

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 604**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 15/09</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/395</b>	(2006.01)
<b>A61P 25/28</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/18</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/53</b>	(2006.01)
<b>C12P 21/08</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/68</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2009 PCT/JP2009/052039**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2009 WO2009099176**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2009 E 09707511 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2246427**

54 Título: **Anticuerpos capaces de unirse específicamente a oligómeros de beta amiloides, y su utilización**

30 Prioridad:

**08.02.2008 JP 2008028386**  
**01.08.2008 US 85545**  
**04.08.2008 JP 2008201058**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.06.2017**

73 Titular/es:

**IMMUNAS PHARMA, INC. (50.0%)**  
**Kanagawa Science Park R&D D11F 3-2-1 Sakado**  
**Takatsu-ku Kawasaki-shi**  
**Kanagawa 213-0012, JP y**  
**NATIONAL CENTER FOR GERIATRICS AND**  
**GERONTOLOGY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MATSUBARA, ETSURO;**  
**SHIBATA, MASAO y**  
**YOKOSEKI, TATSUKI**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 617 604 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 capaces de unirse específicamente a oligómeros de beta amiloides, y su utilización

Campo de la técnica

5 La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a oligómeros de A $\beta$  y usos de los mismos.

Estado de la técnica

10 Diversas evidencias han demostrado que el deterioro de la memoria surge de la disfunción sináptica desencadenada por oligómeros de A $\beta$  solubles (véanse los documentos 1 y 2 que no son de patente). La acumulación excesiva y la deposición de oligómeros de A $\beta$  pueden ser los desencadenantes de una serie de cascadas patológicas que conducen a la enfermedad de Alzheimer (EA). Por lo tanto, la intervención terapéutica dirigida a los oligómeros de A $\beta$  puede ser eficaz para bloquear estas cascadas. Sin embargo, los hallazgos sobre la neurodegeneración mediada por moléculas centrales de esta hipótesis de cascada amiloide que son responsables de la neurodegeneración, particularmente por los oligómeros de A $\beta$ , se originan a partir de experimentos *in vitro* (véase el documento 3 que no es de patente). Esta neurodegeneración no ha sido probada directamente *in vivo*. El mayor defecto de los experimentos *in vivo* previamente reportados es que fallaron en demostrar la toxicidad sináptica de los oligómeros de A $\beta$  endógenos debido a la falta de herramientas moleculares específicas de conformación (véase el documento 4 que no es de patente). No se ha conocido ninguna técnica capaz de demostrar la toxicidad dentro del cerebro humano, un aspecto que es difícil de demostrar incluso en los modelos de ratón de la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, la neurotoxicidad *in vivo* del A $\beta$  endógeno ha sido a menudo ignorada. Se desconoce por qué la formación de NFT y la pérdida de células nerviosas preceden a la formación de placas seniles en la corteza entorrinal humana y cómo los oligómeros de A $\beta$  están implicados en este mecanismo.

20 La información de la literatura del estado de la técnica relacionada con la presente invención se muestra a continuación.

[Documento 1 que no es de patente] Klein WL, Trends Neurosci. 24: 219-224, 2001.

25 [Documento 2 que no es de patente] Selkoe DJ, Science 298: 789-791, 2002.

[Documento 3 que no es de patente] Hass C y colaboradores: Nature Review 8: 101-12, 2007.

[Documento 4 que no es de patente] Lee EB, y colaboradores: J. Biol. Chem. 281: 4292-4299, 2006.

30 El documento WO 03/104437 A2 describe anticuerpos policlonales que se unen preferentemente a oligómeros de amiloide  $\beta$ . El documento WO 03/104437 A2 describe además el uso de dichos anticuerpos para el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades asociadas con depósitos amiloides incluyendo la enfermedad de Alzheimer.

El documento WO 2006/055178 A1 describe anticuerpos monoclonales que se unen a oligómeros de amiloide  $\beta$ . El documento WO 2006/055178 A1 describe además el uso de dichos anticuerpos para la detección, tratamiento y prevención de la enfermedad de Alzheimer.

35 Moretto N. y colaboradores (J. Biol. Chem. (2007); Conformation-sensitive antibodies against Alzheimer amyloid- $\beta$  by immunization with a thioredoxin-constrained B-cell epitope peptide; 282 (15): 11436-11445) describen un anticuerpo que reconoce el oligómeros de amiloide  $\beta$ , y su uso para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en tejido cerebral humano y un modelo de ratón.

Divulgación de la invención

40 Problemas a ser resueltos por la invención

45 La presente invención se logró en vista de las circunstancias anteriores. Un objetivo de la presente invención es proporcionar anticuerpos que se unan específicamente a oligómeros de A $\beta$ , pero no a un monómero de A $\beta$  y sus usos. Más específicamente, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a oligómeros de A $\beta$ , pero no a un monómero de A $\beta$ , en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal y se selecciona del grupo que consiste de:

(1) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 89 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 91 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 93 como CDR3 y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 97 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 99 como CDR3;

50

(2) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 85 como VH y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 87 como VL; y

(3) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 81 y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83.

5 La presente invención proporciona además métodos para detectar oligómeros de A $\beta$  usando el anticuerpo, métodos para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer usando el anticuerpo, y agentes farmacéuticos que comprenden el anticuerpo.

Medios para resolver los problemas

10 Los inventores de la presente invención produjeron anticuerpos monoclonales que son específicos sólo para oligómeros de amiloides  $\beta$  (A $\beta$ ) solubles y no reconocen monómeros de A $\beta$  solubles que son moléculas fisiológicas, y confirmaron que los anticuerpos tienen lo siguiente:

(1) actividad antineurotóxica;

(2) actividad para suprimir la formación de fibrillas de amiloide A $\beta$ ;

(3) especificidad para reconocer solamente oligómeros de A $\beta$ ;

15 (4) capacidad para capturar oligómeros de A $\beta$  en el cerebro con EA; y

(5) capacidad para prevenir el desarrollo de fenotipos similares a la enfermedad de Alzheimer (deterioro de la memoria, acumulación de A $\beta$  en el cerebro) en ratones transgénicos APP<sup>swe</sup> (Tg2576).

20 Usando un método de ultrafiltración/tamiz molecular, entre los anticuerpos producidos, se determinaron los anticuerpos monoclonales 1A9 y 2C3 para reconocer específicamente oligómeros de 30 kDa o más, principalmente 100 kDa o más, pero no monómeros de aproximadamente 4,5 kDa. Se confirmó que los dos anticuerpos tenían actividad neutralizadora de la neurotoxicidad mediante la evaluación del efecto neutralizante contra la neurotoxicidad inducida por A $\beta$  1-42 en células PC 12 diferenciadas en células nerviosas. El ensayo de Tioflavina T y la microscopía electrónica demostraron que los anticuerpos tienen actividad para suprimir la formación de fibrillas de amiloide A $\beta$ . La capacidad de 1A9 y 2C3 para capturar oligómeros de A $\beta$  en un cerebro con EA fue confirmada por inmunoprecipitación usando los anticuerpos en presencia de 4, 5, 8 y 12 mers estables en SDS. Además, para determinar la neurotoxicidad *in vivo* en el cerebro humano, se evaluó la cantidad de polímeros reconocidos por los anticuerpos en la corteza entorrinal humana principalmente en los estadios I a III de NFT de Braak. Al centrarse particularmente en el 12 mer, que se ha informado que tiene neurotoxicidad en estudios con animales, se confirmó que la acumulación de polímero precede a la aparición de deterioro cognitivo, y se incrementa con la progresión del estadio de NFT de Braak. Este resultado muestra por primera vez que el 12 mer, que es específicamente reconocido por los anticuerpos, es un montaje conformacional que causa neurotoxicidad *in vivo* en el cerebro humano. Los presentes inventores también descubrieron que la estructura conformacional oligomérica reconocida por los anticuerpos está presente en el líquido cefalorraquídeo (LCR), y está aumentada en pacientes con EA. Los presentes inventores utilizaron 1A9 o 2C3 en inmunoterapia pasiva mediante inyección intravenosa como con otros trastornos neurológicos. Se confirmó que los ratones Tg2576 están protegidos contra el deterioro de la memoria, la formación de placa senil, la disfunción sináptica y la acumulación de A $\beta$  mediante inmunoterapia pasiva subcrónica, sin efectos secundarios nocivos. Los resultados obtenidos por los presentes inventores demostraron por primera vez que los anticuerpos monoclonales 1A9 y 2C3 son candidatos prometedores para anticuerpos terapéuticos para prevenir los fenotipos de tipo Alzheimer en ratones Tg2576, que se espera que muestren su efecto por administración intravenosa periférica convencional y, por tanto, no es necesario considerar la transferencia al cerebro.

45 Los autores de la presente invención también confirmaron que la inmunoterapia pasiva usando los anticuerpos 1A9 y 2C3 suprime la formación de placa amiloide senil y la formación de neurita distrófica hinchada. Además, los presentes inventores descubrieron que una fracción de los anticuerpos 1A9 y 2C3 administrados en la sangre se transfiere al cerebro.

Como se describió anteriormente, los presentes inventores describen en este documento que los anticuerpos 1A9 y 2C3 monoclonales, que son anticuerpos que se unen específicamente a oligómeros de A $\beta$ , cumplen todos los criterios de anticuerpos diagnósticos/terapéuticos y son candidatos prometedores para anticuerpos terapéuticos para diagnosticar/ prevenir la enfermedad de Alzheimer.

50 Además, como con los anticuerpos 1A9 y 2C3, los presentes inventores obtuvieron con éxito los anticuerpos 5A5, 5A9, 4F7, 4H5, 6E4 y 6H4 que se unen específicamente a oligómeros de A $\beta$ , pero no reconocen monómeros de A $\beta$ . Los presentes inventores descubrieron que estos seis tipos de anticuerpos tienen actividad para neutralizar la neurotoxicidad inducida por A $\beta$  y para suprimir la formación de fibrillas amiloides A $\beta$ .

## ES 2 617 604 T3

Los presentes inventores describen que los anticuerpos 5A5, 5A9, 4F7, 4H5, 6E4 y 6H4 antes mencionados son candidatos prometedores para anticuerpos terapéuticos para diagnosticar/prevenir la enfermedad de Alzheimer.

Más específicamente, se divulga lo siguiente:

- 5 [1] un anticuerpo que se une a un oligómero de A $\beta$  que se une a un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;
- [2] un anticuerpo que se une a un oligómero de A $\beta$  que se une a un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21 y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23;
- 10 [3] un anticuerpo que se une a un oligómero de A $\beta$  que se une a un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41 y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43;
- [4] un anticuerpo que se une a un oligómero de A $\beta$  que se une a un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61 y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63;
- 15 [5] un anticuerpo que se une a un oligómero de A $\beta$  que se une a un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 81 y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83;
- [6] un anticuerpo que se une a un oligómero de A $\beta$  que se une a un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 101 y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 103;
- 20 [7] un anticuerpo de cualquiera de (1) a (38) a continuación:
- (1) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 como CDR3;
- 25 (2) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 como CDR3;
- (3) un anticuerpo que comprende la cadena H de (1) y la cadena L de (2);
- 30 (4) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 como VH;
- (5) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 como VL;
- (6) un anticuerpo que comprende la cadena H de (4) y la cadena L de (5);
- 35 (7) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 como CDR3;
- (8) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 como CDR3;
- 40 (9) un anticuerpo que comprende la cadena H de (7) y la cadena L de (8);
- (10) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 como VH;
- (11) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 como VL;
- 45 (12) un anticuerpo que comprende la cadena H de (10) y la cadena L de (11);
- (13) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53 como CDR3;

## ES 2 617 604 T3

- (14) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59 como CDR3;
- (15) un anticuerpo que comprende la cadena H de (13) y la cadena L de (14);
- 5 (16) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 como VH;
- (17) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47 como VL;
- (18) un anticuerpo que comprende la cadena H de (16) y la cadena L de (17);
- 10 (19) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 69 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 73 como CDR3;
- (20) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79 como CDR3;
- 15 (21) un anticuerpo que comprende la cadena H de (19) y la cadena L de (20);
- (22) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 65 como VH;
- (23) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67 como VL;
- 20 (24) un anticuerpo que comprende la cadena H de (22) y la cadena L de (23);
- (25) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 89 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 91 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 93 como CDR3;
- 25 (26) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 97 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 99 como CDR3;
- (27) un anticuerpo que comprende la cadena H de (25) y la cadena L de (26);
- 30 (28) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 85 como VH;
- (29) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 87 como VL;
- (30) un anticuerpo que comprende la cadena H de (28) y la cadena L de (29);
- 35 (31) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 109 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 111 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 113 como CDR3;
- (32) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 115 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 117 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 119 como CDR3;
- 40 (33) un anticuerpo que comprende la cadena H de (31) y la cadena L de (32);
- (34) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 105 como VH;
- (35) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 107 como VL;
- 45 (36) un anticuerpo que comprende la cadena H de (34) y la cadena L de (35);

- (37) un anticuerpo que comprende una o más sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en el anticuerpo de uno cualquiera de (1) a (36), que tiene actividad equivalente al anticuerpo de cualquiera de (1) a (36); y
- (38) un anticuerpo que se une al epítipo unido por el anticuerpo de cualquiera de (1) a (36);
- 5 [8] el anticuerpo de [7], en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado;
- [9] una composición que comprende el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] y un vehículo farmacéuticamente aceptable;
- [10] un agente contra el deterioro cognitivo, que comprende el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] como ingrediente activo;
- 10 [11] un agente terapéutico para la enfermedad de Alzheimer, que comprende el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] como ingrediente activo;
- [12] un agente para suprimir la progresión de la enfermedad de Alzheimer, que comprende el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] como ingrediente activo;
- 15 [13] un agente para suprimir la formación de placa senil, que comprende el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] como ingrediente activo;
- [14] un agente para suprimir la acumulación de A $\beta$ , que comprende el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] como ingrediente activo;
- [15] un agente antineurotóxico, que comprende el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] como ingrediente activo;
- 20 [16] un agente para inhibir la formación de fibrillas de amiloide A $\beta$ , que comprende el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] como ingrediente activo;
- [17] un agente contra la toxicidad sináptica, que comprende el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] como ingrediente activo;
- 25 [18] un método para detectar un oligómero de A $\beta$ , que comprende la etapa de detectar un oligómero de A $\beta$  contenido en una muestra recogida de un sujeto usando el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8];
- [19] un método para diagnosticar si un sujeto es o no un posible paciente con enfermedad de Alzheimer, que comprende el uso del anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] para detectar un oligómero de A $\beta$  en una muestra recogida de un sujeto;
- 30 [20] un método para diagnosticar si un sujeto es o no un posible paciente con enfermedad de Alzheimer, que comprende las etapas de:
- (a) poner en contacto una muestra recogida de un sujeto con el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8]; y
- (b) medir la cantidad de oligómero de A $\beta$  en la muestra,
- en la que se determina que el sujeto es un posible paciente con enfermedad de Alzheimer, cuando la cantidad medida en la etapa (b) es más alta que la de un individuo sano;
- 35 [21] un método para diagnosticar si un sujeto es o no un posible paciente con enfermedad de Alzheimer, que comprende las etapas de:
- (a) poner en contacto una muestra recogida de un sujeto con el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] y un anticuerpo que se une a un monómero de A $\beta$ ; y
- (b) medir la relación de oligómero de A $\beta$  con respecto a monómero de A $\beta$  en la muestra, en la que se determina que el sujeto es un posible paciente con enfermedad de Alzheimer, cuando la proporción medida en la etapa (b) es mayor que la de un individuo sano;
- 40 [22] el método de cualquiera de [18] a [21], en el que la muestra es sangre o líquido cefalorraquídeo;
- [23] un agente farmacéutico para uso en el método de cualquiera de [18] a [21]; y
- [24] un kit para su uso en el método de cualquiera de [18] a [21].
- 45 Además, se divulga lo siguiente:

- [25] un método para prevenir y/o tratar el deterioro cognitivo, que comprende la etapa de administrar el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] como ingrediente activo;
- [26] un método para prevenir y/o tratar la enfermedad de Alzheimer, que comprende la etapa de administrar el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] como ingrediente activo;
- 5 [27] un método para suprimir la progresión de la enfermedad de Alzheimer, que comprende la etapa de administrar el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] como ingrediente activo;
- [28] un método para suprimir la formación de placa senil, que comprende la etapa de administrar el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] como ingrediente activo;
- 10 [29] un método para suprimir la acumulación de A $\beta$ , que comprende la etapa de administrar el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] como ingrediente activo;
- [30] un método para neutralizar la neurotoxicidad, que comprende la etapa de administrar el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] como ingrediente activo;
- [31] un método para inhibir la formación de fibrillas amiloides A $\beta$ , que comprende la etapa de administrar el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] como ingrediente activo;
- 15 [32] un método para neutralizar la toxicidad sináptica, que comprende la etapa de administrar el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] como ingrediente activo;
- [33] el uso del anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] en la producción de un agente contra el deterioro cognitivo;
- 20 [34] el uso del anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] en la producción de un agente terapéutico para la enfermedad de Alzheimer;
- [35] el uso del anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] en la producción de un agente para suprimir la progresión de la enfermedad de Alzheimer;
- [36] uso del anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] en la producción de un agente para suprimir la formación de placa senil;
- 25 [37] uso del anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] en la producción de un agente para suprimir la acumulación de A $\beta$ ;
- [38] uso del anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] en la producción de un agente para neutralizar (suprimir) la neurotoxicidad;
- 30 [39] uso del anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] en la producción de un agente para inhibir la formación de fibrillas amiloides A $\beta$ ;
- [40] la utilización del anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] en la producción de un agente para neutralizar (suprimir) la toxicidad sináptica;
- [41] el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] para su uso en la prevención y/o el tratamiento del deterioro cognitivo;
- 35 [42] el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer;
- [43] el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] para su uso en la supresión de la progresión de la enfermedad de Alzheimer;
- 40 [44] el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] para su uso en la supresión de la formación de placa senil;
- [45] el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] para su uso en la supresión de la acumulación de A $\beta$ ;
- [46] el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] para su uso en neutralización (supresión) de neurotoxicidad;
- 45 [47] el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] para su uso en la inhibición de la formación de fibrillas amiloides A $\beta$ ; y

[48] el anticuerpo de cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9] para su uso en la neutralización (supresión) de la toxicidad sináptica.

#### Efectos de la invención

5 Se espera que los anticuerpos proporcionados por la presente invención contribuyan en gran medida al establecimiento de métodos preventivos/terapéuticos selectivos con moléculas responsables de evocar condiciones patológicas de la enfermedad de Alzheimer y al establecimiento de marcadores diagnósticos tempranos para la enfermedad de Alzheimer. Los presentes inventores obtuvieron evidencias que demuestran que, incluso en la terapia de anticuerpos dirigida a condiciones patológicas en el cerebro, la administración intravenosa periférica es suficiente y no hay necesidad de considerar la transferencia al cerebro. Por lo tanto, se espera que la presente  
10 invención aumente rápidamente el progreso de los fármacos de anticuerpos para la enfermedad de Alzheimer.

#### Breve descripción de los dibujos

15 La Fig. 1 presenta fotografías y un gráfico que muestra los resultados de la producción y la determinación característica de anticuerpos específicos de oligómeros. A: Electroforesis de inmunógenos. Se aisló el tetrámero de A $\beta$  1-42 (punta de flecha negra) que está libre de contaminación del monómero de A $\beta$  1-42 (cabeza de flecha resaltada) usando SDS-PAGE. Carril 1: A $\beta$  1-42 disuelto en amortiguador de fosfato 10 mM; y el carril 2: A $\beta$  1-42 disuelto en agua destilada desionizada. B: El amiloide A $\beta$ , que es insoluble en un amortiguador, pero que puede extraerse utilizando ácido fórmico del cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer, se inmunoprecipitó utilizando el sobrenadante de un cultivo de células de hibridoma positivo, y se separó selectivamente el complejo inmune usando proteína G-agarosa (Amersham). Se probaron nueve clones; el carril 2 (asterisco) es 1A9 y el carril 6 (doble asterisco) es 2C3. C: Perfil de elución de CET de un medio acondicionado. Entre las 24 fracciones recolectadas de CET, se sometieron las fracciones 8, 13 y 16 a inmunoprecipitación de 1A9. Se detectó la inmunorreactividad de A $\beta$  usando 4G8. La punta de flecha negra indica el trímero y la punta de flecha resaltada indica el dímero. Asterisco (\*) indica la cadena ligera de anti-IgG de ratón.

25 La Fig. 2 presenta fotografías y un gráfico que muestra la actividad antitóxica de 1A9 y 2C3. A hasta F: Imágenes representativas de células PC12 tratadas con NGF (PC12N), que fueron expuestas a A $\beta$  1-42 libre de semilla a 37°C durante 48 horas en presencia o ausencia de anticuerpos (mitad izquierda de cada panel). Tinción de calceína AM/PI representativa donde las células vivas se tiñeron de color verde y las células muertas se tiñeron de rojo (mitad derecha de cada panel). G: La viabilidad de las células expuestas a A $\beta$  1-42 libre de semilla (25  $\mu$ M) con los siguientes anticuerpos: IgG2b no específica (cuadrado relleno); 4G8 (triángulo sin relleno); 1A9 (cuadrado sin relleno); y 2C3 (círculo relleno).  
30

35 La Fig. 3 presenta fotografías y un gráfico que muestra el tamaño y las características morfológicas de los montajes de A $\beta$  tóxicos dirigidos por 1A9 y 2C3. A: El sobrenadante de 540.000 x g de A $\beta$  1-42 (25  $\mu$ M) se sometió a un proceso de tamizado molecular continuo usando membranas de ultrafiltración que tenían un valor de corte de peso molecular de 3, 10, 30 y 100 kDa (Microcon). Los cuatro tipos de filtrados así fraccionados se denominaron como sigue: fracción 1 (< 3 kDa), fracción 2 (3 a 10 kDa), fracción 3 (10 a 30 kDa), fracción 4 (30 a 100 kDa); y la fracción 5 (> 100 kDa) que finalmente fue retenida. La presencia de A $\beta$  1-42 en cada una de las fracciones antes mencionadas se detectó mediante inmunotransferencia 4G8. B: Imágenes representativas de células PC12 tratadas con NGF (PC12N) tratadas con las cinco fracciones a 37°C durante 48 horas. La toxicidad de cada fracción se evaluó como se ha descrito anteriormente para la Fig. 2. C: La viabilidad de células tratadas con el sobrenadante de 540.000 x g de A $\beta$  1-42 y las cinco fracciones (fracciones 1 a 5). Resultados similares se obtuvieron a partir de dos experimentos independientes. Los valores se presentan en porcentaje (media  $\pm$  DE) con respecto al control. D: Análisis de transferencia de puntos (*dot blot*) de las cinco fracciones (fracciones 1 a 5). Las transferencias se hicieron reaccionar con A11, 1A9, 2C3 y 4G8. E: Imágenes de AFM de las cinco fracciones. En la fracción 5 (Fr. 5) que tenía la toxicidad más fuerte, se observaron estructuras en forma de anillo y en forma de perlas además de moléculas granulares.  
40  
45

50 La Fig. 4 presenta fotografías y gráficos que muestran la actividad de 1A9 y 2C3 para suprimir la formación de fibrillas amiloides A $\beta$ . A: Se controló la formación de fibrillas amiloides A $\beta$  1-42 a diversas concentraciones (10)  $\mu$ M (cuadrado sin relleno), 25  $\mu$ M (diamante relleno) y 50  $\mu$ M (círculo sin relleno) mediante un ensayo ThT a 37°C durante hasta 72 horas. B: Se observó la inhibición coexistente dependiente de la dosis de anticuerpo de la formación de fibrillas amiloides A $\beta$  1-42 para 2C3 (círculo sin relleno). Por el contrario, los anticuerpos 1A9 (cuadrado sin relleno), 4G8 (triángulo relleno) e IgG no específicos (cuadrado relleno) no inhibieron el montaje formador de fibrillas de A $\beta$  1-42 libres de semillas (sobrenadante de 540.000 x g negativo para ThT). C: Se observó la inhibición coexistente dependiente de la dosis del anticuerpo del montaje formador de fibrillas de A $\beta$  1-42 para 2C3 (círculo sin relleno), y se observó también inhibición casi completa para 1A9 (cuadrado sin relleno) a 3  $\mu$ M. D: Ninguno de los anticuerpos de ensayo añadidos después de una preincubación de 24 horas para la formación de fibrillas de amiloide A $\beta$  1-42 podría disolver o desensamblar las fibrillas de amiloide A $\beta$  1-42. E hasta G: Imágenes de EM de A $\beta$  1-42 en ausencia (Panel E) y presencia de 2C3 (Panel F) y 1A9 (Panel G).  
55

La Fig. 5 presenta fotografías y gráficos sobre oligómeros de A $\beta$  1-42 relacionados con la toxicidad. A: Ensayo de transferencia de puntos (mitad superior del Panel A): Se incubaron monómeros de A $\beta$  1-42 (25  $\mu$ M) durante un

tiempo especificado (0 a 72 horas) a 37°C, y se inmovilizaron sobre una membrana de nitrocelulosa, y se sometieron a un ensayo de transferencia de puntos que usa A11, 1A9, 2C3 o 4G8. Se analizó la aparición de estructuras positivas a la inmunorreactividad para cada anticuerpo. Análisis de intensidad de inmunorreactividad (mitad inferior del Panel A): Los resultados del ensayo de transferencia de puntos se analizaron semicuantitativamente usando el software Multi Gauge versión 3.0 (Fuji Film, Tokio). Para correlacionar la formación de oligómeros y la formación de fibrillas amiloides, el valor de fluorescencia ThT (el eje Y derecho) se superpuso en el mismo eje de tiempo. B: El montaje A $\beta$  1-42 después de 0, 2, 4 y 24 horas de incubación a 37°C, y el cambio en el montaje de A $\beta$ 1-42 después de una incubación adicional de 48 horas. El montaje de A $\beta$  1-42 se detectó por inmunotransferencia 4G8. C: La actividad tóxica de los diversos montajes de A $\beta$ 1-42 mencionados anteriormente. La viabilidad de las células nerviosas se determinó mediante el ensayo LIVE/DEAD como se describe en la Fig. 2. D: La actividad antineurotóxica de 1A9 y 2C3 se evaluó usando diversos montajes de A $\beta$  (los montajes de A $\beta$  1-42 formados a 37°C durante 0 y 2 horas ("0 h" y "2 h") y el sobrenadante positivo para ThT recogido después de la ultracentrifugación a 540.000 x g durante dos horas ("sobrenadante de 2 h")). Las imágenes representativas de células PC12N expuestas a diversos montajes de A $\beta$  1-42 en ausencia o presencia de los anticuerpos se muestran en la mitad izquierda del Panel D (a: "0 h"; b: "2 h"; c: "sobrenadante de 2 h"; D: "sobrenadante de 2 h" + IgG2b; e: "sobrenadante de 2 h" + 1A9; f: "sobrenadante de 2 h" + 2C3). La viabilidad de las células expuestas a diversos montajes de A $\beta$  1-42 en ausencia o presencia de los anticuerpos se presenta en porcentaje (media  $\pm$  DE) con respecto al control, y esto se muestra en la mitad derecha del Panel D. Comparado con el montaje de A $\beta$  1-42 de "0 h", el montaje de A $\beta$  1-42 de "2 h" disminuyó la neurotoxicidad. El "sobrenadante de 2 h" recuperó la neurotoxicidad en un grado similar al del montaje de A $\beta$  1-42 de "0 h". La IgG2b no específica no pudo bloquear la inducción de neurotoxicidad del montaje de A $\beta$  1-42 de "sobrenadante de 2 h". El anticuerpo 1A9 monoclonal inhibió completamente la neurotoxicidad inducida por el "sobrenadante de 2 h", mientras que la capacidad de 2C3 para inhibir la toxicidad fue ligeramente inferior. En los experimentos usando los dos anticuerpos monoclonales (mAb), se observó la actividad antitóxica de los mAb a una relación molar mAb:A $\beta$  de 1:<25 a 50. Esto sugiere que existen montajes oligoméricos reconocidos por 1A9 y 2C3 estructuralmente diferentes a una concentración relativamente baja.

La Fig. 6 presenta fotografías y gráficos que muestran que existen oligómeros solubles reconocidos por 1A9 y 2C3 en el cerebro humano. Los anticuerpos contra oligómeros de A $\beta$  pueden detectar placas seniles y amiloides vasculares en el cerebro con EA sólo después del pretratamiento con proteasa K. A: tinción con 1A9; B: tinción con 2C3; y C: tinción con A11. D: inmunotransferencia de 4G8 de A $\beta$  inmunoprecipitado con 1A9 o 2C3 en cerebro con EA soluble en amortiguador (carriles 1, 2, 4 y 5) y cerebro de control sano (carriles 3 y 6). Los resultados representativos para 1A9 y 2C3 se muestran en la mitad izquierda y derecha del panel, respectivamente. E y F: Análisis semicuantitativo (con control de actina) de 12 mer inmunorreactivo a 1A9 soluble (Panel E) y 12 mer inmunorreactivo a 2C3 soluble (Panel F) en la corteza entorrinal humana obtenido de 50 casos de autopsia de una población de ancianos sanos (NFT de Braak Etapa I o II: n = 35, NFT de Braak Etapa III o IV: n = 13 y NFT de Braak Etapa > IV, casos de EA: n = 2).

La Fig. 7-1 presentan gráficos que muestran que los oligómeros reconocidos por 1A9 y 2C3 solubles existen en CSF humano. Se sometieron a cromatografía de exclusión por tamaño (CET) líquido cefalorraquídeo (LCR) entero combinado (EA = 10, y CN = 10) (Paneles A y B) y LCR combinado sin lipoproteína (EA = 10 y CN = 10) (Paneles C y D). En los paneles A y B, se analizaron las fracciones recogidas para la distribución de los monómeros de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 mediante los ELISA BNT77-BA27 y BNT77-BC05. Los paneles C y D muestran la presencia de oligómeros de A $\beta$  40 y A $\beta$  42 capturados por anticuerpos mixtos 1A9/2C3.

La Fig. 7-2 es la continuación de la Fig. 7-1. Se midieron la cantidad de montaje oligomérico reconocido por 1A9 (ELISA 1A9-BC05 y 1A9-BA27) y la cantidad de montaje reconocido por 2C3 (ELISA 2C3-BC05 y 2C3-BA27) para 12 casos con EA (círculo sin relleno) y 13 casos de CN (círculo relleno) (Paneles E y G). La relación oligómero/monómero se muestra en los Paneles F (1A9) y H (2C3).

La Fig. 8 presenta gráficos que muestran que la aparición de deterioro de la memoria en ratones Tg2576 se puede prevenir mediante el tratamiento de inmunización pasiva. Los ratones Tg2576 de 13 meses de edad se dividieron en los siguientes tres grupos para realizar ensayos de aprendizaje/comportamiento: grupo que recibió PBS: n = 10; grupo que recibió 1A9: n = 13; y grupo que recibió 2C3: n = 11. Todos los valores medidos se indicaron como media  $\pm$  EE. (A) prueba de laberinto en Y. El comportamiento de la alteración espontánea se controló en cada grupo durante una sesión de ocho minutos de la labor en el laberinto en Y. Los resultados del ANOVA unidireccional fueron los siguientes: F (1, 52) = 3,09, p < 0,05; \* p < 0,05 en la comparación con ratones Tg2576 que recibieron PBS. (B) Prueba de reconocimiento de objetos nuevos. La sesión de retención se realizó 24 horas después del entrenamiento. En cada grupo se determinó la preferencia exploratoria en una sesión de diez minutos en la prueba de reconocimiento de objetos nuevos. Los resultados del ANOVA bidireccional fueron los siguientes: entrenamiento/retención, F (1, 64) = 31,53, p < 0,01; grupo de animales, F (2, 64) ~ 7,49, p < 0,01; entrenamiento/retención repetido por el grupo de animales, F (2, 64) = 10,12, p < 0,01; \*\* p < 0,01 en la comparación con los ratones correspondientes no entrenados, ### p < 0,01 en la comparación con ratones Tg2576 que recibieron PBS. (C) Se midió la longitud de la trayectoria de natación durante una sesión de 60 segundos de prueba de laberinto en agua para cada grupo. Los resultados del ANOVA bidireccional fueron los siguientes: ensayo, F (9, 320) = 20,46, p < 0,01; grupo de animales, F (2, 320) = 12,59, p < 0,01; ensayo repetido por el grupo de animales, F (18, 320) = 1,78, p < 0,05; p < 0,05, \*\* p < 0,01 en la comparación con ratones Tg2576 que recibieron PBS. Ensayo de

aprendizaje condicionado al miedo: Se determinaron los tiempos de bloqueo (E) dependientes del contexto (D) y dependientes de las pistas. Los resultados del ANOVA bidireccional fueron los siguientes: prueba dependiente del contexto,  $F(2, 32) = 5,94$ ,  $p < 0,01$ ; prueba dependiente de las pistas,  $F(2, 32) = 7,33$ ,  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$  en la comparación con ratones Tg2576 que recibieron PBS.

5 La Fig. 9 presenta gráficas y una fotografía que muestra que la acumulación de A $\beta$  en Tg2576 puede prevenirse mediante inmunoterapia pasiva. Se extrajeron el hipocampo y la corteza cerebral de tres grupos de ratones Tg2576 de 13 meses de edad (grupo que recibió PBS,  $n = 10$ , grupo que recibió 1A9,  $n = 13$  y grupo que recibió 2C3,  $n = 11$ ) en tres etapas continuas para preparar las fracciones solubles en amortiguador, solubles en SDS y extraíbles en ácido fórmico (FA). Cada una de las fracciones se sometió a pruebas ELISA específicas para A $\beta$  (kit WAKO: BNT77-BA27 para A $\beta$  x-40; BNTT7-BC05 para A $\beta$  x-42). Se encontró que la acumulación de A $\beta$  40 (SDS y FA) y A $\beta$  42 (SDS) se suprimió significativamente solamente en el grupo tratado con 1A9. El efecto de supresión de acumulación para el oligómero positivo para A11 (4 mer) se confirmó en las fracciones de la corteza cerebral solubles en SDS de los dos grupos tratados con anticuerpos.

