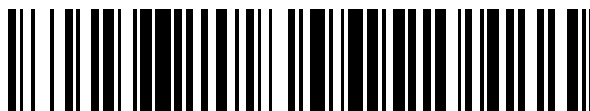


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 840**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2012 PCT/US2012/045956**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2013 WO13009703**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2012 E 12737445 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2732289**

54 Título: **Anticuerpos, kit y método in vitro para detectar  $\beta$ -oligómeros amiloides**

30 Prioridad:

**13.07.2011 WO PCT/US2011/043866**  
**13.07.2011 US 201161507332 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.05.2018**

73 Titular/es:

**ACUMEN PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)**  
**4435 North First Street 360**  
**Livermore, CA 94551, US y**  
**MERCK SHARP & DOHME CORP. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GOURE, WILLIAM F.;**  
**GASPAR, RENEE C.;**  
**MCCAMPBELL, ALEXANDER;**  
**SAVAGE, MARY J.;**  
**SHUGHRUE, PAUL J.;**  
**WANG, FUBAO;**  
**WANG, WEIRONG;**  
**WOLFE, ABIGAIL L.;**  
**ZHANG, NINGYAN;**  
**ZHAO, WEI-QIN y**  
**XU, MIN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 666 840 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, kit y método *in vitro* para detectar  $\beta$ -oligómeros amiloides

## Antecedentes de la invención

La enfermedad de Alzheimer ("Alzheimer's disease", AD) es una enfermedad neurodegenerativa devastadora que se caracteriza por la acumulación de placas de  $\beta$ -amiloides ( $A\beta$ ) en regiones cerebrales implicadas en el aprendizaje y la memoria. Aunque se ha creído que estas grandes placas provocan la AD, en la actualidad las pruebas indican que unos pequeños oligómeros difundibles de  $A\beta$  pueden ser los responsables. Los ligandos difundibles derivados de amiloides ("amyloid-derived diffusible ligands", ADDL) son una especie de oligómeros de  $A\beta$  que pueden generarse *in vitro* con propiedades similares a los oligómeros de  $A\beta$  endógenos (patentes de EE. UU. n.º 6.218.506; Klein, *et al.* (2004), *Neurobiol. Aging*, 25:569-580; Lambert, *et al.* (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:6448-6453). Los oligómeros de  $A\beta$  están presentes en el cerebro de pacientes con AD, se unen a las neuronas e inducen déficits en la morfología neuronal y en la memoria. Estudios realizados con anticuerpos que se unen a oligómeros de  $A\beta$  han demostrado una mejora en la morfología neuronal y en la memoria.

Se conocen ensayos para medir los monómeros de  $A\beta$ . Por ejemplo, se ha desarrollado un ELISA de "sandwich" compuesto por un anticuerpo específico del extremo N-terminal ( $A\beta$ 1) (clon 82E1) y anticuerpos específicos de los extremos C-terminales para  $A\beta$ 1-40 (clon 1A10) y  $A\beta$ 1-42 (clon 1C3) para detectar  $A\beta$ 1-40 y  $A\beta$ 1-42 de longitud completa con una sensibilidad en el intervalo menor de un dígito de fmol/ml (equivalente a un único dígito de pg/ml) sin reactividad cruzada con APP (Horiskoshi, *et al.* (2004), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 319:733-737, y publicación de patente de EE. UU. n.º 2011/0008339). Otros ensayos han empleado la actividad de las enzimas  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasa sobre la proteína precursora de amiloides ("amyloid precursor protein", APP) para detectar monómeros; sin embargo, pocos ensayos han detectado de modo específico y fiable los oligómeros de  $A\beta$  en una muestra de fluido humana, tal como fluido cerebroespinal (CSF) en controles normales y en AD (Georganopoulou, *et al.* (2005), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:2273-2276; Fukumoto, *et al.* (2010), *FASEB J.*, 24:2716-2726; Gao, *et al.* (2010), *PLoS One*, 5(12):e15725). Los ensayos de oligómeros  $A\beta$  indicados han empleado una serie de estrategias que incluyen anticuerpos específicos de ADDL acoplados con una plataforma de amplificación de PCR de biocódigo de barras (Georganopoulou, *et al.* (2005), *supra*), ELISA de solapamiento de epitopos (Gandy, *et al.* (2010), *Ann. Neurol.*, 68:220-230; Xia, *et al.* (2009), *Arch. Neurol.*, 66:190-199), también junto con una primera cromatografía de exclusión molecular (Fukumoto, *et al.* (2010), *supra*), y métodos de matrices de afinidad por amiloides (Gao, *et al.* (2010), *supra*; Tanghe, *et al.* (2010), *Int. J. Alz. Dis.*, 2010:417314), seguido por la disociación de los oligómeros y la medición con anticuerpos contra monómeros de  $A\beta$ .

El documento WO2006055178 se refiere a anticuerpos que reconocen diferencialmente conformaciones multidimensionales de ligandos difundibles derivados de  $A\beta$ , también conocidos como ADDL. Los anticuerpos de la invención pueden distinguir entre extractos de cerebro humano con enfermedad de Alzheimer y cerebro humano control y son útiles en los métodos para detectar los ADDL y para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer. Los presentes anticuerpos también bloquean la unión de ADDL a neuronas, el ensamblaje de los ADDL, y la taufosforilación y, por tanto, son útiles en métodos para prevenir y tratar enfermedades asociadas con oligómeros solubles de  $\beta$ -amiloides 1-42. El documento WO2007050359 se refiere a anticuerpos que reconocen diferencialmente conformaciones multidimensionales de ligandos difundibles derivados de  $A\beta$ , también conocidos como ADDL. Los anticuerpos de la invención pueden distinguir entre extractos de cerebro humano con enfermedad de Alzheimer y cerebro humano control y son útiles en los métodos para detectar los ADDL y para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer. Los presentes anticuerpos también bloquean la unión de ADDL a neuronas, el ensamblaje de los ADDL, y la taufosforilación y, por tanto, son útiles en métodos para prevenir y tratar enfermedades asociadas con oligómeros solubles de  $\beta$ -amiloides 1-42.

