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios, anticuerpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticuerpo y diacuerpos. Los diacuerpos se forman por la creación de scFv con péptidos conectores que son demasiado cortos para que las dos regiones variables se plieguen juntas (aproximadamente cinco aminoácidos), lo que fuerza a los scFv a dimerizarse. Se ha demostrado que los diacuerpos tienen constantes de disociación de hasta 40 veces más bajas que los correspondientes scFv, lo que significa que tienen una afinidad mucho más alta por su diana. Por consiguiente, los fármacos basados en los diacuerpos podrían en principio utilizarse a dosis mucho más bajas que otros anticuerpos terapéuticos. Las versiones modificadas de cada una de estas categorías de fragmentos de anticuerpos recombinantes y las combinaciones de los mismos serán perceptibles para el experto en la técnica y se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Los fragmentos de anticuerpo, entre ellos los anticuerpos monocatenarios, podrían comprender la una o varias regiones variables solas o en combinación con la totalidad o una parte de lo siguiente: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. También están incluidos en la invención los fragmentos de fijación a antígeno que también comprenden cualquier combinación de regiones variables con una región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. Los anticuerpos o fragmentos inmunoespecíficos de los mismos para ser usados en los métodos terapéuticos descritos en la presente memoria podrían tener su origen en cualquier animal, incluidos pájaros y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos son anticuerpos de humano, murinos, de burro, conejo, cabra, conejillo de Indias, camello, llama, caballo o pollo. En otra realización, la región variable puede tener un origen conditio (p. ej., de tiburones). Tal y como se utiliza en la presente memoria, los anticuerpos de «humano» incluyen los anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen los anticuerpos aislados de genotecas de inmunoglobulinas de humano o de animales transgénicos para una o varias inmunoglobulinas humanas y que no expresan las inmunoglobulinas endógenas, tal y como se describe a continuación y, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. n.º 5.939.598 de Kucherlapati et al. En algunos anticuerpos contra la PrP^C o fragmentos inmunoespecíficos de los mismos para ser usados en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria, las porciones de cadena pesada de una cadena polipeptídica de un multímero son idénticos a las en una segunda cadena polipeptídica del multímero. Como alternativa, los monómeros que contienen la porción de cadena pesada para ser usados en los métodos de la invención no son idénticos. Por ejemplo, cada monómero puede comprender un sitio de fijación diana diferente que forma, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico.

Los anticuerpos podrían estar humanizados. La humanización de los anticuerpos se conoce en la técnica y el experto en la técnica la puede llevar a cabo con facilidad. Por ejemplo, el ICSM-18 se podría humanizar ventajosamente en relación con las secuencias que codifican las CDR. Idóneamente, el anticuerpo comprende al menos las CDR de uno o varios anticuerpos descritos en la presente memoria.

En este sentido, la siguiente secuencia corresponde a ICSM18VH:

ICSM18VH

ATGGAATGGAGCTGGGTTTTCTCTTCCTCCTGTCAGGAACTGCAGGTGT
CCTCTCTGAGGTCCAGCTACAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTG
GGTCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCATCTAGAAACACATTCACTGAC
TATAACTTGGACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGACACTTGAGTGGAT
TGGAAATGTTTATCCTAACAATGGTGTACTGGCTACAACCAGAAgTTCA
GGGGTAAGGCCACACTGACTGTAgACAAGTCTCCAGCACAGCCTACATG
GAGCTCCACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCCCT
TTATTACTACgATgTCTCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCT
CTGCA

La siguiente secuencia corresponde a ICSM18lc:

ICSM18lc

ATGGATTACAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGT
CATAATATCCAGAGGACAAATTGTTCTCACCAGTCTCCAGCAATCATGT
CTGCATCTCCAGGGGAGAAgGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGT
GTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAG
ATGGATTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCA
GTGGCAGTGGGTCTGGGACCTTACTCTCTCACAATCAGCAGTATGGAG
GCTGAAGATGCTGCCACTTATTTCTGCCACCAAGTGGAGAAgTAACCCATA
CACGTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAACGGGCTGATGCTGCAC
CAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGT
GCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGACATCAATGT
CAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTT
GGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCTC
ACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGC
CACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGGGAG
AGTGTTAGTGA

- 5 La figura 11 y la figura 12 muestran las secuencias de anticuerpo preferidas que se han anotado para mostrar las CDR y otras características.

En la bibliografía se podría encontrar orientación con respecto a la humanización, por ejemplo, como publicaron Greg Winter et al., y las técnicas para la manipulación y la producción de anticuerpos recombinantes se podría encontrar en «Antibodies: A Laboratory Manual» de Harlow y Lane, Cold Spring Harbour Press.

- 10 En una realización, los anticuerpos (o fragmentos) se podrían humanizar ventajosamente mediante la fabricación de anticuerpos quiméricos.

En otra realización, los anticuerpos (o fragmentos) podrían llevar injertadas ventajosamente las CDR.

En otra realización, los anticuerpos (o fragmentos) podrían estar ventajosamente todo lo humanizados que la tecnología permita.

- 15 Afinidad de fijación

Mediante afinidad de fijación se quiere hacer referencia a la afinidad de fijación del ligando por la molécula de PrP.

Tal y como apreciará el lector experto, alta afinidad significa una constante de disociación (K_d) baja. En otras palabras, los anticuerpos con fijación «más fuerte» saturan la secuencia diana a una concentración más baja que los anticuerpos con fijación «más débil». Así pues, los anticuerpos con fijación más fuerte tienen una constante de disociación (K_d) más baja. Así pues, un anticuerpo con una «afinidad más alta» en la jerga habitual es un anticuerpo que se fija con más fuerza y con un valor de constante de disociación (K_d) más bajo.

- 20 El ligando necesita tener una afinidad lo suficientemente alta (a saber, una K_d suficientemente baja) para que la

secuencia diana de la PrP permanezca fijada de forma estable. Por ejemplo, el ICSM-32 (136-143) reconoce la secuencia diana de PrP, pero no inhibe la fijación al A β porque no permanece fijado de manera estable a la PrP durante el experimento.

5 Así pues, la afinidad del ligando es idóneamente de 100 nM o menor. Más idóneamente, la afinidad del ligando es de 10 nM o menor, tal como de 1 a 10 nM. Más idóneamente, la afinidad del ligando es de 1 nM o menor, tal como 1 nM a 100 pM. Lo más idóneamente, la afinidad es de aproximadamente 600 pM, que es la afinidad del ICSM-18 (la versión humanizada equivalente es PRN100).

10 La afinidad de fijación se puede medir de acuerdo con cualquier método idóneo conocido en la técnica. Por ejemplo, los valores de afinidad se podrían determinar al seguir el método dado en los ejemplos, por ejemplo, bajo el encabezamiento «Ensayo DELFIA®» y el subtítulo «Determinación de la fijación (afinidad) del anticuerpo».

Idóneamente, el ligando, tal como un anticuerpo, se fija específicamente a la secuencia diana de la PrP. Un ligando, tal como el anticuerpo, «se fija específicamente» a la secuencia diana de la PrP si reacciona a un nivel detectable con la secuencia diana de la PrP y no reacciona de forma detectable con los péptidos que contienen una secuencia sin ninguna relación o diferente. Las propiedades de fijación se podrían evaluar tal y como se describe.

15 Administración/formulación

Se conocen bien en la técnica los métodos para administrar los ligandos que actúan selectivamente sobre las proteínas priónicas para la inhibición de la fijación del A β oligomérico y para otras enfermedades del sistema nervioso en las que intervienen las proteínas priónicas. Las composiciones que contienen los ligandos de la invención se conocen bien en la técnica y se incorporan en la presente memoria por referencia para ser usadas para la prevención o el tratamiento de las afecciones médicas relacionadas con la oligomerización de A β .

20 El ligando utilizado se podría formular en composiciones farmacéuticas para la administración a los mamíferos, entre ellos los humanos. Las composiciones farmacéuticas podrían comprender uno o varios vehículos farmacéuticamente aceptables que incluyen, p. ej., intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como seroalbúmina humana, sustancias tamponantes, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de disodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en la celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y/o grasa de lana. Las composiciones utilizadas se podrían administrar por cualquier método idóneo, p. ej., por vía parenteral, oral, pulverización por vía inhalatoria, tópica, rectal, nasal, yugal, vaginal o mediante el implante de un reservorio. El término «parenteral», tal y como se utiliza en la presente memoria, incluye las técnicas de infusión o inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal.

35 Los ligandos utilizados podrían actuar en el sistema nervioso para inhibir la supresión de la potenciación a largo plazo y/o incrementar la retención de la memoria inmediata, y/o para mejorar el funcionamiento de la memoria espacial. Por consiguiente, el ligando se podría administrar de tal manera que atravesase la barrera hematoencefálica. Este franqueamiento puede deberse a las propiedades fisicoquímicas inherentes a la propia molécula del ligando, al etiquetado o conexión del ligando a un vehículo que facilita el franqueamiento de la barrera hematoencefálica, o a los otros componentes de una formulación farmacéutica, o al uso de un dispositivo mecánico, tal como una aguja, cánula o instrumento quirúrgico, que traspase la barrera hematoencefálica. Cuando el ligando es una molécula que no atraviesa por sí sola la barrera hematoencefálica, p. ej., una fusión a un resto que facilita el franqueamiento, las vías idóneas de administración son, p. ej., intratecal o intracraneal. Cuando el ligando es una molécula que atraviesa inherentemente la barrera hematoencefálica, la vía de administración podría ser una o varias de las diferentes vías que se describen a continuación.

45 Idóneamente, el ligando o la composición que lo comprende se podrían administrar por vía intracerebral o más idóneamente por vía periférica p. ej., inyección intravenosa o subcutánea.

Las formas inyectables estériles de las composiciones descritas podrían ser la suspensión acuosa u oleaginosas. Estas suspensiones se pueden formular de acuerdo con la metodología conocida en la técnica mediante el uso de dispersantes o humectantes y agentes de suspensión idóneos. La preparación inyectable y estéril puede ser una solución o suspensión inyectable y estéril en un diluyente o solvente aceptable por vía parenteral que no sea tóxico, por ejemplo, tal como una suspensión en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que se pueden emplear están el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, se emplean convencionalmente aceites no volátiles y estériles como solvente o medio de suspensión. Con este propósito, se podría emplear cualquier aceite no volátil y suave, entre ellos los mono- o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como el ácido oleico y sus glicéridos derivados son útiles para la preparación de inyectables, al igual que los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como el aceite de oliva o el aceite de ricino, en especial en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones oleaginosas también podrían contener un diluyente alcohólico de cadena larga o un dispersante, tal como carboximetilcelulosa o dispersantes similares que se utilizan

habitualmente en la formulación de formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables, que incluyen emulsiones y suspensiones. Otros tensioactivos utilizados corrientemente, tales como Tween, Span, y otros emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se suelen utilizar en la fabricación de sólido, líquido, y otras formas de dosificación farmacéuticamente aceptables también se podrían utilizar para los propósitos de la formulación.

- 5 Las composiciones que contienen el ligando de acuerdo con la invención podrían contener vehículos idóneos farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, pueden contener excipientes y/o auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en las preparaciones diseñadas para ser administradas en el sitio de actuación. Las formulaciones idóneas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma hidrosoluble, por ejemplo, sales hidrosolubles. Además, se podrían administrar las suspensiones de los compuestos activos como suspensiones oleosas adecuadas para la inyección. Los solventes o vehículos lipófilos idóneos incluyen aceites grasos, por ejemplo, aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo, oleato de etilo o triglicéridos. Las suspensiones acuosas para inyección podrían contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y dextrano. Opcionalmente, la suspensión podría también contener estabilizantes. Los liposomas también pueden utilizarse para encapsular las moléculas de la invención y administrarlas a las células o en los espacios intersticiales. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son los solventes fisiológicamente compatibles, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antimicóticos, agentes isotónicos y que retardan la absorción, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares. En algunas realizaciones, la composición comprende agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden sustancias farmacéuticamente aceptables, tales como humectantes, o cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como humectantes o emulsionantes, conservantes o tamponantes, que mejoran la vida útil o la eficacia de los ingredientes activos.

- 25 Las formulaciones parenterales podrían ser una dosis única en embolada, una infusión o una dosis de carga en embolada seguida de una dosis de mantenimiento. Estas composiciones se podrían administrar a intervalos fijos específicos o a intervalos variables, p. ej., una vez al día o en función de «cuando se necesite».

- Algunas composiciones farmacéuticas utilizadas en los métodos de esta invención se pueden administrar por vía oral en una forma farmacéutica aceptable que incluye, p. ej., cápsulas, comprimidos, suspensiones acuosas o soluciones. Algunas composiciones farmacéuticas también se podrían administrar mediante aerosol nasal o inhalación. Tales composiciones se podrían preparar como soluciones en solución salina, con el uso de alcohol bencílico u otros conservantes idóneos, promotores de absorción para mejorar la biodisponibilidad y/o otros solubilizantes o dispersantes convencionales. Las composiciones de la invención podrían estar en muchas formas, que incluyen, por ejemplo, líquido (p. ej., soluciones que se pueden inyectar e infundir), dispersiones, suspensiones, formas farmacéuticas semisólidas y sólidas. La forma preferida depende del modo de administración y la aplicación terapéutica. Para el tratamiento de los tejidos del sistema nervioso central, la administración puede ser, p. ej., por inyección o infusión en el líquido cefalorraquídeo (LCR). La administración también puede ser con uno o varios agentes capaces de favorecer la penetración de un ligando a través de la barrera hematoencefálica.

- La composición se puede formular como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración elevada del fármaco. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar por incorporación del ingrediente activo a la cantidad necesaria en un solvente adecuado con una o una combinación de los ingredientes recogidos más arriba, según se necesite, seguido de la esterilización por filtración. Por lo general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del ingrediente activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los recogidos más arriba. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente esterilizada por filtración. La fluidez adecuada de una solución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas necesario en el caso de la dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo con la inclusión en la composición de un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

- El ligando de acuerdo con la invención se puede formular con una formulación o dispositivo de liberación controlada. Ejemplos de tales formulaciones y dispositivos incluyen implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulada. Se pueden utilizar polímeros biocompatibles y biodegradables, por ejemplo, acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones y dispositivos se conocen en la técnica. Véase, p. ej., «Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems», J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc. Nueva York, 1978.

- Las formulaciones inyectables de liberación prolongada se pueden realizar mediante la formación de matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables, tales como polilactida-poliglicólido. Según la proporción de fármaco por polímero y de la naturaleza del polímero empleado, se puede controlar la velocidad de la liberación del fármaco. Otros polímeros biodegradables de ejemplo son poliortoésteres y polianhídridos. Las

formulaciones inyectables de liberación prolongada se pueden preparar también mediante el atrapamiento del fármaco en liposomas o microemulsiones.

En las composiciones se pueden incorporar otros compuestos activos más. Estos pueden ser agentes terapéuticos eficaces para tratar, mejorar o prevenir la enfermedad de Alzheimer, tales como un adrenérgico, antiadrenérgico, antiandrógeno, antianginoso, ansiolítico, anticonvulsivo, antidepresivo, antiepiléptico, hipolipidémico, antihiperlipoproteínémico, antihipertensor, antiinflamatorio, antiobesivo, antiparkinsoniano, antipsicótico, corticoesteroide; supresor corticosuprarrenal; antagonista de la aldosterona; aminoácido; esteroide anabólico; analéptico; andrógeno; regulador de la glucemia; cardioprotector; cardiovascular; agonista o antagonista colinérgico; desactivador o inhibidor de la colinesterasa, tal como galantamina, rivastigmina, tacrina y donepezilo; adyuvante o potenciador cognitivo; dopaminérgico; inhibidor enzimático, estrógeno, depurador de los radicales de oxígeno libre; agonista del GABA; antagonista de glutamato; hormona; hipocolesterolémico; hipolipidémico; hipotensor; inmunizante; inmunoestimulante; inhibidor de la monoamino oxidasa, neuroprotector; antagonista del *N*-metil-D-aspartato (NMDA), tal como memantina; antagonista del AMPA, antagonista de NMDA competitivo o no competitivo; antagonista de opioides; abridor del canal de potasio; derivado no hormonal del esteroide; tratamiento posterior a traumatismo de cabeza y al accidente cerebrovascular; prostaglandina; piscótropo; relajante; sedante; sedante-hipnótico; antagonista selectivo de la adenosina; antagonista de la serotonina; inhibidor de la serotonina; inhibidor selectivo de la captación de serotonina; antagonista del receptor de la serotonina; bloqueante del canal de sodio y calcio; esteroide; estimulante; y hormona tiroidea y agentes inhibidores. La cantidad del ligando que se puede combinar con los materiales de vehículo para producir una sola forma farmacéutica variará según el hospedador tratado, el tipo de antagonista utilizado y el modo de administración concreto. La composición se podría administrar como una única dosis, múltiples dosis o durante un periodo de tiempo establecido en una infusión.