15 La Fig. 10 presenta fotografías y gráficos de oligómeros de A $\beta$  en el plasma y el cerebro de Tg2576. A y B: Como resultado del análisis de ELISA, no se observó diferencia significativa en la cantidad de A $\beta$  x-40 y A $\beta$  x-42 en el plasma entre el grupo que recibió PBS y el grupo de inmunoterapia. C: De manera similar, no se observó diferencia en la relación de A $\beta$  40/A $\beta$  42 entre los tres grupos ensayados. D: Como resultado del análisis de transferencia de puntos utilizando homogeneizados de cerebro combinados, no se observó diferencia en la cantidad de oligómero positivo para A11 soluble en solución fisiológica entre los tres grupos ensayados. Hipocampo (panel izquierdo) y corteza cerebral (panel derecho). Grupo que recibió PBS,  $n = 10$ ; grupo que recibió 1A9,  $n = 13$ ; y el grupo que recibió 2C3,  $n = 11$ . E: De acuerdo con el análisis de inmunotransferencia utilizando el anticuerpo antioligómero A11, la inmunorreactividad del tetrámero de A $\beta$  en la fracción de corteza cerebral extraída con SDS (panel derecho) disminuyó en los grupos que recibieron 1A9 y 2C3 en comparación con el grupo que recibió PBS. Por otro lado, esto no se observó en el hipocampo (panel izquierdo). F: Se combinó sangre de cada uno de los grupos (plasma sin albúmina, parte superior del Panel F, plasma sin albúmina/lipoproteína, parte inferior del Panel F) y se sometió a análisis por transferencia de puntos con A11. Como resultado, se encontró que la inmunorreactividad de A11 aumentaba en los grupos que recibieron 1A9 y 2C3 en comparación con el grupo que recibió PBS (Panel F). La proporción de la forma unida a lipoproteína de oligómeros reconocidos por 2C3 fue mayor que la de los oligómeros reconocidos por 1A9 (parte inferior del Panel F). Además, la inmunotransferencia de A11 también mostró señales positivas a aproximadamente 200 kDa, y la inmunorreactividad aumentó claramente en los grupos que recibieron 1A9 y 2C3 en comparación con el grupo que recibió PBS (Panel G). A partir de estos resultados, se puede concebir que el efecto terapéutico selectivo sólo para las moléculas de oligómero de A $\beta$  objetivo se obtuvo en los grupos que recibieron anticuerpo sin afectar a las moléculas fisiológicas.

35 La Fig. 11 presenta fotografías y gráficos que muestran que la formación de amiloide de placa senil (A: tinción de anticuerpo específico de A $\beta$  P y B: análisis positivo para tioflavina S) y la formación de neurita distrófica hinchada (C: análisis positivo para sinaptofisina) fueron suprimidas en el cerebro de ratón Tg2576 por tratamiento de inmunización pasiva.

40 La Fig. 12 presenta fotografías que muestran la supresión de la degeneración sináptica mediante el tratamiento de inmunización pasiva con 1A9 y 2C3. Inmunotinción de sinaptofisina (paneles de la izquierda) y drebrina (paneles de la derecha) en las células periféricas similares a puntos presinápticos y postsinápticos. Parte superior: administración de PBS; parte central: administración de 1A9; y parte inferior: administración de 2C3.

45 La Fig. 13 presenta fotografías que muestran la transferencia cerebral de los anticuerpos por tratamiento de inmunización pasiva. Se muestra la distribución de anticuerpos administrados en el cerebro de ratón Tg2576. Tinción con anticuerpos anti-A $\beta$  (paneles de la izquierda) e IgG (paneles centrales). Administración de 1A9 (A), administración de 2C3 (B) y administración de PBS (C).

La Fig. 14 presenta fotografías que muestran, mediante análisis por transferencia de puntos, que los anticuerpos monoclonales 5A5, 5A9, 4F7, 4H5, 6E4 y 6H4 son específicos para los oligómeros de A $\beta$  (3 a 96 horas), pero no reconocen los monómeros de A $\beta$  (0 horas).

50 La Fig. 15 presenta gráficas que muestran la capacidad de unión selectiva a oligómeros de A $\beta$  de los seis tipos de anticuerpos (4F7, 4H5, 5A5, 5A9, 6E4 y 6H4). El eje vertical indica la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm y el eje horizontal indica la concentración de oligómero de A $\beta$  o monómero de A $\beta$  utilizados como inhibidor. En cada gráfico, la línea discontinua indica la actividad de unión al anticuerpo cuando se usó el oligómero de A $\beta$  como inhibidor, y la línea continua indica la actividad de unión al anticuerpo cuando se usó el monómero de A $\beta$  como inhibidor.

55 La Fig. 16 presenta gráficas que muestran la actividad neutralizante de los seis tipos de anticuerpos (4F7, 4H5, 5A5, 5A9, 6E4 y 6H4) contra la neurotoxicidad inducida por A $\beta$ . El eje horizontal indica la cantidad de anticuerpo añadido, y el eje vertical muestra la citotoxicidad relativa a aquella bajo la condición libre de anticuerpo como patrón (véase la ecuación en la Figura). Se utilizó IgG de control (3F1), que es un anticuerpo que no se une a A $\beta$  42, para comparación.

La Fig. 17 presenta gráficas que muestran la actividad supresora de los seis tipos de anticuerpos (4F7, 4H5, 5A5, 5A9, 6E4 y 6H4) contra la formación de fibrillas de A $\beta$  amiloide. Los anticuerpos se añadieron a tres concentraciones diferentes a una solución de A $\beta$  1-42 (12,5  $\mu$ M). Después de la incubación a 37°C durante 24 horas, se midió el nivel de formación de fibrillas amiloides A $\beta$  mediante el método de intensidad de fluorescencia ThT. El eje horizontal indica la cantidad de anticuerpo añadido y el eje vertical muestra el nivel de formación de fibrillas amiloides mediante la adición de anticuerpo que es relativa al nivel de formación de fibrillas amiloides sin adición de anticuerpo como estándar.

Modo para llevar a cabo la invención

La presente invención se describirá más específicamente a continuación.

Como se describió anteriormente, los presentes inventores tuvieron éxito en la obtención de anticuerpos que se unen específicamente a oligómeros de A $\beta$  pero no a monómeros de A $\beta$ . Es decir, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen a oligómeros de A $\beta$  pero no a monómeros de A $\beta$ . Los anticuerpos están preferiblemente aislados o purificados.

Los términos "aislados" y "purificados" utilizados para sustancias (anticuerpos y similares) de la presente invención indican que las sustancias no incluyen sustancialmente al menos una sustancia que puede estar contenida en la fuente natural. Por lo tanto, "anticuerpos aislados" y "anticuerpos purificados" se refieren a anticuerpos que no incluyen sustancialmente materiales celulares tales como hidrocarburos, lípidos u otras proteínas contaminantes de la célula o fuente de tejido a partir de la cual se derivan los anticuerpos (proteínas). Cuando los anticuerpos se sintetizan químicamente, los términos se refieren a anticuerpos que no incluyen sustancialmente sustancias precursoras químicas u otras sustancias químicas. En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención se aíslan o se purifican.

"Anticuerpos" se refiere a glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Los anticuerpos muestran una especificidad de unión frente a antígenos específicos. En el presente documento, "antígenos" se refiere a proteínas que tienen la capacidad de unirse a los anticuerpos correspondientes, e inducen reacciones antígeno-anticuerpo *in vivo*.

Las proteínas A $\beta$ , que son los constituyentes principales de los amiloides, son péptidos que consisten en 40 a 42 aminoácidos y se sabe que se producen a partir de proteínas precursoras llamadas proteínas precursoras amiloides (APP) por acción de proteasas. Además de las fibrillas amiloides recogidas en la fracción de sedimento ultracentrifugado, las moléculas amiloides producidas a partir de APP incluyen montajes oligoméricos no fibrosos además de monómeros solubles. Los "oligómeros de A $\beta$ " como se describe en la presente invención se refieren a montajes no fibrosos. Los "oligómeros de A $\beta$ " como se describe en la presente invención incluyen, por ejemplo, oligómeros de A $\beta$ 40 (A $\beta$  1-40) y oligómeros de A $\beta$ 42 (A $\beta$  1-42). Por ejemplo, los "oligómeros de A $\beta$ 42" como se escribe en la presente invención son moléculas que muestran un peso molecular de 45 a 160 kDa en SDS-PAGE y de 22,5 a 1.035 kDa en PAGE Blue Native. Utilizando tamices moleculares, las moléculas se recogen principalmente en la solución de retención > 100 kDa. Cuando se observan bajo microscopio de fuerza atómica, las moléculas muestran morfologías mixtas de moléculas granulares, en forma de perlas y en forma de anillo que tienen una altura de 1,5 a 3,1 nm. Mediante el método de filtración en gel, se eluyeron las moléculas en la fracción 8 de volumen vacío con un peso molecular de 680 kDa o más y en la fracción 15 con un peso molecular de 17 a 44 kDa.

No hay limitación en el origen y la forma de los anticuerpos utilizados en la presente invención, siempre que se unan a oligómeros de A $\beta$  pero no a monómeros de A $\beta$ .

Los "anticuerpos" de la presente invención son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos de la presente invención también incluyen cualquier tipo de anticuerpos tales como anticuerpos de animales no humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, los minicuerpos descritos más adelante, anticuerpos modificados en la secuencia de aminoácidos, anticuerpos modificados conjugados con otras moléculas (por ejemplo, polímeros tales como polietilenglicol), y anticuerpos modificados con cadena de azúcar.

En la presente memoria, el término "anticuerpos monoclonales" se refiere a anticuerpos que se obtienen a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos. Es decir, los anticuerpos individuales que constituyen la población son idénticos con la excepción de posibles mutantes naturales que pueden estar presentes en una cantidad traza. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y reconocen un único sitio antigénico. Cada uno de los anticuerpos monoclonales reconoce un solo determinante del antígeno, en contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que típicamente contienen diferentes anticuerpos contra diferentes determinantes antigénicos (epítopos).

Además de la especificidad mencionada anteriormente, los anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de que pueden ser sintetizados a partir de un cultivo de hibridoma que no está contaminado con otras inmunoglobulinas. Por lo tanto, "monoclonal" indica las características de los anticuerpos que se pueden obtener de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea. Este término no indica el requisito de ningún método específico para la producción de anticuerpos.

- 5 Básicamente, los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando técnicas conocidas. Por ejemplo, pueden producirse mediante el método de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler y Milstein (Nature 256: 495-7, 1975), o por el método de ADN recombinante (Cabilly y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81 : 3273-7, 1984), pero los métodos no están limitados a los mismos. Por ejemplo, cuando se usa el método de hibridoma, se usa un oligómero de A $\beta$  (por ejemplo, el tetrámero de A $\beta$  descrito en los Ejemplos) como un antígeno de sensibilización, y la inmunización se lleva a cabo de acuerdo con un método de inmunización convencional. Las células inmunitarias obtenidas se fusionan con células progenitoras conocidas mediante un método de fusión celular convencional, y las células productoras de anticuerpos monoclonales se pueden cribar y aislar usando un método de cribado convencional.
- 10 Los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden producir de la siguiente manera. Se disuelve el A $\beta$  1-42 sintético (Peptide Institute, Inc., Osaka) en agua desionizada destilada o una solución amortiguadora de fosfato 10 mM, y ésta se incuba a 37°C durante 18 horas. Después, los péptidos se separan por SDS-PAGE al 4-12% y se visualizan mediante tinción con CBB, y la porción del tetrámero de A $\beta$  1-42 solo que no está contaminada con el monómero de A $\beta$  1-42 se corta y se usa como un antígeno. Por otra parte, se prepara una preparación que
- 15 contiene una gran cantidad del oligómero de A $\beta$  1-40 mezclando (i) un A $\beta$  1-40 modificado preparado uniendo químicamente 6-carboxitertrametilrodamina (6-TAMRA) (SIGMA) al extremo terminal N de un péptido A $\beta$  1-40 sintético usando un método convencional con (ii) A $\beta$  1-40 sintético (Peptide Institute, Inc., Osaka) en una proporción de 5:100, 10:100, 20: 100, 30:100, 40:100, 50:100, 60:100, 70:100 o 80:100, preferiblemente 90:100, o más preferiblemente 100:100, y llevando a cabo la reacción de polimerización durante tres horas, preferiblemente seis horas o más preferiblemente 20 horas. A continuación, se inmunizan los ratones Balb-c con 2,5  $\mu$ g ya sea del tetrámero de A $\beta$  1-42 o el oligómero de A $\beta$  1-40 emulsionado usando adyuvante de Freund completo inyectando el antígeno en sus patas. Posteriormente, se llevan a cabo inmunizaciones de refuerzo seis veces. Los hibridomas se producen a partir del ganglio linfático inguinal por fusión con células Sp2/O-Ag14 usando polietilenglicol 1500.
- 20 Los animales inmunizados con antígenos sensibilizadores no están particularmente limitados, pero se seleccionan preferiblemente teniendo en cuenta la compatibilidad con las células parentales utilizadas para la fusión celular. Generalmente, se utilizan roedores, Lagomorfos o primates. Los roedores incluyen, por ejemplo, ratones, ratas y hámsteres. Los Lagomorfos incluyen, por ejemplo, conejos. Los primates incluyen, por ejemplo, monos Catarrhini (viejo mundo) tales como *Macaca fascicularis*, *Macaca mulatta*, Hamadryas y chimpancés.
- 25 Los animales se inmunizan con antígenos sensibilizantes de acuerdo con métodos conocidos. Por ejemplo, como método estándar, la inmunización se realiza por inyección intraperitoneal o subcutánea de un antígeno sensibilizante en mamíferos.
- 30 Un ejemplo de las células progenitoras fusionadas con los inmunocitos mencionados anteriormente es la célula Sp2/O-Ag14, que se describirá a continuación en los Ejemplos. Sin embargo, pueden usarse otras diversas líneas celulares conocidas.
- 35 La fusión celular entre el inmunocito mencionado anteriormente y una célula de mieloma puede llevarse a cabo básicamente de acuerdo con métodos conocidos que incluyen el método de Kohler y Milstein (Kohler G. y Milstein C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46).
- 40 Los hibridomas obtenidos de esta manera se seleccionan cultivándolos en un medio de cultivo de selección convencional tal como un medio de cultivo HAT, que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina. El cultivo en el medio de cultivo HAT antes mencionado se continúa generalmente durante varios días a varias semanas durante un tiempo adecuado para matar células distintas de los hibridomas deseados (células no fusionadas). A continuación, se lleva a cabo un método de dilución limitante convencional para el cribado y la clonación individual de un hibridoma que produce el anticuerpo deseado.
- 45 A continuación, el hibridoma obtenido se trasplanta a la cavidad abdominal de un ratón y se extrae el fluido ascítico que contiene los anticuerpos monoclonales deseados. Por ejemplo, los anticuerpos pueden purificarse a partir del fluido ascítico por métodos convencionales de separación y/o purificación de proteínas tales como una combinación seleccionada de cromatografía en columna incluyendo, pero sin limitarse a, cromatografía de afinidad, filtración, ultrafiltración, precipitación con sal, diálisis, electroforesis en gel de poliacrilamida SDS enfoque isoelectrico (Antibodies: A Laboratory manual, Harlow y David, Lane (edit.), Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).
- 50 Las columnas de proteína A y las columnas de proteína G se pueden usar para columnas de afinidad. Ejemplos de las columnas de Proteína A utilizadas incluyen Hyper D, POROS y Sefarosa F.F. (Pharmacia).
- 55 La cromatografía (excluyendo la cromatografía de afinidad) incluye cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel, cromatografía en fase inversa y cromatografía de adsorción ("Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual", Daniel R Marshak y colaboradores Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Cuando se lleva a cabo la cromatografía, se pueden usar métodos de cromatografía en fase líquida tales como HPLC y FPLC.
- Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales preparados de esta manera pueden subcultivarse en un medio de cultivo convencional, y pueden almacenarse durante mucho tiempo en nitrógeno líquido.

Cualquier mamífero puede ser inmunizado usando un inmunógeno para la producción de anticuerpos. Sin embargo, cuando se preparan anticuerpos monoclonales mediante la producción de hibridomas, se considera preferiblemente la compatibilidad con las células parentales utilizadas en la fusión celular para la producción de hibridomas.

5 Generalmente, se usan para la inmunización roedores, lagomorfos o primates. Los roedores incluyen, por ejemplo, ratones, ratas y hámsteres. Los Lagomorfos incluyen, por ejemplo, conejos. Los primates incluyen, por ejemplo, monos Catarrhini (viejo mundo) tales como *Macaca fascicularis*, *Macaca mulatta*, Hamadryas y chimpancés.

10 El uso de animales transgénicos que tienen un repertorio de genes de anticuerpos humanos es conocido en la técnica (Ishida I, y colaboradores, Cloning and Stem Cells 4: 91-102, 2002). Como con otros animales, para obtener anticuerpos monoclonales humanos, se inmunizan los animales transgénicos, luego se recogen células productoras de anticuerpos de los animales y se fusionan con células de mieloma para producir hibridomas, y se pueden preparar anticuerpos anti-proteína humana a partir de estos hibridomas (véanse las publicaciones internacionales Nos. WO92/03918, WO94/ 02602, WO94/25585, WO96/33735, y WO96/34096).

15 Alternativamente, se pueden usar linfocitos inmortalizados con oncogenes para la producción de anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, los linfocitos humanos infectados con virus EB o similares se inmunizan *in vitro* con inmunógenos. A continuación, se fusionan los linfocitos inmunizados con células de mieloma derivadas de humanos (U266, etc.) capaces de división ilimitada, y por lo tanto se obtienen hibridomas que producen los anticuerpos humanos deseados (publicación de la solicitud de patente japonesa de Kokai No. (JP-A) S63-17688 (solicitud de patente japonesa publicada no examinada)).

20 Una vez que se pueden obtener anticuerpos monoclonales mediante cualquiera de los métodos antes mencionados, los anticuerpos pueden prepararse también usando métodos de ingeniería genética (véase, por ejemplo, Borrebaeck CAK y Larrirk JW, Therapeutic Monoclonal Antibodies, MacMillan Publishers, RU, 1990). Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos recombinantes mediante clonación de los ADN que codifican los anticuerpos deseados a partir de células productoras de antígeno tales como hibridomas o linfocitos inmunizados que producen los anticuerpos, insertando a continuación los ADN clonados en vectores apropiados y transfectando los vectores en células huésped adecuadas. Tales anticuerpos recombinantes también se incluyen en la presente invención.

30 Ejemplos de los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen el anticuerpo monoclonal 6E4. Preferiblemente, los anticuerpos monoclonales de la invención incluyen un anticuerpo que se une a un oligómero de A $\beta$  pero no a un monómero de A $\beta$ , en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal y es un anticuerpo que comprende una cadena H (cadena pesada) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 81 y una cadena L (cadena ligera) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83.

35 En una realización, los anticuerpos de la presente invención incluyen minicuerpos. Un minicuerpo contiene un fragmento de anticuerpo que carece de una porción de un anticuerpo completo, y no está particularmente limitado, siempre y cuando tenga la capacidad de unirse a un antígeno. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv. Ejemplos de minicuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv (Fv de cadena sencilla), diacuerpo y sc(Fv)<sub>2</sub> ((Fv)<sub>2</sub> de cadena sencilla).

40 Para obtener los anticuerpos policlonales descritos contra las proteínas, se retira sangre de un mamífero sensibilizado con un antígeno después de que se confirma que el nivel en suero del anticuerpo deseado aumenta. El suero se separa de la sangre mediante un método conocido. Cuando se utiliza un anticuerpo policlonal, se puede utilizar suero que contiene el anticuerpo policlonal. Alternativamente, si es necesario, se puede aislar una fracción que contiene el anticuerpo policlonal del suero y después utilizarse. Por ejemplo, se puede preparar inmunoglobulina G o M mediante la obtención de una fracción que reconoce específicamente una proteína descrita en la presente memoria utilizando una columna de afinidad acoplada con la proteína y luego purificando esta fracción usando una columna de Proteína A o Proteína G.

45 Se da a conocer un anticuerpo que se une a un oligómero de A $\beta$  que es un anticuerpo que se une a un oligómero de A $\beta$  que se une a 1A9, 2C3, 5A5, 5A9, 4F7, 4H5, 6E4 o 6H4. Lo que se divulga es que el anticuerpo es cualquiera de los anticuerpos de (A) hasta (F) a continuación:

(A) un anticuerpo que se une a un oligómero de A $\beta$  que se une a un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;

50 (B) un anticuerpo que se une a un oligómero de A $\beta$  que se une a un anticuerpo que comprende una cadena H de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21 y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23;

55 (C) un anticuerpo que se une a un oligómero de A $\beta$  que se une a un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41 y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43;

(D) un anticuerpo que se une a un oligómero de A $\beta$  que se une a un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61 y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63;

5 (E) un anticuerpo que se une a un oligómero de A $\beta$  que se une a un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 81 y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83;

(F) un anticuerpo que se une a un oligómero de A $\beta$  que se une a un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 101 y una cadena L (cadena ligera) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 103.

10 Además, se divulgan los oligómeros de A $\beta$  a los que se unen los anticuerpos de la presente invención. Preferiblemente, los anticuerpos incluyen, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 6E4. Tales oligómeros de A $\beta$  se pueden usar como antígenos para preparar anticuerpos o vacunas.

Lo que se divulga es, por ejemplo, el anticuerpo de cualquiera de (1) a (38) a continuación:

15 (1) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 como CDR3;

(2) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 como CDR3;

20 (3) un anticuerpo que comprende la cadena H de (1) y la cadena L de (2);

(4) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 como VH;

(5) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 como VL;

25 (6) un anticuerpo que comprende la cadena H de (4) y la cadena L de (5);

(7) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 como CDR3;

30 (8) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 como CDR3;

(9) un anticuerpo que comprende la cadena H de (7) y la cadena L de (8);

(10) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 como VH;

35 (11) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 como VL;

(12) un anticuerpo que comprende la cadena H de (10) y la cadena L de (11);

40 (13) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53 como CDR3;

(14) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59 como CDR3;

(15) un anticuerpo que comprende la cadena H de (13) y la cadena L de (14);

45 (16) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 como VH;

(17) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47 como VL;

- (18) un anticuerpo que comprende la cadena H de (16) y la cadena L de (17);
- (19) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 69 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 73 como CDR3;
- 5 (20) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79 como CDR3;
- (21) un anticuerpo que comprende la cadena H de (19) y la cadena L de (20);
- 10 (22) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 65 como VH;
- (23) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67 como VL;
- (24) un anticuerpo que comprende la cadena H de (22) y la cadena L de (23);
- 15 (25) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 89 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 91 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 93 como CDR3;
- (26) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 97 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 99 como CDR3;
- 20 (27) un anticuerpo que comprende la cadena H de (25) y la cadena L de (26);
- (28) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 85 como VH;
- (29) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 87 como VL;
- 25 (30) un anticuerpo que comprende la cadena H de (28) y la cadena L de (29);
- (31) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 109 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 111 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 113 como CDR3;
- 30 (32) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 115 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 117 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 119 como CDR3;
- (33) un anticuerpo que comprende la cadena H de (31) y la cadena L de (32);
- (34) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 105 como VH;
- 35 (35) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 107 como VL;
- (36) un anticuerpo que comprende la cadena H de (34) y la cadena L de (35);
- (37) un anticuerpo que comprende una o más sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en el anticuerpo de cualquiera de (1) a (36), que tiene actividad equivalente al anticuerpo de cualquiera de (1) a (36); y
- 40 (38) un anticuerpo que se une al epítipo unido por el anticuerpo de cualquiera de (1) a (36).
- La presente invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un oligómero de A $\beta$  pero no a un monómero de A $\beta$ , en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal y se selecciona del grupo que consiste en:
- 45 (1) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 89 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 91 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 93 como CDR3 y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 97 como CDR2 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 99 como CDR3;





de nucleótidos de la CDR2 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 71 y la SEQ ID NO: 72, respectivamente; la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR3 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 73 y la SEQ ID NO: 74, respectivamente; la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR1 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 75 y la SEQ ID NO: 76, respectivamente; la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR2 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 77 y la SEQ ID NO: 78, respectivamente; y la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR3 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 79 y la SEQ ID NO: 80, respectivamente.

Para el anticuerpo 6E4, la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la cadena H de longitud completa se muestran en la SEQ ID NO: 81 y la SEQ ID NO: 82, respectivamente; la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la cadena L de longitud completa se muestran en la SEQ ID NO: 83 y la SEQ ID NO: 84, respectivamente; la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena H (VH) se muestran en la SEQ ID NO: 85 y la SEQ ID NO: 86, respectivamente; la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena L (VL) se muestran en la SEQ ID NO: 87 y la SEQ ID NO: 88, respectivamente; la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR1 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 89 y la SEQ ID NO: 90, respectivamente; la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR2 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 91 y la SEQ ID NO: 92, respectivamente; la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR3 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 93 y la SEQ ID NO: 94, respectivamente; la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR1 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 95 y la SEQ ID NO: 96, respectivamente; la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR2 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 97 y la SEQ ID NO: 98, respectivamente; y la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR3 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 99 y la SEQ ID NO: 100, respectivamente.

Para el anticuerpo 6H4, la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la cadena H de longitud completa se muestran en la SEQ ID NO: 101 y la SEQ ID NO: 102, respectivamente; la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la cadena L de longitud completa se muestran en la SEQ ID NO: 103 y la SEQ ID NO: 104, respectivamente; la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena H (VH) se muestran en las SEQ ID NO: 105 y la SEQ ID NO: 106, respectivamente; la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena L (VL) se muestran en las SEQ ID NO: 107 y la SEQ ID NO: 108, respectivamente; la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR1 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 109 y la SEQ ID NO: 110, respectivamente; la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR2 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 111 y la SEQ ID NO: 112, respectivamente; la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR3 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 113 y la SEQ ID NO: 114, respectivamente; la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR1 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 115 y la SEQ ID NO: 116, respectivamente; la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR2 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 117 y la SEQ ID NO: 118, respectivamente; y la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR3 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 119 y la SEQ ID NO: 120, respectivamente.

Los anticuerpos mencionados anteriormente de (1) a (38) incluyen no sólo anticuerpos monovalentes sino también anticuerpos multivalentes con dos o más valencias. Los anticuerpos de la presente invención incluyen no solamente anticuerpos monovalentes sino también anticuerpos multivalentes cuyos sitios de unión al antígeno son todos iguales y los anticuerpos multivalentes cuyos sitios de unión al antígeno son parcial o completamente diferentes.

Preferiblemente, el anticuerpo de (37) mencionado anteriormente es un anticuerpo sin CDR modificadas. Por ejemplo, el "anticuerpo que comprende una o más sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en el anticuerpo de (1), que tiene actividad equivalente a la del anticuerpo de (1)" del anticuerpo de (37) anteriormente mencionado es preferiblemente "un anticuerpo que tiene actividad equivalente a la del anticuerpo de (1), y comprende una o más sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en el anticuerpo de (1), y comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 como CDR3". Otro anticuerpo del anticuerpo (37) mencionado anteriormente puede expresarse de una manera similar.

En la presente memoria, "actividad equivalente" significa que el anticuerpo de interés tiene actividad biológica o bioquímica similar a la de un anticuerpo de la presente invención. Ejemplos de la "actividad" como se describe en la presente invención incluyen la actividad para unirse específicamente a oligómeros de A $\beta$ , pero no a monómeros de A $\beta$ , actividad anti-neurotóxica, actividad para suprimir la formación de fibrillas amiloides A $\beta$ , actividad contra la toxicidad sináptica y actividad contra el deterioro de memoria.

Los métodos para preparar un polipéptido que tiene actividad equivalente a la de un cierto polipéptido que son bien conocidos por los expertos en la técnica incluyen métodos para introducir mutaciones en un polipéptido. Por ejemplo, un experto en la técnica puede preparar un anticuerpo que tiene actividad equivalente a la de un anticuerpo de la presente invención mediante la introducción de mutaciones apropiadas en el anticuerpo usando mutagénesis dirigida al sitio (Hashimoto-Gotoh, T. y colaboradores (1995) Gene 152, 271-275; Zoller, MJ, y Smith, M. (1983) Methods Enzymol, 100, 468-500, Kramer, W. y colaboradores (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9446, Kramer W,

- y Fritz HJ (1987) *Methods Enzymol.*, 154, 350-367, Kunkel, TA (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82, 488-492, Kunkel (1988) *Methods Enzymol.*, 85, 2763-2766 ) y otros. Las mutaciones de aminoácidos también pueden ocurrir de forma natural. Los anticuerpos de la presente invención también incluyen un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos con una o más mutaciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de la presente invención y que tiene una actividad equivalente a la del anticuerpo de la presente invención. El número de aminoácidos mutados en tales mutantes puede ser generalmente de 50 aminoácidos o menos, preferiblemente 30 aminoácidos o menos, y más preferiblemente diez aminoácidos o menos (por ejemplo, cinco aminoácidos o menos).
- Los residuos de aminoácidos se mutan preferiblemente en otros aminoácidos que conservan las propiedades de las cadenas laterales de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos se clasifican como sigue dependiendo de las propiedades de la cadena lateral: aminoácidos hidrófobos (A, I, L, M, F, P, W, Y y V), aminoácidos hidrofílicos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S y T), aminoácidos con cadenas laterales alifáticas (G, A, V, L, I y P), aminoácidos con cadenas laterales que contienen grupos hidroxilo (S, T y Y), aminoácidos con cadenas laterales que contienen átomos de azufre (C y M), aminoácidos con cadenas laterales que contienen ácido carboxílico y amida (D, N, E y Q), aminoácidos con cadenas laterales básicas (R, K y H), y aminoácidos con cadenas laterales que contienen anillos aromáticos (H, F, Y y W) (los aminoácidos están representados por códigos de una letra entre paréntesis).
- Se sabe que un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos, en la que uno o más residuos de aminoácidos están modificados (suprimidos, añadidos y/o sustituidos con otros aminoácidos) en una cierta secuencia de aminoácidos, conserva su actividad biológica original (función).
- Además de las modificaciones mencionadas anteriormente, los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse con otras sustancias, siempre que se mantenga la actividad. Ejemplos de las sustancias incluyen péptidos, lípidos, azúcares y cadenas de azúcar, grupos acetilo y polímeros naturales y sintéticos. Estas modificaciones pueden realizarse para conferir funciones adicionales a los anticuerpos, o para estabilizar los anticuerpos.
- Los anticuerpos en los que se han añadido varios residuos de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de la presente invención incluyen proteínas de fusión que contienen el anticuerpo. En las proteínas de fusión, el anticuerpo se fusiona con otro péptido o proteína. Los métodos para producir una proteína de fusión pueden llevarse a cabo ligando un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente invención en marco con un polinucleótido que codifica otro péptido o polipéptido e insertándolo en un vector de expresión y expresando el constructo de fusión en un huésped. Para este fin se pueden utilizar técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Los péptidos o polipéptidos fusionados con un anticuerpo de la presente invención incluyen, por ejemplo, péptidos conocidos tales como FLAG (Hopp, TP y colaboradores, *BioTechnology* (1988) 6, 1204-1210), 6x His consistente en seis residuos de histidina (His), 10x His, hemaglutinina de influenza (HA), fragmentos de c-myc humanos, fragmentos de VSV-GP, fragmentos de p18HIV, etiqueta de T7, etiqueta de HSV, etiqueta E, fragmentos de antígeno SV40T, etiqueta Ick, fragmentos de  $\alpha$ -tubulina, etiqueta B, y fragmentos de Proteína C; glutatión-S transferasa (GST); regiones constantes de inmunoglobulina;  $\beta$ -galactosidasa; y la proteína de unión a la maltosa (MBP), etc. Los polinucleótidos comercialmente disponibles que codifican estos péptidos o polipéptidos pueden fusionarse con polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la presente invención y los polipéptidos de fusión pueden producirse expresando los polinucleótidos de fusión así preparados.
- Los anticuerpos de la presente invención pueden diferir en la secuencia de aminoácidos, peso molecular, presencia o ausencia de cadenas de azúcar, estructura y similares, dependiendo de la célula o huésped que produce los anticuerpos o del método de purificación.
- Los anticuerpos que se unen a un epítipo al que se une un anticuerpo de cualquiera de los (1) a (36) anteriores pueden obtenerse por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden obtener (i) determinando el epítipo unido por el anticuerpo de cualquiera de (1) a (36) usando un método convencional, y produciendo los anticuerpos usando un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos incluida en el epítipo como un inmunógeno; o (ii) determinar los epítipos de anticuerpos producidos por un método convencional, y seleccionar anticuerpos cuyo epítipo es el mismo que el del anticuerpo de uno cualquiera de (1) a (36).
- Los anticuerpos mencionados anteriormente de (1) a (38) también incluyen cualquier tipo de anticuerpos tales como los minicuerpos anteriormente descritos, anticuerpos con secuencias de aminoácidos modificadas tales como anticuerpos humanizados y anticuerpos quiméricos, anticuerpos animales no humanos, anticuerpos humanos, anticuerpos modificados conjugados con otras moléculas (por ejemplo, polímeros tales como polietilenglicol) y anticuerpos modificados en la cadena de azúcar.
- En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos modificados tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Ejemplos de anticuerpos preferidos incluyen (i) un anticuerpo quimérico cuya región variable se deriva del anticuerpo 6E4 y cuya región constante se deriva de una inmunoglobulina humana; y (ii) un anticuerpo humanizado cuya CDR se deriva del anticuerpo 6E4, y cuyo FR se

deriva de una inmunoglobulina humana y cuya región constante se deriva de una inmunoglobulina humana. Estos anticuerpos modificados se pueden producir utilizando métodos conocidos.

Dado que se reduce la antigenicidad de un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado en el cuerpo humano, dicho anticuerpo es útil para la administración a seres humanos con fines terapéuticos o similares.

5 Los anticuerpos quiméricos se producen combinando secuencias derivadas de diferentes animales. Ejemplos de anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos que comprenden las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo de ratón y las regiones constantes de cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo humano. La producción de anticuerpos quiméricos puede llevarse a cabo utilizando métodos conocidos (véase, por ejemplo, Jones y colaboradores, *Nature* 321: 522-5, 1986; Riechmann y colaboradores, *Nature* 332: 323-7, 1988; y Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 593-6, 1992). Por ejemplo, primero, se preparan genes que codifican las regiones variables o las CDR del anticuerpo de interés a partir de los ARN de células productoras de anticuerpos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o similares (véase, por ejemplo, Larrick y colaboradores, "Methods: a Comparison to Methods in Enzymology", Vol. 2, 106, 1991. Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies" en *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*; Ritter y colaboradores (eds.), página 166, Cambridge University Press, 1995, y Ward y colaboradores, "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies" en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*; y Birch y colaboradores (eds.), página 137, Wiley-Liss, Inc., 1995). Los genes preparados que codifican las regiones variables están enlazados a genes que codifican las regiones constantes o las regiones marco. Los genes que codifican las regiones constantes o las regiones marco pueden determinarse de una manera similar a la de los genes que codifican la CDR o, alternativamente, pueden prepararse con base en la información de secuencia de anticuerpos conocidos. Las secuencias de ADN que codifican productos quiméricos y productos injertados en la CDR pueden sintetizarse total o parcialmente usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Por ejemplo, puede realizarse la síntesis de oligonucleótidos descrita por Jones y colaboradores (*Nature* 321: 522-5, 1986). Además, en algunos casos, pueden utilizarse adecuadamente técnicas mutagénesis dirigida al sitio y de reacción en cadena de la polimerasa. Pueden utilizarse técnicas para mutagénesis específica de oligonucleótidos de regiones variables conocidas descritas por Verhoeyen y colaboradores (*Science* 239: 1534-6, 1988) y Riechmann y colaboradores (*Nature* 332: 323-7, 1988) para modificar las secuencias de regiones variables, por ejemplo, para mejorar la capacidad de unión de anticuerpos quiméricos. Además, si es necesario, puede realizarse el relleno enzimático de oligonucleótidos con huecos mediante la utilización de ADN polimerasa T4, por ejemplo, como se describe por Queen y colaboradores (*Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86: 10029-33, 1989 y WO 90/07861).