También se han detectado oligómeros de  $A\beta$  en CSF (fluido cerebroespinal) o cerebro empleando una electroforesis en gel, seguida de un análisis de la transferencia Western (Klyubin, *et al.* (2008), *J. Neurosci.*, 28:4231-4237; Hillen, *et al.* (2010), *J. Neurosci.*, 30:10369-10379), o después de una cromatografía de exclusión molecular (Shankar, *et al.* (2011), *Methods Mol. Biol.*, 670:33-44), que se basa en el peso molecular de los oligómeros que se mantienen después del procedimiento de electroforesis. Sin embargo, las técnicas electroforéticas y de transferencia no proporcionan la sensibilidad necesaria para observar estas especies en el CSF control normal (Klyubin, *et al.* (2008), *supra*), que muestra un registro en 1000 veces de concentraciones de oligómeros de  $A\beta$  (Georganopoulou, *et al.* (2005), *supra*). Las especies de oligómero de  $A\beta$  representan un amplio intervalo de pesos moleculares y, así, la asignación a una molaridad precisa resulta problemática. Aunque se ha demostrado un límite inferior de detección de 100 aM (Georganopoulou, *et al.* (2005), *supra*), la mayoría de los métodos indicados (Georganopoulou, *et al.* (2005), *supra*; Gao, *et al.* (2010), *supra*; Fukumoto, *et al.* (2010), *supra*; Gandy, *et al.* (2010), *supra*) no evalúan la selectividad entre las señales de los oligómeros de  $A\beta$ , comparadas con los monómeros de  $A\beta$ , de modo que las concentraciones indicadas deben considerarse con precaución. Un ensayo (Xia, *et al.* (2009), *Arch. Neurol.*, 66:190-199), comercializado por Immunobiological Laboratories, Inc. (Minneapolis, MN) afirma conseguir una selectividad en 320 veces por los dímeros de  $A\beta$ 1-16, comparados con el monómero  $A\beta$ 40, pero carece de la sensibilidad necesaria para evitar la reactividad cruzada con el monómero de  $A\beta$  en el CSF. Puesto que la hipótesis es que los oligómeros de  $A\beta$  en el CSF están presentes a niveles de fM y que los monómeros de  $A\beta$  en el CSF están presentes a 1,5-2 nM, un ensayo que mida selectivamente los oligómeros de  $A\beta$  en una muestra de CSF debe tener una selectividad

excepcional por los oligómeros de A $\beta$  frente a los monómeros.

Los oligómeros de A $\beta$  también se han empleado como diana para anticuerpos monoclonales terapéuticos para tratar la AD (véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 7.811.563, 7.780.963, y 7.731.962). Se cree que estos anticuerpos acceden al sistema nervioso central (SNC) y eliminan las especies tóxicas de ADDL del cerebro a través de 1) el recambio catalítico mediante activación mediada por Fc de la microglia, 2) la eliminación de los complejos de anticuerpo/ADDL hacia la vasculatura cerebral, o 3) la digestión enzimática de los ADDL tras la unión de anticuerpos y un mejor acceso de las enzimas degradativas, tales como neprilisina, enzima degradadora de la insulina, plasmina, enzimas conversoras de endotelina (ECE-1 y -2), metaloproteinasas de matriz (MMP-2, -3 y -9), y enzima convertora de angiotensina (ACE). Así, un objetivo de un ensayo de oligómeros de A $\beta$  selectivo es medir el cambio farmacocinético (PD) en los oligómeros de A $\beta$  del SNC tras un tratamiento con un anticuerpo antioligómero u otro tratamiento que altere la formación de monómeros/oligómeros de A $\beta$  o su eliminación. Además, un ensayo que permita la detección específica de oligómeros de A $\beta$  unidos a un anticuerpo antioligómeros de A $\beta$ , es decir, un ensayo de unión a la diana ("target engagement", TE) sería inestimable para la evaluación de anticuerpos terapéuticos después de un tratamiento.

## 15 Sumario de la invención

La presente descripción se dirige a un kit de oligómeros de A $\beta$  selectivo y a un método *in vitro* capaz de detectar, de modo fiable y sensible, oligómeros de A $\beta$  en una muestra biológica, por ejemplo, una muestra de fluido, de un sujeto. El kit y el método *in vitro* descrito emplean una pareja de anticuerpos antioligómeros de A $\beta$  muy selectivos para detectar y cuantificar oligómeros de A $\beta$  en una muestra biológica. En particular, el kit y el método *in vitro* de la invención emplean un anticuerpo de captura, tal como se indica en las reivindicaciones; y un anticuerpo de detección que reconoce un epitopo lineal N-terminal del péptido beta-amiloide 1-42 que es 82E1. En algunas realizaciones, la afinidad del anticuerpo de captura por los oligómeros del beta-amiloide 1-42, comparada con monómeros del beta-amiloide 1-40 en un ensayo de unión competitiva, es al menos 500:1. En otras realizaciones, la afinidad del anticuerpo de captura por los oligómeros del beta-amiloide 1-42, comparada con monómeros del beta-amiloide 1-42 en un ensayo de ELISA de "sandwich" es de al menos 500:1 o al menos 1000:1. El anticuerpo de captura es el anticuerpo 19.3. El anticuerpo de detección es 82E1, y puede incluir opcionalmente un marcador. El uso del kit y del método *in vitro*, opcionalmente en combinación con un medio para concentrar un complejo de antígeno-anticuerpo, permitir lograr un nivel de detección de los oligómeros del beta-amiloide 1-42 menor que 5 pg/ml o menor que 3 pg/ml. También se describen anticuerpos aislado, o fragmentos de anticuerpos, para su uso en el kit y el método *in vitro* de la invención.

## Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una representación gráfica que muestra la selectividad de los anticuerpos anti-ADDL que se unen a la especie de ADDL de oligómeros de A $\beta$  (barra intermedia de cada conjunto), comparado con monómeros de A $\beta$  o fibrillas de A $\beta$ . Se muestra la unión con ELISA de un panel de anticuerpos anti-ADDL humanizados (h3B3) y madurados por afinidad (14.2, 7.2, 11.4, 9.2, 13.1, 17.1, y 19.3) y tres anticuerpos de comparación (Comp 1, 2, and 3) a A $\beta$  monomérico, ADDL y A $\beta$  fibrilar. Se sabe que el anticuerpo comparativo 2 es un anticuerpo no selectivo para ADDL. El fondo de este ensayo se determinó retirando el anticuerpo de captura del ELISA (no mAb). Las barras de error representan el error estándar del promedio.

La figura 2 es una representación gráfica de la unión con ELISA del anticuerpo anti-ADDL 19.3 y el anticuerpo 3B3 a ADDL o monómero de A $\beta$  (A $\beta$ 1-40) evaluada con una curva de titulación de 11 puntos.

La figura 3 es una representación gráfica de la capacidad del anticuerpo anti-ADDL 19.3 y 3B3 para bloquear la unión de ADDL a células neuronales del hipocampo primarias después de una preincubación con una concentración creciente del anticuerpo. La capacidad del anticuerpo anti-ADDL 19.3 para bloquear la unión de ADDL a neuronas fue atenuada después de desnaturalizar el anticuerpo con calor. Las barras de error representan el error estándar del promedio.

La figura 4 es una representación gráfica de la unión y la disociación de anticuerpos anti-ADDL a FcRn humano inmovilizado cuando se evalúan con BIACORE (GE Healthcare, Piscataway, NJ). El sensograma ajustado muestra la unión inicial a pH 6,0 y después la disociación de los anticuerpos a pH 7,3 desde 180 segundos. Se inserta un punto indicador (estabilidad) a los 5 segundos después de la unión a pH 6,0 y se calculó el "porcentaje unido" como  $RU_{\text{estabilidad}}/RU_{\text{unión}}$  (%).

La figura 5A muestra un ELISA unilateral con placas revestidas con oligómeros de A $\beta$  (triángulos) o monómeros de A $\beta$  (cuadrados), que demuestra las afinidades relativas y las características de unión máxima del anticuerpo humanizado 19.3.