Dosis

Las pautas de dosificación también se pueden ajustar para proporcionar la respuesta deseada óptima (p. ej., una respuesta terapéutica o profiláctica).

Típicamente, un médico determinará la dosis real que será la más adecuada para un determinado sujeto. Se podría variar la cantidad específica de la dosis y la frecuencia de dosificación para cualquier paciente concreto, y dependerá de una serie de factores, entre ellos la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción del compuesto, la edad, masa corporal, salud general, sexo, dieta, modo y momento de administración, velocidad de excreción, politerapia, la gravedad de la afección concreta y el tratamiento que se administre a la persona.

Típicamente, si la dosis se inyectase periféricamente, sería más alta, y si se inyectase en el cerebro, sería más baja.

Las composiciones para la administración se pueden formular para que se administre una dosis de ligando de 0,001 a 10 mg/kg de masa corporal al día. En algunas realizaciones de la invención, la dosis podría ser de 0,01 a 1,0 mg/kg de masa corporal al día. En algunas realizaciones, la dosis podría ser de 0,001 a 0,5 mg/kg de masa corporal al día.

Para el tratamiento con un anticuerpo que se fija a la secuencia diana de la PrP^C, la dosis puede oscilar, p. ej., de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg y más normalmente de 0,01 a 5 mg/kg (p. ej., 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.) de la masa corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 1 mg/kg de masa corporal o de 10 mg/kg de masa corporal o dentro del margen de 1 a 10 mg/kg, preferiblemente al menos 1 mg/kg. También se pretende que las dosis intermedias en los márgenes anteriores queden dentro del alcance de la invención. A los sujetos se les pueden administrar tales dosis diariamente, en días alternos, cada semana o de acuerdo con cualquier otra pauta determinada mediante el análisis empírico. Un tratamiento de ejemplo implica la administración en dosis múltiples a lo largo de un periodo prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Otras pautas de tratamiento de ejemplo implican la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Las pautas de dosificación de ejemplo incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg a la semana. En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de fijación se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado cae dentro de los márgenes indicados.

Las dosis explicadas son para sujetos humanos, a menos que se indique de otra manera. Las dosis para otras especies se ajustan en concordancia. En los ratones, las dosis típicas son de 2 mg/ratón. Esto es aproximadamente equivalente a una dosis de 30 mg/kg. Idóneamente, la dosificación es de 0,1 a 30 mg/kg.

Lo más idóneamente, cada proteína se podría administrar a una dosis de 0,01 a 30 mg/kg de masa corporal, preferiblemente de 0,1 a 10 mg/kg, más preferiblemente de 0,1 a 1 mg/kg de masa corporal.

Cuando se administran ácidos nucleicos para la expresión de la proteína, estos se administran idóneamente en cantidades capaces de mantener niveles de expresión que corresponden a los niveles de administración mencionados para las proteínas. Los polinucleótidos se podrían administrar directamente como un ácido nucleico desnudo. Cuando los polinucleótidos/vectores se administran como ácido nucleico desnudo, la cantidad de ácido

nucleico administrado podría estar típicamente en el margen de 1 µg a 10 mg, preferiblemente de 100 µg a 1 mg.

El ligando de acuerdo con la invención se podría utilizar como parte de un kit farmacéutico, que podría comprender además un medio de administración. Los medios para la administración incluyen, pero sin limitarse a ellos, jeringuillas y agujas, catéteres, inyectores biolísticos, aceleradores de partículas, a saber, «armas biolísticas», inyectores neumáticos «sin agujas», liberaciones prolongadas con esponjas de espuma de gel, otros materiales de liberación prolongada disponibles en el mercado, p. ej., hidrogeles, bombas osmóticas, y decantadores, suturas revestidas con polinucleótidos, parches cutáneos o aplicaciones tópicas durante la cirugía.

Cada uno de los kits farmacéuticos puede además comprender una hoja de instrucciones para la administración de la composición a un mamífero. Si el ligando se proporciona en forma liofilizada, el polvo seco o la torta podría también incluir cualquier sal, agente auxiliar, agente facilitador de la transfección y aditivos de la composición en forma seca. Tal kit podría además comprender un contenedor con una cantidad exacta de agua estéril libre de pirógenos para la reconstitución precisa de los componentes liofilizados de la composición.

El contenedor en el cual se envasa la composición antes de su uso puede comprender un contenedor sellado herméticamente que encierra una cantidad de la formulación liofilizada o una solución que contiene la formulación idónea para una dosis farmacéuticamente eficaz de la misma, o múltiplos de una dosis eficaz. La composición se envasa en un contenedor estéril y el contenedor sellado herméticamente está diseñado para que conserve la esterilidad de la formulación farmacéutica hasta su uso. Opcionalmente, el contenedor puede estar asociado a los medios de administración y/o a las instrucciones para su uso.

Ha sido sorprendente hallar que la prevención o disminución de la interacción entre las PrP impide la fijación del Aβ oligomérico a la PrP. Preferiblemente, el ligando que impide o disminuye las interacciones PrP:PrP impide la oligomerización de PrP desde monómeros, y como consecuencia de esto, se impide la fijación de Aβ. Este efecto sería complementario a la inhibición directa del sitio de fijación a ADDL y/o el sitio diana de PrP descrito en la presente memoria. En tal situación, por lo tanto, sería ventajoso administrar/utilizar un ligando que inhiba la interacción entre las PrP junto con uno o varios ligandos que se fijan al sitio diana de PrP descrito en la presente memoria.

También podría ser ventajoso administrar/utilizar un ligando que inhiba la región de fijación de la PrP a los ADDL junto con el ligando o ligandos que se fijan al sitio diana de la PrP descrito en la presente memoria.

También podría ser ventajoso administrar una combinación de ligandos de tres vías que inhiben la interacción entre las PrP, que inhibe la región de fijación de la PrP a los ADDL, y el ligando o ligandos que se fijan al sitio diana de PrP descrito en la presente memoria.

Los ligandos que pueden impedir o disminuir las interacciones entre las PrP se conocen bien en la técnica para el tratamiento de otras enfermedades en las que intervienen las proteínas priónicas, en particular en el sistema nervioso central. Los ligandos que se sabe que se usan para impedir o disminuir las interacciones entre las PrP, en particular en el sistema nervioso central, se incorporan en la presente memoria por referencia como ligandos que se podrían utilizar en combinación con los ligandos de la invención.

Los ligandos que actúan directamente de forma selectiva sobre el sitio de fijación de la PrP₉₅₋₁₀₅ a los ADDL también se conocen bien, tal y como se reconoció más arriba, y se incorporan en la presente memoria por referencia.

Otros componentes

Las aplicaciones de la invención podrían comprender además la administración de un agente terapéutico adicional; se describen composiciones, tales como composiciones farmacéuticas que comprenden un ligando de la invención y otro agente terapéutico. Los agentes terapéuticos adicionales incluyen, pero sin limitarse a ellos, agente adrenérgico, agente antiadrenérgico, agente antiandrógeno, agente antianginoso, agente ansiolítico, agente anticonvulsivo, agente antidepresivo, agente antiepiléptico, agente antihiperlipidémico, agente anitiperlipoproteínico, agente antihipertensor, agente antiinflamatorio, agente antiobesivo, agente antiparkinsoniano, agente antipsicótico, agente adrenocorticoesteroide, agente supresor corticosuprarrenal, agente antagonista de la aldosterona; agente aminoácido, esteroide anabólico; agente analéptico; agente andrógeno; regulador de la glucemia; agente cardioprotector; agente cardiovascular; agonista o antagonista colinérgico; desactivador o inhibidor de la colinesterasa, tal como galantamina, rivastigmina, tacrina y donepezilo; adyuvante o potenciador cognitivo; agente dopaminérgico; inhibidor enzimático, estrógeno, depurador de los radicales libres del oxígeno; agonista de GABA; antagonista de glutamato; hormona; agente hipocolesterolémico; agente hipolipidémico; agente hipotensor; agente inmunizador; agente inmunoestimulante; inhibidor de la monoamino oxidasa, agente neuroprotector; antagonista del N-metil-D-aspartato (NMDA), tal como memantina; antagonista de AMPA, antagonista de NMDA competitivo o no competitivo; antagonista de opioides; abridor del canal de potasio; derivado no hormonal del colesterol; tratamiento posterior al accidente cerebrovascular y al traumatismo encefálico; prostaglandina; agente psicótropo; relajante; sedante; agente sedante-hipnótico; antagonista selectivo de la adenosina; antagonista de la serotonina; inhibidor de la serotonina; inhibidor selectivo de la captación de serotonina; antagonista del receptor de la serotonina; bloqueador del canal de sodio y calcio; esteroide, estimulante; y hormona tiroidea y agentes inhibidores.

Otras aplicaciones

En principio, la invención se podría aplicar a cualquier escenario en el que se desea suprimir o interferir con la propia interacción entre PrP y A β . Con más detalle, la invención podría además aplicarse a uno o varios de lo que inhibe la supresión de la potenciación a largo plazo, lo que incrementa la retención de la memoria inmediata, mejora el funcionamiento de la memoria espacial y/o bloquea la disrupción de la plasticidad sináptica.

También se describe un ligando del que al menos parte de él se fija a al menos parte de la hélice 1 de la PrP para ser usado en la prevención o mejoría de las afecciones médicas relacionadas con la oligomerización de A β . Idóneamente, el oligómero de A β se hace a partir de formas no fibrilares solubles de A β . Idóneamente, la oligomerización de A β es la formación de placas de A β . Idóneamente, la afección médica es la plasticidad sináptica. Idóneamente la plasticidad sináptica se manifiesta como enfermedad de Alzheimer. Idóneamente, la PrP es la PrP^C. Idóneamente, el ligando es un anticuerpo. Idóneamente, el anticuerpo está humanizado.

Ventajas

Esta fijación en los aminoácidos 131 a 153 de la proteína priónica otorga varias ventajas sobre los ligandos conocidos en la técnica que actúan selectivamente sobre la región de fijación de la proteína priónica a los ADDL. La región de fijación a los ADDL se ha relacionado con la toxicidad, por ejemplo, con la señalización tóxica. Los ligandos que se fijan a esta región podrían contribuir a la señalización tóxica, p. ej., D13 e IgG P (Solfrosi, 2004) o 4H11 (Lefebvre-Roque, 2007). Es una ventaja de la invención que se pueden evitar tales efectos de toxicidad.

Los ligandos de acuerdo con la presente invención reconocen selectivamente la forma fisiológica de la PrP, PrP^C, mientras que los ligandos que se fijan a la región 95-105 donde se fijan los ADDL también se fijan a las formas aberrantes de la proteína priónica. Así pues, los ligandos de acuerdo con la presente invención podrían ayudar a estabilizar la forma normal de la proteína y, en particular, no contribuyen a estabilizar la forma aberrante de la proteína, lo que podría ser el caso para los ligandos de la técnica anterior dirigidos contra 95-105.

La región de fijación a los ADDL se ha sugerido que está implicada en varias funciones fisiológicas posibles de la PrP, que van desde la fijación a metal o glucosaminoglucano, a la endocitosis o prevención del estrés oxidativo. Por lo tanto, bloquear dicha región tal como en la técnica con el uso de ligandos que se fijan a 95-105 podría interferir con las funciones fisiológicas. Es una ventaja por utilizar los ligandos descritos en la presente memoria, de tal manera que se evitan estos problemas.

El hecho de que el ligando que se fija a 131-153 es eficaz a la hora de bloquear la fijación a los ADDL resulta sorprendente porque la región de la hélice 1 se encuentra en el lado geoméricamente opuesto de la proteína priónica con respecto a la región del sitio de fijación a los ADDL (Zahn, 2000) y, por lo tanto, se esperaría de hecho que fuera una de las regiones menos activas dada su distancia estructural a la región de fijación a los ADDL. Esto es incluso más sorprendente a la luz de estudios recientes que se centran en hallar posibles ligandos para otras regiones de la proteína priónica^{4,14}.

La invención se describe ahora por medio de ejemplos. Estos ejemplos pretenden ser ilustrativos y no se pretende que limiten las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Materiales. El A β ₁₋₄₂ era de California Peptide Research Inc. (Napa, CA) y el Dr. James I. Elliott en la Universidad de Yale (New Haven, CT) sintetizó y purificó el A β ₁₋₄₂ biotinilado con la biotina unida al Asp1 por un conector de 6 carbonos (bA β ₁₋₄₂). La masa y pureza de los péptidos se determinó por espectrometría de masas con ionización por electropulverización/atrapamiento de iones y HPLC en fase inversa, respectivamente. Se compraron otros reactantes a Sigma Aldrich, a menos que se mencione otra cosa.

Producción de preparaciones de ADDL/bADDL. Se pesó el bA β ₁₋₄₂ o el A β ₁₋₄₂ (~1,25 mg) en un tubo Eppendorf de 1,7 ml con tapón de rosca, se disolvió en hexafluoro-2-propanol (HFIP) enfriado en hielo a una concentración de 1 mM, se trató con ultrasonidos durante 10 min, se selló el tubo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, la solución se transfirió a un vial de vidrio de 2 ml y el HFIP se evaporó en una corriente de aire seco/N₂ para producir una película transparente. La película peptídica se disolvió en DMSO anhidro con agitación vorticial vigorosa durante 10 min para producir una solución a 5 mM y a continuación se diluyó a 100 μ M en un medio F12 de Ham sin rojo fenol (Promocell GmbH, Heidelberg, Alemania) y se mezcló con agitación vorticial durante 15 s. A continuación, se transfirió el mismo volumen de muestra a dos viales de vidrio sellados independientes y se incubaron a temperatura ambiente durante 16 h. Se produjo el A β ₁₋₄₂ monomérico mediante la disolución del péptido A β ₁₋₄₂ a 100 μ M en NaOH a 10 mM (pH 11) durante 1 hora y el estado monomérico se confirmó mediante cromatografía de exclusión por tamaños. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 14.200 $\times$ g durante 15 min para retirar cualquier agregado grande, y el 90% de la parte superior de cada solución se recogió, se utilizó inmediatamente, o se congeló instantáneamente en N₂ líquido y se conservó a -80 °C.

Cromatografía de exclusión por tamaños. Se prepararon en el momento alícuotas de 0,5 ml del A β ₁₋₄₂ a 100 μ M

(NaOH a 10 mM, pH 11), de los ADDL y de los bADDL (medio F12 de Ham sin rojo fenol, DMSO al 2%) se inyectaron en una columna Superdex 75 10/30 (GE Healthcare) y se eluyó con PBS a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min en una FPLC AKTA, y la elución de péptidos se monitorizó por la absorbancia a 280 nm.

5 Ultracentrifugación analítica para la velocidad de sedimentación. Los experimentos se realizaron en una ultracentrífuga analítica Beckman XLI. Los bADDL a 100 μ M recién preparados (medio F12 de Ham sin rojo fenol, DMSO al 2%) se centrifugaron a 50.000 rpm a 20 °C y los datos de absorbancia se recogieron a 278 nm. Los datos de velocidad de la sedimentación se analizaron tal y como está descrito^{32,33} y se presentaron gráficamente en el formato estándar con el coeficiente de sedimentación representado frente a la distribución del coeficiente de sedimentación.

10 Microscopía electrónica. Para el análisis, se cargó una gota de 4 μ l de bADDL/ADDL sobre rejillas de cobre descargadas para tinción negativa que previamente se habían revestido con una película continua de carbono. Se dejó que la muestra se adhiriera durante 30 s y el exceso de solución se secó cuidadosamente con papel absorbente Whatman de grado 4, la muestra se tiñó con acetato de uranilo al 2% (6 μ l) durante 30 s, se secó sobre papel absorbente y la rejilla se dejó secar al aire. Se tomaron las imágenes en una película a 42.986 $\times$ aumentos con el microscopio electrónico FEI Tecnai T12 operando a 120 kV. Se tomaron las imágenes en un margen de desenfoque de 700 nm a 1 μ m y una dosis de electrones de 10-20 electrones por $\text{\AA}^2$. Las películas se digitalizaron con un tamaño de salto de 7 μ m en un escáner de películas Zeiss SCAI, lo que arroja un tamaño de píxel de 1,63 $\text{\AA}$.

20 SDS-PAGE. Se hirvieron las alícuotas (5 y 10 μ l) de preparaciones de bADDL y ADDL a 10 μ M en tampón de muestra y se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 16% en tris-tricina y se les analizó el contenido de A β por comparación con los estándares conocidos de A β tras la visualización con tinción de plata. Como alternativa, los ADDL/bADDL se diluyeron a 1:10 (1 μ M) en tampón de muestra y se utilizaron sin hervir para la transferencia Western con el extremo amino del anticuerpo anti-A β , 6E10 (Signet, Dedham, MA). Las bandas inmunorreactivas se detectaron y se cuantificaron con un sistema de toma de imágenes Licor Odyssey (Licor Biosciences, Lincoln, NE, EE. UU.).