Por ejemplo, las técnicas de injerto en la CDR son conocidas en la técnica ("Immunoglobulin genes", Academic Press (Londres), páginas 260-74, 198899; y Michael A y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. EE.UU.* 91: 969-73, 1994). Utilizando las técnicas, se reemplazan las CDR de un determinado anticuerpo por las CDR de otro anticuerpo. Mediante dicho reemplazo, se cambia la especificidad de unión del anticuerpo anterior por aquella del último anticuerpo. Entre estos anticuerpos quiméricos, aquellos en los que los aminoácidos marco se derivan de un anticuerpo humano se denominan "anticuerpos humanizados (anticuerpos injertados en la CDR)". Cuando se usan anticuerpos para tratar seres humanos, se utilizan preferentemente anticuerpos humanos o anticuerpos humanizados.

40 Generalmente, los anticuerpos quiméricos comprenden las regiones variables de un anticuerpo derivado de mamífero no humano y las regiones constantes derivadas de un anticuerpo humano. Por otra parte, los anticuerpos humanizados comprenden las regiones determinantes de la complementariedad de un anticuerpo derivado de mamífero no humano y las regiones marco y las regiones constantes derivadas de un anticuerpo humano.

Después de producir los anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados, se pueden sustituir los aminoácidos en las regiones variables (por ejemplo, las FR) o en las regiones constantes con otros aminoácidos.

45 El origen de las regiones variables de los anticuerpos quiméricos o las CDR de los anticuerpos humanizados no está particularmente limitado.

Se usan regiones C derivadas de anticuerpo humano para las regiones C de los anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Por ejemplo, se pueden utilizar C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 3, C $\gamma$ 4, C $\mu$ , C $\delta$ , C $\alpha$ 1, C $\alpha$ 2 y C $\epsilon$  para las regiones C de cadena H y se pueden utilizar C $\kappa$  y C $\lambda$  para las regiones C de cadena L. Sus secuencias son conocidas. Además, las regiones C del anticuerpo humano pueden modificarse para mejorar la estabilidad de los anticuerpos o su producción.

55 La actividad de unión de los anticuerpos de la presente invención a los antígenos (oligómeros de A $\beta$ ) se puede medir usando, por ejemplo, un método de medición de absorbancia, un método de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), un método de inmunoensayo enzimático (EIA), un método de radioinmunoensayo (RIA) y/o un método de inmunoanálisis con flúor. En ELISA, se inmoviliza un anticuerpo en una placa, y se añade un antígeno para el anticuerpo a la placa, después se añade una muestra que contiene el anticuerpo deseado, tal como el sobrenadante de cultivo de células productoras de anticuerpos o un anticuerpo purificado. A continuación, se añade a la placa un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario y está marcado con una enzima tal como fosfatasa alcalina, y se incuba previamente. Después del lavado, se añade a la placa un sustrato enzimático

tal como fosfato de p-nitrofenilo y se mide la absorbancia para evaluar la capacidad de unión al antígeno de la muestra de interés. La evaluación se puede realizar utilizando BIAcore (Pharmacia).

Además, la presente invención proporciona composiciones que comprenden el anticuerpo antes mencionado de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 Tal como se describe más adelante, la presente invención sugiere fuertemente que los anticuerpos monoclonales 1A9 y 2C3 son candidatos prometedores para anticuerpos terapéuticos para prevenir fenotipos similares al Alzheimer. Se ha demostrado que el deterioro de la memoria está relacionado con la disfunción sináptica causada por oligómeros de A $\beta$  solubles (Klein WL, 2001, Trends Neurosci; y Selkoe DJ, 2002, Science). La acumulación  
10 excesiva y deposición de oligómeros de A $\beta$  pueden desencadenar las complicadas cascadas que conducen a la enfermedad de Alzheimer. Si este es el caso, la intervención terapéutica utilizando una composición que comprende un anticuerpo de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable podría ser eficaz para bloquear las cascadas patológicas y, por lo tanto, esto podría permitir el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

15 El "tratamiento" de la presente invención no tiene necesariamente efectos terapéuticos o preventivos completos contra órganos o tejidos que presentan síntomas de trastornos o enfermedades, pero pueden tener efectos parciales.

"Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer" en la presente invención significa la mejora de al menos un síntoma que puede ser causado por la enfermedad de Alzheimer, y los ejemplos inducen la mejora o la supresión del deterioro cognitivo, la mejora o la supresión de la formación de placa senil, la mejora o la supresión de la disfunción  
20 sináptica y la reducción o supresión de la acumulación de A $\beta$  en los tejidos cerebrales, sangre o similares. En la presente memoria, "deterioro cognitivo" incluye, por ejemplo, deterioro de la memoria incluyendo deterioro de la memoria a largo/corto plazo, deterioro de la memoria del reconocimiento de objetos, deterioro de la memoria espacial y deterioro de la memoria asociativa y emocional.

25 La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas o agentes farmacéuticos que comprenden como ingrediente activo la composición anteriormente descrita que comprende un anticuerpo de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En la presente invención, la frase "que comprende como ingrediente activo la composición anteriormente descrita que comprende un anticuerpo de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable" significa que comprende la composición anteriormente descrita que comprende un anticuerpo de la presente invención y un  
vehículo farmacéuticamente aceptable como ingrediente principal, pero no limita su tasa de contenido.

30 Ejemplos de las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente incluyen agentes contra el deterioro cognitivo, agentes de la enfermedad de Alzheimer, agentes para suprimir la progresión de la enfermedad de Alzheimer, agentes para suprimir la formación de placa senil, agentes para suprimir la acumulación de A $\beta$ , agentes anti-neurotóxicos (agentes para neutralizar la neurotoxicidad), agentes para inhibir la formación de fibrillas de amiloide A $\beta$ , y agentes contra la toxicidad sináptica (agentes para neutralizar la toxicidad sináptica).

35 La composición farmacéutica mencionada anteriormente de la presente invención puede usarse, por ejemplo, en métodos para suprimir la enfermedad de Alzheimer que comprenden la etapa de administrar a un sujeto (individuo) la composición anteriormente descrita que comprende un anticuerpo de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros ejemplos de una composición farmacéutica de la presente invención para uso  
40 incluyen el uso en métodos para suprimir el deterioro cognitivo, métodos para suprimir la progresión de la enfermedad de Alzheimer, métodos para suprimir la formación de placa senil, métodos para suprimir la acumulación de A $\beta$ , métodos para neutralizar (suprimir) la actividad neurotóxica, métodos para inhibir la formación de fibrillas amiloides A $\beta$ , y métodos para neutralizar (suprimir) la toxicidad sináptica. Otros ejemplos de una composición farmacéutica de la presente invención incluyen el uso en métodos para prevenir y/o tratar el deterioro cognitivo, y métodos para prevenir y/o tratar la enfermedad de Alzheimer.

45 La presente invención también proporciona el uso de una composición que comprende el anticuerpo anteriormente descrito de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable en la producción de la composición farmacéutica mencionada anteriormente.

Además, la presente invención se refiere a las siguientes composiciones.

- 50
- Una composición que comprende el anticuerpo anteriormente descrito de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en la prevención y/o el tratamiento del deterioro cognitivo.
  - Una composición que comprende el anticuerpo anteriormente descrito de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
  - Una composición que comprende el anticuerpo anteriormente descrito de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en la supresión de la progresión de la enfermedad de Alzheimer.

- Una composición que comprende el anticuerpo anteriormente descrito de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable para uso en la supresión de la formación de placa senil.
- Una composición que comprende el anticuerpo anteriormente descrito de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en la supresión de la acumulación de A $\beta$ .
- 5 – Una composición que comprende el anticuerpo anteriormente descrito de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable para uso en la actividad neurotóxica de neutralización (supresión).
- Una composición que comprende el anticuerpo anteriormente descrito de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable para uso en la inhibición de la formación de fibrillas amiloides A $\beta$ .
- 10 – Una composición que comprende el anticuerpo anteriormente descrito de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable para uso en la neutralización (supresión) de la toxicidad sináptica.

Los agentes farmacéuticos anteriormente mencionados de la presente invención se pueden administrar a seres humanos u otros animales. En la presente invención, los animales no humanos a los que se administran los agentes farmacéuticos incluyen ratones, ratas, cobayas, conejos, pollos, gatos, perros, ovejas, cerdos, ganado, monos, babuinos y chimpancés. Estos animales presentan preferiblemente al menos un síntoma seleccionado de, por ejemplo, deterioro cognitivo, formación de placa senil, disfunción sináptica, acumulación de A $\beta$  en tejidos cerebrales o sangre, etc.

Los anticuerpos contenidos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención no están particularmente limitados siempre que estén incluidos en los anticuerpos antes mencionados de la presente invención, y los ejemplos incluyen los anticuerpos descritos en la presente memoria.

20 Cuando se usan los anticuerpos antes mencionados de la presente invención para composiciones farmacéuticas, pueden formularse por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, según sea necesario, se pueden preparar en forma de soluciones o suspensiones inyectables estériles usando agua u otro líquido farmacéuticamente aceptable, y se pueden administrar por vía parenteral. Por ejemplo, los anticuerpos a incluir en las composiciones farmacéuticas pueden combinarse con vehículos o medios aceptables, específicamente, agua  
25 estéril, solución salina fisiológica, aceites vegetales, emulsionantes, suspensiones, surfactantes, estabilizantes, agentes saborizantes, excipientes, disolventes, conservantes, aglutinantes, o similares, y se mezclan en una forma de dosis unitaria requerida para la práctica farmacéutica generalmente aceptada. La frase "farmacéuticamente aceptable" indica que la sustancia es inactiva, y contiene sustancias convencionales usadas como diluyentes o vehículos para productos farmacéuticos. Los excipientes adecuados y sus formulaciones se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16<sup>a</sup> ed. (1980) Mack Publishing Co., ed. Oslo y colaboradores.

30 Se pueden usar soluciones salinas fisiológicas y otras soluciones isotónicas que contienen glucosa o adyuvantes (por ejemplo, D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro sódico) como soluciones acuosas para inyección. Pueden usarse junto con solubilizantes apropiados tales como alcoholes, más específicamente, etanol y polialcoholes (propilenglicol, polietilenglicol y similares), y surfactantes no iónicos (Polisorbato 80<sup>MR</sup>, HCO-50, etc.).

35 El aceite de sésamo o el aceite de soja pueden usarse como un líquido oleaginoso, y el benzoato de bencilo o el alcohol bencílico pueden usarse en combinación como solubilizante. Para las formulaciones se pueden usar amortiguadores (por ejemplo, amortiguador de fosfato y amortiguador de acetato sódico), agentes calmantes (por ejemplo, clorhidrato de procaína), estabilizadores (por ejemplo, alcohol bencílico y fenol) y antioxidantes. Las soluciones inyectables preparadas se pueden llenar en ampollas apropiadas.

40 La administración es preferiblemente administración parenteral, y ejemplos específicos incluyen administración por inyección, administración transnasal, administración transpulmonar y administración transdérmica. Ejemplos de administración por inyección incluyen administración sistémica y local por inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, y similares.

45 Las composiciones farmacéuticas contienen una cantidad farmacéuticamente eficaz del componente activo (el anticuerpo antes mencionado de la presente invención). "Cantidad farmacéuticamente eficaz (de un compuesto)" se refiere a una cantidad suficiente para tratar y/o prevenir trastornos en los que los antígenos para los anticuerpos antes mencionados de la presente invención juegan un papel importante. Por ejemplo, "una cantidad farmacéuticamente aceptable" puede ser una cantidad requerida para reducir la acumulación de A $\beta$ , neutralizar la toxicidad inducida por A $\beta$ , reducir la formación de fibrillas de A $\beta$ , etc., tratando o previniendo por lo tanto condiciones  
50 causadas por la enfermedad de Alzheimer, cuando el compuesto se administra a individuos (pacientes). La reducción o neutralización puede ser, por ejemplo, una reducción o neutralización de al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 80%, 90%, 95%, 99% , o el 100%.

La evaluación para determinar dicha cantidad farmacéuticamente eficaz de los anticuerpos antes mencionados de la presente invención puede llevarse a cabo usando un protocolo clínico estándar incluyendo diagnóstico  
55 histopatológico.

- Se puede seleccionar un método de administración adecuado dependiendo de la edad y los síntomas del paciente. La dosis de una composición farmacéutica que contiene anticuerpos puede seleccionarse, por ejemplo, dentro del intervalo de 0,0001 mg a 1.000 mg por kilogramo de peso corporal para cada administración. Alternativamente, por ejemplo, la dosificación para cada paciente puede seleccionarse dentro del intervalo de 0,001 a 100.000 mg/kg de peso corporal; sin embargo, la dosificación no está necesariamente limitada a estos intervalos. Aunque la dosificación y los métodos de administración varían dependiendo del peso corporal del paciente, edad, síntomas, y similares, un experto en la técnica puede seleccionarlos apropiadamente. En los experimentos con animales descritos más adelante, la dosificación se seleccionó con base en la terapia intravenosa de inmunoglobulina de dosis alta (400 mg/kg) cubierta por el seguro de salud para seres humanos.
- Además, la presente invención proporciona métodos para detectar oligómeros de A $\beta$  (los ejemplos incluyen oligómeros de A $\beta$ 40 (A $\beta$  1-40) y A $\beta$ 42 (A $\beta$  1-42)) en muestras. Ejemplos de "muestras" como se describe en la presente invención incluyen muestras recogidas de sujetos. Específicamente, los presentes métodos incluyen la etapa de detectar oligómeros de A $\beta$  contenidos en una muestra recogida de un sujeto usando un anticuerpo de la presente invención. Los oligómeros de A $\beta$  en una muestra se pueden detectar usando, por ejemplo, métodos de inmunoensayo enzimático de fase sólida tipo sándwich que usan quimioluminiscencia (ELISA de quimioluminiscencia), métodos de inmunoprecipitación que utilizan los anticuerpos obtenidos, inmunotransferencia, citometría de flujo, espectrometría de masas y análisis inmunohistoquímico.
- Cuando se detectan oligómeros de A $\beta$  en una muestra recogida de un sujeto por los métodos de medición antes mencionados, el sujeto puede ser un paciente con enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, cuando la cantidad de oligómeros de A $\beta$  en una muestra recogida de un sujeto se compara con la de un individuo sano y si la cantidad de oligómeros de A $\beta$  es mayor en el sujeto que en el individuo sano, se determina que el sujeto es un posible paciente de la enfermedad de Alzheimer. El hecho de que un sujeto sea o no un posible paciente con enfermedad de Alzheimer es diagnosticado generalmente por médicos (incluyendo individuos bajo las instrucciones de los médicos; igual para lo que sigue a continuación). Los datos sobre la cantidad de oligómeros de A $\beta$  en muestras recogidas de un sujeto y un individuo sano, que se obtienen mediante los métodos actuales de diagnóstico, serán útiles para el diagnóstico por los médicos. Por lo tanto, los métodos actuales de diagnóstico pueden expresarse como métodos de recolección y presentación de datos útiles para el diagnóstico por los médicos.
- Específicamente, la presente invención proporciona métodos para diagnosticar si un sujeto es o no un posible paciente con enfermedad de Alzheimer, en donde los métodos comprenden detectar oligómeros de A $\beta$  en una muestra recogida del sujeto usando un anticuerpo de la presente invención.
- Además, la presente invención proporciona métodos para diagnosticar si un sujeto es o no un posible paciente con enfermedad de Alzheimer, que comprenden las etapas de:
- (a) poner en contacto una muestra recogida de un sujeto con un anticuerpo de la presente invención y un anticuerpo que se une a un monómero de A $\beta$ ; y
- (b) medir la relación del oligómero de A $\beta$  con respecto al monómero de A $\beta$  en la muestra,
- en donde se determina que el sujeto es un posible paciente con enfermedad de Alzheimer, si la proporción medida en la etapa (b) es mayor que la de un individuo sano.
- En primer lugar, en los presentes métodos, una muestra recogida de un sujeto se pone en contacto con un anticuerpo de la presente invención y un anticuerpo que se une a un monómero de A $\beta$ . Aquí, el "contacto" se puede llevar a cabo, por ejemplo, añadiendo cada uno de los anticuerpos antes mencionados a una muestra recogida de un sujeto, que se coloca en un tubo de ensayo. En este caso, el anticuerpo se añade adecuadamente en forma de una solución, un sólido obtenido por liofilización o similar. Cuando se añade el anticuerpo como una solución acuosa, la solución puede contener únicamente el anticuerpo solo, o puede contener, por ejemplo, surfactantes, excipientes, agentes colorantes, sabores, conservantes, estabilizadores, amortiguadores, agentes de suspensión, agentes de tonicidad, agentes aglutinantes, desintegrantes, lubricantes, promotores de fluidez, o correctores. La concentración a la que se añade el anticuerpo no está particularmente limitada. Por ejemplo, como con las formulaciones de inmunoglobulina humana, pueden usarse adecuadamente formulaciones liofilizadas de 500 mg, 1.000 mg y 2.500 mg.
- A continuación, se mide la relación de oligómero de A $\beta$  con respecto a monómero de A $\beta$  (en la presente memoria, también se denomina "índice O/M") en la muestra antes mencionada. Para medir esta relación, se utiliza adecuadamente el siguiente método. Por ejemplo, como se describe a continuación en los Ejemplos, la medición puede llevarse a cabo usando un método de comparación de los valores de oligómero y monómero por ELISA obtenidos de la misma muestra.
- A continuación, se compara esta relación con la relación para un individuo sano. Cuando la relación es mayor en el sujeto que en el individuo sano, se determina que el sujeto es un posible paciente con enfermedad de Alzheimer.
- Los métodos de diagnóstico de la presente invención se pueden llevar a cabo tanto *in vitro* como *in vivo*, pero se realizan preferiblemente *in vitro*.

Preferiblemente, la "muestra" como se describe en la presente invención no está particularmente limitada, siempre y cuando sea un tejido derivado de un sujeto. Los ejemplos incluyen el cerebro (parénquima cerebral y otros), órganos y fluidos corporales (sangre, líquido cefalorraquídeo y otros) de un sujeto. Preferiblemente, la muestra es sangre (más preferiblemente plasma) o líquido cefalorraquídeo.

5 Además, la presente invención proporciona agentes farmacéuticos para uso en los métodos anteriormente mencionados de medición de oligómeros de A $\beta$  en una muestra, o métodos para diagnosticar si un sujeto es o no un posible paciente con enfermedad de Alzheimer.

10 En la presente invención, las composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo pueden incluirse en productos y kits que contienen materiales útiles para tratar estados patológicos de un sujeto. Los productos pueden comprender cualquier recipiente marcado para un compuesto. Los recipientes adecuados incluyen botellas, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados a partir de una variedad de materiales tales como vidrio y plástico. La etiqueta en la superficie del recipiente debe indicar que la composición se usa para tratar o presentar una o más condiciones de la enfermedad. La etiqueta también puede indicar descripciones para la administración, etc.

15 Además del recipiente mencionado anteriormente, un kit que contiene una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo puede incluir opcionalmente un segundo recipiente que almacena un diluyente farmacéuticamente aceptable. El kit puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e insertos de envases con descripciones para su uso.

20 Si es necesario, las composiciones farmacéuticas se pueden proporcionar en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que comprenden un ingrediente activo. El envase puede comprender papel metálico o plástico y, por ejemplo, es un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración.

25 En los agentes y kits farmacéuticos mencionados anteriormente, además del anticuerpo de la presente invención que es un ingrediente activo, pueden mezclarse según sea necesario agua estéril, solución salina fisiológica, aceites vegetales, surfactantes, lípidos, agentes solubilizantes, amortiguadores, estabilizadores de proteína (BSA, gelatina, etc.), conservantes, soluciones de bloqueo, soluciones de reacción, solución de detención de la reacción, reactivos para tratamiento de las muestras, y similares.

30 Los presentes inventores demostraron que los anticuerpos de la presente invención son eficaces para prevenir la enfermedad de Alzheimer. Es decir, la presente invención proporciona métodos para suprimir la progresión de la enfermedad de Alzheimer, en donde los métodos comprenden la etapa de administrar a un individuo afectado con enfermedad de Alzheimer, una composición que comprende el anticuerpo de la presente invención mencionado anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

### Ejemplos

35 Métodos

Preparación de antígenos (1A9 y 2C3)

40 Se disolvió el A $\beta$  1-42 sintético (Peptide Institute, Inc., Osaka) en agua destilada o amortiguador de fosfato 10 mM, y se incubó a 37°C durante 18 horas. A continuación, se separaron los péptidos mediante SDS-PAGE (gel de Tris-Glicina NuPAGE al 4-12%) y después de la visualización mediante tinción con CBB, sólo se extrajo el tetrámero de A $\beta$  1-42 sin contaminación del monómero de A $\beta$  1-42.

Preparación de antígenos (4F7, 4H5, 5A5, 5A9, 6E4 y 6H4)

45 Un colorante fluorescente, 6-carboxitetrametilrhodamina (6-TAMRA) (SIGMA) se unió químicamente al extremo terminal N de un péptido sintético A $\beta$  1-40 (Peptide Institute, Inc.) para producir un A $\beta$  modificado. Se preparó una muestra rica en oligómeros (oligómero de A $\beta$  1-40) copolimerizando el A $\beta$  modificado y el péptido sintético A $\beta$  1-40. Es preferible ajustar las condiciones para que la intensidad de la fluorescencia determinada por el ensayo ThT, que se describe más adelante, sea un cuarto o menos la intensidad de fluorescencia en ausencia de A $\beta$  modificado. Más específicamente, se prefiere que se mezclen 100  $\mu$ M de cada uno del péptido A $\beta$  modificado y el péptido sintético A $\beta$  1-40, y se polimerizan durante 20 horas.

Preparación de hibridomas productores de anticuerpos

50 Se inmunizaron ratones Balb/c inyectando el antígeno preparado por el método descrito anteriormente en sus patas. A continuación, se realizó la inmunización de refuerzo seis veces. Los hibridomas se prepararon a partir de ganglios linfáticos inguinales por fusión con células Sp2/O-Ag14 usando polietilenglicol 1500.

Isotipificación de anticuerpos

La isotipificación de inmunoglobulinas purificadas se llevó a cabo utilizando un kit de isotipificación del anticuerpo monoclonal de ratón Serotec (Oxford, RU).

El análisis por transferencia de puntos (cribado primario)

5 El cribado inicial se llevó a cabo mediante análisis de transferencia de puntos usando una membrana de nitrocelulosa sobre la cual se inmovilizaron 2,5 µl de Aβ 1-42 (2,5 µg/punto) incubada previamente durante 18 horas. Se bloquearon los sitios de unión no específicos de la membrana con un amortiguador de fosfato que contenía leche con bajo contenido de grasa al 5%, BSA al 1% y Tween-20 al 0,05%, y después se incubó la membrana con un sobrenadante de cultivo. Los anticuerpos de unión al oligómero de Aβ en el sobrenadante de cultivo se detectaron mediante F(ab')<sub>2</sub> de cabra antirratón marcado con peroxidasa de rábano picante (1:3000; Amersham) y se visualizaron usando un kit de quimioluminiscencia (ECL) mejorado y LAS3000 mini (Fujitsu, Tokio, Japón). Entre 400 clones, 16 clones positivos en la transferencia de puntos, incluyendo 1A9 y 2C3, se sometieron al cribado secundario descrito a continuación.

Inmunoprecipitación y análisis de inmunotransferencia (cribado secundario)

15 Se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación (Ghisso J, y colaboradores, Biochem J, 1993) utilizando una fracción amiloide rica en oligómeros de Aβ (Matsubara E, y colaboradores, Neurobiol Aging, 2004) para el cribado secundario para evaluar si los 16 clones seleccionados en el cribado primario pueden capturar oligómeros de Aβ en el cerebro con EA. Se incubó una fracción soluble en ácido fórmico insoluble en amortiguador preparada a partir de cerebro con EA con un sobrenadante de cultivo y Proteína G-Sefarosa. Los oligómeros de Aβ inmunoprecipitados se separaron usando un gel de Bis-Tris-Glicina NuPAGE al 4-12% y se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa o Immobilon P (Millipore) usando ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfónico 10 mM (pH 11) que contenía metanol al 10% a 400 mA durante una hora. Los sitios de unión no específicos en la membrana se bloquearon con un amortiguador de fosfato que contenía leche baja en grasa al 5%, BSA al 1% y Tween-20 al 0,05% a temperatura ambiente durante tres horas. Los oligómeros de Aβ inmunoprecipitados se detectaron por inmunotransferencia utilizando el anticuerpo monoclonal 4G8 (1:1000) o 6E10 (1:1000) como se ha descrito anteriormente. Se seleccionaron dos clones, 1A9 y 2C3, de los 16 clones como candidatos para anticuerpos terapéuticos para la enfermedad de Alzheimer.

Anticuerpos

30 Los anticuerpos monoclonales 6E10 y 4G8 (Covance Immuno-Technologies, Dedham, MA) reconocen los epítomos en las posiciones de los aminoácidos 1-16 y 17-24 de la secuencia de Aβ humana, respectivamente. A11 policlonal que específicamente reconoce oligómeros de Aβ se adquirió a través de Biosource (Camarillo, CA). Se adquirieron anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con Alex Fluor (AF) 488 o 594 y de cabra anti-IgG de rata conjugada con Alex Fluor (AF) 488 de Molecular Probes (Eugene, OR). Se adquirió anti-IgG2b de ratón a través de Sigma (St. Louis, MO). Se adquirió un anticuerpo anti-sinaptofisina a través de Santa Cruz (Santa Cruz, CA), y se adquirió un anticuerpo anti-drebrina a través de MBL (Nagoya, Japón).

35 Cromatografía de exclusión por tamaño (CET)

40 Se llevó a cabo una CET para evaluar 1A9 y 2C3 por su especificidad de tamaño. Como se ha reportado anteriormente (Matsubara E., y colaboradores, Neurobiol Aging, 25: 833-841, 2004), este método puede separar selectivamente monómeros de Aβ y oligómeros de Aβ, o Aβ unido a lipoproteína y Aβ libre de lipoproteína. Los presentes inventores concentraron el sobrenadante de cultivo de células HEK293 que sobreexpresan APP/PS1 aproximadamente diez veces usando un filtro de corte de peso molecular de 3 kDa Microcon (Millipore Corp.). A continuación, se fraccionó este concentrado en 28 fracciones de un mililitro utilizando una columna de exclusión por tamaño Superose 12 (1 cm x 30 cm, Pharmacia Biotech., Uppsala, Suecia, velocidad de flujo de 0,5 ml/min) previamente equilibrada con un amortiguador de fosfato. La mitad de cada fracción se sometió a inmunoprecipitación usando 1A9 o 2C3. El Aβ contenido en los inmunoprecipitados resultantes se detectó por inmunotransferencia utilizando 4G8.

50 El líquido cefalorraquídeo (LCR) combinado a partir de diez casos de pacientes con enfermedad de Alzheimer o individuos sanos coincidentes en edad, y el LCR exento de lipoproteínas de las combinaciones también se fraccionaron en las mismas condiciones descritas anteriormente. Se detectó Aβ en las fracciones recogidas mediante análisis ELISA. Para detectar el lípido, se cuantificó enzimáticamente el colesterol total utilizando un kit estándar (Wako, Osaka, Japón). Bajo las condiciones experimentales de los presentes inventores, se eluyeron las lipoproteínas del LCR en las fracciones 7 a 14, mientras que las fracciones 15 a 28 contenían proteínas libres de colesterol.

Preparación de una solución de Aβ sin semilla

55 Se disolvió Aβ 1-42 sintético hasta 250 µM en agua amoniacal al 0,02%. A continuación, para preparar una solución de Aβ libre de semilla, se precipitaron péptidos insolubles, que pueden funcionar como semillas, por ultracentrifugación usando una ultracentrífuga Optima TL (Beckman, EE.UU.) a 540.000 x g durante tres horas. Se recogió el sobrenadante resultante, se dividió en alícuotas y se almacenó a -80°C hasta su uso. Las muestras se

prepararon descongelando las soluciones madre de A $\beta$  inmediatamente antes de su uso y diluyéndolas diez veces con solución salina amortiguada con Tris (TBS, NaCl 150 mM y Tris-HCl 10 mM (pH 7,4)). Las soluciones 25  $\mu$ M resultantes se usaron en los experimentos descritos a continuación. Se preparó A $\beta$  1-40 sintético (forma HCl, Peptide Institute, Inc., Osaka) a una concentración de 2x.

5 Incubación de A $\beta$  y ensayo de ThT (Yamamoto N, y colaboradores, J Biol Chem, 282: 2646-2655, 2007)

10 Se incubó una solución A $\beta$  (25  $\mu$ M) en presencia de una concentración predeterminada de un anticuerpo a 37°C durante dos o 24 horas. La intensidad de fluorescencia ThT de la mezcla de incubación se determinó usando un espectrofotómetro de fluorescencia (RF-5300PC, Shimadzu Co., Kyoto, Japón). Se determinó la intensidad de fluorescencia óptima para las fibrillas amiloides A $\beta$  a las longitudes de onda de excitación y emisión de 446 y 490 nm, respectivamente, utilizando 1,0 ml de una mezcla de reacción que contenía 5  $\mu$ M de ThT y 50 mM de glicina-NaOH (pH 8,5). La intensidad de fluorescencia se determinó inmediatamente después de la preparación de la mezcla.

15 Además, se evaluó la actividad de los anticuerpos 4F7, 4H5, 5A5, 5A9, 6E4 y 6H4 para suprimir la formación de fibrillas de amiloide A $\beta$  mediante el siguiente procedimiento. Se incubó una solución de A $\beta$  1-42 diluida a 12,5  $\mu$ M con medio de cultivo celular en presencia o ausencia de cada anticuerpo a 37°C durante 24 horas. La cantidad de fibrillas amiloides formadas se determinó mediante el método de ensayo de intensidad de fluorescencia ThT descrito anteriormente.

Ensayo de neurotoxicidad inducida por A $\beta$  (Yamamoto N, y colaboradores, J Biol Chem, 282: 2646-2655, 2007)

20 Se cultivaron células PC12 de feocromocitoma de rata en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenían suero de caballo al 10% inactivado por calor (Invitrogen) y suero fetal bovino al 5% (FBS) (Invitrogen). Para inducir la diferenciación en células nerviosas, se sembraron células PC12 a una densidad de 20.000 células/cm<sup>2</sup> en placas de cultivo recubiertas con poli-L-lisina (10 mg/mL) y se cultivaron durante seis días en DMEM suplementado con 100 ng/mL de factor de crecimiento nervioso (NGF, Alomone Labs, Jerusalén, Israel) (PC12N). Se expuso PC12N a A $\beta$  1-42 libre de semillas 25  $\mu$ M o A $\beta$  1-42 incubado previamente en presencia o ausencia de anticuerpo a 4°C durante 48 horas. Se evaluó neurotoxicidad inducida por A $\beta$  1-42 mediante un ensayo de fluorescencia de doble color de Live/Dead de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Molecular Probes, Eugene, Oregón).

30 Además, se evaluó la actividad de los anticuerpos 4F7, 4H5, 5A5, 5A9, 6E4 y 6H4 para neutralizar la neurotoxicidad inducida por A $\beta$  mediante el método descrito a continuación. En primer lugar, se cultivaron células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) durante 24 horas en DMEM que contenía FBS al 10%, a una densidad de 150.000 células/pozo en placas de 24 pozos. A continuación, se reemplazó el medio con medio de cultivo libre de suero que contenía A $\beta$  1-42 (12,5  $\mu$ M) en presencia o en ausencia de anticuerpo, y se cultivaron las células durante otras 24 horas. Para determinar la citotoxicidad inducida por A $\beta$  1-42, se midió el nivel de LDH derivada de células muertas liberado en el medio mediante un kit CytoTox96 (Promega).

35 Ultrafiltración y tamiz molecular

40 Con el fin de determinar las características dependientes del tamaño de los oligómeros de A $\beta$  neurotóxicos, se prepararon los cuatro tipos de filtrados (<3 kDa, 3 a 10 kDa, 10 a 30 kDa, 30 a 100 kDa) y la solución de retención (> 100 kDa) a partir de una solución de oligómero de A $\beta$  25  $\mu$ M por ultrafiltración secuencial usando membranas de corte Microcon de 3 kDa, 10 kDa, 30 kDa y 100 kDa. Se sometieron cada una de las fracciones al ensayo de neurotoxicidad inducida por A $\beta$  descrito anteriormente. Se expuso PC12N a cada fracción para identificar la fracción tóxica como se describió anteriormente. Se identificó también la distribución de las estructuras tridimensionales reconocidas por A11, 1A9, 2C3 y 4G8 mediante el análisis de transferencia de puntos descrito anteriormente. La caracterización morfológica de los oligómeros neurotóxicos se realizó examinando cada fracción utilizando un microscopio de fuerza atómica.

45 Microscopía electrónica (ME) y microscopía de fuerza atómica (MFA)

50 Se diluyeron las muestras con agua destilada y se rociaron sobre rejillas recubiertas de carbono para llevar a cabo la microscopía electrónica. Las rejillas se tiñeron negativamente con ácido fosfotúngstico al 1% y se observaron bajo un microscopio electrónico Hitachi H-7000 (Tokio, Japón) con un voltaje de aceleración de 77 kV. La evaluación por MFA se llevó a cabo según se informó recientemente. Las gotas de las muestras se colocaron sobre mica recién escindida. La mica se dejó reposar durante 30 minutos y después se lavó con agua y las muestras líquidas se analizaron usando Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Bárbara, CA, EE.UU.) ajustado en modo de pulsación (Tero, R, y colaboradores, Langmuir 20, 7526-7531, 2004). El voladizo usado fue OMCL-TR400PSA (Olympus, Japón).

Tejidos y extracción de material

55 El presente estudio se realizó a partir de casos de autopsia (n = 50, 26 casos masculinos y 24 casos femeninos) del Banco Metropolitano de Cerebros de Tokio para Investigación del Envejecimiento del Instituto Metropolitano de

Gerontología de Tokio (Itabashi, Tokio, Japón). Este proyecto de investigación fue aprobado por los comités éticos institucionales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Tokio; el Hospital Geriátrico Metropolitano de Tokio del Instituto Metropolitano de Gerontología de Tokio; y el Centro Nacional de Geriátria y Gerontología. Se han descrito detalles de los sujetos y la recolección de muestras (Katsuno T, *Neurology*, 64: 687-692, 2005). Sin embargo, este estudio analizó fracciones cerebrales insolubles, mientras que en este proyecto de investigación (Katsuno T, *Neurology*, 64: 687-692, 2005), los presentes inventores analizaron fracciones solubles de cerebro, que no se caracterizaron en estudios previos. Se homogeneizaron muestras de tejido congelado (la porción anterior de la corteza entorrinal) en nueve volúmenes de solución salina amortiguada con Tris (TS) que contenía un cóctel inhibidor de proteasa. Los homogeneizados se ultracentrifugaron a 265.000 x g durante 20 minutos. Se sometieron un tercio de las alícuotas (0,5 mL) de los sobrenadantes resultantes a análisis de inmunotransferencia.