La figura 5B muestra un ELISA competitivo y las afinidades relativas de 19.3 por oligómeros de A $\beta$  (triángulos) y monómeros de A $\beta$  (cuadrados) revestidos sobre una placa de ELISA en presencia de las especies competitivas en disolución.

Las figuras 6A-6C son representaciones gráficas de la unión con ELISA de ADDL al anticuerpo anti-ADDL 19.3

(denominado WT en la figura 6A) y dos anticuerpos anti-ADDL derivados de 19.3 (figuras 6B y 6C) después de una incubación de hasta un mes a temperaturas variables para evaluar la estabilidad del anticuerpo. Los anticuerpos anti-ADDL derivados de 19.3 están compuestos de una única sustitución de aminoácido de Asn33 dentro del CDR1 de la cadena ligera a Ser33 (N33S; figura 6B) o Thr33 (N33T; figura 6C). La sustitución de Asn33 por S33 o T33 produce una mejor estabilidad del anticuerpo frente al anticuerpo 19.3 de origen.

Las figuras 7A-7C son representaciones gráficas que muestran la sensibilidad de tres parejas de anticuerpos en un formato de ELISA de "sandwich" empleando la quimioluminiscencia (lector ENVISION Multilabel Reader, Perkin Elmer, Waltham, MA) como método de detección, y sus afinidades relativas por oligómeros de A $\beta$ . La figura 7A muestra el anticuerpo antioligómero de A $\beta$  19.3 como anticuerpo de captura, y 82E1 como anticuerpo de detección, a lo largo de un intervalo de concentraciones de oligómeros de A $\beta$ . Las figuras 7B y 7C muestran 6E10 y 19.3, respectivamente, como anticuerpos de captura y de detección. La pareja de ELISA de "sandwich" 19.3 x 82E1 (figura 7A) fue significativamente más sensible para detectar los oligómeros de A $\beta$ , comparado con las otras parejas (figuras 7B y 7C).

La figura 8 es una representación gráfica de la sensibilidad y la selectividad para la detección de oligómeros de A $\beta$  (cuadrados), comparado con monómeros de A $\beta$  (triángulos) empleando los anticuerpos antioligómeros de A $\beta$  19.3 y 82E1, según se mide usando un detector de micropartículas paramagnéticas, tal como el detector digital ERENNA (SINGULEX, Almeda, CA). El uso del detector de micropartículas paramagnéticas mejora significativamente la sensibilidad para detectar oligómeros de A $\beta$  con la pareja de anticuerpos 19.3/82E1.

Las figuras 9A y 9B son representaciones gráficas del ELISA de "sandwich" de oligómeros de A $\beta$ , es decir, el ensayo farmacodinámico (PD), y el ELISA de "sandwich" de oligómeros de A $\beta$ /anticuerpo, es decir, el ensayo de unión a la diana, respectivamente.

Las figuras 10A y 10B son representaciones gráficas de los niveles de oligómeros de A $\beta$  detectados en muestras de fluido cerebroespinal (CSF) humano. La figura 10A muestra que los niveles de oligómeros de A $\beta$  fueron cuatro veces mayores en pacientes con AD, comparado con pacientes de la misma edad control, es decir, sin AD, en una evaluación ciega empleando el método *in vitro* de la presente. Las diferencias fueron estadísticamente significativas a  $p \leq 0,0004$ , según se determina empleando un ensayo de la t de dos vías y un análisis de rangos de Mann Whitney, suponiendo que la población no es gaussiana. La figura 10B muestra que los niveles de oligómeros de A $\beta$  fueron ocho veces mayores en pacientes con AD, comparado con pacientes más jóvenes control, es decir, sin AD, en una evaluación ciega empleando el método *in vitro* de la presente. Las diferencias también fueron estadísticamente significativas entre estos grupos empleando el mismo método estadístico que en la figura 10A a un valor de  $p \leq 0,0021$ .

Las figuras 11A y 11B son representaciones gráficas de los niveles de monómeros de A $\beta$  en el CSF de pacientes con AD confirmada clínicamente o pacientes jóvenes control, es decir, sin AD, con una correspondiente disminución en los niveles de monómeros A $\beta$ 1-42 y unos niveles sin cambios de monómeros A $\beta$ 1-40 en las muestras de AD. Esto es representativo del patrón general observado para pacientes con AD y confirma el estado de enfermedad de las muestras evaluadas en la figura 10B. La figura 11A muestra los niveles reducidos del monómero A $\beta$ 1-42 en muestras de CSF de AD. Las diferencias fueron estadísticamente significativas a  $p \leq 0,002$ , según se determina empleando un ensayo de la t de dos vías y un análisis de rangos de Mann Whitney, suponiendo que la población no es gaussiana. La figura 11B muestra los niveles sin cambios entre los dos grupos de monómeros de A $\beta$ 1-40.

La figura 12 es una representación gráfica de la correlación entre las puntuaciones del miniexamen del estado mental ("Mini-Mental State Exam", MMSE) como una medida de la actuación cognitiva, y los niveles de oligómeros de A $\beta$  medidos empleando el ensayo descrito en la presente. Todos los pacientes mostrados en la figura 10B se incluyeron en esta correlación. La correlación a  $-0,7445$  pg/ml de oligómeros de A $\beta$  es significativa con  $p \leq 0,0001$ .

La figura 13 es una representación gráfica del PK del anticuerpo anti-ADDL 19.3 evaluado en fluido cerebroespinal (CSF) de primates (tres monos rhesus macho) empleando un modelo de cisterna magna de rhesus tras la administración de una dosis IV en embolada de 20 mg/kg. A aproximadamente 24 horas después de la dosis, el anticuerpo 19.3 está presente en el CSF a 100 ng/ml.

Las figuras 14A y 14B son representaciones gráficas del ensayo de unión a la diana. La figura 14A es una representación de los complejos de anticuerpo antioligómero de A $\beta$  19.3/oligómero de A $\beta$  formados *ex vivo* con siembra en CSF humano (círculos) o tampón de caseína (triángulos). La figura 14B es una representación de los complejos de anticuerpo antioligómero de A $\beta$  19.3/oligómero de A $\beta$  formados *ex vivo* con siembra en CSF humano (círculos) o tampón de caseína (triángulos). Se observó una sensibilidad diferencial en la detección de los complejos de 19.3/oligómero de A $\beta$  en un ELISA de unión a la diana con anticadena kappa humana (captura) x 82E1 (detección). El anticuerpo de captura anti-kappa diferencia muy mal el anticuerpo antioligómero de A $\beta$  19.3 de las especies de anticuerpos endógenas en CSF humano.