25 Preparación de muestras de cerebro humano con EA. Se utilizaron tres cerebros para este estudio: uno de una mujer de 78 años de edad con antecedentes de demencia y enfermedad de Alzheimer confirmada (de Asterand, Detroit, MI), un segundo cerebro de una mujer de 80 años (banco de cerebros del Instituto de Neurología de la UCL) con diagnósticos clínicos y patológicos de EA, y el otro cerebro era de una mujer de 68 años cognitivamente intacta (banco de cerebros del Instituto de Neurología de la UCL). Las muestras congeladas de la corteza temporal posterior se descongelaron en hielo y la materia gris se diseccionó para su uso, se cortó en trozos pequeños con una cuchilla de afeitar y a continuación se homogeneizó con 25 impulsos de un homogeneizador Dounce (Fisher, Ottawa, Canadá) en 5 volúmenes de Tris-HCl a 20 mM enfriado en hielo, pH 7,4, que contenía NaCl a 150 mM (TBS). Para aislar el A β hidrosoluble, libre de material asociado a la placa o unido a las membranas, se centrifugaron los homogeneizados a 91.000g y 4 °C en un rotor 55 TLA (Beckman Coulter, Fullerton, CA) durante 78 min, se retiró el sobrenadante y se utilizó. Para eliminar las moléculas bioactivas de masa molecular baja y los fármacos, se dializaron los homogeneizados a 4 °C con casetes de diálisis Slide-a-Lyzer™ con un umbral de corte para masas moleculares de 2 kDa (Fisher, Dublín, República de Irlanda) frente a un volumen total de 5 l de TBS (con 2 cambios) durante un periodo de 48 h. A continuación, el dializado se distribuyó en lotes de alícuotas de 1 ml y se conservó a –80 °C hasta su posterior uso, o bien se utilizó directamente para medir la cantidad y la forma del A β presente. Para lo último, se inmunoprecipitaron 0,8 ml del dializado con AW7³⁴ a una dilución de 1:80 y se analizó por transferencia Western con una combinación de anticuerpos monoclonales del extremo carboxilo, 2G3 y 21F12, cada uno a una concentración de 2 μ g/ml (Dr. Peter Seubert, Elan Pharmaceuticals, San Francisco, CA). Las bandas inmunorreactivas se visualizaron con un anticuerpo secundario conjugado a fluorocromo (Rockland, Gilbertsville, PA) y se cuantificó por comparación con estándares sintéticos de A β en un sistema de toma de imágenes Licor Odyssey (Licor Biosciences, Lincoln, NE, EE. UU.).

50 Generación de una línea genosuprimida de PrP congénica con FVB/N. La línea congénica de FVB/N-*Prnp*^{0/0} (sin PrP) se generó mediante 10 generaciones de retrocruzamiento de ratones ZH1³⁵ sin PrP con FVB/N seguidos del análisis genético por Charles River (Margate, GB) con 84 marcadores microsatélite para PCR específicos de FVB que cubren 19 cromosomas a aproximadamente intervalos de 20 cM para seleccionar parejas de crianza positivas para el 100% de los marcadores específicos de FVB. Las parejas congénicas seleccionadas se cruzaron entre sí para retirar el gen murino endógeno de PrP y para restaurar la homocigosidad del alelo genosuprimido.

55 Electrofisiología *in vitro*. Los ratones macho sin PrP (MRC Prion Unit) o FVN/N (Harlan, Wyton, GB) de dos a cuatro meses de edad se utilizaron para estudiar los efectos de los bADDL y de los extractos de cerebro humano que contienen A β . Además, se utilizaron ratones C57BL/6J (Charles River, Margate, GB) de dos a tres meses de edad para examinar los efectos de los bADDL/ADDL y los anticuerpos anti-PrP, ICSM-18 e ICSM-35. En todos los casos, los ratones se anestesiaron con isoflurano/O₂ y se les decapitó. Se les retiró el cerebro rápidamente y se sumergió en líquido cefalorraquídeo artificial con sacarosa (LCRAS) enfriado en hielo que contenía NaCl a 87 mM, KCl a 2,5 mM, MgSO₄ a 7 mM, CaCl₂ a 0,5 mM, NaHCO₃ a 25 mM, glucosa a 25 mM, NaH₂PO₄ a 1,25 mM y sacarosa a 75 mM. Los cortes parasagitales (350 μ m) se prepararon en un vibrátomo VT1000S de Leica con cuchillas de afeitar de acero inoxidable (Campden, Loughborough, GB). Los cortes se transfirieron inmediatamente a una cámara de

espera (BSC-PC, Warner Instruments, Hamden, CT) que contiene LCRA: NaCl a 119 mM, KCl a 2,5 mM, MgSO₄ a 1,3 mM, CaCl₂ a 2,5 mM, NaHCO₃ a 26,2 mM, glucosa a 11 mM y NaH₂PO₄ a 1,25 mM. En el LCRA en circulación se burbujeó continuamente una mezcla de O₂ al 95% y CO₂ al 5%, y los cortes se dejaron recuperar durante al menos 90 min a temperatura ambiente.

5 Los registros extracelulares se realizaron como se describió anteriormente (O'Nuallain et al. 2010). Brevemente, los cortes se sumergieron en una cámara de registro y se perfundieron con LCRA oxigenado a una velocidad de 2-3 ml/min y el perfundido se calentó a 30 °C con un tubo de calentamiento alineado (HPT-2A, ALA Scientific Instruments, Westbury, NY). Se utilizó un microelectrodo de acero inoxidable (FHC, Bowdoin, EE. UU.) para estimular las fibras colaterales de Schaffer y los PPE de campo extracelular (PPEc) se registraron del *stratum radiatum* de CA1 utilizando un microelectrodo de vidrio. Los PPEc se registraron con un amplificador Multiclamp 700B en tándem con un digitizador Digidata 1440A (Axon Instruments). Los datos se recogieron con el programa informático pClamp 10 y se analizaron con Clampfit 10.2 (Molecular Devices). Para todos los experimentos, los estímulos problema se administraron una vez cada 30 s (0,033 Hz) y la intensidad del estímulo se ajustó para dar un PPEc basal del 40-50% de la respuesta máxima. Se registró un nivel basal estable durante al menos 20 min antes de la aplicación de ADDL/anticuerpo. En los experimentos que utilizan los bADDL/ADDL (las soluciones madre se diluyeron a 1:200 en LCRA para producir concentraciones nominales de 500 nM basándose en el peso de partida del monómero de A β ₁₋₄₂) o extractos de cerebro humano en TBS (1 ml de extracto diluido en 20 ml de LCRA), la muestra se añadió al perfundido 30 min antes de la inducción de la PLP. Cuando se utilizó una combinación de ADDL y anticuerpos anti-PrP, se añadió el anticuerpo al perfundido 20 min antes de los ADDL. Se indujo la PLP mediante una estimulación con ondas θ (TB, 10 ráfagas de 4 estímulos de 100 Hz, con un intervalo entre ráfagas de 200 ms) dadas a una intensidad basal. El LCRA se recicló con bombas peristálticas (101U/R, Watson-Marlow, GB) asegurándose de que los ADDL, las muestras de cerebro y/o los anticuerpos estaban presentes durante todo el experimento. La PLP se expresa como la media $\pm$ % de EEM de la pendiente de PPEc basal. Las comparaciones estadísticas utilizaron ANOVA con una prueba de Tukey-Kramer *post-hoc*. Todos los experimentos se interpolaron con respecto al genotipo. Además, los experimentos con A β procedentes de ADDL/bADDL/cerebro humano y con vehículo se realizaron el mismo día, lo que garantiza que cada animal era su propio control, mientras que se alternaron los tratamientos cada día para evitar cualquier sesgo temporal.

Electrofisiología *in vivo*. Los estudios *in vivo* con ratas Wistar adultas macho (250-300 g) anestesiadas con uretano (1,5 mg/kg i.p.) fueron autorizados por el comité de revisión de ética del Trinity College de Dublín y por el Departamento de Salud de la República de Irlanda. Los electrodos se fabricaron y se implantaron tal y como se ha descrito previamente³⁶. Brevemente se construyeron electrodos bipolares de alambre trenzado de cables de tungsteno revestidos con Teflón (diámetro interno del núcleo de 62,5 μ m, diámetro externo de 75 μ m). Los registros por vía única de los PPEc se hicieron del *stratum radiatum* en el área de CA1 del hemisferio derecho del hipocampo en respuesta a la estimulación de la vía colateral-comisural de Schaffer ipsilateral. Los sitios de implantación de los electrodos se identificaron con coordenadas estereotácticas respecto a la bregma, con el sitio de registro localizado 3,4 mm detrás de la bregma y 2,5 mm a la derecha de la línea media, y el electrodo estimulador localizado 4,2 mm detrás de la bregma y 3,8 mm a la derecha de la línea media. La profundidad óptima de los cables de los electrodos en el *stratum radiatum* de la región de CA1 del hipocampo dorsal se determinó con criterios electrofisiológicos y se comprobó después de la muerte. Se provocaron los PPEc de prueba a una frecuencia de 0,033 Hz y a una intensidad de estimulación ajustada para desencadenar una amplitud de PPEc del 50% de máximo. El protocolo de estimulación de alta frecuencia (EAF) para inducir la PLP consistió en 10 ráfagas de 20 estímulos con un intervalo entre estímulos de 5 ms (200 Hz) y un intervalo entre ráfagas de 2 s. La intensidad se incrementó para dar un PPE del 75% de la amplitud máxima durante la EAF. Para inyectar muestras, se implantó una cánula de guía de acero inoxidable (22 gauges, diámetro exterior de 0,7 mm, 13 mm de longitud) por encima del ventrículo lateral derecho (1 mm lateral a la línea media y 4 mm por debajo de la superficie de la duramadre) justo antes de la implantación de los electrodos. Los animales recibieron dos inyecciones intracerebroventriculares (i.c.v.) a través de una cánula interna (28 gauge, diámetro externo de 0,36 mm). La primera inyección contenía agua como vehículo, ICSM-18 o anticuerpo de control de isotipo IgG1 de ratón (MAB002, R&D Systems, Mineápolis) en un volumen de 10 μ l. La segunda inyección (5 μ l), que contenía agua como vehículo o bien extracto de cerebro humano en TBS, se administró 30 min después, 15 min antes la EAF. El experimentador no conocía el grupo de tratamiento en el experimento en el que se comparaban directamente el ICSM-18 y el anticuerpo de control. La verificación de la colocación de la cánula se realizó después de la muerte, mediante la comprobación de la diseminación de la tinta colorante inyectada i.c.v. La PLP se expresa como la media $\pm$ EEM de la amplitud del % de PPE de campo basal registrada durante al menos 30 minutos del periodo de basal. Se obtuvieron resultados parecidos cuando se midió la pendiente de PPE. Las comparaciones estadísticas utilizaron el ANOVA con la prueba de Tukey *post hoc*, pruebas de la *t* de Student emparejadas y sin emparejar, o la prueba de la *U* de Mann Whitney, según fuera apropiado.

Expresión y purificación de proteínas. Las construcciones de PrP de humano se expresaron³⁷ y se purificaron³⁸ tal y como está descrito con anterioridad. La calidad de las proteínas se confirmó por SDS-PAGE, espectrometría de masas MALI-TOF y espectroscopia de dicroísmo circular.

60 Ensayo DELFIA®³⁹. Se fijaron 100 μ l de PrP de humano a 1 μ M (carbonato de sodio a 10 mM, pH 9,6) a placas blancas de 96 pocillos con medio de fijación (Greiner) durante una noche a 4 °C, se lavaron con 3 $\times$ 300 μ l de PBS (Tween-20 al 0,05%), se bloquearon con 300 μ l de SAB al 2% en PBS (Tween-20 al 0,05%) a 37 °C durante 2 h, y

se lavaron con $3 \times 300 \mu\text{l}$ de PBS (Tween-20 al 0,05%). Si era necesario, $100 \mu\text{l}$ de anticuerpo se incubaron a continuación en PBS (Tween-20 al 0,05%) durante 1 h y se lavaron con $3 \times 300 \mu\text{l}$ de PBS (Tween-20 al 0,05%). Se incubaron $100 \mu\text{l}$ de diferentes preparaciones de $\text{A}\beta_{1-42}$ en PBS (Tween-20 al 0,05%, SAB al 0,1%) durante 1 h y se lavaron con $3 \times 300 \mu\text{l}$ de PBS (Tween-20 al 0,1%). Se detectó el $\text{A}\beta$ con $100 \mu\text{l}$ de 6E10 a $1 \mu\text{g/ml}$ en PBS (Tween-20 al 0,05%) durante 1 hora, se lavaron con $3 \times 300 \mu\text{l}$ de PBS (Tween-20 al 0,05%), se incubaron durante 30 min con 300 ng/ml de anticuerpo antirratón Eu-N1 de DELFIA® en el tampón de ensayo de DELFIA®, se lavaron con $3 \times 300 \mu\text{l}$ de PBS (Tween-20 al 0,05%) antes del realce con $100 \mu\text{l}$ de la solución de realce de DELFIA®. Se detectó el $\text{A}\beta$ biotinilado con $100 \mu\text{l}$ de estreptavidina Eu-N1 de DELFIA® a 50 pM (tampón de ensayo de DELFIA®) y se lavó con $3 \times 300 \mu\text{l}$ de PBS (Tween-20 al 0,05%) antes del realce con $100 \mu\text{l}$ de la solución de realce DELFIA®.

10 Determinación de la fijación (afinidad) del anticuerpo

Para los experimentos de fijación del anticuerpo contra PrP (p. ej., determinación de la afinidad de los ligandos por la PrP), se incubaron los anticuerpos ICSM durante 30 min con 300 ng/ml de anticuerpo antirratón Eu-N1 de DELFIA® en el tampón de ensayo de DELFIA®, se lavó con $3 \times 300 \mu\text{l}$ de PBS (Tween-20 al 0,05%) antes del realce con $100 \mu\text{l}$ de la solución de realce de DELFIA®. La fijación de los anticuerpos a la PrP se detectó mediante la incubación durante 30 min con el anticuerpo antirratón Eu-N1 de DELFIA® a 300 ng/ml en el tampón de ensayo de DELFIA®, se lavó con $3 \times 300 \mu\text{l}$ de PBS (Tween-20 al 0,05%) antes del realce con $100 \mu\text{l}$ de la solución de realce de DELFIA®. A las placas se les escaneó la intensidad de fluorescencia resuelta en el tiempo de la sonda de europio ($\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 615 \text{ nm}$) utilizando un lector de placas EnVision de Perkin Elmer. Las constantes de fijación se calcularon con una isoterma Langmuir de 1 sitio y se les analizaron las características de fijación fuerte con la ecuación $y = (F_{\text{min}} + (((L + E_0 + K_d) - (((L + E_0 + K_d)^2 - 4 \times E_0 \times L)^{0.5}) / (2 \times E_0)) \times (F_{\text{max}} - F_{\text{min}})))$, donde F_{min} = fluorescencia mínima, F_{max} = fluorescencia máxima, E_0 = la concentración total de los sitios de fijación, K_d = la constante de disociación y L = concentración total de $\text{A}\beta$. Esto asegura que se pueda medir una K_d verdadera y que no se ha producido la saturación directa de la superficie de la proteína en cuanto se añaden las cantidades estequiométricas del péptido.

Modelización molecular. Se construyó como sigue un modelo del complejo del anticuerpo ICSM-18 completo con la $\text{PrP}^{\text{C}}_{119-231}$ de humano. Dos copias del correspondiente complejo PrP-Fab (2W9E) se superpusieron sobre los dominios Fab de una estructura de anticuerpo IgG completo de humano (1HZH). Se le retiraron los dominios Fab de humano y se reconstruyeron los bucles entre los dominios de 1HZH-Fc y 2W9E-Fab.

Ejemplo 1: Se construyó la partícula de ADDL mediante la elaboración primero de un modelo atómico completo de $\text{A}\beta_{1-42}$ como una hebra β extendida con ausencia de carga en las cadenas laterales y en los extremos. Esta molécula se sometió a una simulación de dinámica molecular a 1000 K durante $0,1 \text{ ns}$ y las estructuras se guardaron cada 1 ps . La cadena colapsada en una estructura globular después de 25 ps de simulación y las 57 estructuras más compactas se eligieron de los últimos 75 ps de la simulación. Se midió la extensión espacial máxima de estas moléculas seleccionadas (en las tres dimensiones) y se encontró que estaba justo por debajo de $3,0 \text{ nm}$. Estas 57 moléculas se colocaron al azar en los 57 sitios vacantes de la matriz esférica fabricada al retirar las esquinas de $8 \times 8,5$ adecuadas (a saber, 7 por esquina y 3 compartidos con esquinas adyacentes) de una matriz cúbica de $5 \times 5 \times 5$ con un espaciamiento entre celdillas de $3,0 \text{ nm}$. El estado de protonación de las 57 moléculas de $\text{A}\beta_{1-42}$ se restableció para que correspondiese a $\text{pH } 7$, se añadieron las moléculas de agua en una capa de $3,5 \text{ \AA}$ en torno a cada polipéptido y el complejo se relajó 2000 etapas de minimización de energía. El complejo se sometió a $0,1 \text{ ns}$ de dinámica molecular a 300 K , lo que dio lugar a un modelo de ADDL hidratado y aproximadamente esférico con un diámetro en torno a 10 nm (y una densidad de proteína correspondiente de $0,82 \text{ g l}^{-1}$).