#### Inmunohistoquímica

Los hemisferios del cerebro izquierdo de ratones Tg2576 se cortaron en secciones sagitales de 30 µm de espesor utilizando un criótomo (RM 2145; Leica, Wetzlar, Alemania) y se tiñeron con tioflavina S como se describió anteriormente (Wyss-Coray y colaboradores, 2001). Se observó la formación de neuritas distróficas hinchadas utilizando un anticuerpo antisinaptofisina (Chemicon, Temecula, CA). Se contó el número de placas positivas para tioflavina S y neuritas distróficas hinchadas positivas para sinaptofisina observando cuatro o cinco secciones del hemisferio cerebral izquierdo de cada ratón con una ampliación de 40 veces. Para observar la deposición de Aβ, se tiñeron secciones en serie brevemente pretratadas con ácido fórmico o Proteasa K usando un kit de inmunotinción de Aβ (Sigma, St. Louis, MO), y se visualizaron señales inmunopositivas usando un kit ABC elite (Vector Laboratories). Se registraron las imágenes de la corteza cerebral y el hipocampo utilizando una cámara digital conectada con un microscopio y se analizaron utilizando un software PCI simple (Compix Imaging System, Lake Oswego, OR). La translocación cerebral de los anticuerpos se observó usando un microscopio confocal láser (Carl Zeiss LSM510). El número de placas positivas para tioflavina S y neuritas distróficas hinchadas positivas para sinaptofisina se determinó de una manera doblemente ciega.

#### Inmunoterapia pasiva y análisis conductual

Ratones no transgénicos (no Tg) hembra de tres meses de edad, y ratones Tg2576 que tienen y que sobreexpresan el gen de APP humana mutante tipo sueco con mutaciones duales (K670N y M671L) derivadas de EA familiar, se adquirieron a través de Taconics (Germantown, NY, EE.UU.). Estos ratones se criaron hasta los 13 meses de edad en la instalación animal de los presentes inventores. Para determinar si el fenotipo de tipo Alzheimer se previene mediante inmunoterapia pasiva, se administró 1A9 o 2C3 (0,4 mg/kg/semana) o PBS en la vena caudal de Tg2576 de cuatro meses y se continuó la administración hasta los 13 meses. La función de memoria se evaluó en el mes 13 como se describió anteriormente (Mouri A, *FASEB J*, 21: 2135-2148, 2007), basado en los siguientes cuatro paradigmas de comportamiento:

- (1) prueba de laberinto Y para la memoria a corto plazo;
- (2) prueba de reconocimiento de objetos nuevos;
- (3) prueba del laberinto de agua de Morris; y
- (4) prueba de condicionamiento contextual del miedo.

Tres días después de las pruebas de comportamiento, los ratones fueron sacrificados para evaluaciones bioquímicas e histológicas. Los resultados experimentales se analizaron por ANOVA unidireccional y ANOVA bidireccional. El análisis post-hoc se realizó mediante la prueba de Fisher.

#### Separación y eliminación de la lipoproteína

Se recogió LCR de 12 pacientes con EA y 13 individuos de CN. Después, se removieron 600 µl de lipoproteínas de cada uno del LCR mediante ultracentrifugación preparativa de gradiente de densidad continua de acuerdo con el protocolo informado previamente (Matsubara E, y colaboradores, *Ann Neurol*, 45: 537-541, 1999). Se ajustó la densidad de LCR a 1,25 g/mL con KBr. El LCR se ultracentrifugó a 100.000 rpm y 16°C durante ocho horas usando una centrífuga Hitachi RP100AT. Se sometieron a ultrafiltración las lipoproteínas flotantes a una densidad de 1,25 g/mL y LCR exento de lipoproteínas (LCR-ELP) usando una membrana de corte 3 kDa. (Microcon 3, Amicon, Inc), y luego se congelaron y se almacenaron, o se almacenaron a 4°C, hasta su uso.

También se eliminaron las lipoproteínas por cromatografía de afinidad utilizando PHML-LIPOSORB (Calbiochem, La Jolla, CA). Se combinó cada una de las muestras (plasma o cerebro) y PHML-LIPOSORB (Calbiochem, La Jolla, CA) en una relación de 1,5:1, y se mezclaron durante 60 segundos. A continuación, la mezcla se centrifugó a 3.000 rpm durante diez minutos. Los sobrenadantes resultantes (muestras libres de lipoproteínas) se sometieron a ELISA utilizando 6E10 para los oligómeros. Las muestras unidas a las lipoproteínas se eluyeron de PHML-LIPOSORB usando desoxicolato de sodio 20 mM. La eliminación de lipoproteínas específicas se confirmó mediante electroforesis de agarosa utilizando gel al 1% (Beckman), seguido por tinción con FAST-RED 7B (Wako, Osaka, Japón).

#### Cuantificación de A $\beta$ humana

Se cuantificaron específicamente el plasma entero y la especie A $\beta$  de LPDP mediante ELISA tipo sándwich como se describió previamente (Matsubara E y colaboradores, *Ann Neurol*, 537-541, 1999; Matsubara E, y colaboradores, *Neurobiol Aging*, 25: 833-841, 2004). Para analizar la especie A $\beta$  de cerebro, se sometió directamente la especie A $\beta$  soluble en 100  $\mu$ L de amortiguador a ELISA, mientras que las muestras de A $\beta$  insolubles extraídas con ácido fórmico al 70% fueron neutralizadas con Tris-HCl 1 M (pH 8,0) y se diluyeron 1000 veces antes de ELISA. Los valores obtenidos por el ensayo fueron normalizados usando el peso húmedo del cerebro, y finalmente se presentaron en pmol/g. La normalización entre las placas se realizó mediante la inclusión de las tres muestras de plasma estándar en las tres placas.

#### 10 ELISA específico para oligómero de A $\beta$

Se usó un inmunoensayo enzimático de fase sólida tipo sándwich con base en quimioluminiscencia (ELISA quimioluminiscente) para detectar específicamente A $\beta$  oligomérico pero no A $\beta$  monomérico. Las microplacas se recubrieron con 1A9 monoclonal (isotipo IgG2b) o 2C3 (isotipo IgG2b), o una mezcla de 1A9 y 2C3. Se añadieron 100  $\mu$ L de una muestra (cerebro o líquido cefalorraquídeo) y se incubó continuamente durante 24 horas a 4°C. A continuación, el fragmento Fab' de BA27 conjugado con peroxidasa de rábano picante (anti-A $\beta$  1-40 específico para A $\beta$  40; producto químico puro de Wako, Osaka, Japón) o un fragmento Fab' BCO5 conjugado con peroxidasa de rábano picante (anti-A $\beta$ 35-43 específico para A $\beta$ 42, producto químico puro de Wako Osaka, Japón) y se incubó a 4°C durante 24 horas. Se cuantificó la quimioluminiscencia generada utilizando un sustrato quimioluminiscente SuperSignal ELISA Pico (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) mediante un luminómetro de Microplacas Veritas (Promega).

20 Para evaluar la eficacia *in vivo* de la administración periférica de 1A9 y 2C3 monoclonales, se recogieron muestras de plasma y órgano de ratones receptores y se analizaron para los oligómeros de A $\beta$  mediante ELISA usando 6E10 marcado con HRP (Senetek PLC, Napa, CA, EE.UU.), específico para los oligómeros humanos. La detección de alta sensibilidad se logró utilizando el sistema quimioluminiscente descrito anteriormente. Para evitar la interferencia por monómeros de A $\beta$  unidos a lipoproteína, los presentes inventores trataron previamente muestras de plasma y  
25 órganos usando PHML-LIPOSORB de la misma manera que se describió anteriormente. Para el ensayo se utilizaron las muestras resultantes sin lipoproteína.

#### ELISA de inhibición

Los oligómeros de A $\beta$  utilizados en este ensayo se prepararon diluyendo A $\beta$  1-40 sintético (forma de HCl) hasta una concentración de 0,1 mg/ml con PBS e incubando esto a 37°C durante una hora. Mientras tanto, se prepararon monómeros de A $\beta$  diluyendo A $\beta$  1-40 sintético (forma TFA) a una concentración de 0,1 mg/ml con PBS. Los oligómeros de A $\beta$  se inmovilizaron en placas inmunológicas de 96 pozos a razón de 400 ng/pocillo, y después se bloquearon las placas con BSA. A continuación, se hicieron reaccionar los monómeros u oligómeros de A $\beta$  diluidos paso a paso en el intervalo de 100 pg/ml a 100  $\mu$ g/ml con los anticuerpos 4F7, 4H5, 5A5, 5A9, 6E4 o 6H4, o los anticuerpos anti-A $\beta$  de control (4G8 y 6E10). Después de la incubación durante dos horas, se añadieron las mezclas a las inmunoplasmas de 96 pozos descritas anteriormente, y se incubaron a temperatura ambiente durante diez minutos. La unión de oligómeros de A $\beta$  inmovilizados a cada uno de los anticuerpos se detectó midiendo la absorbancia a 450 nm en la reacción de desarrollo de color usando un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con HRP y una solución de TMB.

#### Ejemplo 1

#### 40 Preparación de anticuerpos monoclonales específicos de oligómeros de A $\beta$ (1A9 y 2C3)

Los oligómeros y monómeros de A $\beta$  coexisten en una solución. Por lo tanto, es esencial eliminar los monómeros de A $\beta$  para la preparación de antígenos para producir anticuerpos específicos de oligómero de A $\beta$ . Como se muestra en la Fig. 1A, los presentes inventores lograron aislar tetrámeros de A $\beta$  estables en SDS sin contaminación de monómeros de A $\beta$  por SDS-PAGE. Después de la inmunización *in vivo* con los tetrámeros de A $\beta$  aislados, se seleccionaron los clones de hibridoma positivos mediante cribado en dos etapas usando análisis de transferencia de puntos seguido por inmunoprecipitación. Entre 400 clones sometidos a análisis por transferencia de puntos, se determinó que 16 clones eran positivos (tasa de positividad = 4%). Para evaluar la especificidad de los clones positivos aislados por los oligómeros, se analizó una fracción de amiloide insoluble en amortiguador de fosfato y soluble en ácido fórmico (AF) derivada de cerebro con EA (Matsubara E y colaboradores, *Neurobiol Aging*, 25: 833-841, 2004) por inmunoprecipitación usando los sobrenadantes de cultivo celular de los hibridomas positivos (Figura 1B). se detectaron el dímero de A $\beta$ , una menor cantidad del trímero, y una característica del frotis de alto peso molecular para las especies moleculares agregadas de A $\beta$  mediante análisis de inmunotransferencias usando 4G8 monoclonal anti-A $\beta$ . También se detectó una cantidad muy pequeña de monómeros de A $\beta$  disociados en presencia de SDS. Para confirmar adicionalmente la existencia de estructuras tridimensionales reconocidas por los 1A9 y 2C3 nativos (es decir, oligómeros), los presentes inventores detectaron los oligómeros en medio acondicionado (MA) de células 293 de riñón embrionario humano (HEK) transfectadas con ADNc de PS1 mutante (Nakaya Y y colaboradores, *J Biol Chem*, 280: 19070-19077, 2005). Los presentes inventores fraccionaron MA de HEK293 por CET, y luego identificaron los oligómeros. Como se reportó anteriormente (Matsubara E y colaboradores, *Neurobiol*

Aging, 25: 833-841, 2004; Yamamoto N, y colaboradores, J Biol Chem, 282, 2646-2655, 2007), este método puede separar eficazmente los oligómeros (fracciones 8 a 13) a partir de monómeros (fracciones 14 a 20). Cuando se inmunoprecipitaron con 1A9 monoclonales, se precipitaron dímeros de A $\beta$  estables en SDS secretados en MA en la fracción 8 (> 680 kDa); se precipitaron los dímeros y trímeros de A $\beta$  estables en SDS en la fracción 13 (17 a 44 kDa); y se precipitó una cantidad muy pequeña de los dímeros en la fracción 16 (Figura 1C). Se obtuvieron resultados similares cuando se llevó a cabo la inmunoprecipitación usando 2C3 (datos no mostrados). Estos datos demuestran que 1A9 y 2C3 monoclonales son exactamente específicos para los oligómeros de A $\beta$  pero no reconocen los monómeros de A $\beta$ .

## Ejemplo 2

10 La actividad anti-neurotóxica de 1A9 y 2C3 monoclonales

Para evaluar si 1A9 y 2C3 monoclonales pueden prevenir la neurotoxicidad inducida por A $\beta$ , se incubaron células PC12 diferenciadas con el FCN (PC12N) con A $\beta$  1-42 libre de semillas 25  $\mu$ M (sobrenadante de 540.000 x g negativo para ThT) en presencia o ausencia de los anticuerpos monoclonales (mAb) a 37°C durante 48 horas. Se determinó la viabilidad de las células nerviosas mediante el ensayo LIVE/DEAD (Figura 2). Se detectó la muerte de células nerviosas a un nivel significativamente mayor (50%) en presencia de A $\beta$  1-42 (Figuras 2B y 2G), en comparación con el ensayo de control (Figura 2A). IgG2b no específica (Figuras 2C y 2G) no pudo inhibir la neurotoxicidad inducida por A $\beta$ 1-42 en las mismas condiciones. El anticuerpo monoclonal 4G8 específico de A $\beta$  comercialmente disponible (isotipo IgG2b, Figuras 2D y 2G) tenía una tendencia a aumentar la toxicidad. 2C3 monoclonal (isotipo IgG2b, Figuras 2F y 2G) neutralizó la neurotoxicidad de A $\beta$  1-42 casi completamente de una forma dependiente de la concentración. De este modo, se especuló que la estructura tridimensional neurotóxica formada de nuevo reconocida por 2C3 adoptaba una forma oligómera. Mientras tanto, la actividad anti-neurotóxica de 1A9 (isotipo IgG2b, Figuras 2E y 2G) se encuentra entre la actividad anti-neurotóxica de 2C3 y la IgG2b no específica. Esto sugiere que la estructura tridimensional reconocida por 1A9 es estructuralmente diferente de los oligómeros reconocidos por 2C3.

25 **Ejemplo 3**

Actualmente, la determinación del tamaño preciso y la conformación de los oligómeros de A $\beta$  1-42 neurotóxicos es una de las cuestiones más urgentes y está sometida a una intensa competencia. Los presentes inventores lograron aislar especies moleculares de A $\beta$  1-42 neurotóxicas solubles y fraccionar la especie en las siguientes cinco fracciones por ultrafiltración y tamizado molecular (UC/MS) (Figura 3A):

30 fracción 1, filtrado de <3 kDa (carril 1);

fracción 2, filtrado de 3 a 10 kDa (carril 2);

fracción 3, filtrado de 10 a 30 kDa (carril 3);

fracción 4, filtrado de 30 a 100 kDa (carril 4); y

fracción 5, solución de retención de > 100 kDa, (carril 5).

35 El análisis de inmunotransferencia utilizando 4G8 monoclonal (Figura 3A) reveló que:

la fracción 1 no contiene A $\beta$  (carril 1);

la fracción 2 contiene monómeros de A $\beta$  (carril 2);

el carril 3 contiene monómeros de A $\beta$  y una pequeña cantidad de dímeros de A $\beta$ ;

la fracción 4 contiene desde monómeros hasta pentámeros de A $\beta$  (carril 4); y

40 la fracción 5 contiene desde monómeros hasta pentámeros de A $\beta$  y moléculas de 45 a 160 kDa (carril 5).

Estos datos sugieren que el SDS al 2% despolimeriza oligómeros de A $\beta$  de alto peso molecular (APM) en monómeros de A $\beta$  y oligómeros de A $\beta$  de bajo peso molecular (BPM). Para evaluar la distribución por tamaño de A $\beta$  1-42 tóxico, los presentes inventores midieron la actividad biológica de cada fracción incubada con PC12N a 37°C durante 48 horas. Como se muestra en las Figs. 3B y 3C, se demostró que: la fracción 1 no era tóxica, y la fracción 2 tenía una toxicidad muy débil, lo que sugiere que es poco probable que los monómeros y los dímeros de A $\beta$  sean tóxicos. Las fracciones 3 a 5 eran significativamente tóxicas (ANOVA unidireccional, p <0,0001), lo que sugiere que el tamaño de los oligómeros neurotóxicos corresponde teóricamente al tamaño de los trímeros o de los polímeros de peso molecular más alto. El análisis de transferencia de puntos utilizando el anticuerpo A11 específico del oligómero demostró que las tres fracciones neurotóxicas mencionadas anteriormente (3 a 5) eran positivas para A11, lo que soporta la evidencia de que las moléculas neurotóxicas son oligoméricas (Figura 3D). Los oligómeros reconocidos por 2C3 se detectaron en las fracciones 4 y 5 (Figura 3D). De este modo, se demostró que 2C3 reaccionaba realmente con oligómeros de A $\beta$  neurotóxicos (> 30 kDa). Además, la mayoría de los oligómeros reconocidos por

2C3 se detectó en la fracción 5 (> 100 kDa) que era la más tóxica, y por lo tanto los oligómeros reconocidos por 2C3 que tenían un peso molecular superior a 100 kDa se consideró que mostraban una fuerte neurotoxicidad (Fig. 3D). Mientras tanto, sólo una cantidad extremadamente pequeña de los oligómeros reconocidos por 1A9 se distribuyó en la fracción 5 que era la más tóxica. Esto es consistente con el resultado de que la neutralización de la neurotoxicidad por 1A9 fue insuficiente (Figuras 2E y 2G). Por el contrario, el 4G8 monoclonal que no tiene actividad anti-neurotóxica detectó la especie A $\beta$  distribuida en todas las fracciones (Figura 3D). Esto sugiere la posibilidad de que coexistan oligómeros no tóxicos y tóxicos del mismo tamaño.

Para evaluar adicionalmente la correlación toxicidad-estructura, cada fracción fue sometida a microscopía de fuerza atómica (MFA). La presencia de morfología de partícula globular consistente con el tamaño de la fracción se detectó en las tres fracciones neurotóxicas. La Fig. 3E muestra las imágenes microscópicas de la fuerza atómica de la fracción no tóxica 2 (Fr. 2), las fracciones tóxicas 3 (Fr. 3) y 4 (Fr. 4), y la fracción más tóxica 5 (Fr. 5). La formación de muchas moléculas poliméricas granulares se observó claramente en las fracciones tóxicas. En particular, se reveló que la fracción 5 contenía moléculas tóxicas heterogéneas que incluían moléculas en forma de perlas y en forma de anillo además de varias moléculas granulares grandes y pequeñas.

#### Ejemplo 4

La actividad de 1A9 y 2C3 para suprimir la formación de fibrillas amiloides A $\beta$

A continuación, los presentes inventores evaluaron la actividad de 1A9 y 2C3 para suprimir la formación de fibrillas amiloides A $\beta$ . La formación de fibrillas amiloides A $\beta$  1-42 (a 0, 10, 25 y 50  $\mu$ M) se evaluó midiendo la fluorescencia de ThT durante 72 horas a 37°C. En las condiciones usadas por los presentes inventores, se polimerizó A $\beta$  1-42 libre de semillas (fracción de sobrenadante negativo para ThT obtenida por ultracentrifugación a 540.000 x g) en fibrillas amiloides por polimerización dependiente de nucleación (Figura 4A). Para evaluar la actividad de 1A9 y 2C3 para suprimir la formación de fibrillas amiloides A $\beta$ , los presentes inventores incubaron a A $\beta$  1-42 libre de semillas 25  $\mu$ M en presencia o en ausencia de los anticuerpos a 37°C durante 48 horas. Como se muestra en la Fig. 4B, se alteró la intensidad de la fluorescencia ThT en una forma dependiente de la concentración de 2C3, mientras que ninguno de 1A9 y 4G8 monoclonales y IgG2b no específico alteraron la intensidad de la fluorescencia. Mientras tanto, cuando A $\beta$  se polimerizó por incubación durante dos horas, 1A9, así como 2C3, mostraron la actividad para suprimir casi completamente la formación de fibrillas (Figura 4C). Dado que se detectó la actividad para suprimir la formación de fibrillas amiloides A $\beta$  incluso cuando la relación molar de 2C3 a A $\beta$  era baja, se dedujo que 2C3 tenía la actividad para inhibir el núcleo de polimerización formado de nuevo o la función de semilla en una etapa temprana de la formación de fibrillas amiloides A $\beta$  1-42. Se obtuvieron resultados similares mediante observación morfológica. Como se muestra en la Fig. 4E (solamente A $\beta$  42) y en la Fig. 4F (A $\beta$  42 + 2C3, 25:3), la microscopía electrónica (EM) demostró que la formación de fibrillas amiloides A $\beta$  se inhibió parcialmente en presencia de 2C3 monoclonal, mientras que sólo se produjo un efecto inhibitorio débil en presencia de 1A9 (Fig. 4G). Mientras tanto, ninguno de los anticuerpos de prueba exhibió el efecto de lisis o despolimerización de las fibrillas amiloides A $\beta$  1-42 que se formaron por incubación durante 24 horas (Figura 4D).

#### Ejemplo 5

Oligómeros relacionados con toxicidad dirigidos por 1A9 y 2C3

Para elucidar la conexión estructural y cinética entre la oligomerización de A $\beta$  1-42 y la formación de fibrillas amiloides, se analizó la polimerización en el transcurso del tiempo mediante transferencia de puntos utilizando A11, 1A9, 2C3 y 4G8. Como se muestra en la Fig. 5A, la mayoría de los oligómeros reactivos al anticuerpo A11 se formó durante la fase del tiempo de retraso de polimerización (0 a 8 horas), y la intensidad de fluorescencia de ThT era relativamente débil. Durante la siguiente fase de extensión de fibrillas (8 a 24 horas), el nivel de oligómeros inmunorreactivos a A11 alcanzó una meseta, y luego fue constante (aproximadamente 20% del nivel máximo) hasta 72 horas (fase de meseta). Se ha demostrado que, dado que el anticuerpo antioligómero A11 no reconoce las fibrillas amiloides, la formación de oligómero de A $\beta$  se puede observar específicamente usando el anticuerpo (Kayed R, y colaboradores, Science 300, 486-489, 2003). Por lo tanto, los presentes resultados sugieren que la formación de oligómeros de A $\beta$  precede a la formación de fibrillas amiloides, y hay un estado de oligomerización que no entra directamente en la ruta de formación de fibrillas amiloides. Los oligómeros reconocidos por 2C3 eran cinéticamente similares a los oligómeros reconocidos por A11, pero no los oligómeros reconocidos por 1A9. Los oligómeros reconocidos por 1A9 se detectaron sólo después de cuatro horas, y después la inmunorreactividad a 1A9 se duplicó con el tiempo. Esto sugiere que los oligómeros reconocidos por 1A9 se forman lentamente. Entre tanto, se reveló que los oligómeros reconocidos por 2C3 se incrementan transitoriamente durante la fase de tiempo de retraso (0 a 8 horas) y luego salen en un nivel muy bajo (menor del 5%) en un estado oligomerizado de 8 a 72 horas. Los datos anteriormente descritos obtenidos por los presentes inventores sugieren la posibilidad de que los oligómeros reconocidos por A11, 1A9 y 2C3 tengan conformaciones o estabilidad estructural e inmunológicamente diferentes y los oligómeros reconocidos por 2C3 sean relativamente inestables en comparación con los oligómeros reconocidos por 1A9.

Para caracterizar el estado de polimerización nuevamente tóxico, se expusieron PC12N a 37°C durante 48 horas a A $\beta$  1-42 libre de semillas (0 horas), o A $\beta$  1-42 incubada previamente durante dos, cuatro o 24 horas (Figura 5B), y se

ensayó la actividad neurotóxica. Como se muestra en la Fig. 5B, el análisis de inmunotransferencia usando 4G8 reveló que los monómeros, dímeros y trímeros existen incluso en el punto de tiempo 0 horas. La incubación previa de dos o cuatro horas dio como resultado un patrón de frotis de alto peso molecular (APM) de 45 a 160 kDa, además de los monómeros hasta los pentámeros. En el punto de tiempo de 24 horas, el frotis de APM se redujo drásticamente, y hubo dos tipos de componentes principales: una especie de alto peso molecular que no podía entrar en el gel y por lo tanto permaneció en el pozo, y una pequeña cantidad de los monómeros. El frotis de APM desapareció después de una incubación adicional a 37°C durante 48 horas. Como se muestra en las Figs. 3A y 5C, el experimento de tamiz molecular reveló que la A $\beta$  1-42 libre de semillas se convierte en una especie molecular de 100 kDa o más y exhibe la toxicidad más fuerte. Mediante SDS-PAGE, se demostró que las moléculas tóxicas incluyen especies moleculares que muestran un patrón de frotis de alto peso molecular (APM) de 45 a 160 kDa, además de la especie monómero hasta pentámero y los polímeros tóxicos pueden despolimerizarse fácilmente en especies de bajo peso molecular en presencia de SDS. Sin embargo, cuando la A $\beta$  1-42 libre de semillas se incubó previamente durante dos, cuatro y 24 horas, la actividad neurotóxica de los oligómeros de A $\beta$  formados nuevamente se redujo de aproximadamente 12,5% y 26%, respectivamente (Figura 5C). Este resultado sugiere que el nivel de oligómeros de A $\beta$  formados nuevamente en el período inicial de polimerización de A $\beta$  es un factor determinante para la neurotoxicidad y que la formación alcanza un máximo en el periodo de cero a dos horas y luego el nivel de oligómeros de A $\beta$  formados se reduce con el tiempo. Alternativamente, existe la posibilidad de que los núcleos para la nueva polimerización de las fibrillas amiloides A $\beta$ , o las mismas fibrillas amiloides, tengan la actividad neutralizadora de la neurotoxicidad. Los presentes inventores incubaron A $\beta$  1-42 durante dos horas, y después eliminaron los núcleos de polimerización de A $\beta$  insolubles y las fibrillas amiloides por ultracentrifugación durante tres horas a 540.000 x g. El sobrenadante y el sedimento obtenidos por ultracentrifugación a 540.000 x g presentaron niveles similares de señales de tioflavina T, lo que sugiere que el sobrenadante de 540.000 x g contiene polímeros A $\beta$  solubles positivos para ThT (la unión de ThT indica cambios estructurales para formar una estructura rica en lámina  $\beta$ , pero no formación de fibrilla). Se restauró y mejoró la neurotoxicidad cuando se expuso PC12N a los polímeros solubles (Figura 5D). Esto sugiere que el mismo A $\beta$  1-42 insoluble tiene actividad antitóxica. Bajo las condiciones descritas anteriormente, el 1A9 monoclonal neutralizó completamente la neurotoxicidad inducida por oligómeros de A $\beta$  solubles enriquecidos en estructuras de lámina  $\beta$ , y esta actividad de neutralización fue mayor que la de 2C3. Mientras tanto, la IgG2b no específica no tiene efecto sobre la viabilidad de PC12N cultivadas. Por consiguiente, se especula que los polímeros neurotóxicos reconocidos por 1A9 son básicamente oligómeros tóxicos solubles que se han estabilizado ligeramente debido a cierto cambio estructural, mientras que los polímeros neurotóxicos reconocidos por 2C3 son básicamente intermediarios oligoméricos de corta duración que son muy inestables debido a cambios estructurales drásticos durante la etapa temprana del proceso de polimerización.

### Ejemplo 6

1A9 y 2C3 monoclonales reconocen oligómeros de A $\beta$  en el parénquima cerebral

Los presentes inventores demostraron la especificidad y la actividad biológica de 1A9 y 2C3. Además, los inventores detectaron polímeros 1A9 y 2C3 en el cerebro mediante inmunohistoquímica. Los presentes inventores realizaron métodos de inmunohistoquímica convencionales para potenciar la reacción inmune mediante fijación con formaldehído, y ácido fórmico, SDS o tratamiento por microondas de secciones cerebrales. Los dos anticuerpos no mostraron inmunoreactividad con un cerebro con EA por ninguno de los métodos de mejora. Por lo tanto, los presentes inventores trataron previamente las secciones con Proteasa K, que se sabe que mejora la inmunotinción (Wrzolek MA, y colaboradores, Am J Pathol, 141: 343-355, 1992). Como resultado, muchas placas seniles se tiñeron con 1A9 (Figura 6A), 2C3 (Figura 6B) y A11 (Figura 6C). Junto con el hallazgo de los experimentos *in vitro* de los presentes inventores de que las fibrillas amiloides A $\beta$  neutralizan la neurotoxicidad inducida por el oligómero de A $\beta$ , el resultado descrito anteriormente sugiere que una placa senil sirve como un depósito defensivo para aislar y almacenar oligómeros de A $\beta$  y, por lo tanto el interior del depósito es difícilmente accesible para los anticuerpos. De hecho, la inmunoprecipitación usando 1A9 y 2C3 demostró que las fracciones amiloides compuestas de placas seniles contienen oligómeros de A $\beta$  reconocidos por los dos anticuerpos. Por lo tanto, se demostró que la hipótesis de los presentes inventores era consistente con el hallazgo *in vivo* (véase la Figura 1B).

Para evaluar adicionalmente la existencia de polímeros "solubles" reconocidos por 1A9 y 2C3 en el cerebro, los presentes inventores llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación usando los dos anticuerpos. Se prepararon homogeneizados de cerebro usando solución salina amortiguada con Tris (TBS) para evitar la modificación química durante la extracción de oligómeros solubles. Los oligómeros que tienen un peso molecular de 4mer, 5mer, 8mer y 12mer se inmunoprecipitaron con 1A9 a partir de muestras de TBS de la corteza cerebral del cerebro con EA (Figura 6D, carril 2), mientras que el nivel de los oligómeros en el cerebro sano de control estaba por debajo del límite de detección (carril 3). Mientras que la intensidad de 4mer, 5mer y 8mer era comparable entre 1A9 (carril 2) y la mezcla monoclonal 4G8/6E10 (carril 1), 1A9 parecía recuperar una mayor cantidad de 12mer que 4G8/6E10. La inmunoprecipitación con 2C3 mostró un resultado comparable (Fig. 6, carriles 4 a 6). A continuación, los presentes inventores identificaron las moléculas responsables de la neurotoxicidad *in vivo* en la corteza entorrinal humana. Es bien sabido que la maraña neurofibrilar (NFT) y la pérdida de células nerviosas preceden a la formación de placas seniles en lesiones en poblaciones generales de ancianos. Los presentes inventores plantearon la hipótesis que la falta de depósitos funcionales tales como placas seniles para los polímeros reconocidos por 1A9 y 2C3 es perjudicial para las neuronas de la corteza entorrinal y es una posible causa de alteración de la memoria. Se

determinó el nivel de 12mer en las fracciones solubles en amortiguador de los 50 casos de autopsias reportados previamente por inmunotransferencia utilizando 1A9 y 2C3 monoclonales. Los 50 casos incluyen dos casos de EA, 35 casos en las etapas I a II de NFT de Braak y 13 casos en las etapas III a IV de NFT (Katsuno y colaboradores, *Neurology*, 64: 687-692, 2005). Como se muestra en las Figs. 6E (1A9) y 6F (2C3), la actividad inmunológica de 12mer inmunorreactivas a 1A9 o 2C3 en relación con la actina fue significativamente mayor en los pacientes con EA en comparación con el grupo de control sano (etapas I a II de NFT de Braak) y el grupo de deterioro cognitivo moderado (etapas III a IV de Braak). Curiosamente, el 12mer se acumuló en la corteza entorrinal del grupo de control sano (etapas I a II de NFT de Braak) y el grupo de deterioro cognitivo moderado (etapas III a IV de Braak) a un nivel de aproximadamente 40% y 60% (el nivel de casos con EA es del 100%), respectivamente (Figuras 6E y 6F). Este resultado indica que la acumulación de 12mer precede al inicio del deterioro cognitivo, y se incrementa a medida que avanza la etapa de NFT de Braak, lo que sugiere que los 12 mer inmunorreactivos a 1A9 y 2C3 son polímeros responsables de la neurotoxicidad *in vivo*.

### Ejemplo 7

1A9 y 2C3 monoclonales reconocen los oligómeros de A $\beta$  en el líquido cefalorraquídeo

Los polímeros A $\beta$  (12 mer solubles inmunorreactivos a 1A9 y 2C3) responsables de la neurotoxicidad *in vivo* se encontraban en el parénquima cerebral. Por lo tanto, los presentes inventores especularon que LCR también contiene los polímeros. Para verificar esto, los presentes inventores fraccionaron los LCR combinados de diez pacientes con EA y diez individuos sanos de la misma edad como un control por CET, y ensayaron las fracciones mediante ELISA tipo sándwich específica para oligómeros de A $\beta$  usando BC05 o BA27 monoclonales en los sistemas de captura y detección. El ELISA del oligómero BC05/BC05 detectó A $\beta$  1-42 soluble en la fracción 13, mientras que el ELISA de BA27/BA27 detectó A $\beta$  1-40 soluble en las fracciones 7 a 14 (datos no mostrados). Sin embargo, en cada ELISA, la absorbancia (DO a 450 nm) era baja para una detección sensible de una cantidad pequeña de oligómeros de A $\beta$  en LCR. La detección de monómeros de A $\beta$  en las mismas fracciones por ELISA de BNT77 mostró que los monómeros de A $\beta$  unidos a lipoproteínas (fracciones 7 a 14) y monómeros de A $\beta$  libres de lipoproteínas (fracciones 15 a 17) coexisten con oligómeros de A $\beta$  en las fracciones (Figuras 7-1 A y 7-1 B) (Matsubara E, y colaboradores, *Neurobiol Aging*, 25: 833-841, 2004). El nivel de monómero de A $\beta$  unido a la lipoproteína en EA fue comparable al del control sano, mientras que el nivel de monómero de A $\beta$ 40 libre de lipoproteína (Figura 7-1A) y el monómero de A $\beta$ 42 (Figura 7-1 B) en EA fue más bajo en comparación con el control sano de la misma edad. Los presentes inventores también encontraron que se pueden detectar monómeros de A $\beta$  unidos a lipoproteínas, además de los oligómeros, cuando se diseña ELISA para usar BC05 o BA27 marcados con HRP como anticuerpo de captura. Este problema permaneció desapercibido en el documento de la técnica anterior (Lee EB, y colaboradores, *J Biol Chem*, 281: 4292-4299, 2006), que describe métodos de ensayo (por ejemplo, ELISA de 6E10/6E10) que son similares a los métodos descritos en la presente memoria. Dado que los oligómeros y los monómeros de A $\beta$  unidos a las lipoproteínas se eluyen a un tiempo de retención comparable en CET, es imposible distinguirlos por ELISA de oligómeros usando el mismo anticuerpo en la captura y detección. Por lo tanto, se reveló que el LCR que contiene lipoproteínas no es adecuado para una muestra de ensayo cuando se analizan oligómeros de A $\beta$  usando anticuerpos no selectivos de oligómeros de A $\beta$ .