#### Descripción detallada de la invención

Esta descripción proporciona un kit y un método *in vitro* para detectar, de modo fiable y sensible, oligómeros de A $\beta$  en una muestra biológica, tal como el CSF de un paciente, para su uso en la medición farmacodinámica y de unión a

la diana de oligómeros de A $\beta$ . El kit y el método *in vitro* de la descripción pueden diferenciar la AD de pacientes sin AD y estratificar el estado de enfermedad de AD basándose en los niveles elevados de oligómeros de A $\beta$ , por ejemplo en el SNC de pacientes con AD, de modo similar a los usos previamente indicados de la proporción en CSF de tau/Abeta42 (De Meyer, *et al.* (2010), Arch. Neurol., 67:949-56). Además, un ensayo de oligómeros de A $\beta$  que detecte la mayoría de las especies neurotóxicas puede correlacionarse mejor y ser una medición más dinámica de los cambios en la actuación cognitiva, comparado con la mala correlación observada para los niveles de monómeros de A $\beta$ . Ahora se ha demostrado que un anticuerpo antioligómeros de A $\beta$  administrado periféricamente puede penetrar la barrera hematoencefálica y unirse a oligómeros de A $\beta$  y, cuando se emplea en combinación con el método *in vitro* de la presente, puede proporcionar un ensayo de criterio de valoración sustituto para la evaluación de productos terapéuticos para AD.

Para los objetivos de esta invención, la expresión "oligómeros de A $\beta$ " se refiere a especies de multímeros de monómeros de A $\beta$  que se producen por autoensamblaje de especies monoméricas. Los oligómeros de A $\beta$  son predominantemente multímeros de A $\beta$ 1-42, aunque se han indicado oligómeros de A $\beta$  de A $\beta$ 1-40. Los oligómeros de A $\beta$  pueden incluir una gama dinámica de dímeros, trímeros, tetrámeros y especies de orden superior tras la agregación de monómeros de A $\beta$  sintéticos *in vitro* o tras el aislamiento/extracción de especies de A $\beta$  del cerebro humano o fluidos corporales. Los ADDL son una especie de oligómeros de A $\beta$ .

El término "ADDL" o las expresiones "ligandos difundible derivados de  $\beta$ -amiloides" o "ligandos de demencia derivados de  $\beta$ -amiloides", tal como se emplean en la presente, se refieren a una estructura oligomérica neurotóxica, soluble, globular, no fibrilar que contiene dos o más monómeros de la proteína de A $\beta$ . Pueden obtenerse estructuras oligoméricas de orden superior no solo a partir de A $\beta$ 1-42, sino también de cualquier proteína de A $\beta$  capaz de formar, de modo estable, estructuras oligoméricas de A $\beta$  no fibrilares solubles, tales como A $\beta$ 1-43 o A $\beta$ 1-40. Véanse la patente de EE. UU. n.º 6.218.506 y el documento WO 01/10900.

Las expresiones "fibrillas de A $\beta$ " o "fibrillas" o "amiloides fibrilar", tal como se emplean en la presente, se refieren a especies insolubles de A $\beta$  que se detectan en tejido de cerebro de ser humano y de ratón transgénico debido a su birrefringencia con tintes, tales como tioflavina S. Las especies de A $\beta$  que forman estructuras similares a fibras compuestas por monómeros de A $\beta$  incluyen láminas  $\beta$  trenzadas. Se cree que estas especies son precursores inmediatos de las estructuras de placas amiloides extracelulares que se encuentran en el cerebro de AD.

Las expresiones "monómero A $\beta$ 1-40" o "monómero A $\beta$ 1-42", tal como se emplean en la presente se refieren al producto directo de la ruptura enzimática, concretamente, de la actividad aspártico proteasa, por la  $\beta$ -secretasa y la  $\gamma$ -secretasa sobre el precursor de la proteína amiloide ("amyloid protein precursor", APP) en un entorno celular o sin células. La ruptura de APP por la  $\beta$ -secretasa genera la especie de A $\beta$  que comienza en Asp 1 (numeración como la secuencia del péptido de A $\beta$  después de la ruptura), mientras que la  $\gamma$ -secretasa libera el C-terminal de A $\beta$ , predominantemente en el resto 40 o 42.

Ahora se ha desarrollado un ensayo muy sensible para detectar y medir los niveles de oligómeros de A $\beta$  en una muestra biológica, por ejemplo, una muestra de fluido, preferiblemente CSF. El kit y el método *in vitro* de la descripción emplean dos anticuerpos selectivos antioligómeros de A $\beta$  como anticuerpos de captura y de detección en un ensayo de unión competitiva, tal como un ELISA de "sandwich". Las expresiones "anticuerpo de captura" o "anticuerpo de captura de oligómeros de A $\beta$ " o "anticuerpo de captura anti-IgG2 humana", tal como se emplean en la presente, se refieren a un anticuerpo que se emplea como anticuerpo de captura en los ensayos de la presente. El anticuerpo de captura, tal como se emplea en la presente, se une a un oligómero de A $\beta$  o a un complejo de oligómero de A $\beta$ /anticuerpo que se está midiendo y/o detectando en una muestra.

Según el kit y el método *in vitro*, el anticuerpo de captura es como se indica en las reivindicaciones; y el anticuerpo de detección se caracteriza porque reconoce un epítipo lineal N-terminal del péptido de beta-amiloides 1-42 que es 82E1.

Tal como se conoce en la técnica, un epítipo lineal es un epítipo en el que la secuencia primaria de aminoácidos incluye el epítipo reconocido. Un epítipo lineal generalmente incluye al menos 3, y de modo más habitual al menos 5, por ejemplo, aproximadamente 8 a aproximadamente 10 aminoácidos en una secuencia exclusiva. En realizaciones concretas de esta invención, el anticuerpo de captura y de detección reconocen ambos un epítipo lineal en el N-terminal del péptido A $\beta$ 1-42 y este epítipo lineal puede ser el mismo u otro diferente. En ciertas realizaciones, el epítipo lineal, o cada epítipo lineal, está localizado dentro de los restos 1-20 del péptido A $\beta$ 1-42, o en los 10, 11, 12, 15 o 20 restos aminoácidos N-terminales del amiloide  $\beta$ 1-42. En realizaciones concretas, un anticuerpo de la invención se une específicamente a un epítipo lineal dentro de los restos 1-5, 1-8, 1-10, 1-20, 3-8, o 3-10 del amiloide  $\beta$ 1-42 y este epítipo lineal puede ser el mismo u otro diferente para cada anticuerpo de captura y de detección.

El epítipo lineal de un anticuerpo puede cartografiarse con facilidad generando un conjunto de péptidos de cinco-diez aminoácidos solapantes de A $\beta$ 1-42, y determinando la unión del anticuerpo al conjunto de péptidos en un ensayo de unión competitiva, tal como un ensayo ELISA. Tras usar dicho ensayo, se ha determinado el epítipo lineal central de diversos anticuerpos comerciales. Basándose en los análisis presentados en la patente de EE. UU. n.º 7.780.963 y Horikoshi, *et al.* (2004), *supra*, los epítipos lineales de los anticuerpos descritos para ser utilizados

en la presente se indican en la tabla 1.