El extremo amino de la molécula de PrP^{C} , tomada del complejo con Fab (2W9E) en estructura cristalizada se extendió hacia el resto 95 como un polipéptido sin estructura. Las copias de esta molécula se acoplaron manualmente a la superficie de la partícula de ADDL en un anillo en torno al «ecuador» para ilustrar cómo las interacciones laterales entre tales moléculas priónicas fijadas a la superficie podrían ocluir la hélice 1 y así comprometer la fijación del ICSM-18. Se realizaron gráficos moleculares y se elaboró el modelo con el uso de InsightII (2005), y los cálculos de energía se hicieron con Discover 2.98 (Accelrys).

Ejemplo 1: Caracterización de las preparaciones reproducibles de los ADDL.

Se utilizó un procedimiento normalizado para generar preparaciones de ADDL a partir del $\text{A}\beta_{1-42}$ o preparaciones de bADDL a partir del $\text{A}\beta_{1-42}$ biotinilado ($\text{bA}\beta_{1-42}$), y a continuación se valoró la coherencia de las especies producidas mediante una batería de pruebas biofísicas. Tanto el $\text{A}\beta$ normal como el biotinilado se utilizaron para confirmar que la biotinilación no alteró fundamentalmente las propiedades de los oligómeros. La cromatografía de exclusión por tamaños (CET) que utiliza 3 tampones de cromatografía diferentes mostraron que tanto los ADDL como los bADDL tenían perfiles muy parecidos, que tenían dos picos prominentes (figura 1a y figura 2). El primer pico se eluyó en el volumen de vacío y el segundo se eluyó en un volumen concordante con el monómero de $\text{A}\beta^{21}$. Además, ambos picos tenían hombros delante y detrás, lo que sugiere la presencia de oligómeros poco abundantes de tamaño intermedio entre el monómero de $\text{A}\beta$ y el material de vacío. Dada la escasa resolución de tamaños de la CET y la posibilidad de formar artefactos que obedecen a interacciones no idóneas con la columna, las preparaciones de bADDL también se analizaron con una técnica que la mide en solución, la ultracentrifugación analítica (figura 1b). La sedimentación de los bADDL se produjo en dos fases diferentes que contenían aproximadamente el 60% y el 40%

del material, respectivamente. La sedimentación inicial contenía una mezcla de especies con unas masas calculadas que oscilan entre 90-400.000, y que contenía aproximadamente el 60% del péptido. La porción de sedimentación lenta contenía una única especie con una masa molecular calculada de 5-6.000, cercana al valor esperado para el péptido A β monomérico biotinilado. De acuerdo con los resultados de la CET, los datos del ABC confirman que las preparaciones de bADDL son heterogéneas e incluyen el monómero de A β , cantidades pequeñas de n-oligómeros inferiores y especies con masas calculadas de más de 90.000. Es digno de atención que, en todas las muestras analizadas, las preparaciones de bADDL contenían cantidades ligeramente más grandes de especies de alta masa molecular que los ADDL (figuras 1a y 2). En concordancia con otras valoraciones biofísicas, la microscopia electrónica de tinción negativa confirmó que las preparaciones de ADDL y bADDL contenían una mezcla de especies con diferentes tamaños, que van de estructuras globulares con un diámetro de 8 a 12 nm a varillas flexibles de 15 a 60 nm de longitud y un diámetro de 5-10 nm (figura 1c y figura 3). Estas estructuras son reminiscentes de las detectadas por Laurén et al.¹, pero se contraponen a las estructuras totalmente globulares observadas por Chen et al.¹⁴ cuando se preparan con un simple tampón de fosfato. Las especies detectadas con la CET, el ABC y la ME eran inestables en SDS y migraron en los SDS-PAGE predominantemente como monómeros (figura 1d); no obstante, se detectó una pequeña cantidad de especies de A β de masa molecular más alta si las muestras no se hervían antes de la SDS-PAGE y las proteínas se visualizaban por transferencia Western. Ya que un factor importante que se ha visto que influye en la producción de las preparaciones de ADDL de la composición concordante es la solubilización eficaz de A β tratada con HFIP, se utilizó la SDS-PAGE y la tinción con plata como medios simples para medir la cantidad total de A β presente en todas las preparaciones de los ADDL. Estos experimentos revelaron que la concentración real de A β total en las preparaciones de ADDL varió entre 70 y 90 μ M (basándose en la masa molecular del monómero de A β), menor que la concentración de 100 μ M basada en la cantidad de partida de A β .

Ejemplo 2: Tanto el A β procedente de cerebro con EA como los ADDL inhiben la PLP de una manera dependiente de la PrP.

Después de haber establecido procedimientos para producir y caracterizar las preparaciones de bADDL y ADDL, se valoró su efecto sobre la plasticidad sináptica y para determinar si este efecto requería la expresión de la PrP. Tal y como se esperaba, las preparaciones de bADDL así como las de ADDL inhibieron significativamente la PLP en los cortes del hipocampo de ratones FVB/N y C57B6/J de tipo silvestre ($P < 0,01$, figura 4a y figura 5). Con una línea de ratones sin PrP congénicos con FVB/N, se investigó después si esta inhibición mediada por A β sobre la PLP requería la expresión de la PrP. Como en un estudio anterior que utilizaba otros modelos de ratón sin PrP¹, los bADDL que bloqueaban la PLP en los ratones de tipo silvestre no lograron deteriorar la PLP en los hipocampos de los ratones sin PrP (figura 4b). Aunque estos resultados sugieren una posible función de PrP en la disminución de la PLP del hipocampo mediada por los bADDL, no está claro si tales preparaciones incluyen especies de A β que se producen en el cerebro con EA. Así pues, se determinó el hecho de si los extractos hidrosolubles del cerebro con EA que contienen dímeros de A β estables en SDS también necesitaban la expresión de la PrP para sus efectos de deterioro de la plasticidad. Para estos experimentos se utilizó un extracto de cerebro de un sujeto control sin demencia que carecía de A β detectable y un extracto en solución salina tamponada con Tris (TBS) de un cerebro con EA que contenía cantidades significativas del monómero de A β y un dímero estable en SDS (figura 4c). Al igual que en los experimentos anteriores²², los extractos que contienen A β inhibieron potencialmente la PLP en los cortes de ratones FVB/N (figura 4d, $P > 0,05$), mientras que los extractos en TBS que carecían de A β no tenían ningún efecto (figura. 4d). Es importante señalar, al igual que en el caso de los bADDL (figura 4b), que el bloqueo de la PLP mediado por el A β procedente de cerebro necesitaba la expresión de la PrP^C, y que el extracto de EA en TBS era incapaz de alterar la PLP en los cortes del hipocampo de los ratones sin PrP (figura 4d). Tal y como se esperaba, la aplicación de TBS de un cerebro de control, que carecía de cantidades detectables de A β , no tuvo ningún efecto sobre la PLP en los cortes de ratones FVB/N que expresan la PrP o bien sin la PrP (figura 4d y $168 \pm 10\%$ frente a $164 \pm 10\%$, respectivamente). Estos hallazgos ofrecen unas pruebas importantes de que se necesita la PrP para los efectos de deterioro de la plasticidad ocasionados por las especies de A β procedentes de cerebro relevantes patogénicamente, y sugieren que la PrP podría ser necesaria para los cambios de la función sináptica que caracterizan las primeras etapas de la EA²³. Respecto a cómo se relacionan las especies de A β activas en el cerebro humano con las especies activas presentes en una preparación de A β , tal como los ADDL, merece la pena destacar que ambas fuentes son heterogéneas. En el caso de extractos acuosos del cerebro humano, se ha demostrado que los dímeros estables en SDS intervienen en la toxicidad sináptica; sin embargo, esta necesidad no existe necesariamente como dímeros de A β independientes, sino que también podrían incluir grandes agrupaciones construidas de dímeros estables en SDS^{22,24}, algunos de los cuales podría solaparse en tamaño y estructura con las agrupaciones presentes en la preparación de ADDL muy heterogénea (figura 1 y Hepler et al.²⁰).

Ejemplo 3: Se puede actuar selectivamente en muchos sitios sobre la interacción de alta afinidad entre PrP y ADDL.

Después de haber establecido el requisito de PrP para la actividad de deterioro de la plasticidad debido tanto al A β procedente del cerebro con EA como a los ADDL, se estudió la fijación a PrP en las preparaciones activas de A β . La caracterización previa de la interacción entre PrP y A β se ha llevado a cabo con preparaciones sintéticas de A β que actuaban de una manera independiente de la PrP³, no habían resultado ser tóxicas^{4,14} o se estudiaron a concentraciones micromolares^{3,14}. Se indagó en la interacción con el uso de un ensayo DELFIA® de alto rendimiento sobre placas. Se detectó una respuesta de fijación entre la huPrP₂₃₋₂₃₁ y los bADDL o bien los ADDL a

concentraciones nanomolares bajas, con constantes de disociación aparentes para el A β total de 82 ± 7 nM y 100 ± 30 nM, respectivamente (figura 6a), sin ninguna indicación de un componente de fijación fuerte (véase Materiales y métodos). Dado que la concentración total de A β presente en la solución madre era de media el 20% menor que el valor de 100 μ M procedente del peso del polvo del péptido de partida, que una porción significativa del péptido permanecía como monómero (figuras 1a y 1b) y que la concentración molar de los oligómeros de A β debe (debido a su masa molecular más alta) ser más baja que la concentración basada en el contenido de monómeros, es evidente que una o varias de las especies presentes en las preparaciones de ADDL se fija a la PrP con mucha fuerza, probablemente en el margen picomolar. Por el contrario, el monómero A β no presentó fijación a PrP a concentraciones $\leq 3 \times 10^{-7}$ M (figura 13a). Se observó la fijación inespecífica del oligómero a una superficie de SAB de fondo tanto con los ADDL como con los bADDL cuando la concentración se elevaba desde una alta nanomolaridad hasta una baja micromolaridad, lo que resalta la importancia de estudiar esta interacción en el margen nanomolar con preparaciones de oligómeros bien definidas. Además, la modesta fijación observada cuando se usaron concentraciones micromolares del monómero se debió probablemente a la agregación espontánea de la A β en este margen de concentraciones²⁴ y, una vez formados tales agregados, se pudieron fijar a la PrP. En consecuencia, todos los experimentos posteriores se llevaron a cabo con los bADDL a una concentración de 100 nM (equivalente de monómeros A β), que era donde se podía medir la interacción más específica. Dado que tanto PrP²⁵ como A β ²⁶ se sabe que contienen sitios de fijación al cobre de alta afinidad en posiciones relevantes, se estudió la posibilidad de que su interacción pudiera estar mediada por la quelación del cobre. La adición de EDTA hasta 10 mM no cambió el nivel de fijación de los bADDL (figura 7). A estas concentraciones, el EDTA debería ser capaz de desplazar el cobre tanto de PrP como de A β ²⁷, lo que excluye que la quelación inespecífica de cobre sea el mecanismo de interacción entre PrP y A β .

La fijación a las construcciones de PrP de diferente longitud mostró que a la huPrP₉₁₋₂₃₁ se fijaba una cantidad parecida de bADDL a la que se vio con la construcción completa, lo que sugiere que el sitio de fijación de alta afinidad que es clave no estaba en la región 23-91 (figura 6b). Por el contrario, la huPrP₁₁₉₋₂₃₁ no mostró casi ninguna fijación, lo que confirmó la importancia de la región 91-119 en la interacción de alta afinidad entre PrP y A β . Un ensayo de competición, mediante el que se incrementaba la concentración de las diferentes construcciones de PrP que se incubaban con los bADDL para impedir la fijación a la huPrP₂₃₋₂₃₁ fijada en la superficie, confirmó que la interacción pudo ocurrir en la solución y reveló que mientras que la región 23-90 no parecía contener un sitio de fijación de alta afinidad independiente, estaba de hecho involucrado en la modulación de la interacción de alta afinidad (figura 6c).

Se analizó a continuación la capacidad que tiene el anticuerpo ICSM-35 de fijarse a un epítipo contenido entre los restos 95 y 105 de la PrP⁷, el posible sitio de fijación de los ADDL¹, mediante la determinación de su capacidad para bloquear la interacción entre PrP y A β . Este anticuerpo bloqueó la fijación de los bADDL a la PrP de una manera clásica, dependiente de la dosis, con una CI_{50} de $10,4 \pm 1,7$ nM (figura 6d). Un cribado selectivo de 28 anticuerpos de fijación a PrP preincubados con PrP antes de añadirles los bADDL mostró que todos los anticuerpos que se fijan completamente a la PrP eran capaces de bloquear la fijación de los bADDL, al menos *in vitro*, aunque con distinta eficacia (figura 6e). Las diferencias de eficacia eran claramente dependientes del epítipo, pues los que se interaccionaban directamente con el posible sitio de fijación de los ADDL eran más eficaces, seguidos de los que se fijaban a la hélice 1 de la PrP, mientras que los que se fijaban a otras regiones estructuradas de la proteína eran los menos eficaces. No había ninguna correlación dependiente del epítipo entre el nivel de fijación del anticuerpo y el nivel de inhibición, aunque, como se esperaba, cada anticuerpo que no conseguía mantenerse fijado a la PrP no inhibía la fijación de los bADDL. Además, los dos anticuerpos mejor caracterizados que se fijan a la hélice 1 y al epítipo en 95-105 (ICSM-18 e ICSM-35, respectivamente) se fijan a la proteína priónica completa de humano con una afinidad de 10 nM aproximadamente, bloquean el oligómero A β con una constante de inhibición de aproximadamente 20 nM, pero siguen siendo diferentes en la magnitud de su inhibición (figura 13). ICSM-18 e ICSM-35 se escogieron para la posterior caracterización como miembros representativos de los grupos que se fijan a la hélice 1 y al epítipo en 95-105, respectivamente, debido a su probada eficacia como tratamiento antipriónico que no ocasiona toxicidad con tratamientos breves⁶ y porque la estructura del complejo PrP:ICSM-18 se había resuelto con resolución atómica⁸.

Resulta sorprendente la capacidad que tiene el ICSM-18 para bloquear la interacción, a pesar de que se fija a un epítipo muy alejado del segmento 95-105 (figura 6f). Es poco probable que la asociación de PrP con A β se reduzca significativamente por la unión al anticuerpo, ya que, al ser una estructura más grande, difundirá muy poquito y muy despacio. La velocidad de disociación de la PrP desde la estructura con A β no es probable que se incremente por interacciones de unión con el anticuerpo debido a los efectos del solvente sobre un soluto voluminoso. El anticuerpo tampoco es probable que altere la estructura del agua ni las propiedades dieléctricas que rodean la interfase de la interacción entre PrP y A β ; así pues, la mayoría de las interacciones hidrófobas o electrostáticas no se verán afectadas. Sin embargo, si fuera necesario el contacto entre las PrP para estabilizar la capa de PrP adherida a los agregados de A β , entonces la interacción con los anticuerpos lo impediría ciertamente y se debilitaría el sistema. Los muchos sitios de fijación de PrP estarían sugiriendo que el oligómero contiene una estructura repetida. Podría ser que tales anticuerpos impidan la fijación de ensamblajes de A β más grandes, pero no de especies más pequeñas. Del mismo modo, la reorganización de la proteína sobre la superficie de la membrana acercaría mucho estos epítopos, con lo que el ICSM-18 podría bloquear estéricamente la interacción, aunque sea poco probable que esto

sea la causa del efecto en un ensayo bioquímico en placas y no explicaría la fuerte inhibición de los anticuerpos dirigidos contra la hélice 1 en comparación con los que se fijan a las áreas estructuradas cercanas al sitio de unión del oligómero de A β . Cualquiera de las dos opciones abre la posibilidad de usar muchos anticuerpos para el bloqueo terapéutico de esta interacción. Además, estos resultados validan el uso de este nuevo sistema de alto rendimiento a modo de una útil primera ronda de cribado para identificar los fármacos candidatos capaces de inhibir o modular la fijación de los ADDL a la PrP.

Ejemplo 4: Los anticuerpos terapéuticos bloquean *in vivo* la ruptura de la PLP mediada por A β .