Para superar las debilidades de los métodos de la técnica anterior, los presentes inventores mejoraron los anticuerpos de detección y las muestras utilizadas en ELISA. Se eliminaron previamente las lipoproteínas del LCR, y se usó el LCR resultante sin lipoproteínas (LPD-LCR) como muestra de ensayo. Se usaron 1A9 y 2C3 específicos para oligómeros de A $\beta$  como anticuerpos de detección para ELISA. Además, se desarrolló un ELISA de quimioluminiscencia para mejorar la sensibilidad. Se fraccionó LPD-LCR combinado (Figs. 7-1C a D) mediante CET y se analizó cada fracción para la distribución de oligómeros de A $\beta$  mediante ELISA de luminiscencia usando 1A9 o 2C3 como anticuerpos de detección. Como se muestra en las Figs. 7-1C a D se detectaron oligómeros de A $\beta$  en las fracciones 12 a 15 de CET (A $\beta$  relativamente grande con un peso molecular que oscila entre 18 y 108 kDa, lo que corresponde al tamaño de 4mer a 24 mer). El nivel de oligómeros reconocidos por 1A9 y 2C3 se elevó en todas las fracciones derivadas de pacientes con EA en las que los oligómeros eran detectables. Para evaluar la utilidad de los oligómeros de A $\beta$  como marcadores terapéuticos, se comparó el nivel de oligómeros de A $\beta$  en LPD-LCR de pacientes con EA con aquel del control sano de la misma edad, aunque se analizaron un número limitado de casos. Como se muestra en la Fig. 7-2G, los oligómeros reconocidos por 2C3 compuestos de A $\beta$  x-42 aumentaron significativamente en el grupo de pacientes con EA comparado con el grupo de control normal (análisis no paramétrico,  $p = 0,0103$ ). Por el contrario, para los oligómeros reconocidos por 2C3 compuestos de A $\beta$  x-42, no hubo diferencias significativas entre los dos grupos. Mientras tanto, el nivel de oligómeros reconocidos por 1A9 compuestos de A $\beta$  x-42 fue mayor en EA que en el control, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. Para los oligómeros reconocidos por 1A9 compuestos de A $\beta$  x-40, no hubo diferencia significativa entre los dos grupos (Figura 7-2E). El cambio estructural de monómero a oligómero de A $\beta$  se produce en el período más temprano del proceso de polimerización de A $\beta$ . La relación entre el oligómero y monómero de A $\beta$  (índice O/M) se puede utilizar como indicador clínico que refleja las condiciones patológicas de la EA. Como se muestra en las Figs. 7-2F y 7-2H, los índices O/M para A $\beta$ 42 y A $\beta$ 40 aumentaron significativamente en el grupo de pacientes con EA comparado con el grupo de control sano (1A9,  $P = 0,0137$  para A $\beta$ 42 y  $P = 0,0429$  para A $\beta$ 40; 2C3,  $P = 0,0012$  para A $\beta$ 42 y  $P = 0,0051$  para A $\beta$ 40). Los resultados descritos anteriormente muestran que las estructuras tridimensionales positivas para 1A9 y 2C3 están presentes como oligómeros de A $\beta$  en LPD-LCR, y aumentan en

pacientes con EA. Además, los resultados obtenidos por los presentes inventores demostraron que la conversión estructural de A $\beta$  soluble libre de lipoproteína en los compuestos intermedios oligoméricos se produce en el LCR de pacientes con EA y se pueden detectar los oligómeros como marcadores biológicos útiles para el diagnóstico de EA esporádico.

5 **Ejemplo 8**

Inmunoterapia pasiva usando 1A9 y 2C3 monoclonales previene la aparición de trastornos de la memoria en Tg2576

10 Para evaluar el efecto preventivo/terapéutico *in vivo* de la inmunoterapia pasiva basada en la administración de 1A9 (n = 13) o 2C3 (n = 11), los presentes inventores administraron 1A9 o 2C3 (0,4 mg/kg/semana) O PBS a ratones Tg2576 a través de la vena caudal durante el período de 4 a 13 meses. La función de la memoria se evaluó a los 13 meses de edad en términos de los siguientes cuatro tipos de paradigmas de aprendizaje/comportamiento:

- (1) memoria de corto plazo en la prueba de laberinto Y (Fig. 8A);
- (2) memoria de reconocimiento de objetos en una nueva prueba de reconocimiento de objetos (Figura 8B);
- (3) memoria espacial en la prueba de laberinto de agua (Fig. 8C); y
- (4) memoria emocional asociativa en la prueba contextual de condicionamiento del miedo (Fig. 8D).

15 En comparación con ratones Tg2576 que recibieron 1A9 y 2C3, los ratones Tg2576 que recibieron PBS mostraron deterioros significativos en el aprendizaje y el comportamiento (Figuras 8A a 8D). A diferencia de la función de memoria de ratones Tg2576 que recibieron PBS (n = 10), la función de memoria de ratones Tg2576 que recibieron 1A9 y 2C3 fue indistinguible de aquella de ratones de cohortes de tipo silvestre de la misma edad que no recibieron tratamiento, que se determinó previamente. Por lo tanto, se demostró que los ratones Tg2576 que recibieron 1A9 y 20 2C3 conservaron la memoria tanto de corto como de largo plazo, que se deterioró en el grupo que recibió PBS. Es decir, los presentes inventores obtuvieron evidencia que apoya la opinión de que el inicio de la alteración de la memoria, en particular la EA, puede prevenirse llevando a cabo una inmunoterapia pasiva dirigida a los oligómeros de A $\beta$  antes del inicio. Además, el resultado descrito anteriormente presenta la primera evidencia *in vivo* que indica directamente que los oligómeros de A $\beta$  son responsables del inicio de la alteración de la memoria.

25 **Ejemplo 9**

1A9 monoclonal previene la acumulación de A $\beta$  en el cerebro de Tg2576

30 Se diseccionaron ratones Tg2576 que recibieron PBS (n = 10) y ratones Tg2576 tratados con inmunoterapia pasiva durante el periodo de 4 a 13 meses (grupo que recibió 1A9, n = 13, grupo que recibió 2C3, n = 11) después de los experimentos de aprendizaje/conductuales. La cantidad de A $\beta$  acumulada en el cerebro (corteza cerebral vs. hipocampo) se determinó en las tres fracciones siguientes (150 mg/extracto) preparadas por extracción en serie: fracción soluble en amortiguador Tris que contenía inhibidores de proteasa; fracción amiloide soluble en SDS al 2%; y fracción amiloide insoluble en SDS al 2% y soluble en ácido fórmico al 70%. Se considera que las moléculas A $\beta$  fisiológicas no acumulativas están contenidas en la fracción de amortiguador Tris, mientras que A $\beta$  soluble en SDS al 2% incluye A $\beta$  en placas seniles difusas antes de la formación de fibrillas amiloides, A $\beta$  inmunocitoquímicamente indetectable y A $\beta$  oligomérico soluble acumulativo conformacionalmente alterado. Se cuantificó selectivamente A $\beta$  mediante ELISA específico para A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 finales (BNT77/BA27 específico para A $\beta$ 40, BNT77/BC05 específico para A $\beta$ 42, kit WAKO). No hubo diferencia marcada entre los tres grupos en la concentración de A $\beta$  en la fracción de amortiguador Tris, donde los componentes principales eran moléculas fisiológicas A $\beta$  no acumulativas (Figuras 9A y 9C, A $\beta$  x 40; Figuras 9B y 9D, A $\beta$  x-42). Con relación A $\beta$  soluble acumulado en el cerebro (fracción SDS), se observó un efecto supresor significativo en la acumulación de A $\beta$  x-40 y A $\beta$  x-42 en la corteza cerebral únicamente en el grupo que recibió 1A9 (Figura 9E, A $\beta$  x-40; Fig. 9F, A $\beta$  x-42). No se observó efecto de acumulación-supresión en el hipocampo (Fig. 9G, A $\beta$  x-40; Fig. 9H, A $\beta$  x-42). Mientras tanto, con respecto al A $\beta$  insoluble acumulado en el cerebro (fracción FA), se observó un efecto supresor significativo sobre la acumulación de A $\beta$  x-40 en la corteza cerebral únicamente en el grupo que recibió 1A9 (Figura 9I, A $\beta$  x-40; Figura 9J, A $\beta$  x-42). No se observó efecto de acumulación-supresión en el hipocampo (Fig. 9K, A $\beta$  x-40; Fig. 9L, A $\beta$  x-42). El análisis de inmunotransferencia de A11 de las fracciones solubles en SDS mostró un efecto supresor sobre la acumulación de oligómero positivo para A11 (4mer) en la corteza cerebral en los dos grupos de tratamiento con anticuerpos (Figura 9M).

45 **Ejemplo 10**

Los oligómeros A $\beta$  en plasma aumentan por inmunoterapia pasiva con 1A9 y 2C3

50 No hubo diferencia significativa en la concentración de A $\beta$  en plasma entre los tres grupos siguientes: ratones Tg2576 que recibieron PBS (n = 10) y ratones Tg2576 tratados con inmunoterapia pasiva durante el período de 4 a 13 meses (grupo que recibió 1A9, n = 13; grupo que recibió 2C3, n = 11) (Figura 10A, A $\beta$  x-40; Fig. 10B, A $\beta$  x-42). Tampoco hubo diferencia significativa en la relación A $\beta$ 40/42 (Figura 10C).

Con el fin de elucidar el mecanismo subyacente del efecto preventivo de la inmunoterapia pasiva con 1A9 y 2C3 (IVIg) contra el fenotipo similar a EA en ratones Tg2576, los presentes inventores evaluaron el nivel de oligómeros de A $\beta$  solubles e insoluble en solución salina fisiológica en homogeneizados de cerebro combinados, y el nivel de oligómeros de A $\beta$  en sangre y plasma periféricos. No hubo diferencia en la cantidad de oligómeros de A $\beta$  solubles en solución salina fisiológica en los homogeneizados de cerebro combinados entre los grupos de tratamiento (Figura 10D). Mientras tanto, se demostró que la cantidad de oligómeros de A $\beta$  insolubles se redujo en los grupos de tratamiento con 1A9 y 2C3 (Figura 10E). Además, se analizó el plasma combinado de cada grupo (plasma sin albúmina, parte superior del panel F, plasma sin albúmina/lipoproteína, parte inferior del panel F) para oligómeros de A $\beta$  mediante transferencia de puntos de A11. El resultado muestra que los oligómeros estaban presentes en el plasma de ratones Tg2576 que recibieron PBS (Figura 10F). Los oligómeros positivos para A11 en plasma aumentaron claramente en los grupos de inmunoterapia pasiva en comparación con el grupo que recibió PBS (Figura 10F). La proporción de oligómeros reconocidos por 2C3 en una forma unida a lipoproteína fue mayor que aquella de oligómeros reconocidos por 1A9 (parte inferior del Panel F). Además, los oligómeros de A $\beta$  en plasma fueron detectados por inmunoprecipitación de A11. El resultado muestra que los oligómeros de aproximadamente 200 kDa aumentaron en ratones Tg2576 tratados con inmunoterapia pasiva en comparación con el grupo que recibió PBS (Figura 10G). El aumento de oligómeros de A $\beta$  en plasma en los grupos de inmunoterapia pasiva puede considerarse que refleja directamente una depuración cerebral mejorada. Por lo tanto, los presentes inventores obtuvieron evidencia de que las moléculas objetivo directas para inmunoterapia pasiva intravenosa también están presentes en sangre además del cerebro y que la depuración cerebral selectiva de oligómeros puede ser mejorada a través de sitios periféricos de acción. Es decir, los presentes inventores mostraron la utilidad clínica de la inmunoterapia pasiva intravenosa.

#### **Ejemplo 11**

La formación de placas amiloides seniles y neuritas distróficas hinchadas puede ser suprimida mediante inmunoterapia pasiva usando 1A9 y 2C3

Se suprimió la deposición inmunohistoquímica de A $\beta$  en los grupos de inmunoterapia pasiva (Figura 11A). La formación de placas amiloide seniles positivas para tioflavina S se suprimió significativamente tanto en la corteza cerebral como en el hipocampo (Figura 11B, parte superior), y también se demostró claramente la reducción de neuritas por histoquímica (Figura 11B, parte inferior). La formación de neuritas distróficas hinchadas positivas para sinaptofisina también se suprimió significativamente en los grupos de inmunoterapia pasiva (Figura 11C).

#### **Ejemplo 12**

Análisis de inmunotinción utilizando anticuerpos anti-sinaptofisina y anti-drebrina

1A9 y 2C3 suprimieron la degeneración presináptica y postsináptica en el neocórtex cerebral (Fig. 12).

#### **Ejemplo 13**

Los anticuerpos se trasladan al cerebro

La existencia/localización de A $\beta$  depositado y de IgG cerebral de ratón se evaluó utilizando un microscopio confocal láser. El resultado muestra que IgG de ratón se localiza casi independientemente del A $\beta$  depositado dentro de las áreas que contienen placas seniles difusas. La IgG de ratón se observó sólo en los grupos de inmunoterapia pasiva (1A9, Fig. 13<sup>a</sup>; 2C3, Fig. 13B), pero no en el grupo que recibió PBS (Figura 13C). Por lo tanto, se consideró que una fracción de los anticuerpos administrados en sangre se trasladó al cerebro. Este resultado demuestra que el efecto preventivo sobre la perturbación de la memoria se produjo no sólo a través de la neutralización directa de la toxicidad de los polímeros A $\beta$  solubles por los anticuerpos trasladados al cerebro, sino también a través de la eliminación de polímeros A $\beta$  solubles en la forma de un complejo con los anticuerpos en la sangre. Por lo tanto, se consideró que el efecto terapéutico se basa en mecanismos de acción múltiple.

#### **Ejemplo 14**

Preparación de anticuerpos monoclonales específicos de oligómero de A $\beta$  (5A5, 5A9, 4F7, 4H5, 6E4 y 6H4) y análisis de transferencia de puntos

Se evaluaron 33 clones preparados por el método descrito anteriormente que utiliza el oligómero de A $\beta$  1-40 como antígeno mediante análisis por transferencia de puntos. El resultado mostró que los seis tipos de anticuerpos monoclonales reconocen específicamente los oligómeros de A $\beta$ . Como se muestra a continuación, se determinó el isotipo de los seis tipos de anticuerpos (4F7, 4H5, 5A5, 5A9, 6E4 y 6H4):

4F7:  $\kappa$  para la cadena L, e IgG2a para la cadena H;

4H5:  $\kappa$  para la cadena L, e IgG2a para la cadena H;

5A5:  $\kappa$  para la cadena L, e IgG2b para la cadena H;

5A9:  $\kappa$  para la cadena L, e IgG2b para la cadena H;

6E4:  $\kappa$  para la cadena L, e IgG1 para la cadena H; y

6H4:  $\kappa$  para la cadena L, e IgG2b para la cadena H.

5 Además, el análisis por inmunotransferencia de puntos mostró que, como con 2C3 descrito anteriormente, los anticuerpos 4F7, 4H5, 5A5, 5A9, 6E4 y 6H4 se unen específicamente a oligómeros de A $\beta$  pero no reconocen los monómeros de A $\beta$  (véase la Figura 14).

### Ejemplo 15

ELISA de inhibición

10 Para evaluar la actividad de unión selectiva al oligómero de A $\beta$  de los seis tipos de anticuerpos (4F7, 4H5, 5A5, 5A9, 6E4 y 6H4), se mezcló cada anticuerpo con oligómeros o monómeros de A $\beta$  diluidos paso a paso ("inhibidores"), y se añadieron soluciones previamente mezcladas a inmunoplasmas de 96 pozos inmovilizadas con oligómero de A $\beta$ , y luego se incubaron (véase la sección "Métodos"). Los anticuerpos 4G8 y 6E10 comercialmente disponibles se usaron como anticuerpos de control que se unen no selectivamente a oligómeros y monómeros de A $\beta$ . Cuando un anticuerpo se une selectivamente a oligómeros de A $\beta$ , el anticuerpo mezclado previamente con monómeros de A $\beta$  no se une a los monómeros de A $\beta$  en la solución y, por lo tanto, se puede unir a oligómeros de A $\beta$  inmovilizados. Por otra parte, el anticuerpo previamente mezclado con oligómeros de A $\beta$  se une a los oligómeros de A $\beta$  en la solución y, por lo tanto, la cantidad de anticuerpo unida a los oligómeros de A $\beta$  inmovilizados se reduce con el aumento en la concentración del inhibidor. Los resultados para los seis tipos de anticuerpos (4F7, 4H5, 5A5, 5A9, 6E4 y 6H4) mostraron una reducción dependiente de la concentración en la cantidad de anticuerpo unido cuando se usaron oligómeros de A $\beta$ . Por el contrario, no se detectó dicha reducción fuerte en la unión cuando se usaron monómeros de A $\beta$  (véase la Figura 15). Mientras tanto, para 4G8 y 6E10, se observó una reducción dependiente de la concentración en la cantidad de anticuerpo unido cuando se usaron monómeros y oligómeros de A $\beta$  (véase la Figura 15). Estos resultados sugieren que los seis tipos de anticuerpos (4F7, 4H5, 5A5, 5A9, 6E4 y 6H4) se unen selectivamente a oligómeros de A $\beta$ .

### 25 Ejemplo 16

La actividad de los seis tipos de anticuerpos (4F7, 4H5, 5A5, 5A9, 6E4, y 6H4) para neutralizar la neurotoxicidad inducida por A $\beta$

30 Para evaluar si los seis tipos de anticuerpos (4F7, 4H5, 5A5, 5A9, 6E4 y 6H4) tienen una actividad de neutralización de neurotoxicidad inducida por A $\beta$ , se cultivaron células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) en un medio que contenía A $\beta$  1-42 (12,5  $\mu$ M) en presencia o en ausencia de los anticuerpos durante 24 horas, y se controló el cambio en la citotoxicidad inducida por A $\beta$  1-42. Como resultado, se mejoró la citotoxicidad mediante la adición de IgG de control (3F1). Aunque también aumentó la citotoxicidad por la adición de los anticuerpos 4F7 y 4H5, el aumento fue menor que el observado para 3F1 (véase la Figura 16). Se encontró que los cuatro tipos restantes de anticuerpos (5A5, 5A9, 6E4 y 6H4) redujeron notablemente la citotoxicidad (véase la Fig. 16). Los resultados descritos anteriormente demuestran que los cuatro tipos de anticuerpos (5A5, 5A9, 6E4 y 6H4) tienen una fuerte actividad de neutralización de la neurotoxicidad inducida por A $\beta$ . Puesto que 4F7 y 4H5 disminuyeron la citotoxicidad en comparación con la IgG de control, se deduce también que estos anticuerpos tienen una actividad de neutralización de la neurotoxicidad inducida por A $\beta$ .

### Ejemplo 17

40 La actividad de los seis tipos de anticuerpos (4F7, 4H5, 5A5, 5A9, 6E4 y 6H4) para suprimir la formación de fibrillas amiloides A $\beta$

45 Para evaluar si los seis tipos de anticuerpos (4F7, 4H5, 5A5, 5A9, 6E4 y 6H4) tienen actividad de supresión de la formación de fibrillas amiloides A $\beta$ , se detectó la formación de fibrillas amiloides A $\beta$  mediante el método de ensayo de intensidad de la fluorescencia de ThT en una solución (medio) cuya composición era la misma que la utilizada en el experimento para la neurotoxicidad inducida por A $\beta$  (véase la sección de "Métodos"). Se encontró que 6E4 y 6H4 suprimen la formación de fibrillas en una forma dependiente de la concentración de anticuerpos (véase la Fig. 17). También se dedujo que los otros cuatro anticuerpos (4F7, 4H5, 5A5 y 5A9) tienen una actividad de supresión de la formación de fibrillas, ya que los anticuerpos exhibían la tendencia a suprimir la formación de fibrillas en comparación con IgG control.

### 50 Discusión

Los datos obtenidos por los presentes inventores muestran que 1A9 y 2C3 monoclonales reconocen específicamente al "epítipo neurotóxico" y al "epítipo de polimerización" de polímeros A $\beta$  solubles que son responsables de la actividad tóxica y la actividad de formación de fibrillas de antígeno. Dado que los 1A9 y 2C3 monoclonales no reaccionan con monómeros de A $\beta$  solubles, que son moléculas fisiológicas, se puede concluir que

una estructura tridimensional que tiene el epitopo que es reconocido por 1A9 o 2C3 es específica para polímeros oligoméricos solubles. Los experimentos usando ultrafiltración y tamiz molecular revelaron que el tamaño de oligómeros inmunorreactivos para 1A9 y 2C3 es mayor a 100 kDa (> 20 mer). El resultado de la observación morfológica mediante MFA demostró que los polímeros tóxicos son morfológicamente heterogéneos (granulares, en forma de perlas y en forma de anillos).

Para demostrar que los polímeros tóxicos son realmente moléculas bioactivas que exhiben toxicidad sináptica *in vivo*, los presentes inventores iniciaron un tratamiento de ratones Tg2576 jóvenes antes del inicio de la alteración de la memoria con inmunoterapia pasiva con anti-oligómeros de A $\beta$  dirigida a polímeros tóxicos reconocidos por 1A9 y 2C3. Por primera vez, los presentes inventores presentaron pruebas que apoyan que el deterioro de la memoria dependiente de la edad que se desarrolla naturalmente en ratones Tg2576 se puede prevenir mediante inmunoterapia pasiva usando anticuerpos anti-oligómeros de A $\beta$  específicos (1A9 y 2C3). En este sentido, la perturbación de la memoria a corto plazo evaluada por la prueba del laberinto en Y es similar a la perturbación de la memoria asociada a la acumulación de A $\beta$  observada en el deterioro cognitivo moderado (MCI) y en la EA temprana. La prueba del laberinto en Y mostró resultados excelentes y casi normales en ratones Tg2576 que recibieron 1A9 y 2C3, respectivamente. Cuando se evaluó mediante la tarea de reconocimiento de nuevos objetos, el laberinto de agua de Morris y la tarea de condicionamiento del miedo contextual, la memoria a largo plazo se mantuvo casi normal mediante los anticuerpos anti-oligómeros de A $\beta$ .

Se observó un aumento selectivo de los oligómeros positivos para A11 en sangre en los grupos de ratones tratados con anticuerpos en comparación con el grupo de tratamiento con PBS, lo cual es consistente con la capacidad de los anticuerpos para prevenir el inicio de la alteración de la memoria (capacidad de mantenimiento de la memoria). El tratamiento con anticuerpo 1A9 también mostró el efecto de suprimir la acumulación de A $\beta$  en el cerebro. El tratamiento con anticuerpo 2C3 demostró un nivel más alto en sangre de oligómeros positivos para A11 en comparación con el tratamiento con anticuerpo 1A9. Sin embargo, el efecto de supresión de acumulación de A $\beta$  en el cerebro del tratamiento con el anticuerpo 2C3 no fue claro. Por consiguiente, se consideró que los oligómeros reconocidos por 1A9 tenían mayor contribución a la acumulación de A $\beta$  en el cerebro que los oligómeros reconocidos por 2C3. La implicación de los polímeros en la acumulación de A $\beta$  en el cerebro puede explicarse con base en la siguiente presunción: los polímeros neurotóxicos 1A9 son oligómeros tóxicos solubles que son algo conformacionales, mientras que los polímeros 2C3 neurotóxicos son compuestos intermedios oligómeros de corta vida y muy inestables que aparecen en la etapa temprana del proceso de polimerización, cuya conformación es fácilmente cambiada.

Los presentes inventores describen aquí el efecto preventivo *in vivo* de anticuerpos anti-oligómero en la enfermedad de Alzheimer, y esta es la primera evidencia que demuestra directamente que los oligómeros tóxicos de A $\beta$  formados *in vivo* pueden inhibir las funciones de las células nerviosas, induciendo por lo tanto los síntomas de la enfermedad de Alzheimer.

Los datos obtenidos por los presentes inventores son también la primera evidencia que soporta la opinión de que A $\beta$  exhibe neurotoxicidad *in vivo* en el cerebro humano. Es bien sabido que la corteza entorrinal humana es un área que se afecta fácilmente con la EA. En esta área, la formación de NFT y la pérdida de células nerviosas preceden a la formación de placas seniles. Por lo tanto, la corteza entorrinal es un área excepcional a la que no se puede aplicar la hipótesis de la cascada amiloide comúnmente aceptada. Sin embargo, esta inconsistencia ha sido abandonada y no se ha estudiado durante mucho tiempo.

Los presentes inventores propusieron y examinaron la hipótesis de que oligómeros de A $\beta$  invisibles previamente no identificables son nocivos para las células nerviosas en la corteza entorrinal y causan alteración de la memoria. Para examinar esta hipótesis, los presentes inventores realizaron un análisis semicuantitativo de 12 mer inmunorreactivo a 1A9 y 2C3 en la corteza entorrinal de individuos ancianos que estaban en su mayor parte en las etapas I a III de NFT de Braak. Los 12 mer inmunorreactivo a 1A9 y 2C3 ya estaban presentes en la corteza entorrinal de individuos sanos en las etapas I a II de NFT de Braak, y aumentaron con el avance de la etapa de NFT de Braak. Se encontró que el 12 mer era significativamente mayor en EA. Por lo tanto, se demostró que la aparición de 12 mer inmunorreactivo a 1A9 y 2C3 precede a la aparición de deterioro cognitivo en el cerebro humano. Por otro lado, mediante técnicas bioquímicas e inmunohistoquímicas, se demostró que las placas seniles contienen oligómeros de A $\beta$  inmunorreactivos a 1A9 y 2C3. Además, se reveló que las propias fibrillas amiloides insolubilizadas tienen una actividad de neutralización de la neurotoxicidad. Estos hallazgos sugieren que, bajo condiciones en las que los oligómeros de A $\beta$  están presentes sin formación de placa senil, los oligómeros de A $\beta$  ejercen toxicidad *in vivo* y por lo tanto pueden ser una causa de alteración de la memoria.

Como se describió anteriormente, los datos de los presentes inventores muestran por primera vez pruebas que demuestran directamente *in vivo* la perturbación de la memoria resultante de la disfunción sináptica causada por oligómeros de A $\beta$  endógenos. Aunque se ha utilizado anteriormente inmunoterapia activa (Janus D, 2000, Nature, Morgan D, 2000, Nature) e inmunoterapia pasiva (Bard F, 2222, Nat med; DeMattos RB, PNAS, 2001), el mecanismo mediante el cual la discapacidad de aprendizaje y la perturbación de memoria puede ser prevenido sigue siendo materia de conjetura. Una posibilidad ampliamente propuesta es que los anticuerpos llegan al cerebro a través de la barrera hematoencefálica y neutralizan directamente *in vivo* los oligómeros solubles de A $\beta$  que causan deterioro de la memoria. La segunda posibilidad, la "teoría del sumidero", es que los anticuerpos actúan

periféricamente para agotar la combinación de A $\beta$  en sangre periférica y por lo tanto la eliminación de A $\beta$  activo del cerebro. DeMattos y colaboradores han informado que un anticuerpo anti-A $\beta$  administrado periféricamente transporta rápidamente no sólo monómeros de A $\beta$  al cerebro sino también dímeros A $\beta$  en plasma, y también A $\beta$  al cerebro en LCR (DeMattos RB y colaboradores, PNAS, 98: 8850-8855, 2001). Los presentes inventores también revelaron que los oligómeros de A $\beta$  están presentes en el LCR humano y aumentaron en pacientes con EA. Por lo tanto, los presentes inventores demostraron que los oligómeros de A $\beta$  pueden ser usados como marcadores de diagnóstico para EA. Además, los presentes inventores presentaron la primera evidencia que soporta la opinión de que los oligómeros de A $\beta$  están presentes en el plasma de ratones Tg2576 y, en inmunoterapia pasiva mediante la cual oligómeros de A $\beta$  son específicamente capturados y neutralizados mediante inyección intravenosa, no se requiere suministro de anticuerpo intracerebrales y se puede mejorar la eliminación de oligómeros de A $\beta$  del cerebro a la sangre en los sitios periféricos de acción, es decir, los vasos sanguíneos. En adición, los presentes inventores presentaron la primera evidencia de que la inmunoterapia pasiva puede suprimir la formación de placa amiloide senil e indirectamente suprimir el daño de las células nerviosas (formación de neuritas distróficas hinchadas) a través de la supresión de placa amiloide senil. Estos resultados confirman que el oligómero de A $\beta$  es la base molecular para el inicio de la enfermedad de Alzheimer y el control selectivo utilizando anticuerpos específicos de oligómeros permite el control de la enfermedad de Alzheimer desde un punto de vista profiláctico además de un punto de vista terapéutico. Además, se probó que una fracción de los anticuerpos administrados se traslada al cerebro. Esto sugiere que el efecto de suprimir la perturbación de la memoria se ejerce mediante una combinación de múltiples acciones tales como la neutralización directa de los oligómeros de A $\beta$  solubles en el cerebro, el transporte de los complejos inmunes anticuerpo-oligómero de A $\beta$  en sangre mediante el receptor neonatal Fc (Deane R, J Neurosci), y la acción de "sumidero" descrita anteriormente,

El establecimiento de un diagnóstico preciso previo al inicio para identificar casos con alto riesgo de desarrollo de EA es esencial para diseñar estrategias preventivas/terapéuticas. Se espera que el aumento significativo en la relación de O/M en LCR en la EA, que se reporta en el presente documento, sea uno de los principales candidatos para los marcadores diagnósticos previos al inicio.

#### Aplicabilidad Industrial

Los anticuerpos proporcionados por la presente invención pueden ser usados, por ejemplo, en inmunoterapia pasiva preventiva basada en inyección intravenosa para la enfermedad de Alzheimer, y como marcadores biológicos para el diagnóstico previo al inicio, control de la enfermedad, control/evaluación de la eficacia del fármaco para la enfermedad, etc.

Además, se espera que los anticuerpos de la presente invención contribuyan en gran medida al establecimiento de métodos preventivos/terapéuticos para la enfermedad de Alzheimer que sean selectivos a las moléculas responsables de evocar las condiciones patológicas de la enfermedad y al establecimiento de marcadores diagnósticos tempranos. Los presentes inventores obtuvieron evidencias que apoyan que las terapias de anticuerpos, incluso cuando se dirigen a condiciones patológicas intracerebrales, pueden ser logradas satisfactorias mediante la administración intravenosa periférica, sin necesidad de considerar la transferencia intracerebral de los anticuerpos. Además, los presentes inventores obtuvieron evidencia que demuestra que una fracción de los anticuerpos administrados se trasladan al cerebro y producen un efecto directo incluso en la terapia de administración intravenosa periférica, de nuevo sin necesidad de considerar transferencia intracerebral de los anticuerpos. Por lo tanto, se espera que la presente invención acelere rápidamente el avance de los agentes terapéuticos de anticuerpos para la enfermedad de Alzheimer.

#### Listado de secuencias

<110> IMMUNAS PHARMA, ICN.