Tabla 1

Anticuerpo	Epitopo central	Secuencia del epitopo dentro de A $\beta$ 1-42	SEQ ID NO:
			DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
6E10	5-11	RHDSGYE	8
BAM-10	3-8	EFRHDS	9
4G8	xx-21	EVHHQKLVFFA	10
WO-2	3-8	EFRHDS	9
26D6	3-8	EFRHDS	9
2A10 <sup>a</sup>	3-8	EFRHDS	9
2B4 <sup>b</sup>	3-8	EFRHDS	9
4C2 <sup>a</sup>	3-8	EFRHDS	9
4E2 <sup>a</sup>	3-8	EFRHDS	9
2H4 <sup>c</sup>	1-8	DAEFRHDS	11
20C2 <sup>a</sup>	3-8	EFRHDS	9
2D6 <sup>a</sup>	3-8	EFRHDS	9
5F10 <sup>c</sup>	3-8	EFRHDS	9
1F4 <sup>a</sup>	*		
1F6 <sup>a</sup>	*		
2E12 <sup>a</sup>	3-10	EFRHDSGY	12
3B3 <sup>a</sup>	*		
82E1	1-5	DAEFR	13

La posición del epitopo central es con respecto a A $\beta$ 1-42. <sup>a</sup>IgG1, <sup>b</sup>IgG2b, <sup>c</sup>IgG2a. \*Se calcula que los epitopos están localizados en el N-terminal de A $\beta$ 1-42, puesto que pueden unirse al péptido A $\beta$ 1-20.

5 Se evaluó el anticuerpo 19.3 como reactivo de captura potencial para oligómeros de A $\beta$  en combinación con tres anticuerpos diferentes como anticuerpos de detección, 19.3, 7305 (es decir, 20C2, patente de EE. UU. n.º 7.780.963), y 82E1, tras su biotilación, en un ensayo ELISA de "sandwich". El 19.3 biotilado se estudió como anticuerpo de detección y se emparejó con 19.3 como anticuerpo de captura en un ensayo de epitopos solapantes. La presencia de epitopos solapantes sería indicativa de una construcción de A $\beta$  con múltiples epitopos, lo cual sugiere la presencia de un dímero o de oligómeros de A $\beta$  de orden superior. El ELISA de epitopo solapante de 19.3 x 19.3 tiene un límite de detección ("limit of detection", LoD) para oligómeros de A $\beta$  de 98 pg/ml. Los ELISA de "sandwich" para la pareja de anticuerpos 19.3 y 82E1 tienen un LoD de 1,3 pg/ml y un límite inferior de cuantificación fiable (LLoRQ) de 4,2 pg/ml para oligómeros de A $\beta$ , y la proporción de señal de oligómeros de A $\beta$ /monómeros de A $\beta$

10

es de aproximadamente 1000:1, lo cual demuestra que el ensayo es 1000 veces más selectivo para oligómeros de A $\beta$  frente al monómero A $\beta$ 40. Por tanto, aunque los anticuerpos de captura y de detección del kit y el método *in vitro* de esta descripción reconocen ambos la porción N-terminal de A $\beta$ 1-42, en ciertas realizaciones, el epitopo del anticuerpo de captura y de detección no se solapan o se solapan en menos de 3, 2, o 1 restos aminoácidos.

5 Para proporcionar especificidad por los oligómeros de A $\beta$ , realizaciones concretas de esta invención incluyen el uso de un anticuerpo de captura que reconoce un epitopo lineal y un epitopo conformacional. Este anticuerpo se describe en la presente como selectivo o específico de oligómeros de A $\beta$ . Tal como se conoce en la técnica, un epitopo conformacional es un epitopo en el que la secuencia primaria de los aminoácidos que comprenden el epitopo no es el único componente definitorio del epitopo reconocido. Generalmente, un epitopo conformacional incluye un número mayor de aminoácidos con relación a un epitopo lineal. Con respecto al reconocimiento de los epitopos conformacionales, el anticuerpo reconoce una estructura tridimensional del péptido o la proteína. Por ejemplo, cuando una molécula de proteína se pliega para formar una estructura tridimensional, ciertos aminoácidos y/o el esqueleto de polipéptido que forma el epitopo conformacional se juxtaponen, permitiendo que el anticuerpo reconozca el epitopo. Los métodos para determinar la conformación de epitopos incluyen, pero no se limitan, por ejemplo, a cristalografía de rayos x, espectroscopía de resonancia magnética nuclear bidimensional y marcaje de espín dirigido a sitio y espectroscopía de resonancia paramagnética de electrones. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology (1996), vol. 66, Morris (ed.).

Preferiblemente, un anticuerpo de captura que es selectivo para un oligómero de A $\beta$  tiene una afinidad mayor por los oligómeros A $\beta$ 1-42 o ADDL que por el monómero A $\beta$ 1-42, el monómero A $\beta$ 1-40, las placas y/o las fibrillas de beta-amiloides. Tal como se demuestra en la presente, la selectividad puede evaluarse empleando una diversidad de métodos *in vitro* que incluyen, pero no se limitan a ensayos de unión competitiva, tales como ensayos de ELISA unilateral, ELISA de "sandwich" o ELISA competitivo. Empleando estos ensayos (ejemplo 15 y figura 1), se ha descubierto que una serie de anticuerpos, por ejemplo, h3B3, 14.2, 7.2, 11.4, 13.1, 17.1, 19.3, 20C2, 2A10, 2B4, 2D6, 5F10, 4E2, 4C2, y WO-2, se unen selectivamente a oligómeros frente al monómero 1-40 y las fibrillas de beta-amiloides. Basándose en este análisis, un anticuerpo se define como específico para oligómeros de A $\beta$  si muestra una afinidad al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces mayor por oligómeros de A $\beta$  cuando se compara con uno o más del monómero A $\beta$ 1-42, monómero A $\beta$ 1-40, placas o fibrillas de beta-amiloides cuando se evalúa en un ensayo convencional, por ejemplo, BIACORE, KINEXA, o ELISA unilateral. En realizaciones concretas, la afinidad del anticuerpo de captura por oligómeros A $\beta$ 1-42, comparado con monómeros A $\beta$ 1-40, en un ensayo de unión competitiva es de al menos 500:1. En otras realizaciones, la afinidad del anticuerpo de captura por los oligómeros 1-42 de beta-amiloides, comparado con los monómeros 1-42 de beta-amiloides, en un ensayo ELISA de "sandwich" es al menos 500:1, al menos 600:1, al menos 700:1, al menos 800:1, al menos 900:1 o más preferiblemente al menos 1000:1.