Para evaluar adicionalmente el potencial de los dos mejores anticuerpos monoclonales identificados en nuestra pantalla y que pertenecen a los dos grupos de anticuerpos que bloqueaban con más eficacia *in vitro* la fijación de los ADDL a la PrP (figura 6e), se examinó si estos anticuerpos también podían bloquear el deterioro de la plasticidad sináptica mediado por A β . Para asegurarse de que el efecto no estaba solo presente en los ratones FVB/N, esta parte del estudio se realizó con el modelo C57B6/J, el que se utiliza con más frecuencia para los estudios electrofisiológicos. La perfusión de los cortes de hipocampo de ratones C57B6/J con los ADDL 30 min antes de la inducción de la PLP disminuyó significativamente la PLP en comparación con los cortes tratados únicamente con el control de tampón (figura 9a, $P < 0,01$), mientras que la aplicación previa de concentraciones bajas del anticuerpo anti-PrP, ICSM-35 (2 $\mu\text{g/ml}$, 13 nM), abolió el deterioro de la PLP mediado por los ADDL (figura 9a, $P < 0,01$). De igual forma, cuando los cortes se incubaron con el ICSM-18 20 min antes de los ADDL, este anticuerpo también protegió contra el bloqueo de la PLP mediado por los ADDL (figura 9b, $P < 0,01$). Es importante señalar que ICSM-18 e ICSM-35 no tenían un efecto significativo sobre la PLP cuando se administraban solos (figuras 8a y 8b). El ICSM-35 se dirige contra los aminoácidos 93 a 102 de la PrP^C, que incluyen el dominio de fijación entre A β y PrP identificado en este estudio y en estudios anteriores¹, mientras que el ICSM-18 se fija selectivamente a la hélice 1 de la PrP⁸. Así pues, a diferencia del ICSM-35, que debería, de forma directa, actuar selectivamente sobre el sitio de fijación de los ADDL, el ICSM-18 podría actuar dificultando la interacción entre PrP y A β .

Después de haber encontrado que los anticuerpos anti-PrP previnieron la inhibición de la PLP mediada por los ADDL en los cortes del hipocampo de ratón, se examinó la eficacia *in vivo* de uno de los anticuerpos, ICSM-18, en una especie diferente, la rata. Esto confirmaría si la dependencia de PrP que presenta la toxicidad de los oligómeros de A β es independiente de la especie y de la cepa de ratón. Se comparó el ICSM-18 con un anticuerpo IgG1 de control del isotipo por su capacidad para anular la inhibición de la PLP del hipocampo mediante el extracto en TBS de cerebros con EA que contienen A β de relevancia fisiopatológica. Además, para confirmar que la implicación de la PrP era generalizable, se utilizaron extractos de diferentes cerebros con EA y de control a los utilizados en la figura 4d. La previa inyección intracerebroventricular (i.c.v.) del anticuerpo anti-PrP impidió por completo la inhibición de la PLP inducida con la EAF (estimulación de alta frecuencia) mediada por los A β del cerebro con EA. En cambio, los animales a los que se inyectó el extracto de cerebro con EA del que se inmunoprecipitó el A β (figura 10), no bloquearon más la PLP (131 ± 6 , $n = 6$; $P < 0,05$ comparado con el nivel basal; $P > 0,05$ comparado con controles a los que se inyectó el vehículo a las 3 h). Así pues, la administración rápida del extracto soluble de cerebros con EA (5 μl , i.c.v.) (figuras 9c y 10) inhibió completamente la PLP al cabo de 3 h de la EAF de una manera dependiente de A β en los animales a los que se inyectó antes, durante 30 min, el anticuerpo de control (30 μg en 10 μl , i.c.v.) ($P > 0,05$ comparado con el nivel basal; $P < 0,05$ comparado con los controles que recibieron dos inyecciones de vehículo). En cambio, en los animales a los que previamente se inyectaron i.c.v. el ICSM-18 (30 μg), la EAF indujo la PLP robusta ($P < 0,05$ comparada con el nivel basal y comparada con el A β de cerebro con EA + IgG1 de control) que era de magnitud parecida a la de los controles ($P > 0,05$). Cuando se inyectaron solos, ni el ICSM-18 ni la IgG1 de control afectaron significativamente a la magnitud de la PLP (figura 8c). El hallazgo de que la acción selectiva con anticuerpos sobre la secuencia de la PrP puede mejorar la actividad de deterioro de la plasticidad del material procedente de cerebro con EA en las ratas *in vivo* corrobora el resultado *in vitro* con los ADDL y respalda con fuerza que se siga explorando este abordaje como una estrategia terapéutica atractiva.

Para destacar la importancia del epítipo de la hélice 1 como posible diana terapéutica para la toxicidad de A β independientemente del esqueleto del anticuerpo, comprobamos la capacidad que tiene una forma humanizada (IgG4) del ICSM-18 (PRN100) para bloquear la inhibición de la PLP inducida por una EAF (estimulación de alta frecuencia) mediada por el A β de cerebro con EA. Los resultados se muestran en la figura 14. El PRN100 bloqueó completamente la inhibición de la PLP (triángulos grises) observada cuando se inyectó únicamente el cerebro con EA (círculo rojo) o en presencia de una IgG4 humana de control (triángulos rosas), en comparación con un control de vehículo (cuadrados negros). Esto confirma que los ligandos tales como los anticuerpos manipulados genéticamente que se fijan a la hélice 1 se podían utilizar para actuar selectivamente sobre la PrP en el cerebro y bloquear los efectos tóxicos relacionados con la enfermedad de Alzheimer humana. Que esto se haya conseguido con éxito con un anticuerpo completamente humanizado demuestra además su potencial terapéutico.

Conclusiones a partir de los ejemplos

Estos datos apoyan los primeros hallazgos de que la PrP^C actúa como receptor para mediar la toxicidad de determinadas especies de A β . Se ha confirmado que el efecto inhibitor de los ADDL sobre la plasticidad sináptica depende de la PrP^C gracias al uso de los registros de PLP *in vitro* de ratones sin PrP y de tipo silvestre congénicos y, muy importante, que se necesita la expresión de la PrP para la actividad de deterioro de la plasticidad producido por

el A β procedente del cerebro humano. Se ha debatido mucho sobre la naturaleza de los oligómeros de A β biológicamente relevantes. Aquí se utilizaron dos preparaciones diferentes, una preparada del A β ₁₋₄₂ sintético para formar los ADDL, y que se confirmó que eran biológicamente activos, y la otra procedente de la fase hidrosoluble del cerebro humano con EA. Al utilizar los ADDL que se sabe que son activos y que tienen características biofísicas similares a las utilizadas por Lauren et al., se pudo comprobar la veracidad de los primeros informes de que la toxicidad de A β estaba mediada (al menos en parte) por la PrP. Es importante señalar que ambas preparaciones inhibieron la PLP de una manera dependiente de PrP, lo que sugiere que la preparación de los ADDL contenía un componente con propiedades parecidas a las encontradas en el cerebro con EA. Se sabe que las preparaciones heterogéneas de agregados de A β tienen una citotoxicidad inespecífica a concentraciones altas y, por lo tanto, sería incorrecto interpretar que no hubo acción selectiva sobre la PrP para mejorar tal toxicidad inespecífica, al igual que descartar la importancia de la PrP en la neurotoxicidad mediada por A β . La EA es un síndrome clinicopatológico, no una única enfermedad, con muchas causas. Si esperamos que la eliminación de PrP bloquee la toxicidad en todos los aspectos de todos los modelos, estaríamos simplificando demasiado un problema complejo. Que la toxicidad dependa de determinados receptores en los modelos de animales individuales de EA podría permitirnos discernir qué modelos imitan correctamente determinados aspectos de la EA.

Se ha mostrado que una serie de proteínas sinápticas afectan a la fijación y a los efectos tóxicos de A β . Se mostró que mGluR5 afectaba a la fijación de los oligómeros de A β a las sinapsis excitadoras con anticuerpos contra los receptores mGluR5, lo que reduce la fijación de los oligómeros de A β en un 50%²⁸. Esto es un nivel de reducción parecido al mostrado por PrP¹. Mientras que el efecto de este receptor sobre la fijación de A β se visualizó directamente, no se ha probado la existencia de una interacción binaria entre A β y mGluR5. Recientemente se ha demostrado que EphB2 se coprecipita con los oligómeros procedentes de las células y se ha demostrado que el dominio de repetición de fibronectina es crítico²⁹. De nuevo, no se ha demostrado que exista una interacción binaria directa. La falta de PLP en el modelo de EA de ratones J20, causada por una represión del NMDAR, se revirtió al sobreexpresar la EphB2 y sería interesante ver si esto también vale para los oligómeros de A β procedentes de cerebro humano exógeno, o si esto requiere que A β esté presente *in situ* durante periodos más largos. Los estudios anteriores han demostrado que NMDAR está implicado en los efectos tóxicos relacionados con los ADDL, pero que no parece que se fijen directamente³⁰. Dado que se ha sugerido que la PrP interacciona con las subunidades de NR2D y atenúa la excitotoxicidad³¹, es plausible que una buena parte de estas proteínas estén implicadas en la toxicidad de A β por vías similares. En este sentido, la ausencia de una función vital de PrP la convertiría una diana terapéutica más atractiva.

Además, la demostración de que la inhibición *in vivo* e *in vitro* de la PLP mediada por el A β se consigue bloquear con los anticuerpos anti-PrP extiende adicionalmente estos hallazgos y contradice que el efecto en los ratones sin PrP se deba a efectos protectores desconocidos con origen en la eliminación constitutiva de la PrP. Que sean activos los anticuerpos generados contra dos regiones diferentes de la proteína desde los puntos de vista estructural y secuencial apoya fuertemente la idea de que la PrP es la diana *in vivo* de estos anticuerpos y que el efecto no es inespecífico. Además, estos mismos anticuerpos ya se han utilizado con éxito para tratar la enfermedad priónica en los ratones sin causarles efectos tóxicos⁶. La interacción de fijación entre PrP y A β se ha caracterizado adicionalmente con material de actividad biológica conocida y un ensayo biofísico desarrollado para investigar los posibles agentes terapéuticos que podrían alterar esta interacción de forma eficaz. Los anticuerpos monoclonales anti-PrP ICSM-18 e ICSM-35, que ya se han estudiado extensamente *in vivo* en los ratones y que se han humanizado completamente para la investigación como posible tratamiento antipriónico para los humanos, posiblemente inhiban los efectos inducidos por el A β sobre la plasticidad sináptica tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que sugiere que estas y/o versiones humanizadas de estos anticuerpos se podrían utilizar como tratamientos contra la EA tanto en monoterapia como en politerapia. Ya que tanto las preparaciones de ADDL como las A β extraídas de cerebro humano en tampón acuoso son muy heterogéneas, la realización de más estudios podría ayudar a caracterizar desde el punto de vista biofísico las especies tóxicas clave que se fijan a la PrP.

Lista de referencias

1. Lauren, J., Gimbel, D. A., Nygaard, H. B., Gilbert, J. W., & Strittmatter, S. M. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* **457**, 1128-1132 (2009).
2. Gimbel, D. A. *et al.* Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. *J. Neurosci.* **30**, 6367-6374 (2010).
3. Balducci, C. *et al.* Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 2295-2300 (2010).
4. Calella, A. M. *et al.* Prion protein and abeta-related synaptic toxicity impairment. *EMBO Mol Med* (2010) **2**, 306-314.
5. Kessels, H. W., Nguyen, L. N., Nabavi, S. & Malinow, R. The prion protein as a receptor for amyloid-beta. *Nature* **466**, E3-E4 (2010).
6. White, A. R. *et al.* Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature* **422**, 80-83 (2003).
7. Khalili-Shirazi, A. *et al.* Beta-PrP form of human prion protein stimulates production of monoclonal antibodies to epitope 91-110 that recognise native PrP(Sc). *Biochim. Biophys. Acta* **1774**, 1438-1450 (2007).
8. Antonyuk, S. V. *et al.* Crystal structure of human prion protein bound to a therapeutic antibody. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 2554-2558 (2009).
9. Walsh, D.M. & Selkoe, D.J. A beta oligomers - a decade of discovery. *J. Neurochem.* **101**, 1172-1184 (2007).
10. Cullen, W. K., Suh, Y. H., Anwyl, R. & Rowan, M. J. Block of LTP in rat hippocampus in vivo by beta-amyloid precursor protein fragments. *Neuroreport* **8**, 3213-3217 (1997).
11. Lambert, M. P. *et al.* Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 6448-6453 (1998).
12. Wang, H. W. *et al.* Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res.* **924**, 133-140 (2002).
13. Klyubin, I. *et al.* Soluble Arctic amyloid beta protein inhibits hippocampal long-term potentiation in vivo. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 2839-2846 (2004).
14. Chen, S. G., Yadav, S. P. & Surewicz, W. K. Interaction between human prion protein and amyloid-beta (A beta) oligomers ROLE OF N-TERMINAL RESIDUES. *J. Biol. Chem.* **285**, 26377-26383 (2010).
15. Chung, E. *et al.* Anti-PrP^C monoclonal antibody infusion as a novel treatment for cognitive deficits in an Alzheimer's disease model mouse. *BMC Neuroscience* **11**, (2010).
16. Nicoll, A. J. & Collinge, J. Preventing prion pathogenicity by targeting the cellular prion protein. *Infect. Disord. Drug Targets* **9**, 48-57 (2009).

17. Mallucci, G. *et al.* Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J.* **21**, 202-210 (2002).
18. Mallucci G. *et al.* Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* **302**, 871-874 (2003).
19. Nicoll, A. J. *et al.* Pharmacological chaperone for the structured domain of human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 17610-17615 (2010).
20. Hepler, R. W. *et al.* Solution state characterization of amyloid beta-derived diffusible ligands. *Biochemistry* **45**, 15157-15167 (2006).
21. Walsh, D. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Condron, M. M. & Teplow, D. B. Amyloid beta-protein fibrillogenesis - Detection of a protofibrillar intermediate. *J. Biol. Chem.* **272**, 22364-22372 (1997).
22. Shankar, G. M. *et al.* Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* **14**, 837-842 (2008).
23. Shankar, G. M. & Walsh, D. M. Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and Abeta. *Mol Neurodegener.* **4**, 48 (2009).
24. O'Nuallain, B. *et al.* Amyloid-beta protein dimers rapidly form stable synaptotoxic protofibrils. *J. Neurosci.* **30**, 14411-14419 (2010).
25. Jackson, G. S. *et al.* Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8531-8535 (2001).
26. Atwood, C. S. *et al.* Characterization of copper interactions with Alzheimer amyloid beta peptides: Identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid beta 1-42. *J. Neurochem.* **75**, 1219-1233 (2000).
27. Data for biochemical research. Dawson, R. M. C., Elliot, D., Elliot, W. & Jones, K. M. (eds.), pp. 399-415 (Clarendon Press, Oxford, 1986).
28. Renner, M. *et al.* Deleterious Effects of Amyloid beta Oligomers Acting as an Extracellular Scaffold for mGluR5. *Neuron* **66**, 739-754 (2010).
29. Cisse, M. *et al.* Reversing EphB2 depletion rescues cognitive functions in Alzheimer model. *Nature* **469**, 47-52 (2011).
30. Decker, H. *et al.* N-Methyl-D-aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic amyloid-beta peptide oligomers. *J. Neurochem.* **115**, 1520-1529 (2010).
31. Khosravani, H. *et al.* Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *J Cell Biol.* **181**, 551-565 (2008).
32. Schuck, P., Perugini, M. A., Gonzales, N. R., Howlett, G. J., & Schubert, D. Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems. *Biophys. J.* **82**, 1096-1111 (2002).
33. Laue, T. M., Shah, B. D., Ridgeway, T. M., & Pelletier, S. L. Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins in *Analytical Ultracentrifugation*

in *Biochemistry and Polymer Science* (eds. Harding, S.E., Horton, J.C. & Rowe, A.J.) 90-125 (Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1992).

34. McDonald, J. M. *et al.* The presence of sodium dodecyl sulphate-stable A beta dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia. *Brain* **133**, 1328-1341 (2010).

35. Bueler, H. *et al.* Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**, 577-582 (1992).

36. Klyubin, I. *et al.* Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization. *J. Neurosci.* **28**, 4231-4237 (2008).

37. Jackson, G. S. *et al.* Multiple folding pathways for heterologously expressed human prion protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1431**, 1-13 (1999).

38. Zahn, R., von Schroetter, C. & Wuthrich, K. Human prion proteins expressed in *Escherichia coli* and purified by high-affinity column refolding. *FEBS Lett.* **417**, 400-404 (1997).

39. Soini, E. & Kojola, H. Time-Resolved Fluorometer for Lanthanide Chelates - A New Generation of Non-Isotopic Immunoassays. *Clin. Chem.* **29**, 65-68 (1983).