<120> ANTICUERPO CAPAZ DE UNIRSE ESPECÍFICAMENTE A UN OLIGÓMERO DE AB, Y SU USO

45 <130> M7-X0801Y1P

<140> PCT/JP2009/052039

<141> 2009-02-06

<150> JP 2008-28386

<151> 2008-02-08

50 <150> US 61/085,545

<151> 2008-08-01

<150> JP 2008-201058

<151> 2008-08-04

<160> 120

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 452

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

```

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

```

Val Asp Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro  
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu  
 225 230 235 240

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

Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 260 265 270

Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu  
 275 280 285

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr  
 290 300

Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser  
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro  
 325 330 335

Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln  
 340 345 350

Val Tyr Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val  
 355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val  
 370 375 380

Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala  
 385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn  
 405 410 415

Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val  
 420 425 430

Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg  
 435 440 445

Ser Pro Gly Lys  
 450

<210> 2

<211> 1359

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

ES 2 617 604 T3

<400> 2

gatgtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ttagtgcagc	ctggagggtc	ccggaaactc	60
tcctgtgcaa	cctctggatt	cactttcagt	agctttggaa	tgactgggt	tcgtcaggct	120
ccagagaagg	gactggagtg	ggtcgcatac	attagtagtg	gcagtagtgc	catctactat	180
gcagacacag	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	atcccaagaa	caccctgttc	240
ctgcaaatga	ccagtctaag	gtctgaggac	acggccatgt	attactgtgc	aagatctggg	300
gatactatgg	actactgggg	tcaaggaacc	tcagtcaccg	tctcctcagc	caaaacaaca	360
ccccatcag	tctatccact	ggcccctggg	tgtggagata	caactggttc	ctccgtgact	420
ctgggatgcc	tggtcaaggg	ctacttccct	gagtcagtga	ctgtgacttg	gaactctgga	480
tccctgtcca	gcagtgtgca	caccttccca	gctctcctgc	agtctggact	ctacactatg	540
agcagctcag	tgactgtccc	ctccagcacc	tggccaagtc	agaccgtcac	ctgcagcggt	600
gctcaccag	ccagcagcac	cacggtggac	aaaaaacttg	agcccagcgg	gcccatttca	660
acaatcaacc	cctgtcctcc	atgcaaggag	tgtcacaat	gccagctcc	taacctcgag	720
ggtggaccat	ccgtcttcat	cttccctcca	aatatcaagg	atgtactcat	gatctccctg	780
acaccaagg	tcacgtgtgt	ggtggtggat	gtgagcgagg	atgaccaga	cgtccagatc	840
agctggtttg	tgaacaacgt	ggaagtacac	acagctcaga	cacaaacca	tagagaggat	900
tacaacagta	ctatccgggt	ggtcagcacc	ctccccatcc	agcaccagga	ctggatgagt	960
ggcaaggagt	tcaaatgcaa	ggtcaacaac	aaagacctcc	catcacccat	cgagagaacc	1020
atctcaaaaa	ttaaagggct	agtcagagct	ccacaagtat	acatcttgcc	gccaccagca	1080
gagcagttgt	ccaggaaaga	tgtcagtctc	acttgcttg	tcgtgggctt	caaccctgga	1140
gacatcagtg	tggagtggac	cagcaatggg	catacagagg	agaactacaa	ggacaccgca	1200
ccagtcctgg	actctgacgg	ttcttacttc	atatatagca	agctcaatat	gaaaacaagc	1260
aagtgggaga	aaacagattc	cttctcatgc	aacgtgagac	acgagggctt	gaaaaattac	1320
tacctgaaga	agaccatctc	ccggtctccg	ggtaaataga			1359

<210> 3

5 <211> 219

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

ES 2 617 604 T3

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Val  
 85 90 95  
 Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 115 120 125  
 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140  
 Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
 145 150 155 160  
 Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175  
 Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu  
 180 185 190  
 Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
 195 200 205  
 Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 210 215

<210> 4

<211> 660

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 4

ES 2 617 604 T3

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60  
atctcttgca gatctagtca gaacattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120  
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180  
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc 240  
agcagcgtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagtttc acatgttcct 300  
ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacggg ctgatgctgc accaactgta 360  
tccatcttcc caccatccag tgagcagtta acatctggag gtgcctcagt cgtgtgcttc 420  
ttgaacaact tctaccccaa agacatcaat gtcaagtgga agattgatgg cagtgaacga 480  
caaatggcg tcctgaacag ttggactgat caggacagca aagacagcac ctacagcatg 540  
agcagtacc tcacgttgac caaggacgag tatgaacgac ataacagcta tacctgtgag 600  
gccactcaca agacatcaac ttcaccatt gtcaagagct tcaacaggaa tgagtgttag 660

<210> 5

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 5

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

<210> 6

10 <211> 348

<212> ADN

ES 2 617 604 T3

<213> Mus musculus

<400> 6

```

gatgtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggaggggc ccggaactc      60
tcctgtgcaa cctctggatt cactttcagt agctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct      120
ccagagaagg gactggagtg ggtcgcatac attagtagtg gcagtagtgc catctactat      180
gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atccaagaa caccctgttc      240
ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aagatctggg      300
gatactatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcctca                      348

```

<210> 7

5 <211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

```

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

```

10 <210> 8

<211> 336

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 8

ES 2 617 604 T3

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60  
atctcttgca gatctagtca gaacattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120  
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180  
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240  
agcagcgtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagtttc acatgttcct 300  
ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336  
<210> 9  
<211> 5  
<212> PRT  
5 <213> Mus musculus  
<400> 9  
Ser Phe Gly Met His  
1 5  
<210> 10  
<211> 15  
10 <212> ADN  
<213> Mus musculus  
<400> 10  
agcttggaa tgcac 15  
<210> 11  
15 <211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 11  
Tyr Ile ser Ser Gly ser Ser Ala Ile Tyr  
1 5 10  
20 <210> 12  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Mus musculus  
<400> 12  
25 tacattagta gtggcagtag tgccatctac 30  
<210> 13  
<211> 7  
<212> PRT  
30 <213> Mus musculus

ES 2 617 604 T3

<400> 13  
 Ser Gly Asp Thr Met Asp Tyr  
 1 5

<210> 14  
 <211> 21  
 5 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <400> 14  
 tctggggata ctatggacta c 21  
 <210> 15  
 10 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 15  
 Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu  
 1 5 10 15

15 <210> 16  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <400> 16  
 20 agatctagtc agaacattgt acatagtaat ggaaacacct atttagaa 48  
 <210> 17  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

25 <400> 17  
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5

<210> 18  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 30 <213> Mus musculus  
 <400> 18  
 aaagttcca accgatttc t 21  
 <210> 19  
 <211> 9  
 35 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Phe Gln Val Ser His Val Pro Pro Thr  
 1 5

<210> 20

5 <211> 27

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 20

tttcaagttt cacatgttcc tccgacg 27

10 <210> 21

<211> 455

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

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

15

ES 2 617 604 T3

Gly 145 Cys Leu Val Lys 150 Gly 150 Tyr Phe Pro Glu 155 Ser Val Thr Val Thr Trp 160  
 Asn Ser Gly Ser 165 Leu Ser Ser Ser Val His 170 Thr Phe Pro Ala Leu 175 Leu  
 Gln Ser Gly 180 Leu Tyr Thr Met Ser 185 Ser Val Thr Val Pro 190 Ser Ser  
 Thr Trp Pro 195 Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His 205 Pro Ala Ser  
 Ser Thr 210 Thr Val Asp Lys 215 Lys Leu Glu Pro Ser Gly 220 Pro Ile Ser Thr  
 Ile 225 Asn Pro Cys Pro 230 Pro Cys Lys Glu Cys His 235 Lys Cys Pro Ala Pro 240  
 Asn Leu Glu Gly 245 Gly Pro Ser Val Phe Ile 250 Phe Pro Pro Asn Ile 255 Lys  
 Asp Val 260 Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro 265 Lys Val Thr Cys Val 270 Val Val  
 Asp Val 275 Ser Glu Asp Asp Pro Asp 280 Val Gln Ile Ser Trp 285 Phe Val Asn  
 Asn Val 290 Glu Val His Thr Ala 295 Gln Thr Gln Thr His 300 Arg Glu Asp Tyr  
 Asn 305 Ser Thr Ile Arg Val 310 Val Ser Thr Leu Pro 315 Ile Gln His Gln Asp 320  
 Trp Met Ser Gly 325 Lys Glu Phe Lys Cys Lys 330 Val Asn Asn Lys Asp 335 Leu  
 Pro Ser Pro 340 Ile Glu Arg Thr Ile Ser 345 Lys Ile Lys Gly Leu 350 Val Arg  
 Ala Pro 355 Gln Val Tyr Ile Leu Pro 360 Pro Pro Ala Glu Gln 365 Leu Ser Arg  
 Lys Asp 370 Val Ser Leu Thr Cys 375 Leu Val Val Gly Phe 380 Asn Pro Gly Asp  
 Ile 385 Ser Val Glu Trp Thr Ser 390 Asn Gly His Thr 395 Thr Glu Glu Asn Tyr Lys 400  
 Asp Thr Ala Pro 405 Val Leu Asp Ser Asp Gly 410 Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser 415  
 Lys Leu Asn Met 420 Lys Thr Ser Lys Trp 425 Glu Lys Thr Asp Ser 430 Phe Ser  
 Cys Asn Val 435 Arg His Glu Gly Leu 440 Lys Asn Tyr Tyr Leu 445 Lys Lys Thr  
 Ile Ser 450 Arg Ser Pro Gly Lys 455

ES 2 617 604 T3

<210> 22  
 <211> 1368  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

5 <400> 22

```

caggttactc tgaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg      60
acttgttctt tctctggatt ttcactgacc acttctgcta tgggtgtgag ctgggttcgt      120
cagccttcaa gaaaggtct ggagtggctg gcacacattt actgggatga tgacaagcgc      180
tataacccat ccctgaagag cgggctcaca atctccaagg atacctccag caaccaggta      240
ttcctcaaga tcaccagtgt ggacactgca gatactgcca catactactg tgctcgaaag      300
ggactgggag gtgctatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctcagcc      360
aaaacaacac ccccatcagt ctatccactg gccctgggt gtggagatac aactggttcc      420
tccgtgactc tgggatgcct ggtcaagggc tacttccctg agtcagtgac tgtgacttgg      480
aactctggat ccctgtccag cagtgtgcac accttcccag ctctcctgca gtctggactc      540
tacactatga gcagctcagt gactgtcccc tccagcacct ggccaagtca gaccgtcacc      600
tgcagcgttg ctaccccagc cagcagcacc acggtggaca aaaaacttga gcccagcggg      660
cccatttcaa caatcaacc ctgtcctcca tgcaaggagt gtcacaaatg cccagctcct      720
aacctcgagg gtggaccatc cgtcttcac ttcctccaa atatcaagga tgtactcatg      780
atctccctga cacccaaggt cacgtgtgtg gtggtggatg tgagcgagga tgaccagac      840
gtccagatca gctggtttgt gaacaacgtg gaagtacaca cagctcagac acaaacccat      900
agagaggatt acaacagtac tatccgggtg gtcagcacc tccccatcca gcaccaggac      960
tggatgagtg gcaaggagt caaatgcaag gtcaacaaca aagacctccc atcaccatc     1020
gagagaacca tctcaaaaat taaagggcta gtcagagctc cacaagtata catcttgccg     1080
ccaccagcag agcagttgtc caggaaagat gtcagtctca cttgcctggg cgtgggcttc     1140
aacctggag acatcagtgt ggagtggacc agcaatgggc atacagagga gaactacaag     1200
gacaccgcac cagtcctgga ctctgacggt tcttacttca tatatagcaa gctcaatatg     1260
aaaacaagca agtgggagaa aacagattcc ttctcatgca acgtgagaca cgagggctctg     1320
aaaattact acctgaagaa gaccatctcc cggctctccg gtaaatga                       1368
    
```

<210> 23  
 <211> 219  
 10 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 23

ES 2 617 604 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
 85 90 95  
 Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105 110  
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 115 120 125  
 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140  
 Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
 145 150 155 160  
 Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175  
 Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu  
 180 185 190  
 Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
 195 200 205  
 Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 210 215

<210> 24

<211> 660

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 24

ES 2 617 604 T3

gatgttgga tgacccaaac tccgctctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc 60  
atctcttgca gatctagtca gaggcttcta cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg 120  
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180  
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240  
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatggtccg 300  
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaacggg ctgatgctgc accaactgta 360  
tccatcttcc caccatccag tgagcagtta acatctggag gtgcctcagt cgtgtgcttc 420  
ttgaacaact tctaccccaa agacatcaat gtcaagtgga agattgatgg cagtgaacga 480  
caaaatggcg tcctgaacag ttggactgat caggacagca aagacagcac ctacagcatg 540  
agcagtacc tcacgttgac caaggacgag tatgaacgac ataacagcta tacctgtgag 600  
gccactcaca agacatcaac ttcaccatt gtcaagagct tcaacaggaa tgagtgttag 660

<210> 25

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 25

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

<210> 26

10 <211> 357

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 26

```

caggttactc tgaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg      60
acttgttctt tctctggatt ttcactgacc acttctgcta tgggtgtgag ctgggttcgt      120
cagccttcaa gaaaggtct ggagtggctg gcacacattt actgggatga tgacaagcgc      180
tataacccat ccctgaagag cgggctcaca atctccaagg atacctccag caaccaggta      240
ttcctcaaga tcaccagtgt ggacactgca gatactgcca catactactg tgctcgaaag      300
ggactgggag gtgctatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctca      357
    
```

5 <210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

```

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

<210> 28

<211> 336

<212> ADN

<213> Mus musculus

15 <400> 28

```

gatgtttgtga tgacccaac tccgctctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc      60
atctcttgca gatctagtca gagccttcta cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg      120
    
```

ES 2 617 604 T3

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180  
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240  
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttccg 300  
 ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 29

Thr Ser Ala Met Gly Val Ser  
1 5

<210> 30

<211> 21

10 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 30

acttctgcta tgggtgtgag c 21

<210> 31

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg  
1 5

20 <210> 32

<211> 27

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 32

25 cacatttact gggatgatga caagcgc 27

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

30 <400> 33

Lys Gly Leu Gly Gly Ala Met Asp Tyr  
1 5

<210> 34  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 5 <400> 34  
 aagggactgg gaggtgctat ggactac 27  
 <210> 35  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 10 <213> Mus musculus  
 <400> 35  
 .....  
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His  
 1 5 10 15  
 <210> 36  
 <211> 48  
 15 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <400> 36  
 agatctagtc agagcctct acacagtaat ggaaacacct attacat 48  
 <210> 37  
 20 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 37  
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5  
 25 <210> 38  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <400> 38  
 30 aaagttcca accgatttc t 21  
 <210> 39  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 35 <400> 39

ES 2 617 604 T3

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr  
 1 5

<210> 40

<211> 27

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 40

tctcaaagta cacatgttcc gctcacg 27

<210> 41

<211> 447

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 41

Gln Val Thr Leu Lys Asp Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20 25 30

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser



Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro  
 340 345 350  
 Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met  
 355 360 365  
 Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn  
 370 375 380  
 Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser  
 385 390 395 400  
 Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn  
 405 410 415  
 Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys ser Val Val His Glu Gly Leu  
 420 425 430  
 His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 42

<211> 1344

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 42

ES 2 617 604 T3

caggttactc tgaagactc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg 60  
acttgttctt tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtgag ctggattcgt 120  
cagccttcag gaaagggctt ggagtggctg gcacacattt actgggatga tgacaagcgc 180  
tataacccat ccctgaagag ccggctcaca atctccaagg atacctccag caaccaggta 240  
ttcctcaaga tcaccagtgt ggacactgca gattctgcca catactactg ttccactatg 300  
attacggggg ttgtttactg gggccaaggg actctgggtca ctgtctctgc agccaaaaca 360  
acagcccat cggtctatcc cctggcccct gtgtgtggag atacaactgg ctcctcgggtg 420  
gctctaggat gcctgggtcaa gggttatttc cctgagccag tgacctgac ctggaactct 480  
ggatcccctgt ccagtgggtgt gcacaccttc ccagctgtcc tgcagtctga cctctacacc 540  
ctcagcagct cagtgactgt aacctcgagc acctggccca gccagtccat cacctgcaat 600  
gtggcccacc cggcaagcag caccaaggtg gacaagaaaa ttgagcccag agggcccaca 660  
atcaagccct gtcctccatg caaatgccca gcacctaacc tcttgggtgg accatccgtc 720  
ttcatcttcc ctcaaagat caaggatgta ctcatgatct ccctgagccc catagtcaca 780  
tgtgtgggtg tggatgtgag cgaggatgac ccagatgtcc agatcagctg gtttgtgaac 840  
aacgtggaag tacacacagc tcagacacaa acctatagag aggattacaa cagtactctc 900  
cgggtgggtca gtgccctccc catccagcac caggactgga tgagtggcaa ggagttcaaa 960  
tgcaaggtca acaacaaaga cctcccagcg cccatcgaga gaaccatctc aaaacccaaa 1020

.....

gggtcagtaa gagctccaca ggtatatgtc ttgcctccac cagaagaaga gatgactaag 1080  
aacagggtca ctctgacctg catggtcaca gacttcatgc ctgaagacat ttacgtggag 1140  
tggaccaaca acgggaaaac agagctaac tacaagaaca ctgaaccagt cctggactct 1200  
gatggttctt acttcatgta cagcaagctg agagtggaaa agaagaactg ggtggaaaga 1260  
aatagctact cctgttcagt ggtccacgag ggtctgcaca atcaccacac gactaagagc 1320  
ttctcccgga ctccgggtaa atga 1344

<210> 43

<211> 219

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 43

ES 2 617 604 T3

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95  
 Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105 110  
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 115 120 125  
 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140  
 Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
 145 150 155 160  
 Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175  
 Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu  
 180 185 190  
 Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
 195 200 205  
 Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 210 215

ES 2 617 604 T3

<211> 660

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 44

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60  
atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120  
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180  
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240  
agtagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttccg 300  
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaacggg ctgatgctgc accaactgta 360  
tccatcttcc caccatccag tgagcagtta acatctggag gtgcctcagt cgtgtgcttc 420  
ttgaacaact tctaccccaa agacatcaat gtcaagtgga agattgatgg cagtgaacga 480  
caaaatggcg tcctgaacag ttggactgat caggacagca aagacagcac ctacagcatg 540  
agcagtaccc tcacgttgac caaggacgag tatgaacgac ataacagcta tacctgtgag 600  
5 gccactcaca agacatcaac ttcaccatt gtcaagagct tcaacaggaa tgagtgttag 660

<210> 45

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

10 <400> 45

ES 2 617 604 T3

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

<210> 46

5 <211> 351

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 46

caggttactc tgaagactc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg 60  
 acttgttctt tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtgag ctggattcgt 120  
 cagccttcag gaaaggtct ggagtggctg gcacacattt actgggatga tgacaagcgc 180  
 tataaccat ccctgaagag ccggctcaca atctccaagg atacctccag caaccaggta 240  
 ttctcaaga tcaccagtgt ggacactgca gattctgcca catactactg ttccactatg 300  
 attacggggt ttgtttactg gggccaaggg actctgggtca ctgtctctgc a 351

10 <210> 47

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 47

ES 2 617 604 T3

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

<210> 48

<211> 336

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 48

gatgttttga tgacccaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc 60  
 atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120  
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180  
 tctgggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcagggga cagatttcac actcaagatc 240  
 agtagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttccg 300  
 ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 49

10 <211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 49

Thr Ser Gly Met Gly Val Ser  
 1 5

ES 2 617 604 T3

<210> 50  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Mus musculus  
5 <400> 50  
actctggta tgggtgag c 21  
<210> 51  
<211> 9  
<212> PRT  
10 <213> Mus musculus  
<400> 51  
His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg  
1 5  
<210> 52  
<211> 27  
15 <212> ADN  
<213> Mus musculus  
<400> 52  
cacatttact gggatgatga caagcgc 27  
<210> 53  
20 <211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 53  
Met Ile Thr Gly phe Val Tyr  
1 5  
25 <210> 54  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Mus musculus  
<400> 54  
30 atgattacgg ggtttgtta c 21  
<210> 55  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
35 <400> 55

ES 2 617 604 T3

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu  
 1 5 10 15

<210> 56

<211> 48

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 56

agatctagtc agagcattgt acatagtaat ggaaacacct attagaa 48

<210> 57

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 57

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5

15 <210> 58

<211> 21

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 58

20 aaagttcca accgatttc t 21

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

25 <400> 59

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr  
 1 5

<210> 60

<211> 27

<212> ADN

30 <213> Mus musculus

<400> 60

ttcaagggt cacatgttc gctcag 27

<210> 61

<211> 445

35 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 61

ES 2 617 604 T3

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
 20 25 30  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Gly Thr Gly Thr Arg Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro  
 115 120 125  
 Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Ala Leu Gly Cys Leu Val  
 130 135 140  
 Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser  
 145 150 155 160  
 Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu  
 165 170 175  
 Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser  
 180 185 190  
 Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val  
 195 200 205  
 Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro  
 210 215 220  
 Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile  
 225 230 235 240  
 Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile  
 245 250 255  
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln  
 260 265 270  
 Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln

ES 2 617 604 T3

275 280 285

Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu  
 290 295 300

Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys  
 305 310 315 320

Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys  
 325 330 335

Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro  
 340 345 350

Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr  
 355 360 365

Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys  
 370 375 380

Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 385 390 395 400

Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val  
 405 410 415

Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn  
 420 425 430

His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 62

<211> 1338

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 62



ES 2 617 604 T3

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95  
 Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 115 120 125  
 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe  
 130 135  
 Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
 145 150 155 160  
 Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175  
 Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu  
 180 185 190  
 Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
 195 200 205  
 Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 210 215

ES 2 617 604 T3

<210> 64

<211> 660

<212> ADN

<213> Mus musculus

5 <400> 64

```

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc      60
atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg      120
tacctgcaga aaccaggcca gtctcctaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt      180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc      240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttcct      300
ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacggg ctgatgctgc accaactgta      360
tccatcttcc caccatccag tgagcagtta acatctggag gtgcctcagt cgtgtgcttc      420
ttgaacaact tctaccccaa agacatcaat gtcaagtgga agattgatgg cagtgaacga      480
caaaatggcg tcctgaacag ttggactgat caggacagca aagacagcac ctacagcatg      540
agcagtaccc tcacgttgac caaggacgag tatgaacgac ataacagcta tacctgtgag      600
gccactcaca agacatcaac ttcaccatt gtcaagagct tcaacaggaa tgagtgttag      660

```

<210> 65

<211> 115

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 65