Pueden emplearse variantes del anticuerpo h3B3 (concretamente, 14.2, 7.2, 11.4, 13.1, 17.1, 19.3), o variantes del anticuerpo 19.3 (concretamente, 19.3 N33S, 19.3 N33T, 19.3 N33A, 19.3 N33E, 19.3 N33D, 19.3 N33S-N35Q, 19.3 N33S-N35S, 19.3 N33S-N35T, 19.3 N33S-N35A, 19.3 N58Q, 19.3 N58S, 19.3 N58T, 19.3N35A) como anticuerpo de captura en el kit y el método *in vitro*. Por consiguiente, un anticuerpo de captura del kit y el método *in vitro* puede tener una región variable de cadena ligera con una CDR1 que tiene la secuencia Arg-Ser-Ser-Gln-Ser-Ile-Val-His-Ser-Xaa<sub>1</sub>-Gly-Xaa<sub>2</sub>-Thr-Tyr-Leu-Glu (SEQ ID NO:1), en la que Xaa<sub>1</sub> es Asn, Ser, Thr, Ala, Asp o Glu, y Xaa<sub>2</sub> es Asn, His, Gln, Ser, Thr, Ala, o Asp, una CDR2 que tiene la secuencia Lys-Ala-Ser-Xaa<sub>1</sub>-Arg-Phe-Ser (SEQ ID NO:2), en la que Xaa<sub>1</sub> es Asn, Gly, Ser, Thr, o Ala, y una CDR3 que tiene la secuencia Phe-Gln-Gly-Ser-Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Xaa<sub>5</sub> (SEQ ID NO:3), en la que Xaa<sub>1</sub> es Arg, Lys o Tyr, Xaa<sub>2</sub> es Val, Ala, o Leu, Xaa<sub>3</sub> es Pro, His, o Gly, Xaa<sub>4</sub> es Ala, Pro, o Val, y Xaa<sub>5</sub> es Ser, Gly, o Phe; y una región variable de cadena pesada con una CDR1 que tiene la secuencia Gly-Phe-Thr-Phe-Ser-Ser-Phe-Gly-Met-His (SEQ ID NO:4), una CDR2 que tiene la secuencia Tyr-Ile-Ser-Arg-Gly-Ser-Ser-Thr-Ile-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Thr-Val-Lys-Gly (SEQ ID NO:5), y una CDR3 que tiene la secuencia Gly-Ile-Thr-Thr-Ala-Leu-Asp-Tyr (SEQ ID NO:6). Por consiguiente, un anticuerpo de captura del kit y el método *in vitro* puede tener una región variable de cadena ligera con una CDR1 que tiene la secuencia Arg-Ser-Ser-Gln-Ser-Ile-Val-His-Ser-Xaa<sub>1</sub>-Gly-Xaa<sub>2</sub>-Thr-Tyr-Leu-Glu (SEQ ID NO:1), en la que Xaa<sub>1</sub> es Thr, Ala, Asp o Glu, y Xaa<sub>2</sub> es Asn, His, Gln, Ser, Thr, Ala, o Asp, o en la que Xaa<sub>1</sub> es Asn, Ser, Thr, Ala, Asp o Glu, y Xaa<sub>2</sub> es Thr, una CDR2 que tiene la secuencia Lys-Ala-Ser-Xaa<sub>1</sub>-Arg-Phe-Ser (SEQ ID NO:2), en la que Xaa<sub>1</sub> es Thr, y una CDR3 que tiene la secuencia Phe-Gln-Gly-Ser-Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Xaa<sub>5</sub> (SEQ ID NO:3), en la que Xaa<sub>1</sub> es Arg, Lys o Tyr, Xaa<sub>2</sub> es Val, Ala, o Leu, Xaa<sub>3</sub> es Pro, His, o Gly, Xaa<sub>4</sub> es Ala, Pro, o Val, y Xaa<sub>5</sub> es Ser, Gly, o Phe; y una región variable de cadena pesada con una CDR1 que tiene la secuencia Gly-Phe-Thr-Phe-Ser-Ser-Phe-Gly-Met-His (SEQ ID NO:4), una CDR2 que tiene la secuencia Tyr-Ile-Ser-Arg-Gly-Ser-Ser-Thr-Ile-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Thr-Val-Lys-Gly (SEQ ID NO:5), y una CDR3 que tiene la secuencia Gly-Ile-Thr-Thr-Ala-Leu-Asp-Tyr (SEQ ID NO:6).

El anticuerpo de captura del kit y el método *in vitro* puede ser un variante del anticuerpo h3B3 (concretamente, 14.2, 7.2, 11.4, 13.1, 17.1, 19.3). El anticuerpo de captura puede tener una región variable de cadena ligera con una CDR1 que tiene la secuencia Arg-Ser-Ser-Gln-Ser-Ile-Val-His-Ser-Asn-Gly-Asn-Thr-Tyr-Leu-Glu (SEQ ID NO:14), una CDR2 que tiene la secuencia Lys-Ala-Ser-Asn-Arg-Phe-Ser (SEQ ID NO:15), y una CDR3 de SEQ ID NO:3; y una región variable de cadena pesada con una CDR1 de SEQ ID NO:4, una CDR2 de SEQ ID NO:5, y una CDR3 de SEQ ID NO:6.

El anticuerpo de captura del kit y el método *in vitro* puede ser un variante del anticuerpo 19.3, en el que la CDR1 de

la región variable de cadena ligera ha sido mutada (concretamente, 19.3 N33S, 19.3 N33T, 19.3 N33A, 19.3 N33E, 19.3 N33D, 19.3 N33S-N35Q, 19.3 N33S-N35S, 19.3 N33S-N35T, 19.3 N33S-N35A). El anticuerpo de captura puede presentar una región variable de cadena ligera con una CDR1 de SEQ ID NO:1, una CDR2 de SEQ ID NO:15, y una CDR3 que tiene la secuencia Phe-Gln-Gly-Ser-Arg-Leu-Gly-Pro-Ser (SEQ ID NO:16); y una región variable de cadena pesada con una CDR1 de SEQ ID NO:4, una CDR2 de SEQ ID NO:5, y una CDR3 de SEQ ID NO:6.

El anticuerpo de captura del kit y el método *in vitro* puede ser un variante del anticuerpo 19.3, en el que la CDR2 de la región variable de cadena ligera ha sido mutada (concretamente, 19.3 N58Q, 19.3 N58S, 19.3 N58T, 19.3N35A). El anticuerpo de captura puede presentar una región variable de cadena ligera con una CDR1 de SEQ ID NO:14, una CDR2 de SEQ ID NO:2, una CDR3 de SEQ ID NO:16; y una región variable de cadena pesada con una CDR1 de SEQ ID NO:4, una CDR2 de SEQ ID NO:5, y una CDR3 de SEQ ID NO:6.

La CDR1 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo de captura puede tener la secuencia Arg-Ser-Ser-Gln-Ser-Ile-Val-His-Ser-Xaa<sub>1</sub>-Gly-Xaa<sub>2</sub>-Thr-Tyr-Leu-Glu (SEQ ID NO:1), en la que Xaa<sub>1</sub> es Thr, Ala, Asp o Glu, y Xaa<sub>2</sub> es Asn, His, Gln, Ser, Thr, Ala, o Asp; o en la que Xaa<sub>1</sub> es Asn, Ser, Thr, Ala, Asp o Glu, y Xaa<sub>2</sub> es Thr. La CDR1 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo de captura puede tener la secuencia Arg-Ser-Ser-Gln-Ser-Ile-Val-His-Ser-Xaa<sub>1</sub>-Gly-Xaa<sub>2</sub>-Thr-Tyr-Leu-Glu (SEQ ID NO:1), en la que Xaa<sub>1</sub> es Thr, Ala, Asp o Glu, y Xaa<sub>2</sub> es Thr. La CDR2 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo de captura puede tener la secuencia Lys-Ala-Ser-Xaa<sub>1</sub>-Arg-Phe-Ser (SEQ ID NO:2), en la que Xaa<sub>1</sub> es Thr.