REIVINDICACIONES

1. Un ligando capaz de fijarse de manera estable a la PrP en un sitio entre los restos aminoacídicos 131 a 153 de la PrP, para ser usado en el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer, en donde dicho ligando es un anticuerpo, scFv, Fab u otro fragmento de fijación a antígeno del mismo.
2. Un ligando capaz de fijarse de manera estable a la PrP en un sitio entre los restos aminoacídicos 131 a 153 de la PrP, para ser usado de acuerdo con la reivindicación 1 en el tratamiento o la prevención de la toxicidad de los oligómeros de A β en la enfermedad de Alzheimer, en donde dicho ligando es un anticuerpo, scFv, Fab u otro fragmento de fijación a antígeno del mismo.
3. Un ligando capaz de fijarse de manera estable a la PrP en un sitio entre los restos aminoacídicos 131 a 153 de la PrP, para ser usado de acuerdo con la reivindicación 1 en el tratamiento o la prevención del deterioro de la plasticidad sináptica en la enfermedad de Alzheimer, en donde dicho ligando es un anticuerpo, scFv, Fab u otro fragmento de fijación a antígeno del mismo.
4. Un ligando para ser usado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho ligando se fija a la PrP en un sitio entre los restos aminoacídicos 131 a 153 de la PrP con un valor de afinidad de 100 nM o menor.
5. Un ligando para ser usado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los restos aminoacídicos 131 a 153 de la PrP tienen la secuencia **G S A M S R P I I H F G S D Y E D R Y Y R E N**.
6. Un ligando capaz de fijarse de forma estable a la PrP en un sitio entre los restos aminoacídicos 131 a 153 de la PrP, para ser usado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer, en donde dicho ligando comprende un anticuerpo, scFv, Fab u otro fragmento de fijación a antígeno del mismo que tiene al menos las secuencias determinantes de complementariedad (CDRs) de las figuras 11 y 12.
7. Un ligando capaz de fijarse de forma estable a la PrP en un sitio entre los restos aminoacídicos 131 a 153 de la PrP, para ser usado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el tratamiento o la prevención de la toxicidad de los oligómeros de A β en la enfermedad de Alzheimer, en donde dicho ligando comprende un anticuerpo, scFv, Fab u otro fragmento de fijación a antígeno del mismo que tiene al menos las secuencias determinantes de complementariedad (CDRs) de las figuras 11 y 12.
8. Un ligando capaz de fijarse de forma estable a la PrP en un sitio entre los restos aminoacídicos 131 a 153 de la PrP, para ser usado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el tratamiento o la prevención del deterioro de la plasticidad sináptica en la enfermedad de Alzheimer, en donde dicho ligando comprende un anticuerpo, scFv, Fab u otro fragmento de fijación a antígeno del mismo que tiene al menos las secuencias determinantes de complementariedad (CDRs) de las figuras 11 y 12.
9. Un ligando capaz de fijarse de forma estable a la PrP en un sitio entre los restos aminoacídicos 131 a 153 de la PrP, para ser usado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer, en donde dicho ligando es un anticuerpo ICSM18, scFv, Fab u otro fragmento de fijación a antígeno del mismo.
10. Un ligando capaz de fijarse de forma estable a la PrP en un sitio entre los restos aminoacídicos 131 a 153 de la PrP, para ser usado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el tratamiento o la prevención de la toxicidad de los oligómeros de A β en la enfermedad de Alzheimer, en donde dicho ligando es un anticuerpo ICSM18, scFv, Fab u otro fragmento de fijación a antígeno del mismo.
11. Un ligando capaz de fijarse de forma estable a la PrP en un sitio entre los restos aminoacídicos 131 a 153 de la PrP, para ser usado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el tratamiento o la prevención del deterioro la plasticidad sináptica en la enfermedad de Alzheimer, en donde dicho ligando es un anticuerpo ICSM18, scFv, Fab u otro fragmento de fijación a antígeno del mismo.

Figura 1

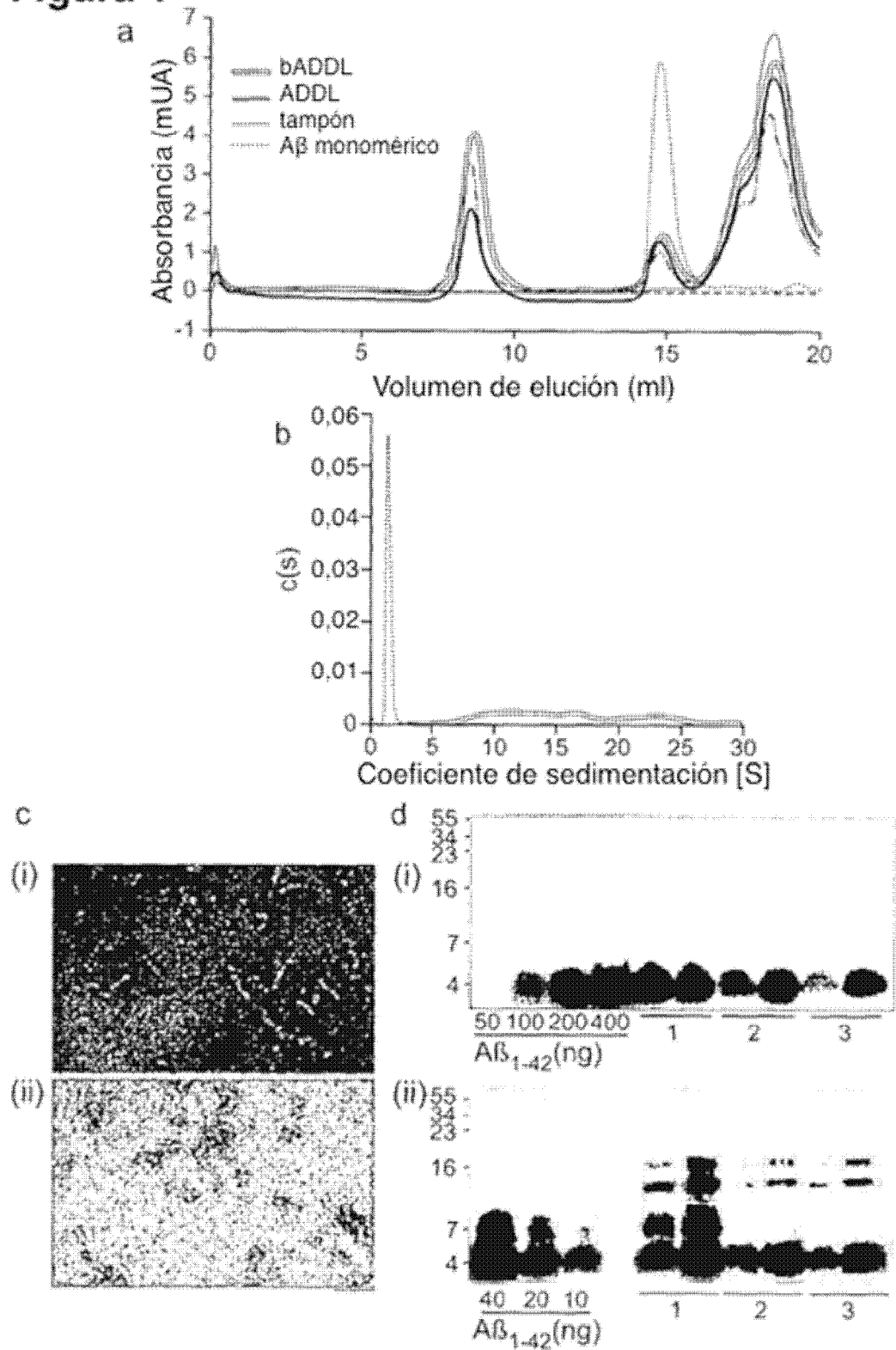


Figura 2

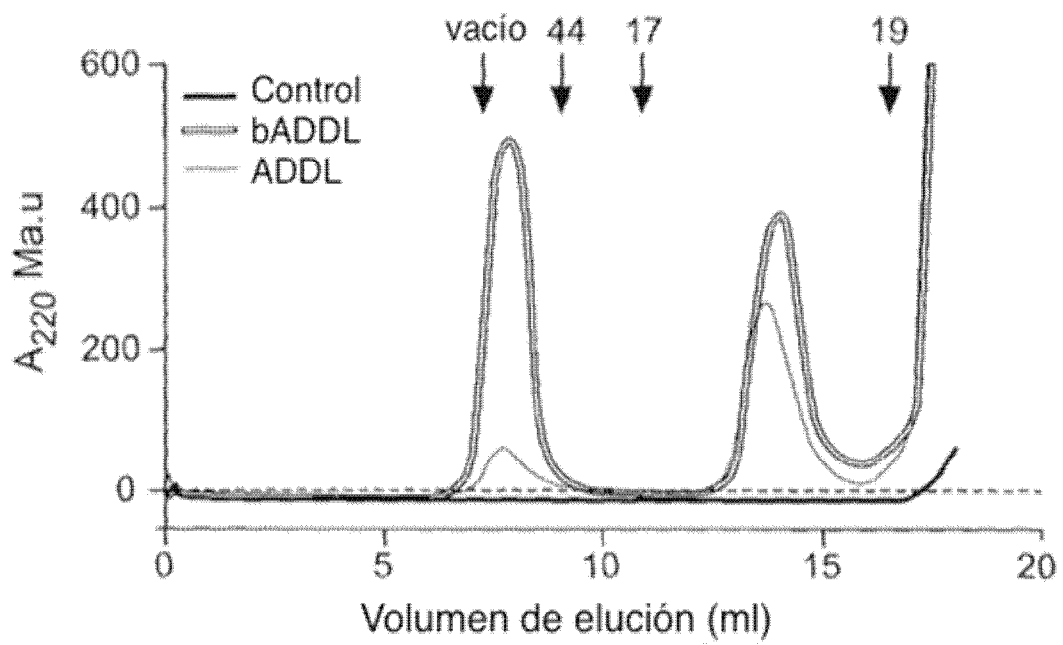


Figura 3

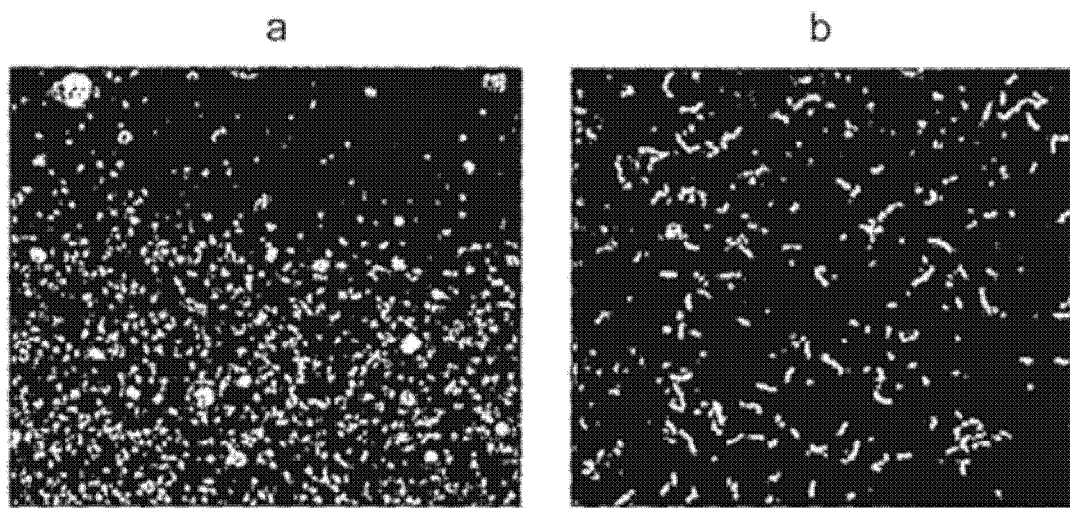
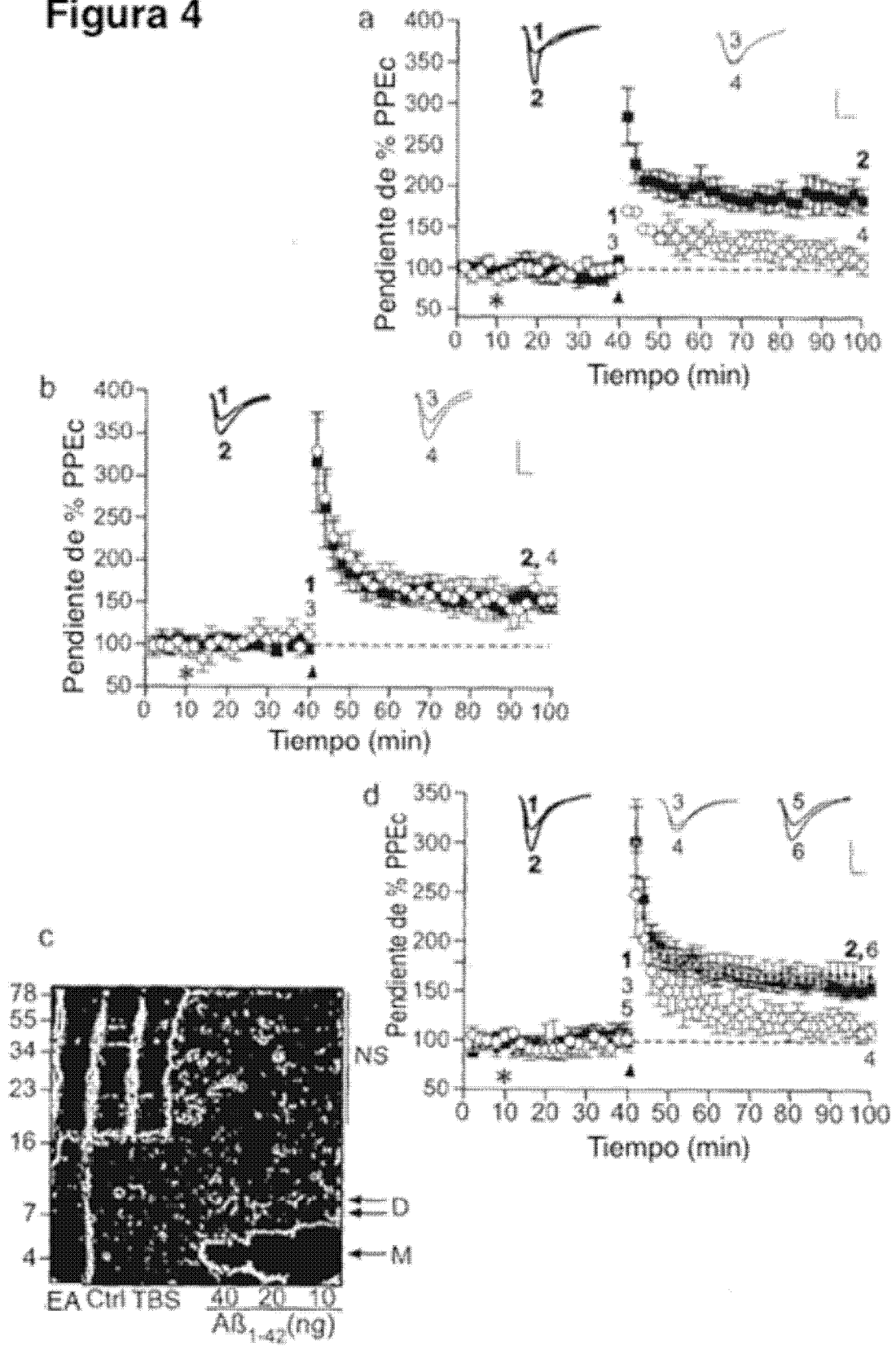