```

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1           5           10
Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
          20           25           30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45

```

ES 2 617 604 T3

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Gly Thr Gly Thr Arg Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ala  
 115

<210> 66

<211> 345

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 66

gatgtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgcagc ctggaggggc ccggaactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct 120  
 ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac attagtagtg gcagtagtac catctactat 180  
 gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atccaagaa caccctgttc 240  
 ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc cgggactggg 300  
 acgagagctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345

<210> 67

<211> 112

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 67

ES 2 617 604 T3

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

<210> 68

<211> 336

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 68

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60  
 atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120  
 tacctgcaga aaccaggcca gtctcctaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180  
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240  
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttcct 300  
 ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 69

10 <211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 69

Ser Phe Gly Met His  
 1 5

15 <210> 70

ES 2 617 604 T3

<211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <400> 70  
 5 agcttggaa tgcac 15  
 <210> 71  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 10 <400> 71  
 Tyr Ile ser ser Gly Ser ser Thr Ile Tyr  
 1 5 10  
 <210> 72  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 15 <213> Mus musculus  
 <400> 72  
 tacattagta gtggcagtag taccatctac 30  
 <210> 73  
 <211> 6  
 20 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 73  
 Thr Gly Thr Arg Ala Tyr  
 1 5  
 <210> 74  
 25 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <400> 74  
 actgggacga gagcttac 18  
 30 <210> 75  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 75  
 35 Arg ser ser Gln Ser Ile val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu  
 1 5 10 15

ES 2 617 604 T3

<210> 76  
<211> 48  
<212> ADN  
<213> Mus musculus  
5 <400> 76  
agatctagtc agagcattgt acatagtaat ggaaacacct atttagaa 48  
<210> 77  
<211> 7  
<212> PRT  
10 <213> Mus musculus  
<400> 77  
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
1 5  
<210> 78  
<211> 21  
15 <212> ADN  
<213> Mus musculus  
<400> 78  
aaagttcca accgatttc t 21  
<210> 79  
20 <211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 79  
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr  
1 5  
25 <210> 80  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Mus musculus  
<400> 80  
30 ttcaagggt cacatgttcc tccgacg 27  
<210> 81  
<211> 442  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
35 <400> 81

ES 2 617 604 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met His Trp Val Lys Leu Arg Pro Gly Gln Gly Phe Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Glu Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Asn Asn Glu Asn Phe  
 50 55 60  
 Lys Arg Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Asp Gly Asn Tyr Asp Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro  
 115 120 125  
 Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly  
 130 135 140  
 Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175  
 Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr  
 180 185 190  
 Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser  
 195 200 205  
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro  
 210 215 220

ES 2 617 604 T3

Cys 225 Ile Cys Thr Val Pro 230 Glu Val Ser Ser Val 235 Phe Ile Phe Pro 240  
 Lys Pro Lys Asp Val 245 Leu Thr Ile Thr Leu 250 Thr Pro Lys Val Thr 255 Cys  
 Val Val Val Asp 260 Ile Ser Lys Asp Asp 265 Pro Glu Val Gln Phe 270 Ser Trp  
 Phe Val Asp 275 Asp Val Glu Val His 280 Thr Ala Gln Thr Gln 285 Pro Arg Glu  
 Glu Gln 290 Phe Asn Ser Thr Phe 295 Arg Ser Val Ser Glu 300 Leu Pro Ile Met  
 His 305 Gln Asp Trp Leu Asn 310 Gly Lys Glu Phe 315 Lys Cys Arg Val Asn 320 Ser  
 Ala Ala Phe Pro Ala 325 Pro Ile Glu Lys Thr 330 Ile Ser Lys Thr Lys 335 Gly  
 Arg Pro Lys Ala 340 Pro Gln Val Tyr Thr 345 Ile Pro Pro Pro Lys 350 Glu Gln  
 Met Ala Lys 355 Asp Lys Val Ser Leu 360 Thr Cys Met Ile Thr 365 Asp Phe Phe  
 Pro Glu 370 Asp Ile Thr Val Glu 375 Trp Gln Trp Asn Gly 380 Gln Pro Ala Glu  
 Asn 385 Tyr Lys Asn Thr Gln 390 Pro Ile Met Asp Thr 395 Asp Gly Ser Tyr Phe 400  
 Val Tyr Ser Lys Leu 405 Asn Val Gln Lys Ser 410 Asn Trp Glu Ala Gly 415 Asn  
 Thr Phe Thr Cys 420 Ser Val Leu His Glu 425 Gly Leu Leu Asn Leu 430 His Thr  
 Glu Lys Ser 435 Leu Ser Leu Ser Pro 440 Gly Lys

ES 2 617 604 T3

<210> 82  
 <211> 1329  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

5 <400> 82

caggtccaac	tccagcagcc	tggggctgaa	ctggtgaagc	ctggggcttc	agtgaagttg	60
tcctgcaagg	cttctggcta	caccttcacc	agctactgga	tgcactgggt	gaagctgagg	120
cctggacaag	gctttgagtg	gattggagag	attaatccta	gaaatggtgg	tactaacaac	180
aatgagaact	tcaagagaaa	ggccacactg	actgtagaca	aatcctccag	cacagcctac	240
.....						
atgcaactca	gcagcctgac	atctgaggac	tctgcggtct	attactgtac	aagagatggt	300
aactacgacc	cctttgctta	ctggggccaa	gggactctgg	tcactgtctc	tgcagccaaa	360
acgacacccc	catctgtcta	tccactggcc	cctggatctg	ctgcccacaa	taactccatg	420
gtgaccctgg	gatgcctggt	caagggctat	ttccctgagc	cagtgacagt	gacctggaac	480
tctggatccc	tgtccagcgg	tgtgcacacc	ttcccagctg	tcctgcagtc	tgacctctac	540
actctgagca	gctcagtgac	tgtcccctcc	agcacctggc	ccagcgagac	cgtcacctgc	600
aacgttgccc	accggccag	cagcaccaag	gtggacaaga	aaattgtgcc	cagggattgt	660
ggttgtaagc	cttgcataatg	tacagtcca	gaagtatcat	ctgtcttcat	cttccccca	720
aagcccaagg	atgtgctcac	cattactctg	actcctaagg	tcacgtgtgt	tgtggtagac	780
atcagcaagg	atgatcccga	ggtccagttc	agctggtttg	tagatgatgt	ggaggtgcac	840
acagctcaga	cgcaacccccg	ggaggagcag	ttcaacagca	ctttccgctc	agtcagtgaa	900
cttcccatca	tgcaccagga	ctggctcaat	ggcaaggagt	tcaaatgcag	ggtcaacagt	960
gcagctttcc	ctgcccccat	cgagaaaacc	atctccaaaa	ccaaaggcag	accgaaggct	1020
ccacaggtgt	acaccattcc	acctcccaag	gagcagatgg	ccaaggataa	agtcagtctg	1080
acctgcatga	taacagactt	cttccctgaa	gacattactg	tggagtggca	gtggaatggg	1140
cagccagcgg	agaactacaa	gaacactcag	cccatcatgg	acacagatgg	ctcttacttc	1200
gtttacagca	agctcaatgt	gcagaagagc	aactgggagg	caggaaatac	tttcacctgc	1260
tctgtgttac	atgagggcct	gctcaacctc	catactgaga	agagcctctc	cctctctcct	1320
ggtaaataga						1329

<210> 83  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

10

ES 2 617 604 T3

<400> 83

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
 85 90 95

Thr His Val Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
                   100                                  105                                  110  
  
 Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser  
                   115                                  120                                  125  
  
 Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn  
           130                                  135                                  140  
  
 Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu  
   145                                  150                                  155                                  160  
  
 Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp  
                   165                                  170                                  175  
  
 Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr  
           180                                  185                                  190  
  
 Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr  
                   195                                  200                                  205  
  
 Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
   210                                  215                                  220

<210> 84

<211> 663

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 84

ES 2 617 604 T3

gatgttgtga tgaccctaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60  
atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg 120  
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagtffc caaccgattt 180  
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240  
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcct 300  
ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaac gggctgatgc tgcaccaact 360  
gtatccatct tcccaccatc cagtgagcag ttaacatctg gaggtgcctc agtcgtgtgc 420  
ttcttgaaca atttctacc caaagacatc aatgtcaagt ggaagattga tggcagtgaa 480  
cgacaaaatg gcgtcctgaa cagttggact gatcaggaca gcaaagacag cacctacagc 540  
atgagcagta ccctcacgtt gaccaaggac gagtatgaac gacataacag ctatacctgt 600  
gaggccactc acaagacatc aacttcaccc attgtcaaga gcttcaacag gaatgagtgt 660  
tag 663

<210> 85

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 85

ES 2 617 604 T3

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

<210> 86

<211> 354

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 86

caggtccaac tccagcagcc tggggctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagttg 60  
 tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaagctgagg 120  
 cctggacaag gctttgagtg gattggagag attaatccta gaaatggtgg tactaacaac 180  
 aatgagaact tcaagagaaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240  
 atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtac aagagatggt 300  
 aactacgacc cctttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgca 354

<210> 87

<211> 113

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 617 604 T3

<400> 87

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

Lys

5

<210> 88

<211> 339

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 88

gatgtttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60  
 atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg 120  
 tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180  
 tctgggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240  
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcct 300  
 ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaa 339

10

<210> 89

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

15

<400> 89

ES 2 617 604 T3

Ser Tyr Trp Met His  
1 5

<210> 90

<211> 15

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 90

agctactgga tgcac 15

<210> 91

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 91

Glu Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn  
1 5 10

<210> 92

15 <211> 30

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 92

gagattaatc ctagaaatgg tggtaactac 30

20 <210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 93

25 Asp Gly Asn Tyr Asp Pro Phe Ala Tyr  
1 5

<210> 94

<211> 27

<212> ADN

<213> Mus musculus

30 <400> 94

gatgtaact acgaccctt tgcttac 27

<210> 95

<211> 16

<212> PRT

35 <213> Mus musculus

ES 2 617 604 T3

<400> 95  
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His  
 1 5 10 15  
 <210> 96  
 <211> 48  
 5 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <400> 96  
 agatctagtc agagcctgt acacagtaat ggaaacacct attacat 48  
 <210> 97  
 10 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 97  
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5  
 15 <210> 98  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <400> 98  
 20 aaagttcca accgatttc t 21  
 <210> 99  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 25 <400> 99  
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Tyr Thr  
 1 5 10  