Para facilitar la producción y potenciar la conservación y el uso del anticuerpo de captura en el kit y el método *in vitro* de esta descripción, ciertas realizaciones incluyen el uso de un anticuerpo de captura que muestra menos de una disminución en 10 número de veces en la CE<sub>50</sub>, en un ensayo basado en ELISA con oligómeros de Aβ, cuando se conservan a 40 °C durante 1 mes. Más preferiblemente, el anticuerpo de captura muestra una disminución en menos de 6 veces, 5 veces, 4 veces, 3 veces, o 2 veces en la CE<sub>50</sub> cuando se conserva a 40 °C durante 1 mes. La estabilidad del anticuerpo puede evaluarse como se describe en los ejemplos de la presente. En los ejemplos 7 y 9 se proporcionan anticuerpos que tienen dicha estabilidad a temperaturas elevadas.

Aunque el anticuerpo de detección reconoce un epitopo lineal localizado en el N-terminal de Aβ1-42, dicho anticuerpo puede o no unirse también a un epitopo conformacional. A este respecto, se han descrito una serie de anticuerpos que pueden emplearse como anticuerpo de detección en el kit y el método *in vitro*. Tal como se indica en la tabla 1, uno cualquiera de los anticuerpos 6E10, BAM-10, WO-2, 26D6, 2A10, 2B4, 4C2, 4E2, 2H4, 2D6, 5F10, 1F4, 1F6, 2E12 o 3B3 reconoce un epitopo lineal localizado en el N-terminal de Aβ1-42 y, por tanto, puede utilizarse en el kit y el método *in vitro*. Los anticuerpos 20C2 y 82E1 pueden utilizarse en el kit y el método *in vitro*. En ciertas realizaciones, el anticuerpo de detección se une a un epitopo N-terminal de 5 a 10 restos aminoácidos de Aβ1-42 que tiene la secuencia DAEFR (SEQ ID NO:13). El anticuerpo de detección, empleado en el kit y el método *in vitro* de la invención, es 82E1.

Para facilitar la detección de un complejo de anticuerpo de captura/oligómero de Aβ/anticuerpo de detección, ciertas realizaciones incluyen el uso de un anticuerpo de detección marcado. En la técnica se conoce una diversidad de marcadores y estos pueden adaptarse a la práctica de esta invención. Por ejemplo, se han descrito marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes y marcadores dispersores de luz (por ejemplo, partículas de oro coloidal). Véase, por ejemplo, Csaki *et al.* (2002), *Expert. Rev. Mol. Diagn.*, 2:187-93.

Los marcadores fluorescentes para su uso en esta invención incluyen, pero no se limitan a fluoróforos hidrófobos (por ejemplo, ficoeritrina, rodamina, ALEXA FLUOR™ 488, ALEXA FLUOR™ 546 y fluoresceína), proteína fluorescente verde ("green fluorescent protein", GFP) y sus variantes (por ejemplo, proteína fluorescente cian y proteína fluorescente amarilla), y puntos cuánticos. Véase, por ejemplo, Haughland (2003), *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, novena edición o edición en web, de Molecular Probes, Inc., o *The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, décima edición o edición en web (2006), de Invitrogen, para descripciones de fluoróforos que emiten a diversas longitudes de onda diferentes. Para el uso de puntos cuánticos como marcadores para biomoléculas, véase, por ejemplo, Dubertret, *et al.* (2002), *Science*, 298:1759; *Nature Biotech.* (2003),21:41-51. En realizaciones concretas, el marcador es un fluoróforo hidrófobo tal como ALEXA FLUOR™.

Pueden introducirse marcadores en el anticuerpo de detección por medio de técnicas establecidas en la técnica. Por ejemplo, están disponibles kits para marcar de modo fluorescente anticuerpos con diversos fluoróforos en Invitrogen Corp. De modo similar, las señales de estos marcadores (por ejemplo, la absorción y/o la emisión fluorescente de un marcador fluorescente) pueden detectarse mediante las técnicas ejemplificadas en la presente (concretamente, los sistemas ENVISION™ o ERENNA™, en los que el anticuerpo detector marcado fluorescente no se desacopla del complejo de ELISA de "sandwich" y posteriormente se detecta) o mediante fundamentalmente cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la detección de múltiples colores, la detección de FRET, la polarización de fluorescencia y similares, son muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, están disponibles citómetros de flujo, por ejemplo, en Becton-Dickinson y Beckman Coulter, y los sistemas LUMINEX 100 y LUMINEX HTS™ están disponibles en Luminex Corporation.



Para potenciar la sensibilidad del kit y del método *in vitro* de esta invención por los oligómeros de A $\beta$ , una realización de esta invención incluye el uso de un medio o sustrato para concentrar el complejo de antígeno-anticuerpo. Tal como se demuestra en la presente, se evalúa la actuación de dos parejas de anticuerpos en un sistema de detección de micropartículas paramagnéticas, de modo específico el sistema ERENNA™ (SINGULEX, Almeda, CA), que emplea la detección de un anticuerpo detector marcado fluorescente que se desacopla del complejo de ELISA de "sandwich". La actuación de un ELISA de "sandwich" de 19.3 x 82E1 se mejora, de tal modo que la pareja de anticuerpos 19.3 x 82E1 permite la detección de señales de oligómeros de A $\beta$  en muestras de CSF de AD a niveles mayores, comparado con muestras control de la misma edad o más jóvenes. De modo más específico, el ensayo de LoD mejora en aproximadamente treinta veces hasta 0,04 pg/ml, mientras que LoRQ mejora en diez veces hasta 0,42 pg/ml. De modo similar, la proporción de oligómeros de A $\beta$ /monómeros de A $\beta$  también mejoró hasta 5000:1. Por tanto, puede emplearse un medio o sustrato para concentrar un complejo de antígeno-anticuerpo para aumentar la sensibilidad del kit y del método *in vitro* de esta invención.

Los sustratos para concentrar complejos de antígeno-anticuerpo son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a superficies sólidas (por ejemplo, esferas), esferas poliméricas fluorescentes, esferas magnéticas, que pueden unirse al anticuerpo de captura.