Figura 4



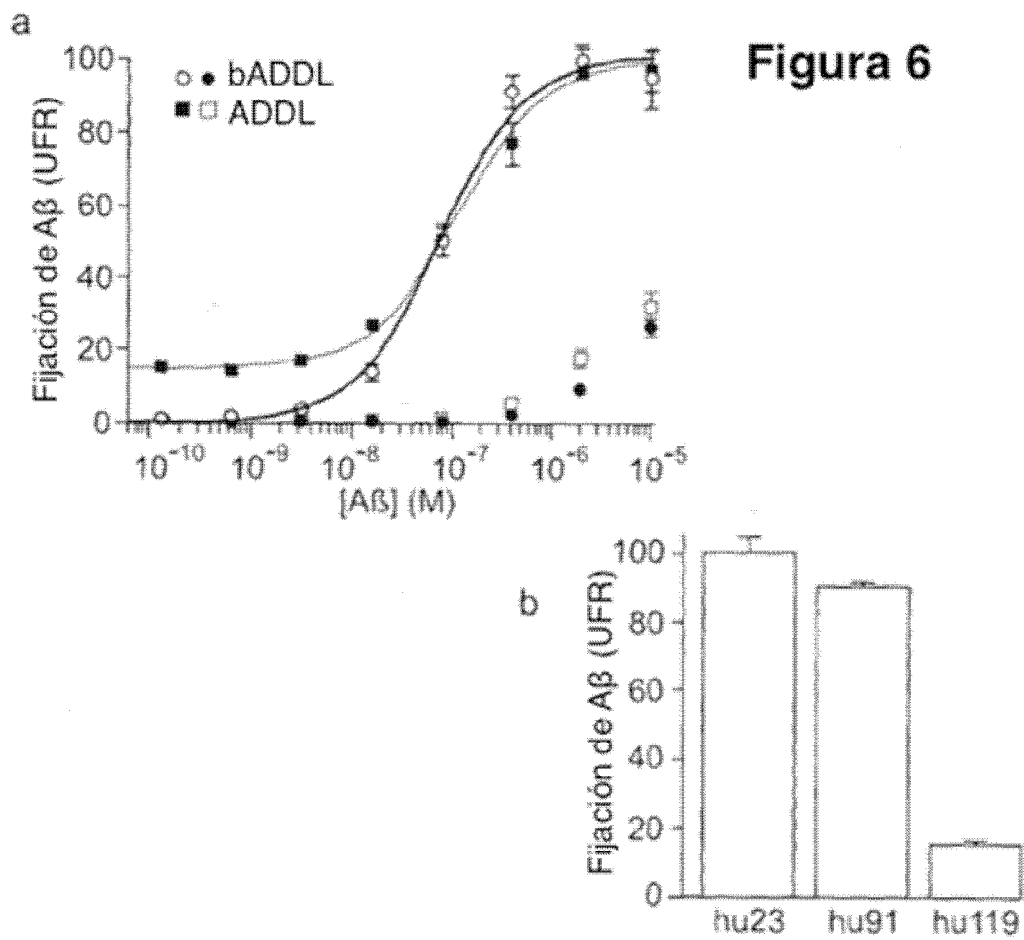
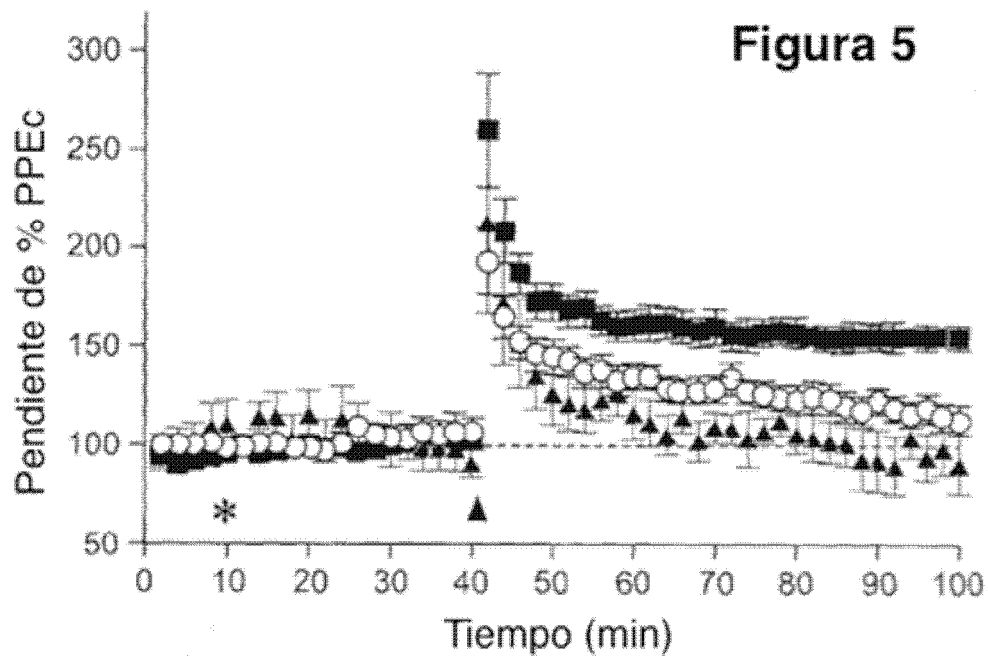


Figura 6

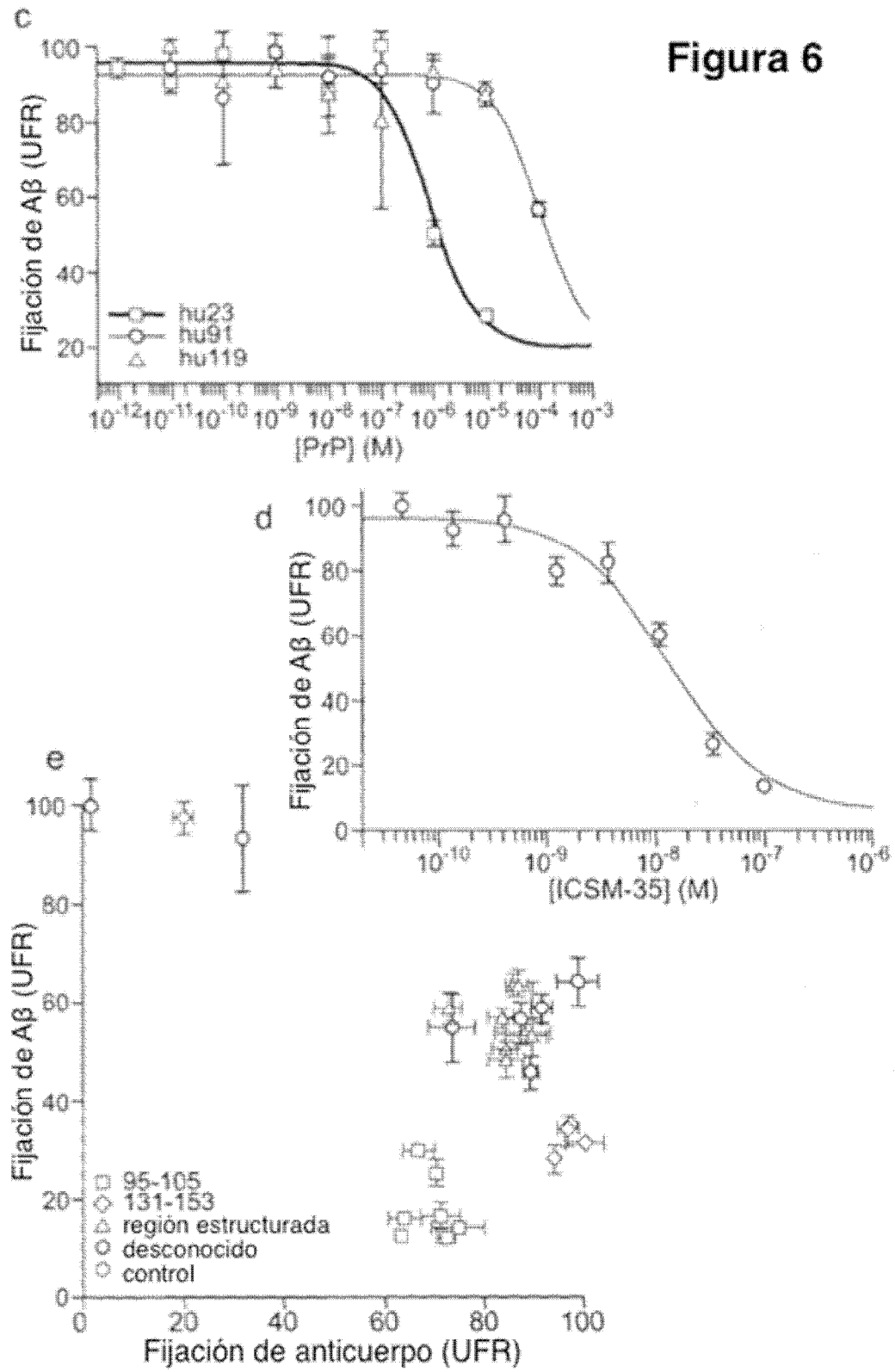
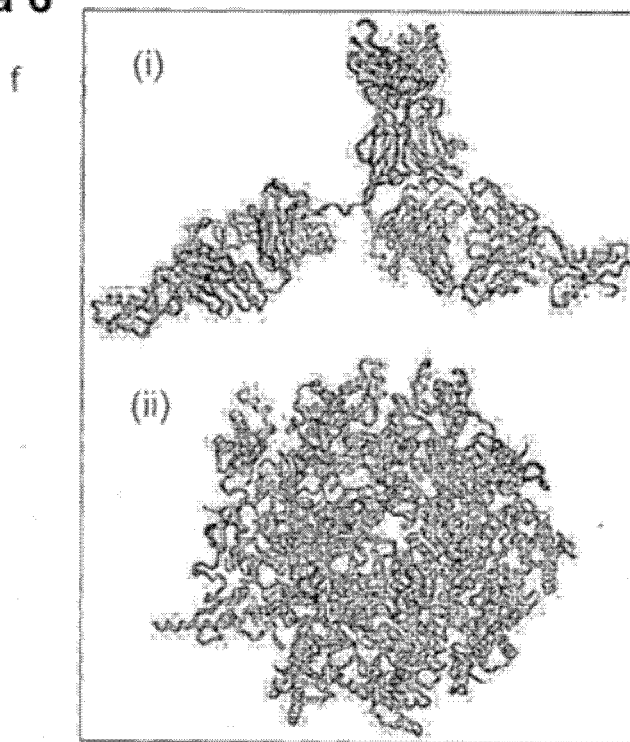
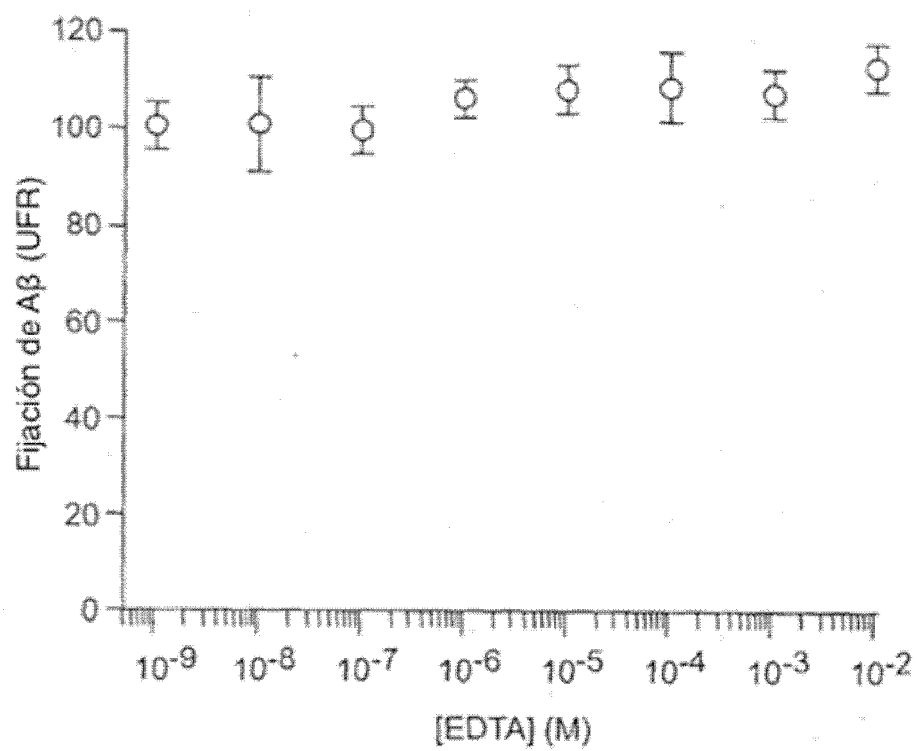