 <210> 100  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 30 <213> Mus musculus  
 <400> 100  
 tctcaaagta cacatgttcc tccgtacacg 30  
 <210> 101  
 <211> 453  
 35 <212> PRT

ES 2 617 604 T3

<213> Mus musculus

<400> 101

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



ES 2 617 604 T3

Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser  
 435 440 445

Arg Ser Pro Gly Lys  
 450

<210> 102

<211> 1362

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 102

caggttactc tgaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg 60  
 acttgttctt tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtgag ctggattcgt 120  
 cagccttcag gagagggctt ggagtggctg gcacacattt actgggatga tgacaagcgc 180  
 tataacccat ccctgaagag ccggctcaca atctccaagg atacctccag aaaccaggta 240  
 ttctcaaga tcaccagtgt ggacactgca gatactgcca catactactg tggtcgatat 300  
 aggtacggct ttgcttactg gggccaaggg actctgggtca ctgtctctgc agccaaaaca 360  
 acacccccat cagtctatcc actggcccct ggggtgtggag atacaactgg ttcctccgtg 420  
 actctgggat gcctgggtcaa gggctacttc cctgagtcag tgactgtgac ttggaactct 480  
 ggatccctgt ccagcagtgt gcacaccttc ccagctctcc tgcagtctgg actctacact 540  
 atgagcagct cagtgactgt ccctccagc acctggccaa gtcagaccgt cacctgcagc 600  
 gttgctcacc cagccagcag caccacggtg gacaaaaaac ttgagcccag cgggcccatt 660  
 tcaacaatca acccctgtcc tccatgcaag gagtgtcaca aatgcccagc tcctaacctc 720  
 gaggggtggac catccgtctt catcttcctt ccaaatatca aggatgtact catgatctcc 780  
 ctgacacca aggtcacgtg tgtgggtggg gatgtgagcg aggatgacct agacgtccag 840  
 atcagctggg ttgtgaacaa cgtggaagta cacacagctc agacacaaac ccatagagag 900  
 gattacaaca gtactatccg ggtggtcagc accctcccca tccagcacca ggactggatg 960  
 agtggcaagg agttcaaag caagggtcaac aacaaagacc tcccatcacc catcgagaga 1020  
 accatctcaa aaattaaagg gctagtcaga gctccacaag tatacatctt gccgccacca 1080  
 gcagagcagt tgtccaggaa agatgtcagt ctcaactgcc tggtcgtggg ctcaaccct 1140  
 ggagacatca gtgtggagtg gaccagcaat gggcatacag aggagaacta caaggacacc 1200  
 gcaccagtcc tggactctga cggttcttac ttcatatata gcaagctcaa tatgaaaaca 1260  
 agcaagtggg agaaaacaga ttccttctca tgcaacgtga gacacgaggg tctgaaaaat 1320  
 tactacctga agaagaccat ctcccgtctt ccgggtaaat ga 1362

<210> 103

<211> 219

<212> PRT

<213> Mus musculus

5 <400> 103

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95  
 Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105 110  
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 115 120 125  
 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140  
 Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
 145 150 155 160  
 Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175  
 Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu  
 180 185 190  
 Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
 195 200 205  
 Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 210 215

ES 2 617 604 T3

<210> 104  
 <211> 660  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

5 <400> 104  
 gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60  
 atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120  
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180  
 tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240  
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttccg 300  
 ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaacggg ctgatgctgc accaactgta 360  
 tccatcttcc caccatccag tgagcagtta acatctggag gtgcctcagt cgtgtgcttc 420  
 ttgaacaact tctaccccaa agacatcaat gtcaagtgga agattgatgg cagtgaacga 480  
 caaaatggcg tcttgaacag ttggactgat caggacagca aagacagcac ctacagcatg 540  
 agcagtaccc tcacgttgac caaggacgag tatgaacgac ataacagcta tacctgtgag 600  
 gccactcaca agacatcaac ttcaccatt gtcaagagct tcaacaggaa tgagtgttag 660

<210> 105  
 <211> 116  
 10 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 105

ES 2 617 604 T3

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

<210> 106

<211> 348

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 106

caggttactc tgaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg 60  
 acttgttctt tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtgag ctggattcgt 120  
 cagccttcag gagagggctt ggagtggctg gcacacattt actgggatga tgacaagcgc 180  
 tataacccat ccctgaagag ccggctcaca atctccaagg atacctccag aaaccaggta 240  
 -----  
 ttctcaaga tcaccagtgt ggacactgca gatactgcca catactactg tggtcgatat 300  
 aggtacggct ttgcttactg gggccaaggg actctgggtca ctgtctct 348

<210> 107

10 <211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 617 604 T3

<400> 107

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

<210> 108

<211> 336

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 108

gatgttttga tgacccaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60  
 atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120  
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180  
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc 240  
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttccg 300  
 ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 109

10 <211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 109

ES 2 617 604 T3

Thr Ser Gly Met Gly Val Ser  
1 5

<210> 110

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 110

acttctggta tgggtgtgag c 21

<210> 111

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 111

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg  
1 5

<210> 112

15 <211> 27

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 112

cacatttact gggatgatga caagcgc 27

20 <210> 113

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 113

Tyr Arg Tyr Gly Phe Ala Tyr  
1 5

25

<210> 114

<211> 21

<212> ADN

<213> Mus musculus

30 <400> 114

tataggtacg gctttgctta c 21

<210> 115

<211> 16

<212> PRT

ES 2 617 604 T3

<213> Mus musculus  
 <400> 115  
 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu  
 1 5 10 15  
 <210> 116  
 5 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <400> 116  
 agatctagtc agagcattgt acatagtaat ggaaacacct attagaa 48  
 10 <210> 117  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 117  
 15 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5  
 <210> 118  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 20 <400> 118  
 aaagttcca accgatttc t 21  
 <210> 119  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 25 <213> Mus musculus  
 <400> 119  
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr  
 1 5  
 <210> 120  
 <211> 27  
 30 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <400> 120  
 ttcaagggt cacatgttcc gctcacg 27

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo que se une a un oligómero de A $\beta$  pero no a un monómero de A $\beta$ ,  
 en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal y se selecciona del grupo que consiste en:
- 5 (1) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 89 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 91 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 93 como CDR3 y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 97 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 99 como CDR3;
- 10 (2) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 85 como VH y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 87 como VL; y
- (3) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 81 y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.
- 15 3. Una composición que comprende el anticuerpo de la reivindicación 1 o 2 y un portador farmacéuticamente aceptable.
4. Un agente para uso en el tratamiento del deterioro cognitivo, que comprende al anticuerpo de la reivindicación 1 o 2 o la composición de la reivindicación 3 como ingrediente activo.
- 20 5. Un agente terapéutico para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que comprende el anticuerpo de la reivindicación 1 o 2 o la composición de la reivindicación 3 como ingrediente activo.
6. Un agente para uso en la supresión de la progresión de la enfermedad de Alzheimer, que comprende al anticuerpo de la reivindicación 1 o 2 o la composición de la reivindicación 3 como ingrediente activo.
7. Un agente para uso en la supresión de la formación de placa senil, que comprende al anticuerpo de la reivindicación 1 o 2 o la composición de la reivindicación 3 como ingrediente activo.
- 25 8. Un agente para uso en la supresión de la acumulación de A $\beta$ , que comprende al anticuerpo de la reivindicación 1 o 2 o la composición de la reivindicación 3 como ingrediente activo.
9. Un agente para uso en neutralización de neurotoxicidad, que comprende al anticuerpo de la reivindicación 1 o 2 o la composición de la reivindicación 3 como ingrediente activo.
- 30 10. Un agente para uso en la inhibición de la formación de fibrillas amiloides A $\beta$ , que comprende al anticuerpo de la reivindicación 1 o 2 o la composición de la reivindicación 3 como ingrediente activo.
11. Un agente para uso en la neutralización de la toxicidad sináptica, que comprende al anticuerpo de la reivindicación 1 o 2 o la composición de la reivindicación 3 como ingrediente activo.
12. Un método para detección de un oligómero de A $\beta$ , que comprende la etapa de detectar un oligómero de A $\beta$  contenido en una muestra recogida de un sujeto utilizando el anticuerpo de la reivindicación 1 o 2.
- 35 13. Un método para diagnosticar si un sujeto es o no un posible paciente de la enfermedad de Alzheimer, que comprende la etapa de (a0) siguiente:
- (a0) usando el anticuerpo de la reivindicación 1 o 2 para detectar un oligómero de A $\beta$  en una muestra recogida de un sujeto; o
- las etapas de (a1) a (c1) siguientes:
- 40 (a1) poner en contacto una muestra recogida de un sujeto con el anticuerpo de la reivindicación 1 o 2;
- (b1) medir la cantidad de oligómero de A $\beta$  en la muestra; y
- (c1) determinar que el sujeto es un posible paciente de la enfermedad de Alzheimer, cuando la cantidad medida en la etapa (b1) es mayor que aquella de un individuo sano; o
- las etapas de (a2) a (c2) siguientes:

(a2) poner en contacto una muestra recogida de un sujeto con el anticuerpo de la reivindicación 1 o 2 y un anticuerpo que se une a un monómero de A $\beta$ ;

(b2) medir la relación del oligómero de A $\beta$  con respecto al monómero de A $\beta$  en la muestra; y

5 (c2) determinar que el sujeto es un posible paciente de la enfermedad de Alzheimer, cuando la relación medida en la etapa (b2) es mayor que aquella de un individuo sano.

14. El método de la reivindicación 12 o 13, en el que la muestra es sangre o líquido cefalorraquídeo.

15. Un agente farmacéutico para uso en el diagnóstico de si un sujeto es o no un posible paciente de la enfermedad de Alzheimer, que comprende al anticuerpo de la reivindicación 1 o 2.

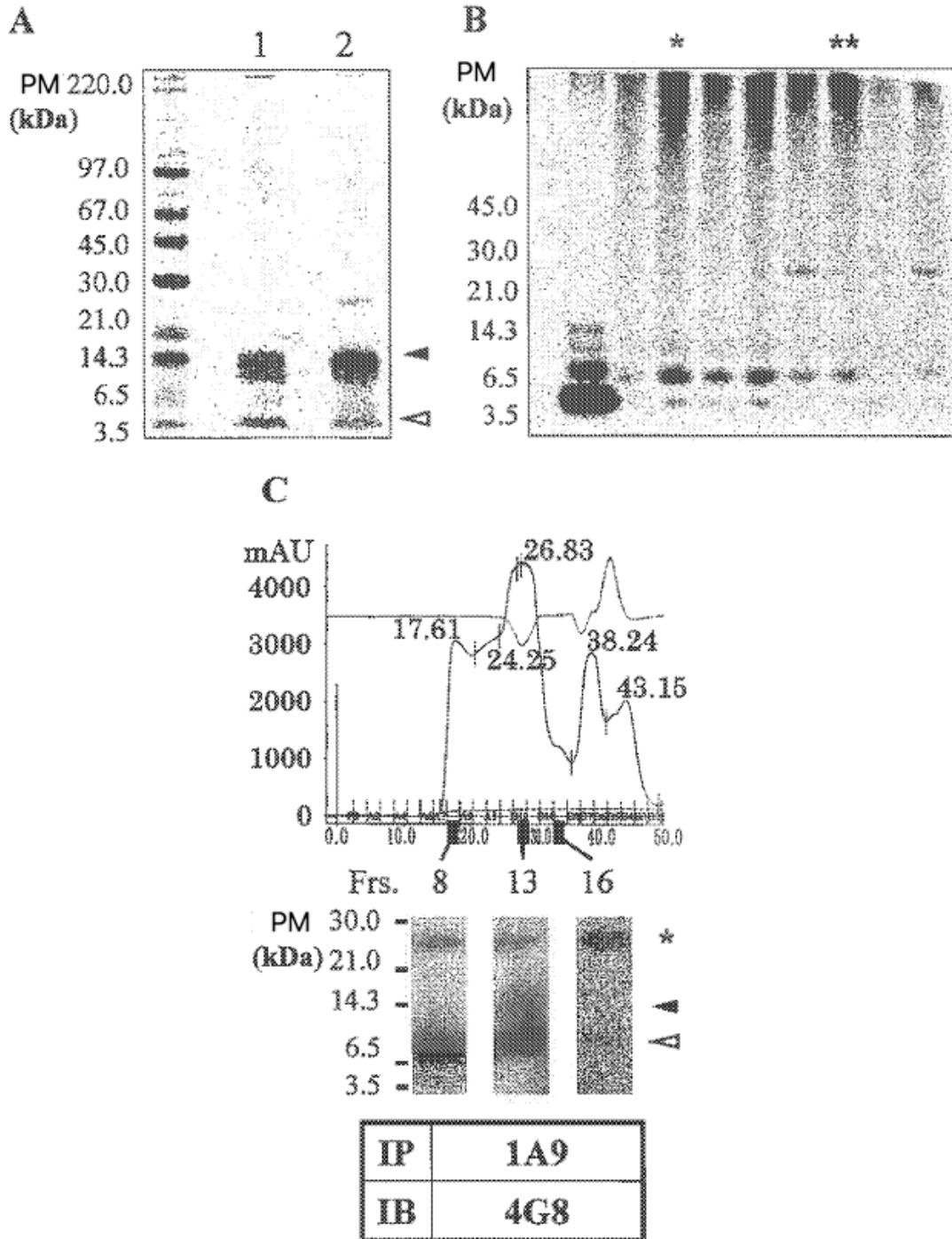


FIG. 1

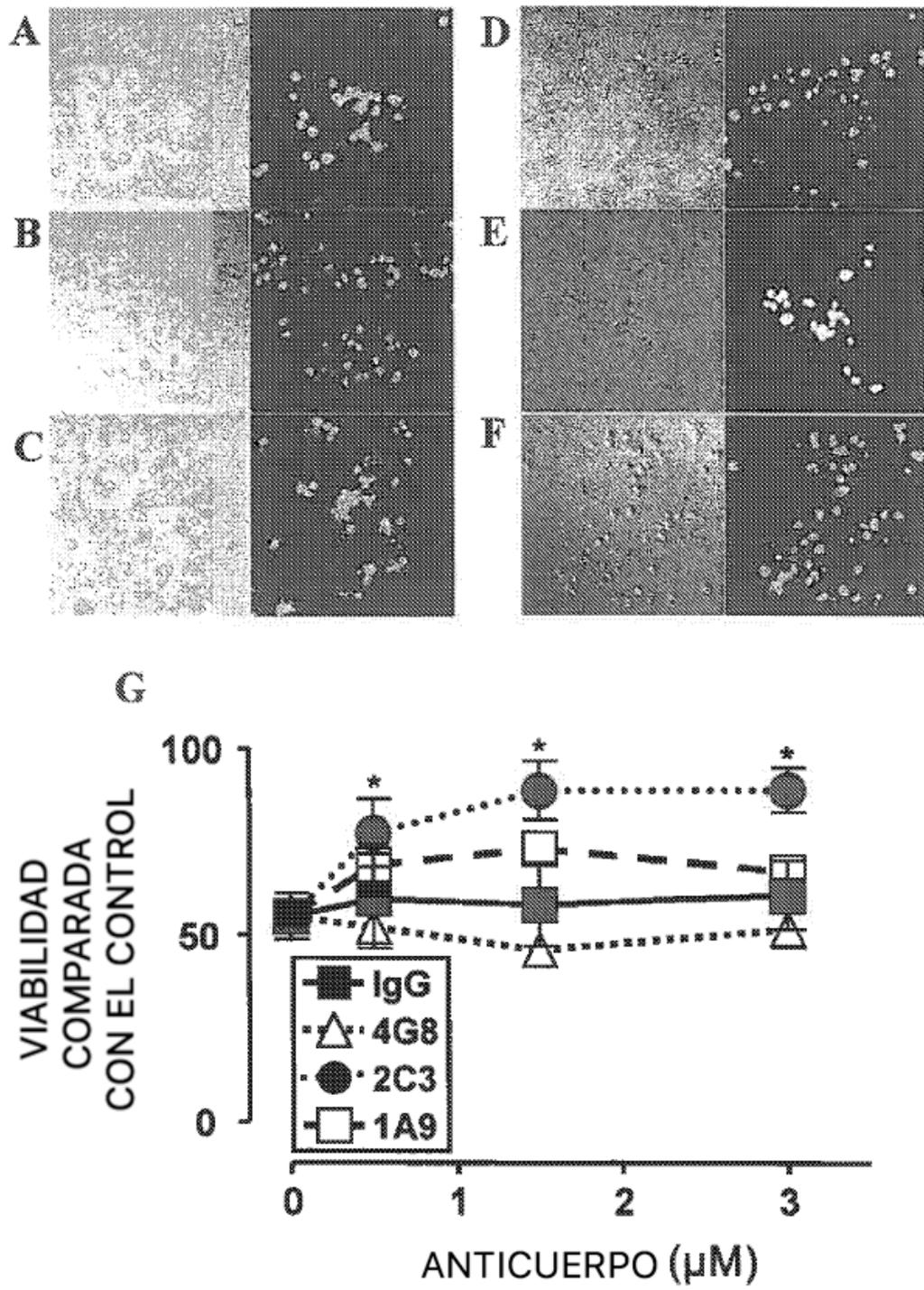


FIG. 2

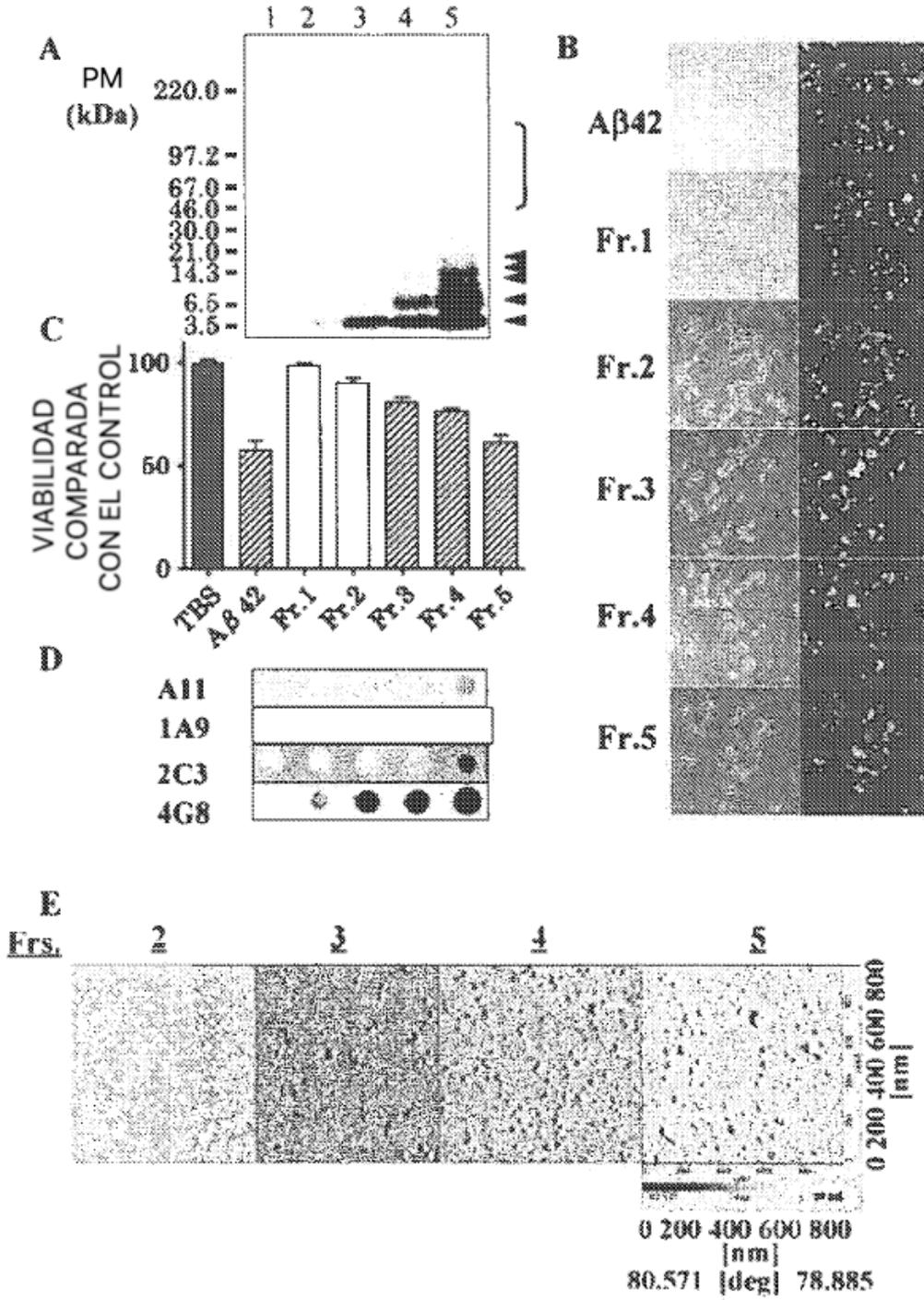


FIG. 3

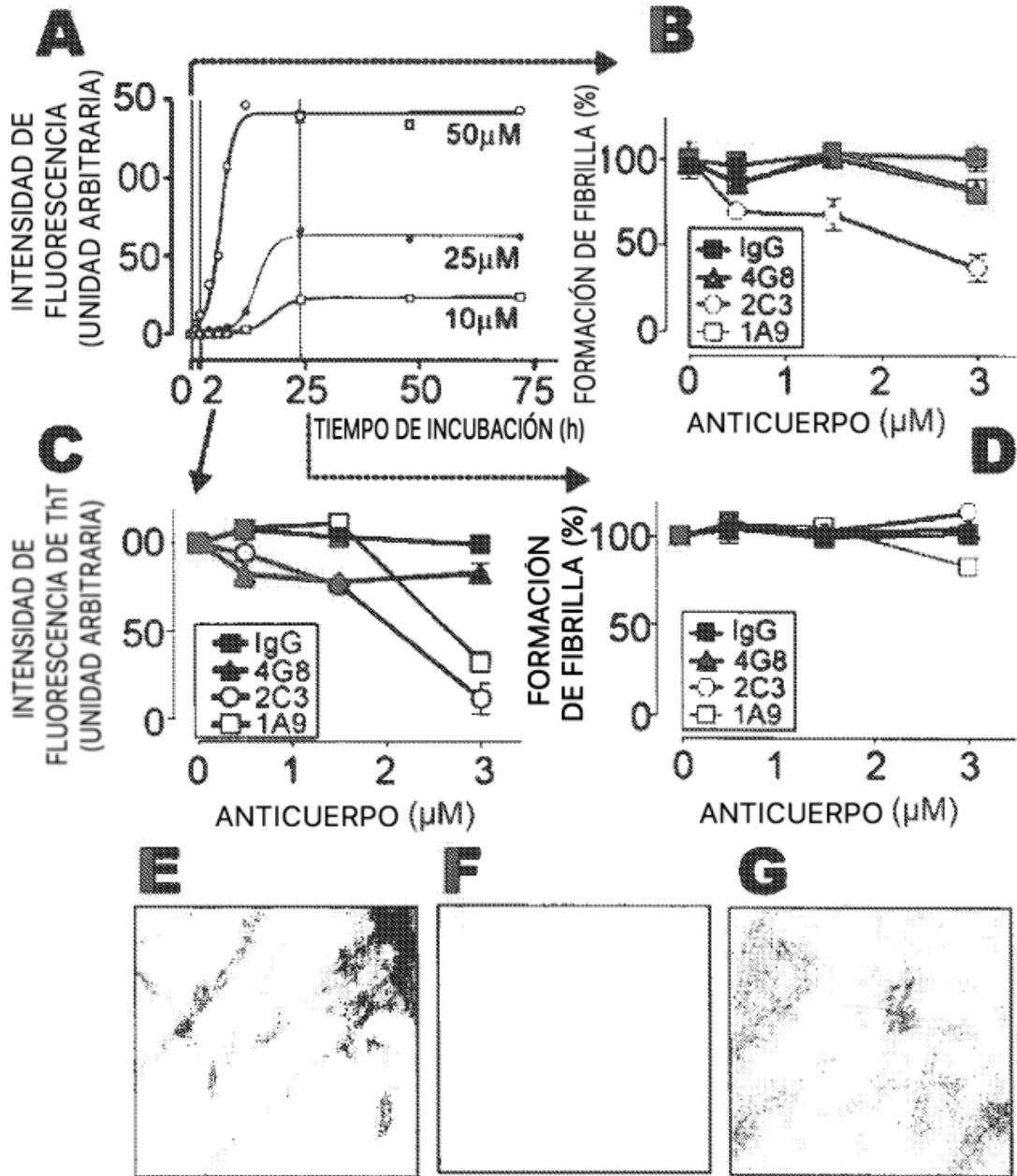


FIG. 4

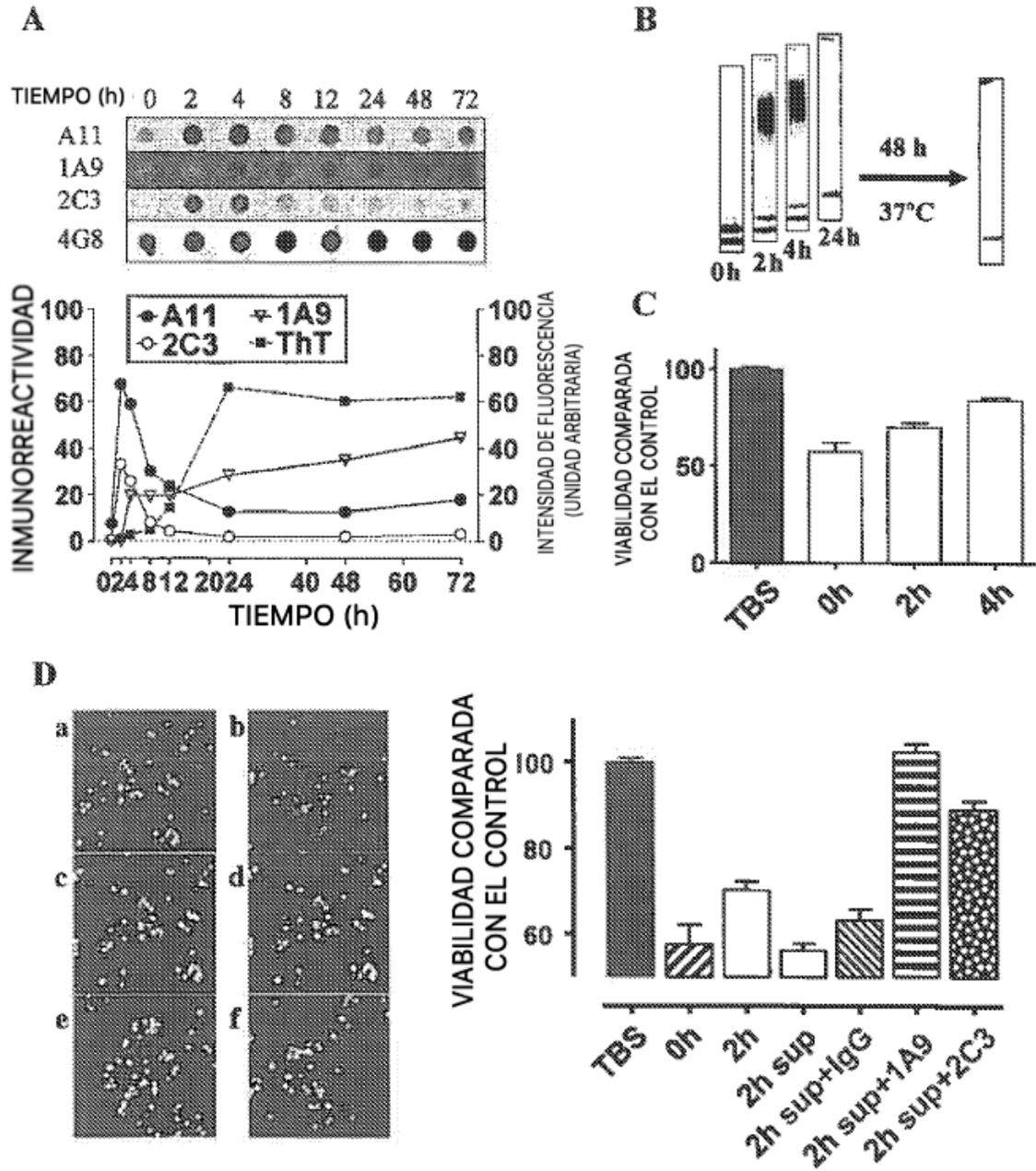


FIG. 5

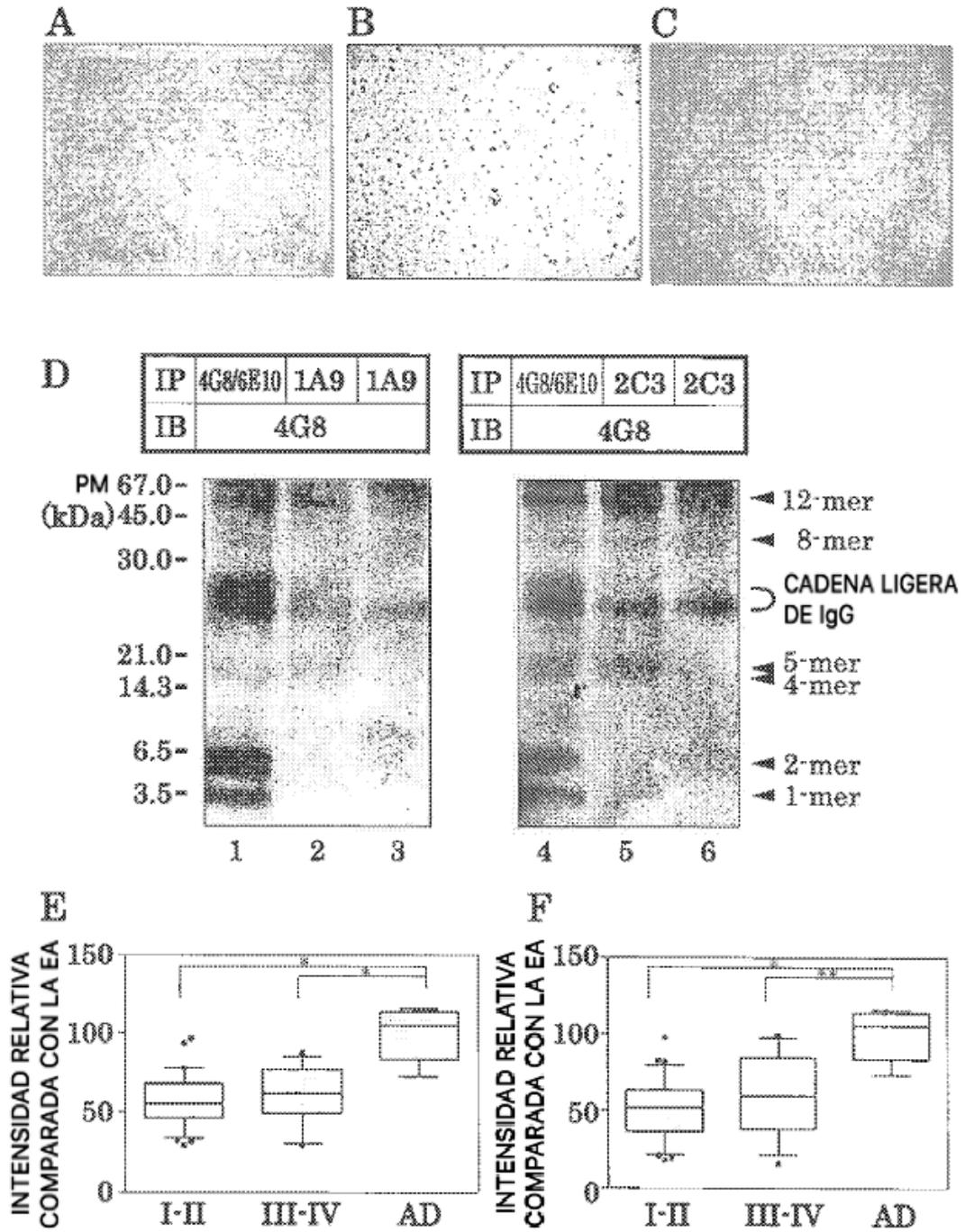


FIG. 6

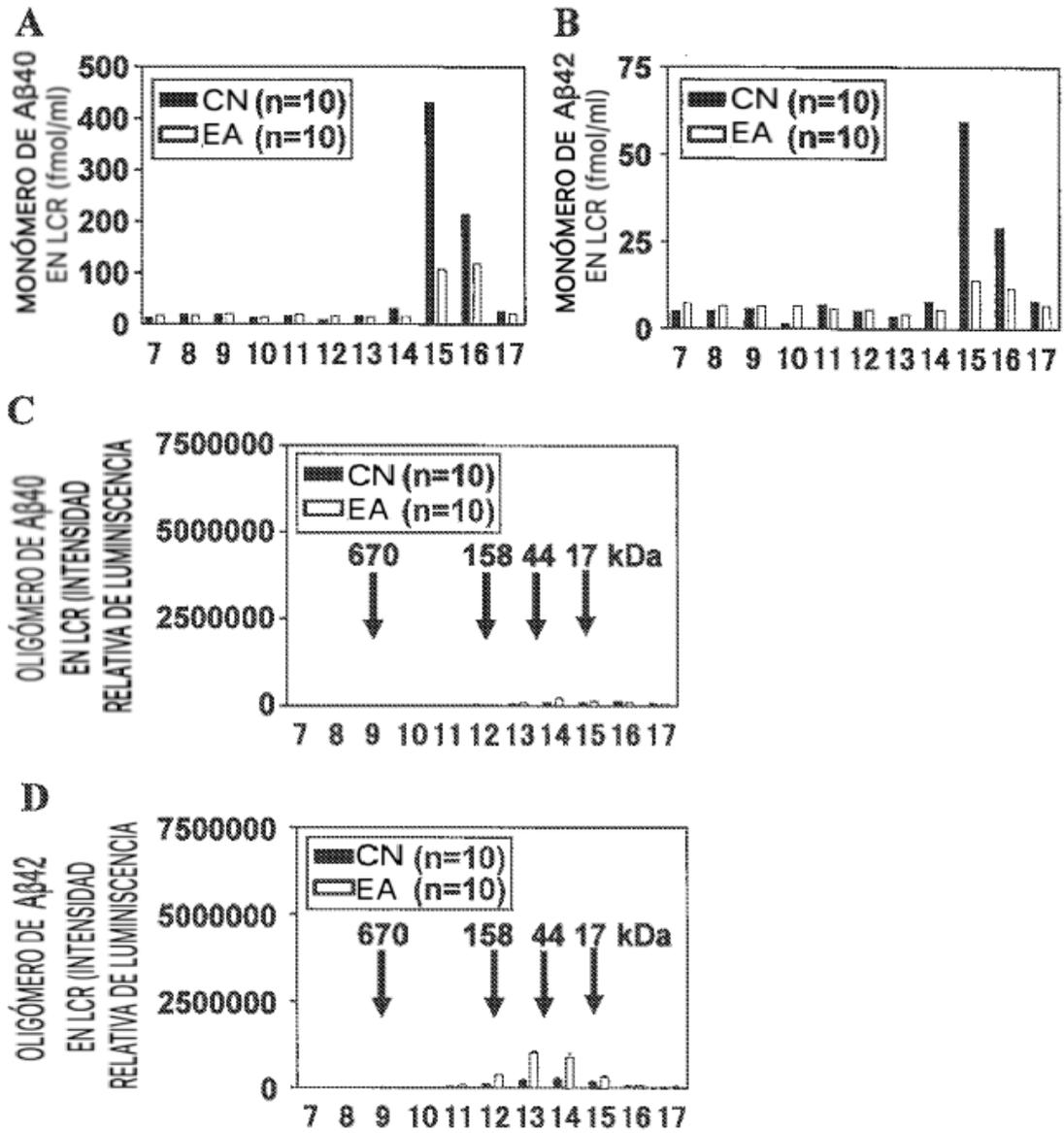


FIG. 7-1

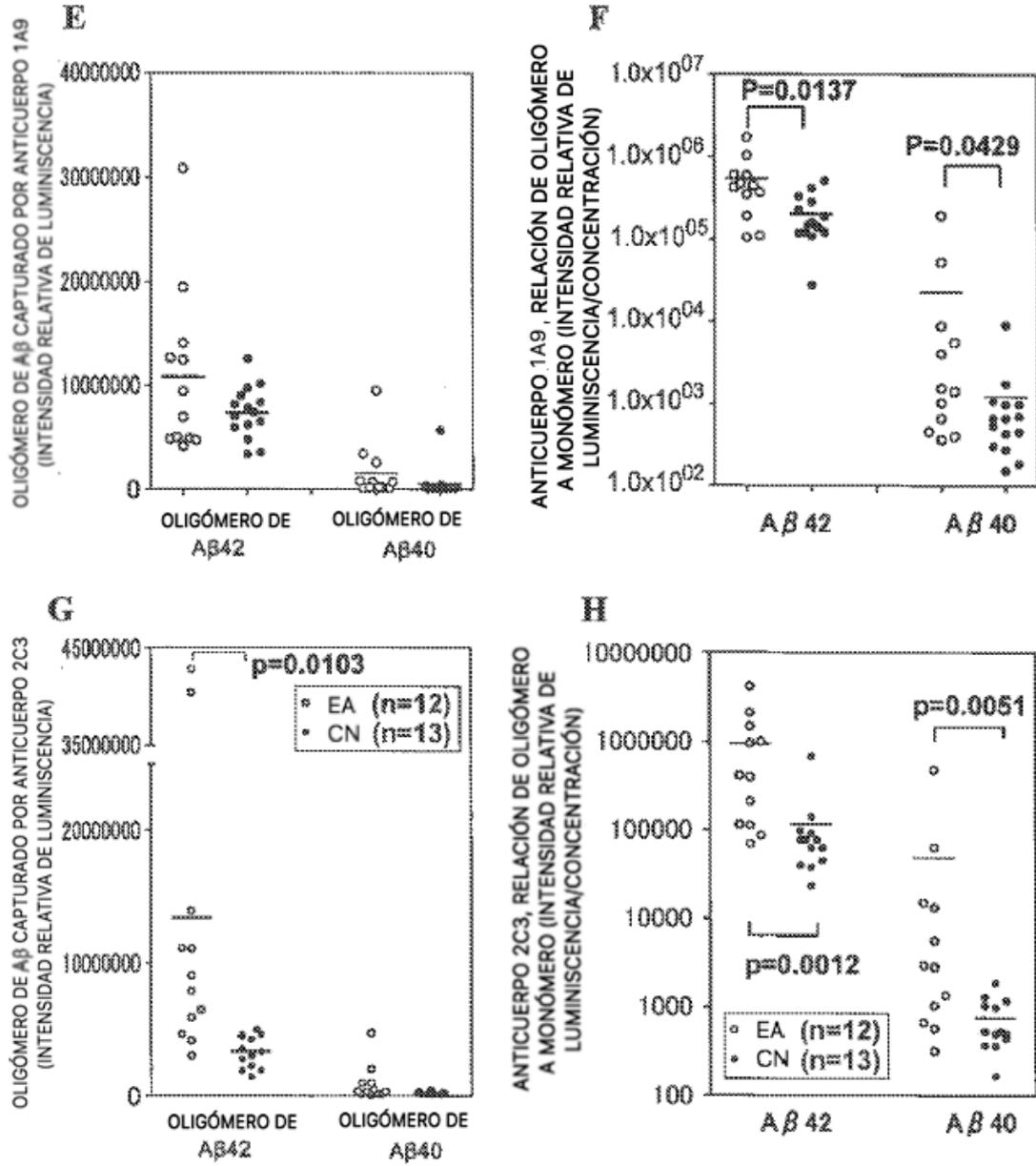


FIG. 7-2

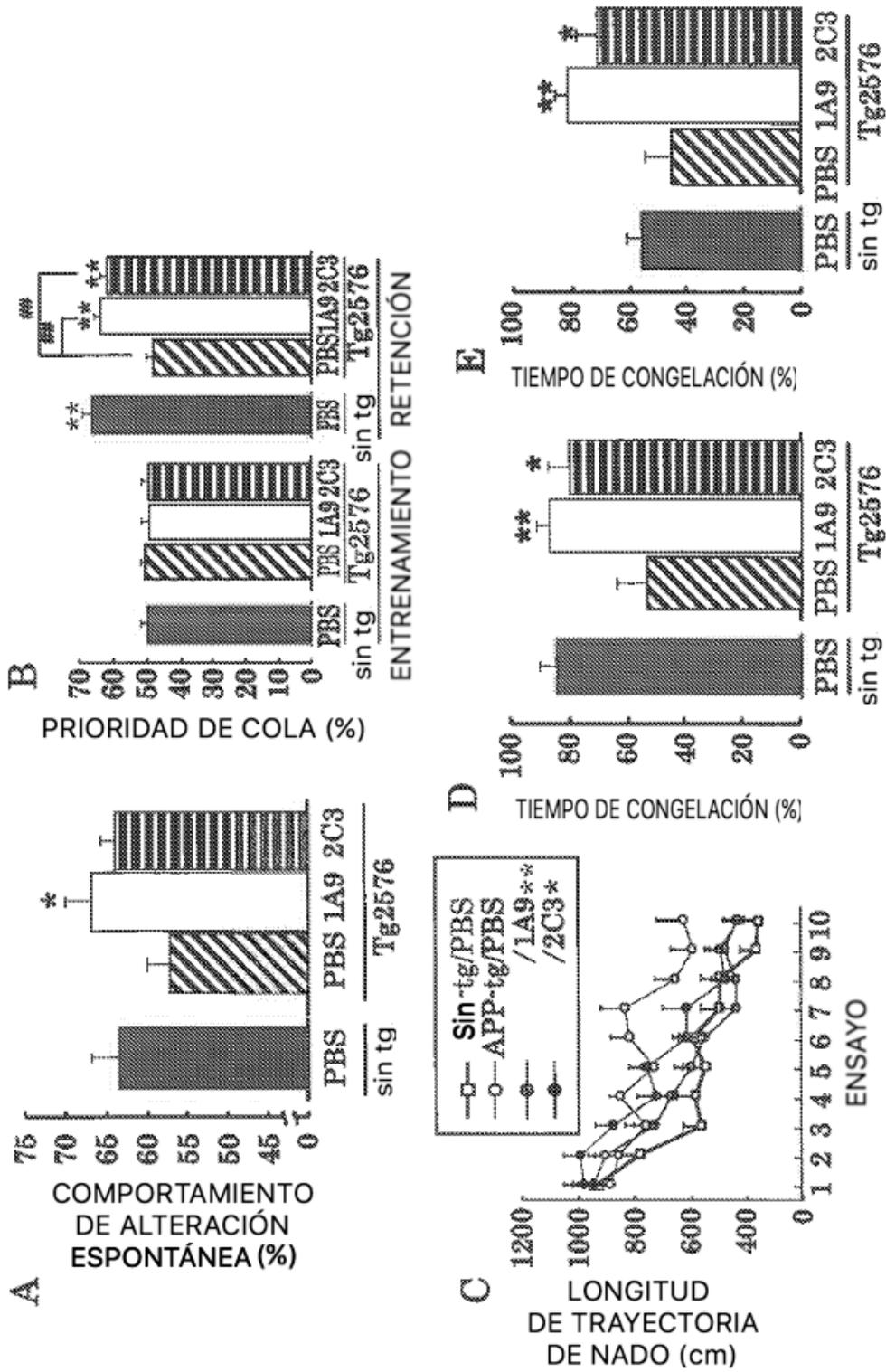


FIG. 8

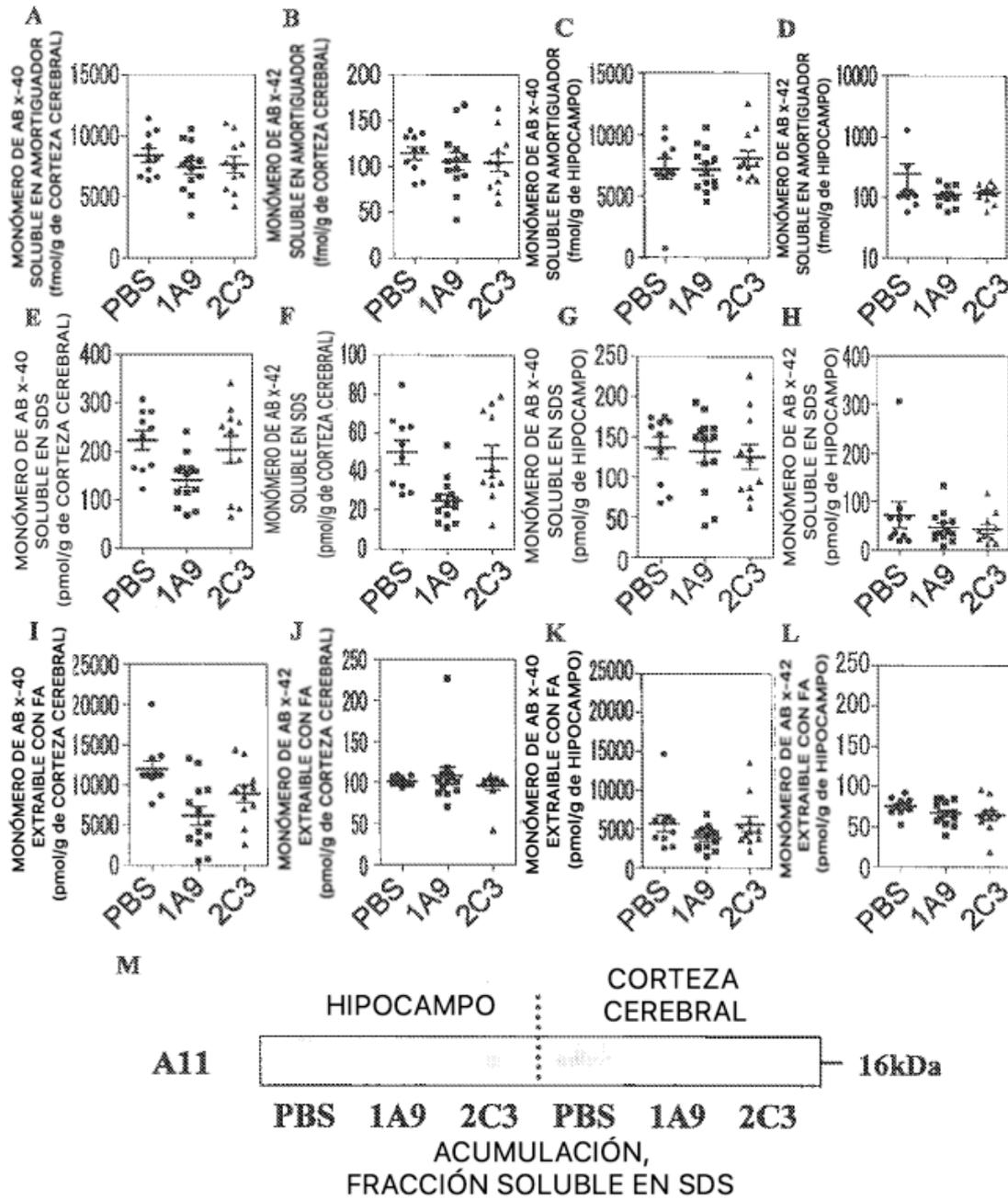


FIG. 9

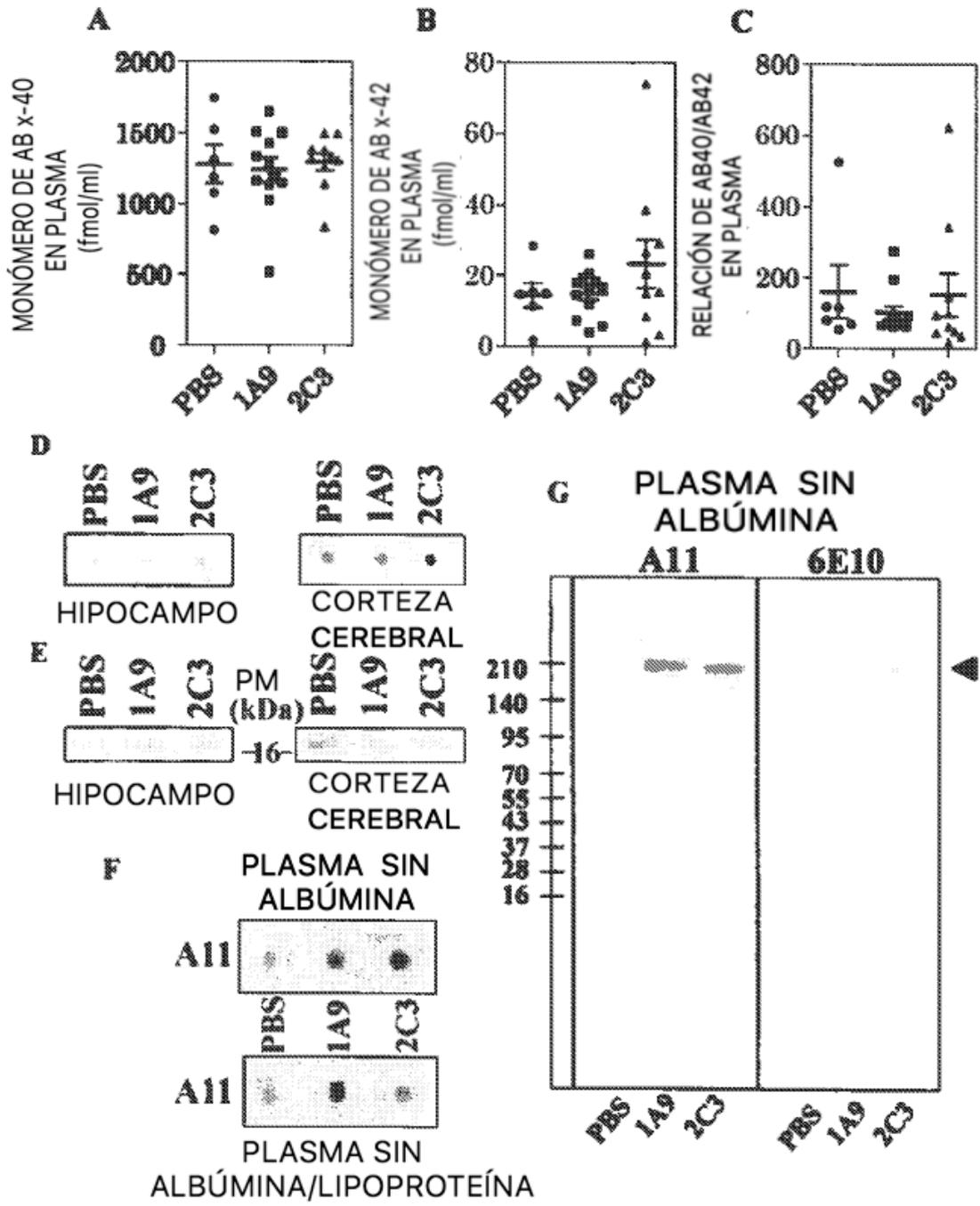


FIG. 10

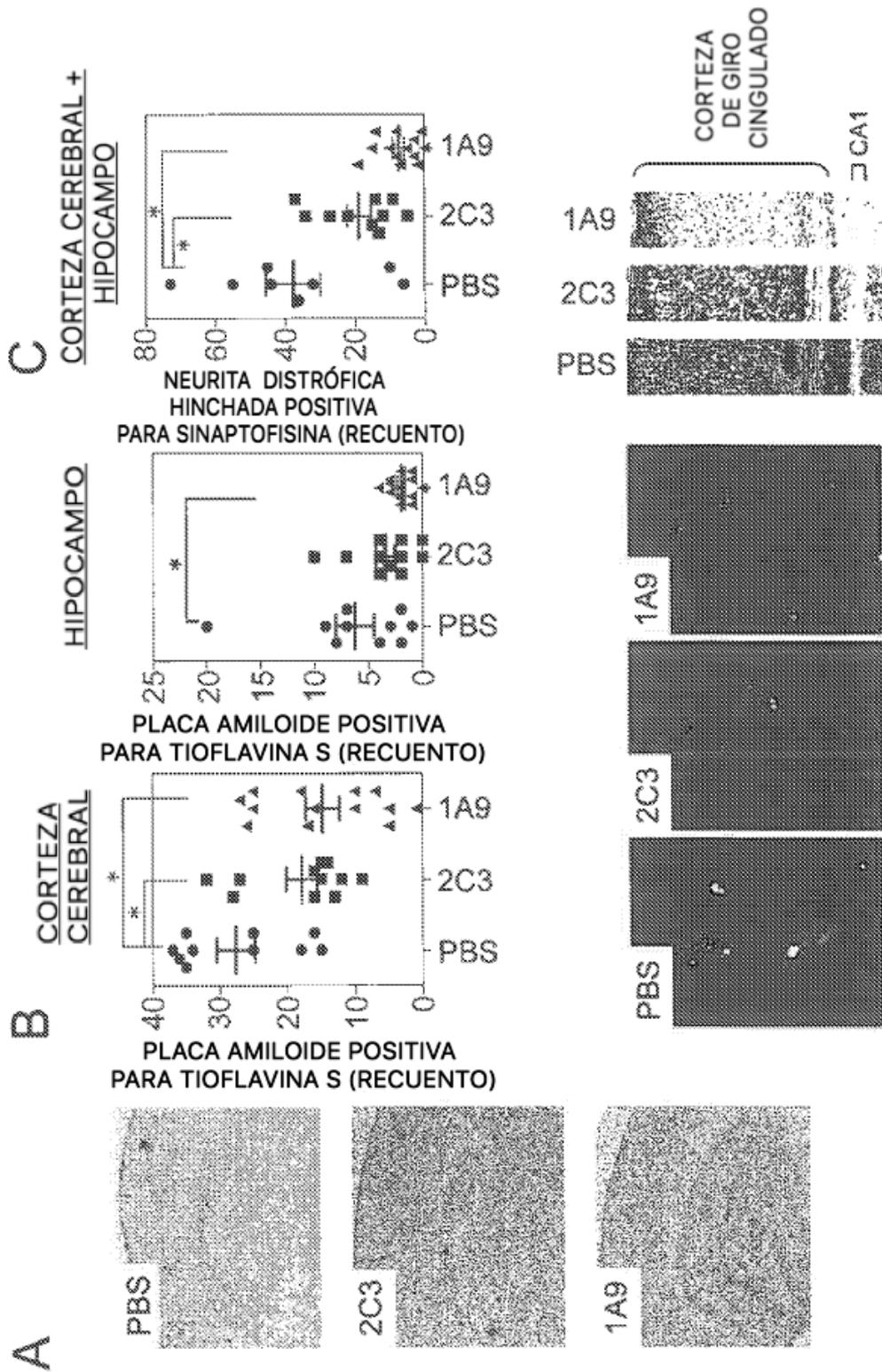


FIG. 11

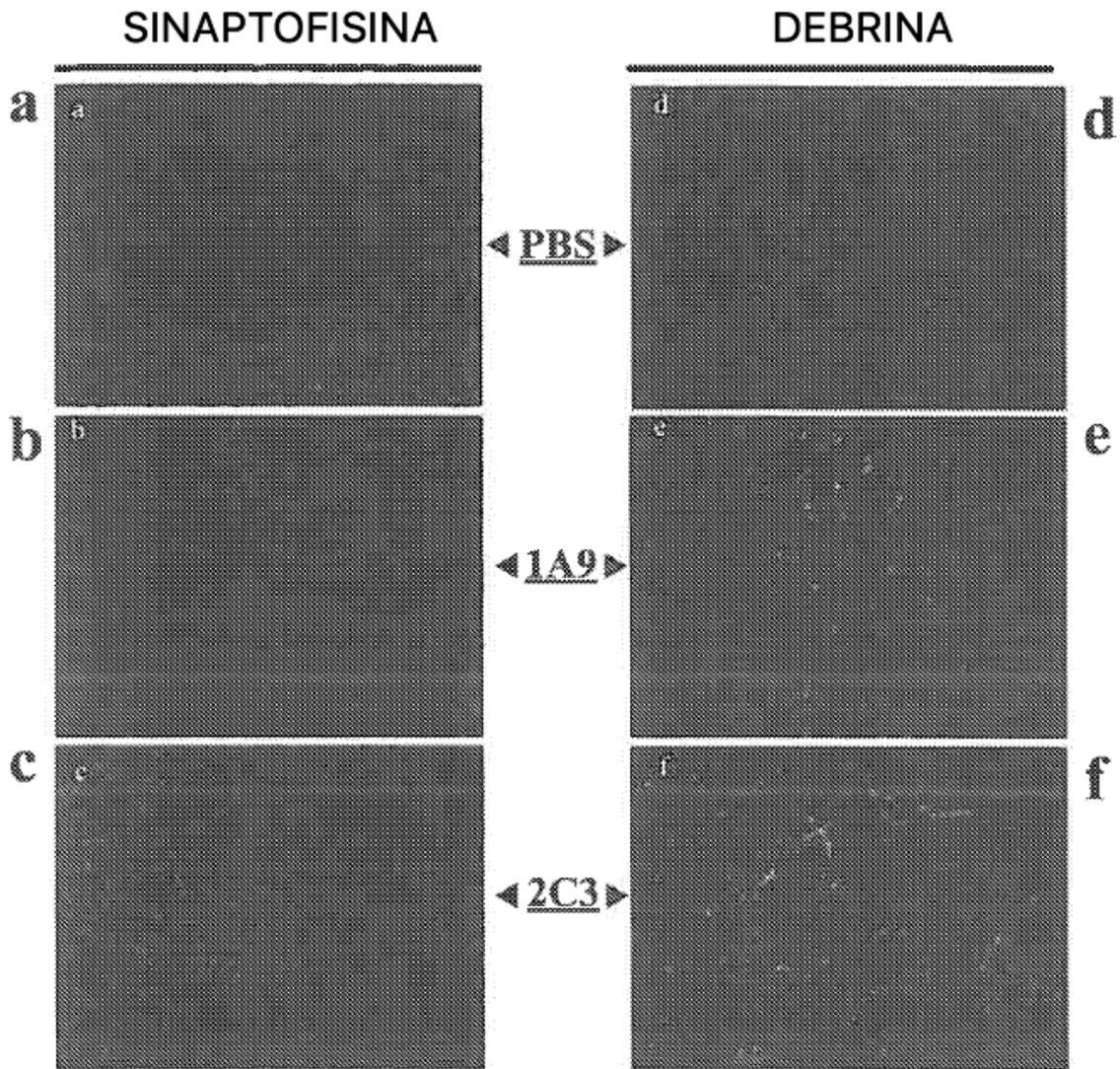
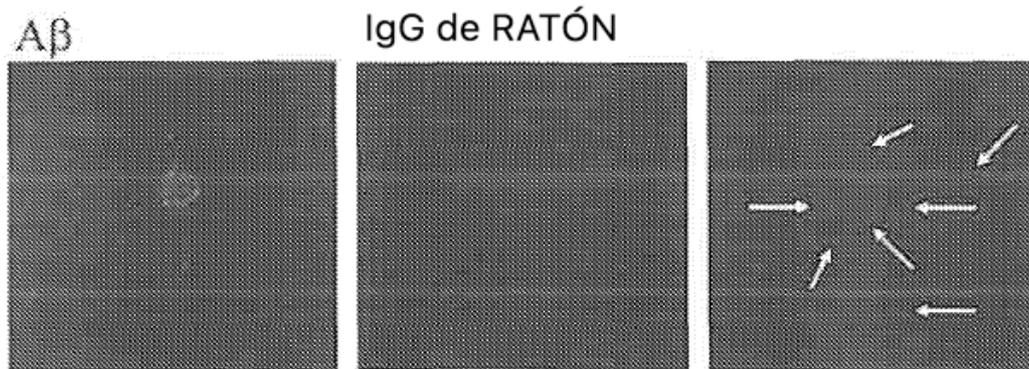


FIG. 12

**A** RATONES Tg2576 TRATADOS CON 1A9



**B** RATONES Tg2576 TRATADOS CON 2C3



**C** RATONES Tg2576 TRATADOS CON PBS

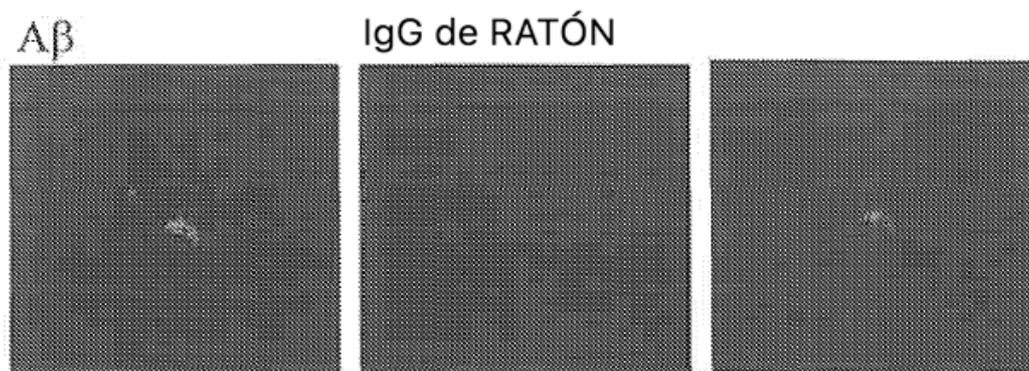


FIG. 13

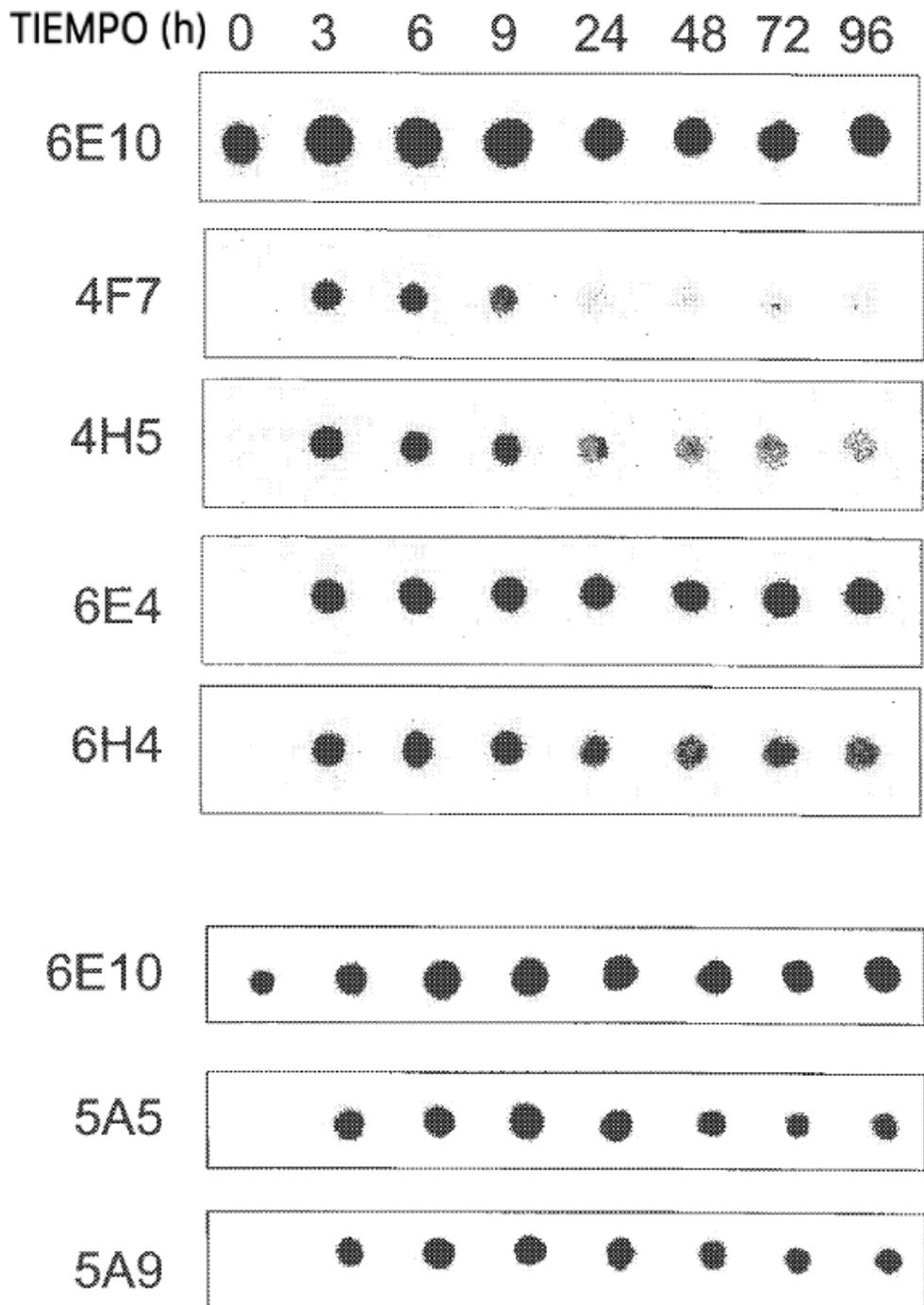


FIG. 14

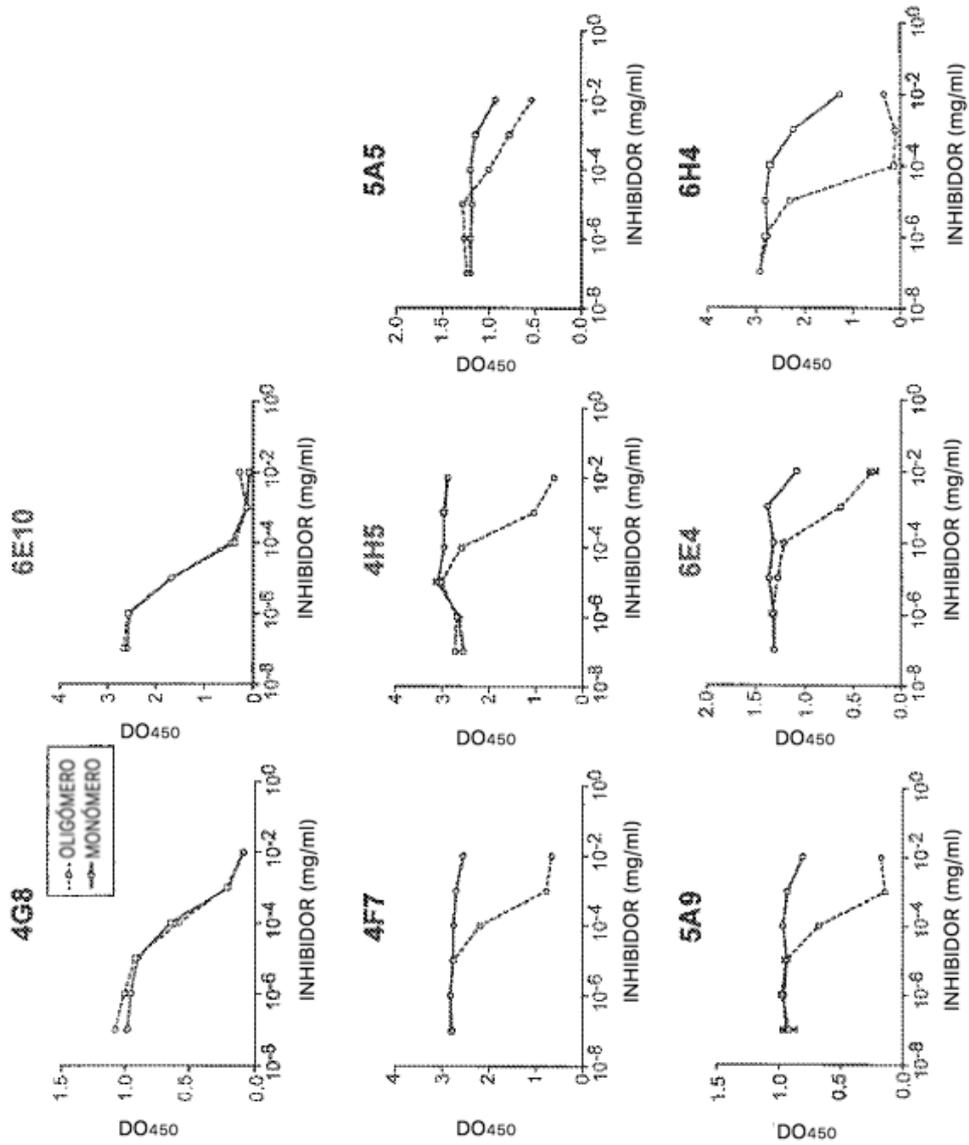


FIG. 15

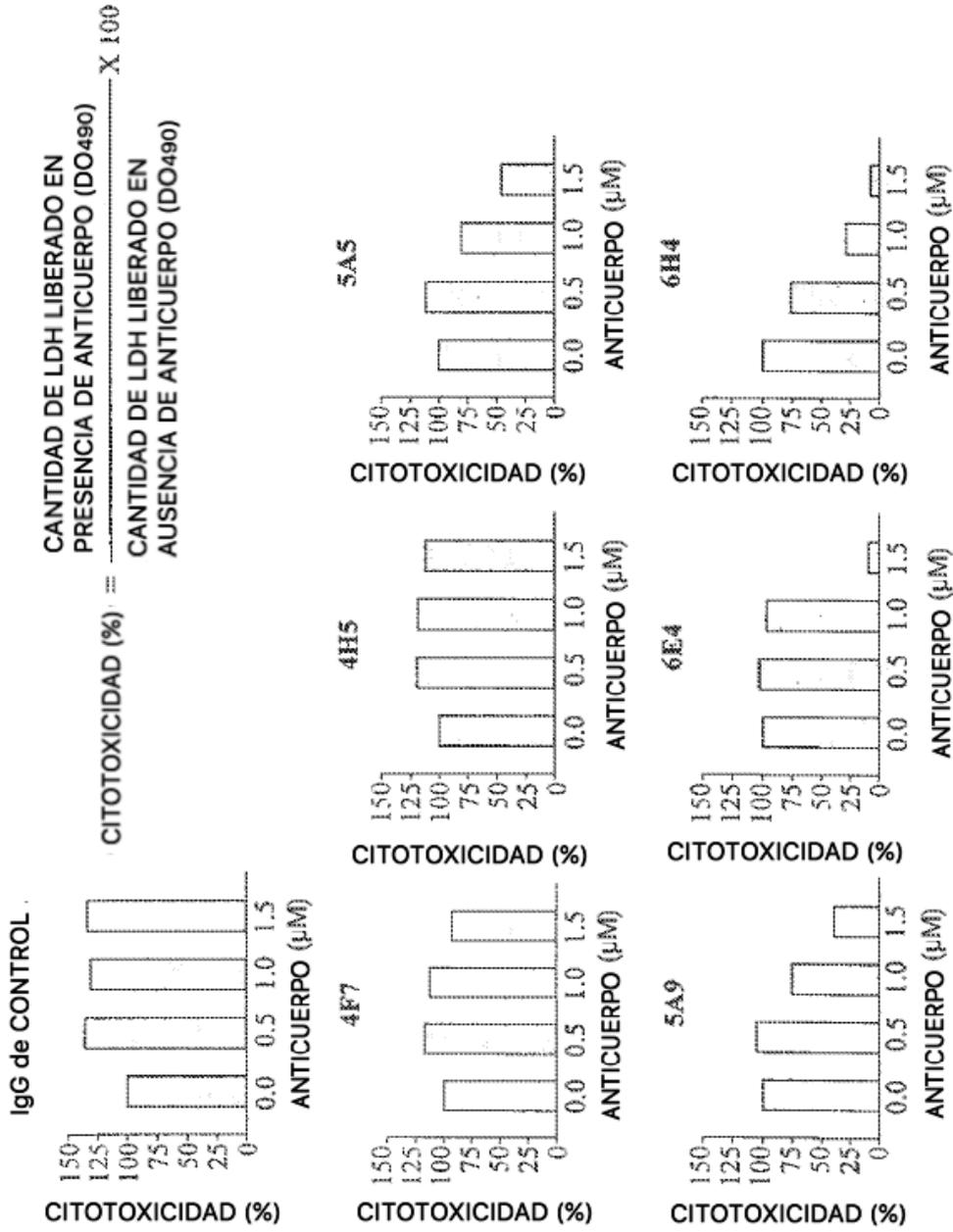


FIG. 16

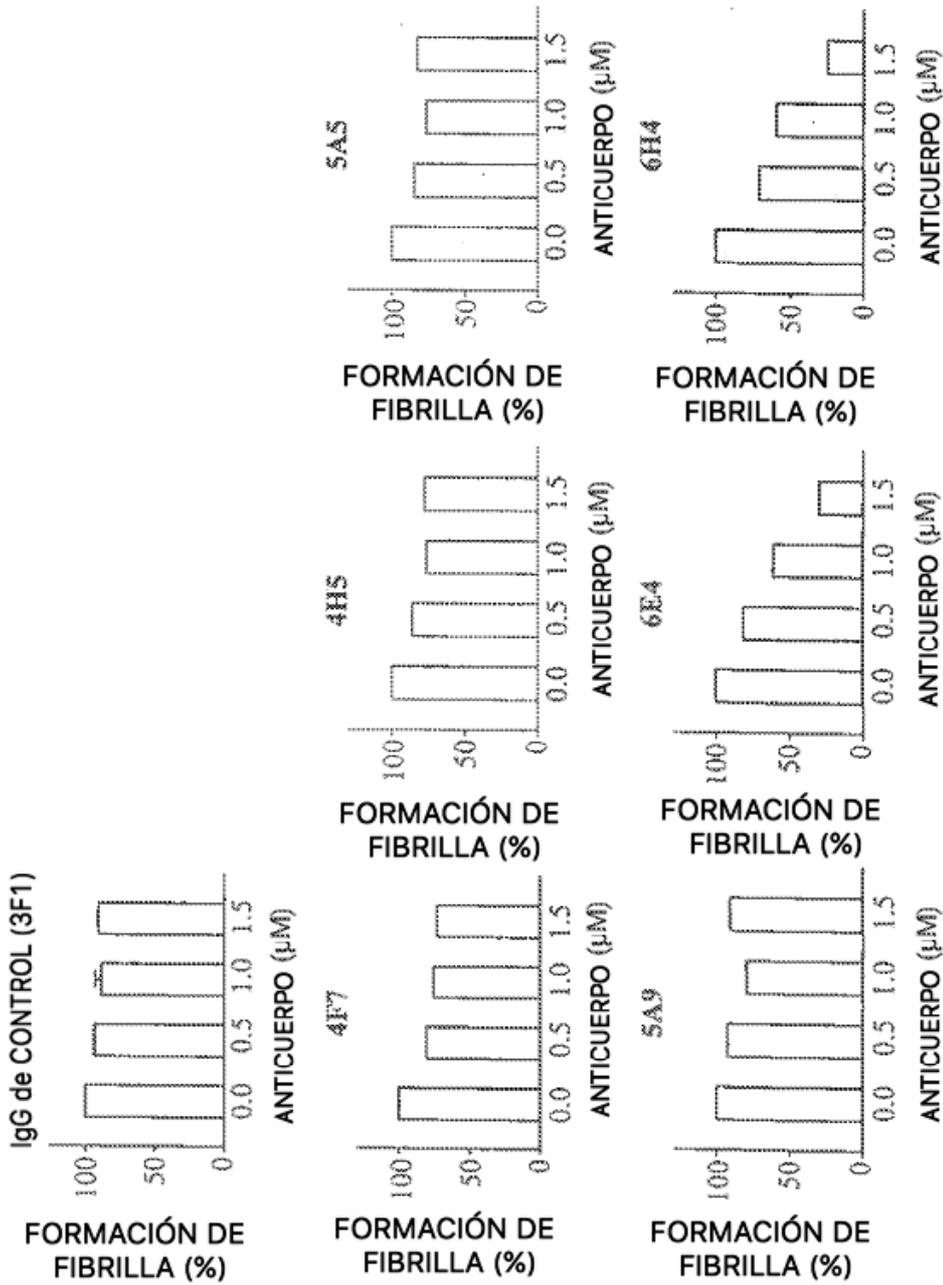


FIG. 17