Figura 6**Figura 7**

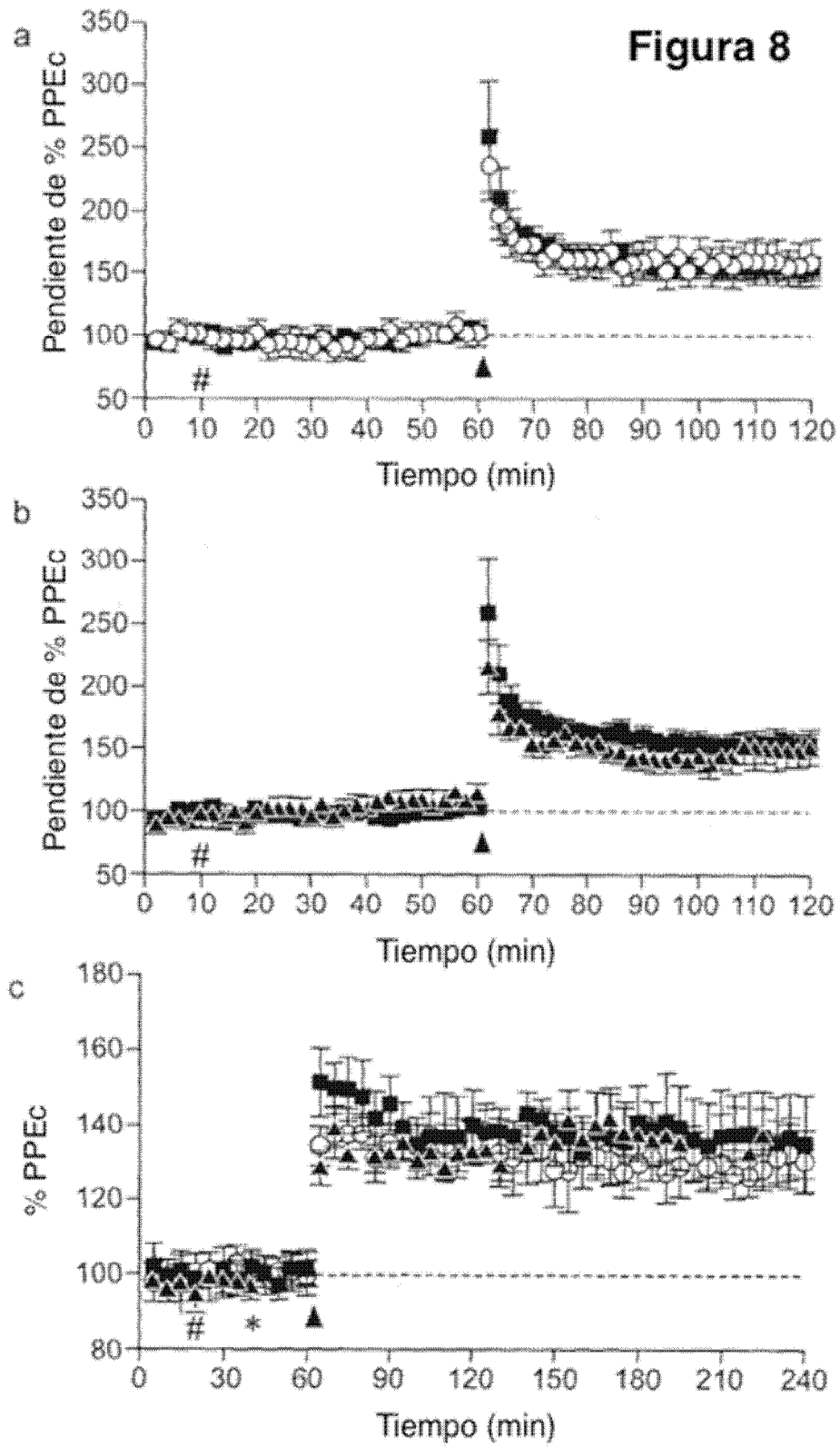


Figura 9

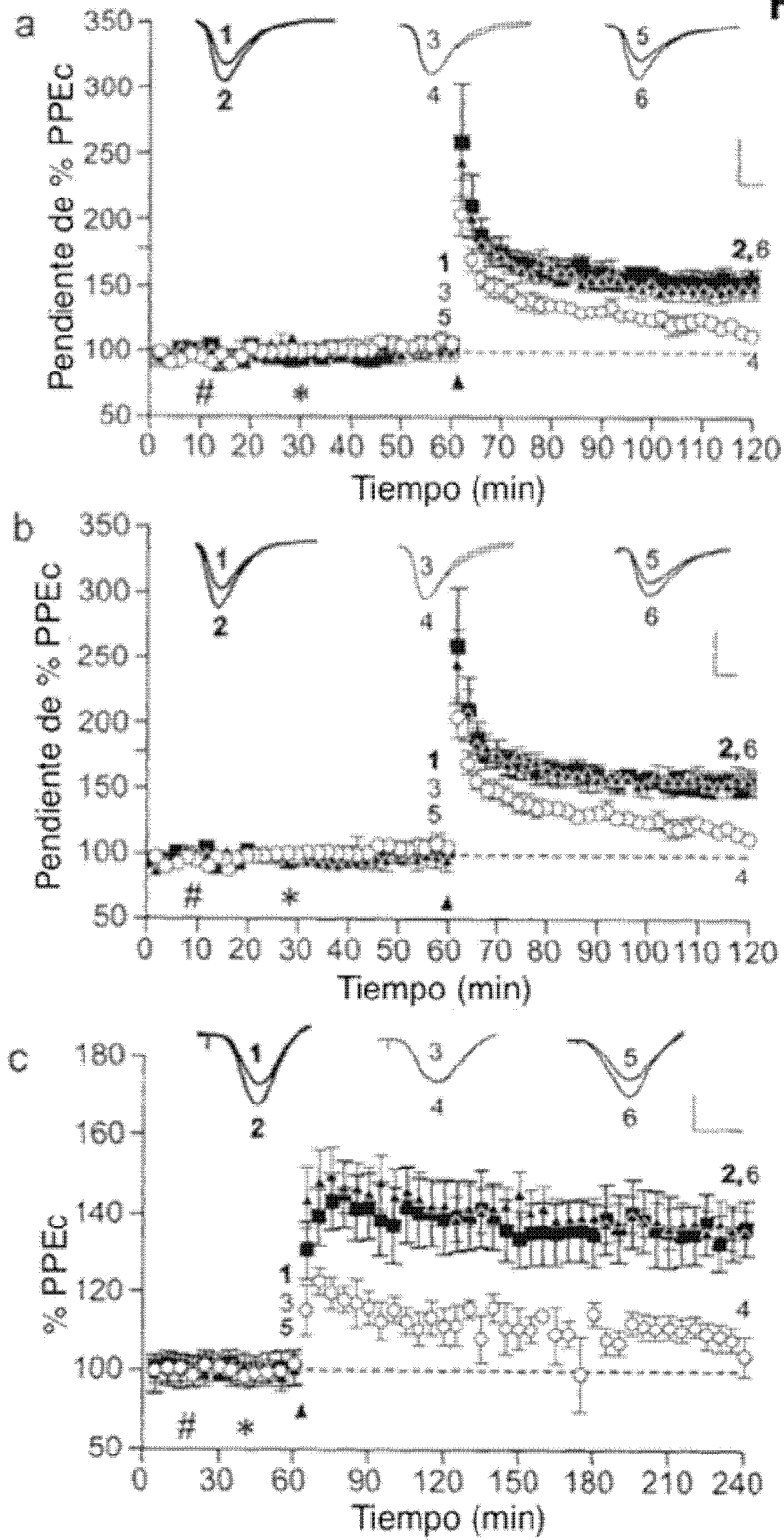


Figura 10

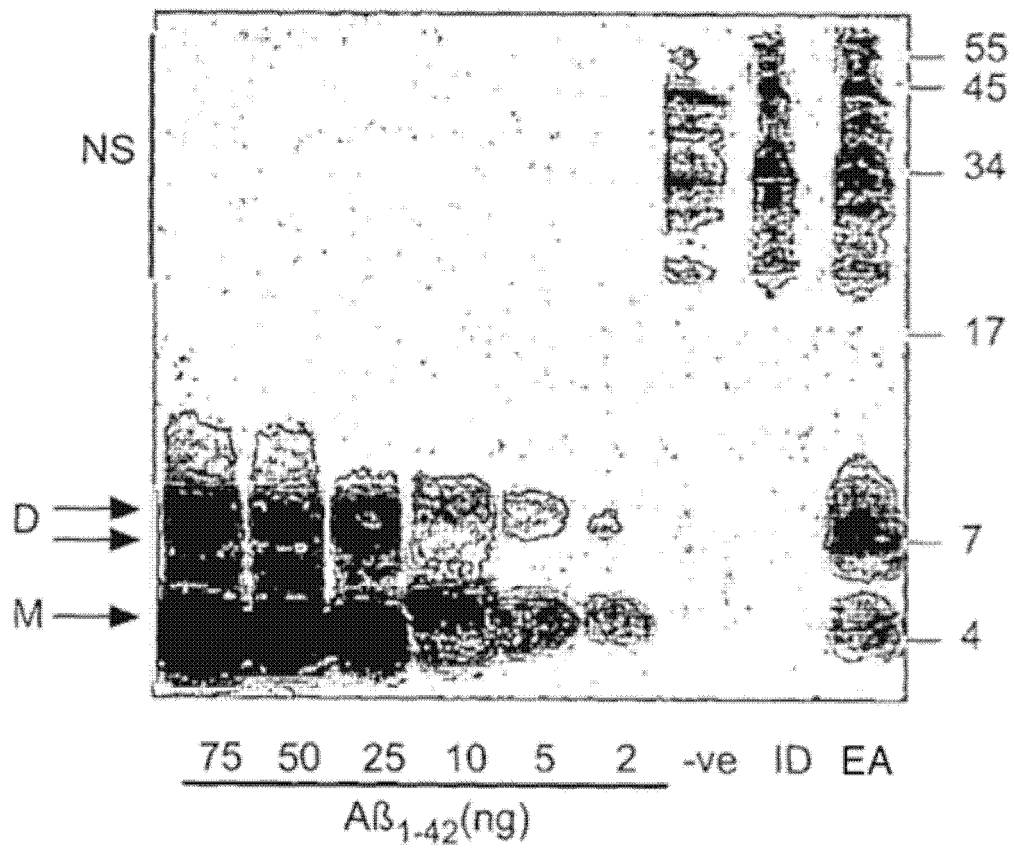
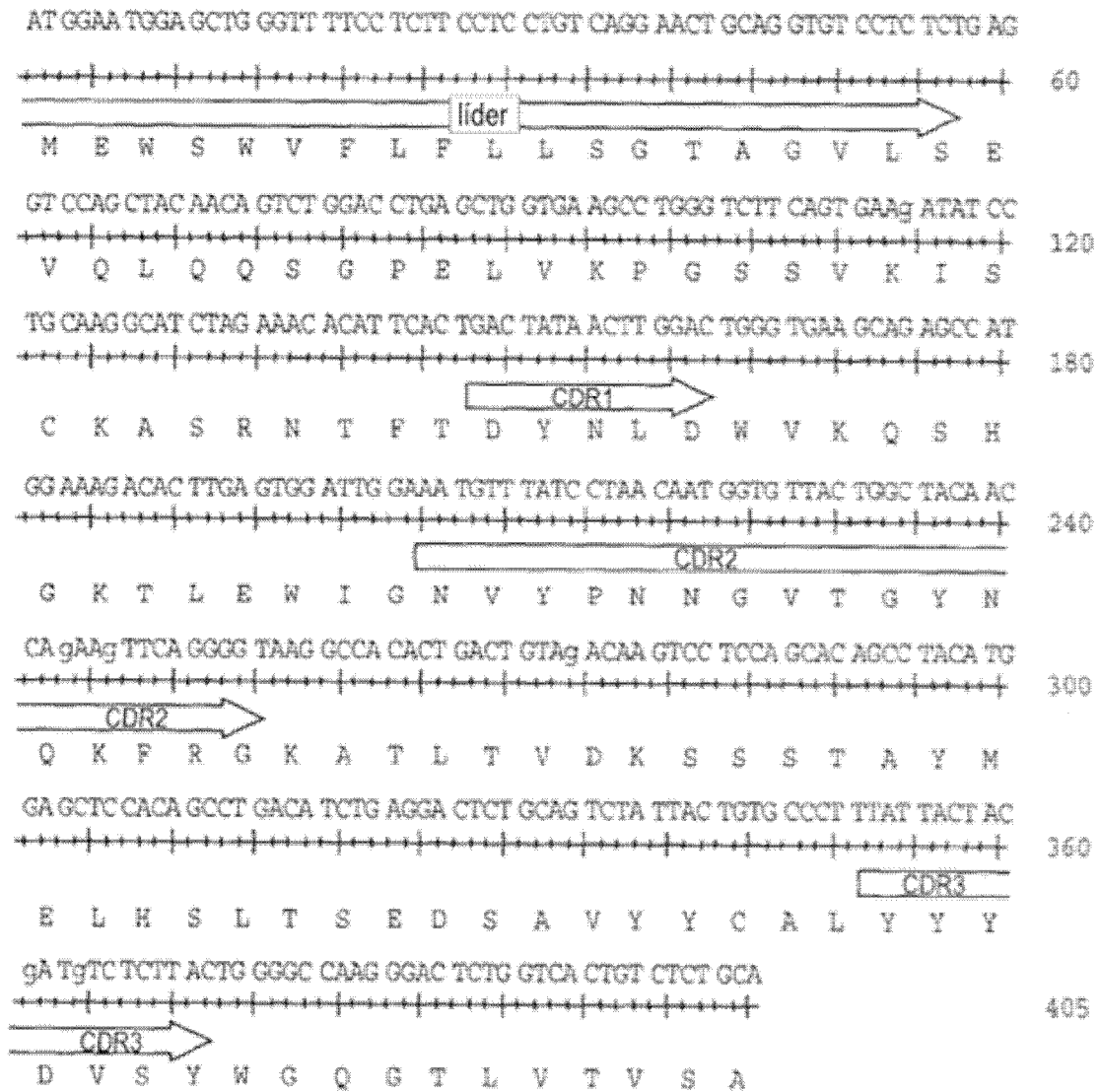


Figura 11 secuencia de ICSM18VH



ATGGAATGGAGCTGGGTTTTCTCTCTCCTCTGTCAGGAACTGCAGGTGT
 CCTCTCTGAGGTCCAGCTACAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTG
 GGTCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCATCTAGAAACACATTCACCTGAC
 TATAACTTGGACCTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGACACTTGAGTGGAT
 TGGAAATGTTTATCCTAACAATGGTGTACTGGCTACAACCAgAAgTTCA
 GGGGTAAAGCCACACTGACTGTAgACAAGTCTCCAGCACAGCCTACATG
 GAGCTCCACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCCCT
 TTAATTACTACgATgTCTCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCT
 CTGCA

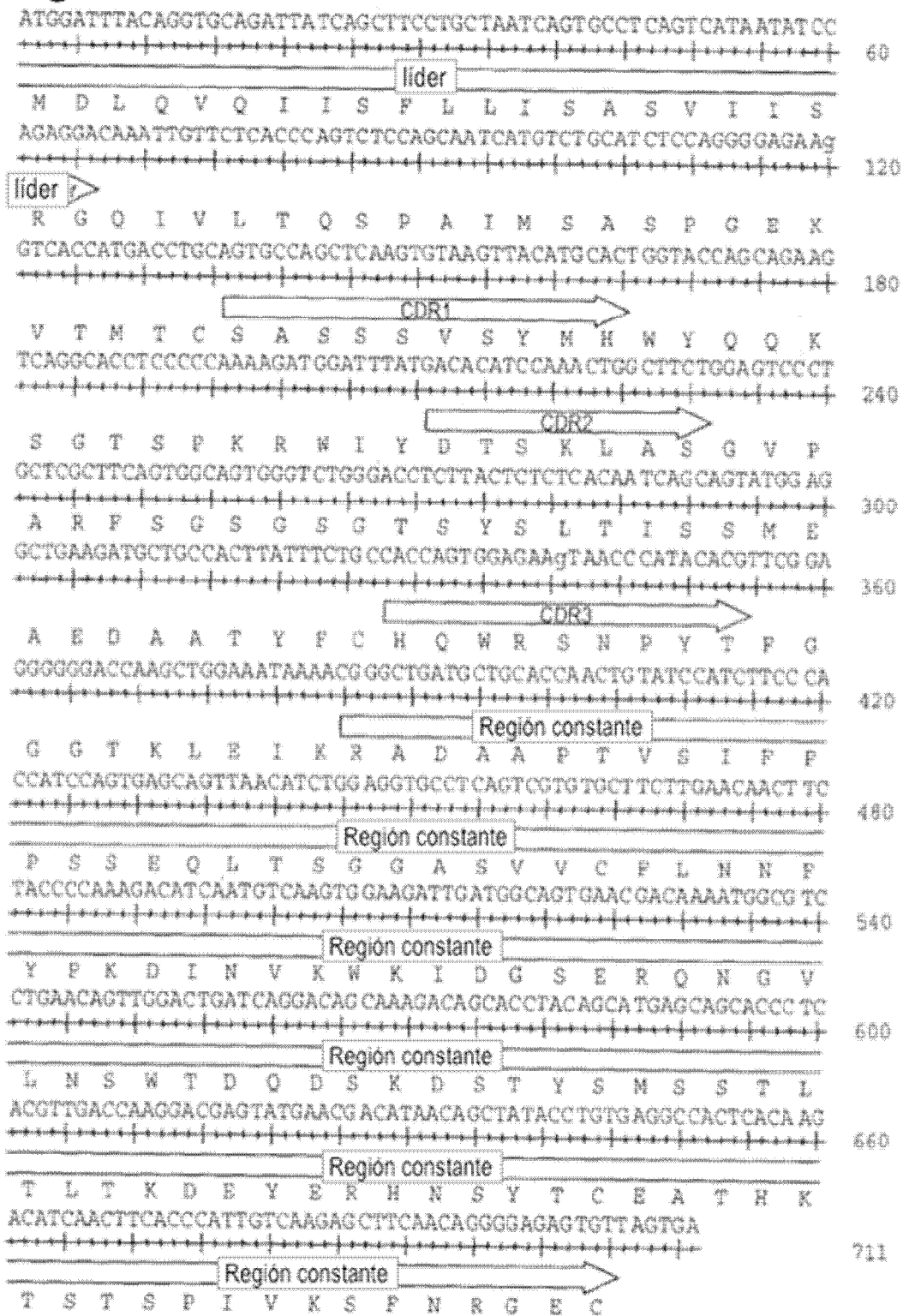
Figura 12A secuencia de ICSM18c

Figura 12B

ATGGATTTACAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGT
 CATAATATCCAGAGGACAAATTGTTCTCACCAGTCTCCAGCAATCATGT
 CTGCATCTCCAGGGGAGAAgGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGT
 GTAAGTTACATGCACITGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAG
 ATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCA
 GTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGTATGGAG
 GCTGAAGATGCTGCCACTTATTTCTGOCACCCAGTGGAGAAgTAACCCATA
 CACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGGGGCTGATGCTGCAC
 CAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGT
 GCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGT
 CAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTT
 GGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTC
 ACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGC
 CACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGGGAG
 AGTGTTAGTGA

Figura 13

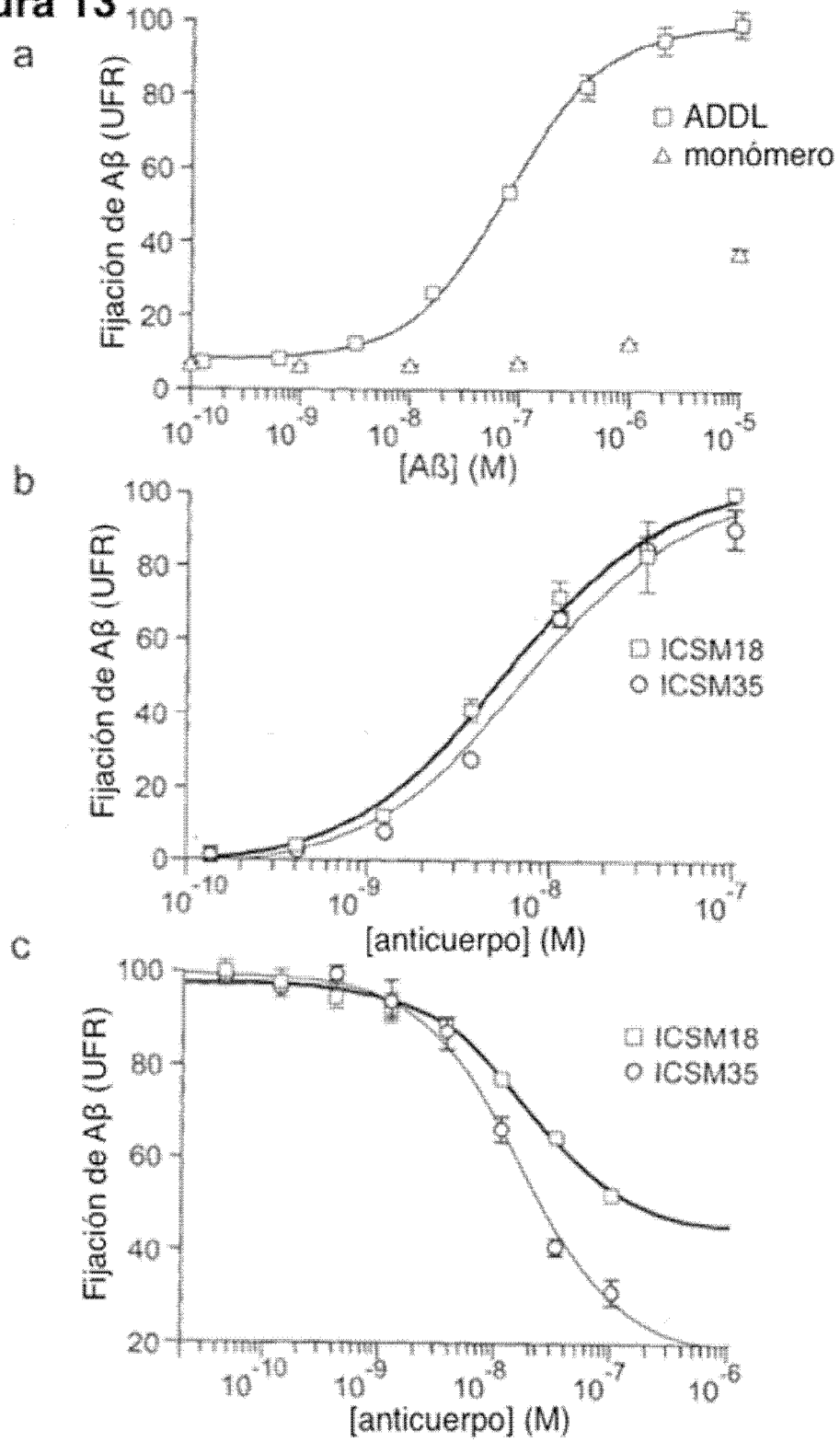


Figura 14