Pueden unirse superficies sólidas, tales como esferas, al anticuerpo de captura, de modo que el complejo de anticuerpo de captura/oligómero de A $\beta$ /anticuerpo de detección puede concentrarse mediante centrifugación o filtración. Las esferas fluorescentes pueden prepararse, por ejemplo, introduciendo un tinte fluorescente en una partícula polimérica o acoplado covalentemente un tinte fluorescente a una partícula polimérica, y uniendo la partícula al anticuerpo de captura. Las micropartículas fluorescentes pueden analizarse de modo manual o mediante otros métodos conocidos en la técnica, pero preferiblemente empleando una técnica automática, por ejemplo, citometría de flujo, tal como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.665.024. La versatilidad de las partículas fluorescentes puede aumentar más mediante la incorporación de múltiples materiales fluorescentes en una única partícula. Como alternativa, pueden utilizarse partículas magnéticas, que incluyen partículas paramagnéticas y superparamagnéticas, para concentrar los complejos de antígeno-anticuerpo a través de un campo magnético. Estas partículas son muy conocidas en la técnica y, además de por sus propiedades magnéticas (es decir, magnéticas, paramagnéticas y superparamagnéticas), pueden clasificarse, por ejemplo, en tres categorías amplias basándose en su tamaño relativo descendente: marcadores magnéticos en partículas, marcadores magnéticos coloidales, y marcadores magnéticos moleculares; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.412.359. En ciertas realizaciones, el anticuerpo de captura se une a una micropartícula magnética como se describe en el método descrito en la presente.

Empleando el kit y el método *in vitro* de esta invención, se ha demostrado que el nivel de detección de los oligómeros 1-42 de beta-amiloides es menor que 5 pg/ml. En efecto, empleando dos anticuerpos antioligómeros de A $\beta$ , 19.3 y 82E1, junto con la detección de micropartículas paramagnéticas en un ensayo ELISA de "sandwich", se ha demostrado que pueden detectarse oligómeros de A $\beta$  en una muestra biológica hasta un límite de detección de 40 fg/ml. Por consiguiente, en algunas realizaciones de esta invención, el límite de detección del kit y del método *in vitro* de la invención es menor que 5 pg/ml, menor que 3 pg/ml, menor que 1 pg/ml, menor que 500 fg/ml, o menor que 100 fg/ml. En ciertas realizaciones, el límite de detección del kit y del método *in vitro* de la invención está en el intervalo de 40 fg/ml y 5 pg/ml.

La expresión "límite de detección" o "LoD", tal como se emplea en la presente, se refiere a la sensibilidad de los ensayos a la concentración más baja que puede detectarse por encima de una muestra que es idéntica, excepto por la ausencia de los oligómeros de A $\beta$ . La señal en ausencia de oligómeros de A $\beta$  se define como el "fondo." Tal como se emplea en la presente, el LoD para los oligómeros de A $\beta$  se define como  $\geq 3$  desviaciones estándar por encima del promedio del fondo. El "límite inferior de cuantificación fiable" o "LLOrQ", tal como se emplea en la presente, se refiere a la sensibilidad del ensayo en combinación con el coeficiente de variabilidad para indicar la concentración más baja que puede diferenciarse, de modo fiable y reproducible, del fondo. Este límite generalmente define el intervalo de trabajo práctico del ensayo en el extremo bajo de sensibilidad, y es la concentración que produce un coeficiente de variabilidad de  $\leq 20\%$  a través de  $\geq$  tres valores medidos.

Aunque se han encontrado oligómeros de A $\beta$  en muestras biológicas, en particular en el CSF (Georganopoulou, *et al.* (2005), *supra*; Klyubin, *et al.* (2008), *supra*), los límites asociados con los métodos de detección conocidos (que incluyen la sensibilidad y la selectividad) han impedido alcanzar este nivel de detección fiable, y mucho menos la cuantificación de los oligómeros de A $\beta$  para poder clasificar el estado de enfermedad del paciente o para desarrollar productos terapéuticos para AD. Por contraste, empleando el método *in vitro* de esta descripción, se demostró un aumento muy significativo en los oligómeros de A $\beta$  en muestras de AD clínicamente confirmadas, comparado con controles más jóvenes o de la misma edad. Estas mismas muestras se emplearon para medir los niveles de los monómeros A $\beta$ 1-42 y A $\beta$ 1-40 y se confirmó que, en las muestras de AD, el monómero A $\beta$ 1-42 se encontraba significativamente reducido comparado con los controles, mientras que los niveles del monómero A $\beta$ 1-40 permanecieron sin cambios. El ensayo ELISA de "sandwich" de oligómeros de A $\beta$  muestra unas correlaciones significativas entre la concentración de oligómeros de A $\beta$  y la actuación en un ensayo cognitivo ampliamente utilizado para medir la gravedad de la AD, conocido como minexamen del estado mental ("Mini-Mental State Exam", MMSE); cuanto mayor es la puntuación cognitiva (hasta un valor de 30, que es cognitivamente normal), menor es el nivel de oligómero de A $\beta$  en el CSF. Por consiguiente, en algunas realizaciones de esta invención, el método *in vitro*

y el kit se emplean para confirmar un diagnóstico o para diagnosticar la AD o la gravedad de la AD. Además, el kit y el método *in vitro* de esta invención pueden emplearse para identificar pacientes en un estadio temprano de la enfermedad (es decir, un ensayo de pronóstico).

5 Por tanto, esta invención también proporciona un método *in vitro* para detectar oligómeros de A $\beta$ . Según este método *in vitro*, se obtiene una muestra biológica que contiene oligómeros de A $\beta$  de un animal, preferiblemente un ser humano; la muestra biológica se pone en contacto con un anticuerpo de captura, tal como se describe en la presente, bajo condiciones suficientes para formar un complejo de anticuerpo de captura/oligómero de A $\beta$ ; el complejo de anticuerpo de captura/oligómero de A $\beta$  después se detecta empleando un anticuerpo de detección, tal como se describe en la presente. En otras realizaciones de este método *in vitro*, una muestra biológica procedente de un animal, preferiblemente de un ser humano, se pone en contacto con un anticuerpo de captura, tal como se describe en la presente, bajo condiciones suficientes para formar un complejo de anticuerpo de captura/oligómero de A $\beta$ ; el complejo de anticuerpo de captura/oligómero de A $\beta$  después se detecta empleando un anticuerpo de detección, tal como se describe en la presente. Los términos "muestra biológica" o "muestra de fluido", tal como se emplean en la presente, se refieren a cualquier tipo de fluido, comparado con un tejido o un vertebrado. Los ejemplos típicos que pueden emplearse en los ensayos de la presente son sangre, orina, lágrimas, saliva y fluido cerebroespinal, que se emplea en una realización de la invención. También puede utilizarse el resto de tipos de fluidos corporales, si están presentes oligómeros de A $\beta$ . Sin embargo, en realizaciones concretas, la muestra biológica es CSF.

20 Este método *in vitro* es un ensayo de unión competitiva sensible y selectivo, tal como un ensayo ELISA de "sandwich", que detecta y cuantifica los oligómeros de A $\beta$  endógenos en muestras biológicas, tales como muestras de CSF procedentes de individuos con AD e individuos control humanos. Aunque la enfermedad de Alzheimer o AD se describe en concreto en la presente como un trastorno que puede diagnosticarse empleando el kit y el método *in vitro* según las reivindicaciones, el espectro de demencias o el deterioro cognitivo que resulta de la degradación neuronal asociada con la formación de oligómeros de A $\beta$  o la formación o el depósito de placas o madejas neurofibrilares de A $\beta$  incluye, pero no se limita a síndrome de Down, demencia de cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer preclínica, deterioro cognitivo suave debido a la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Alzheimer de aparición temprana (EOD), enfermedad de Alzheimer familiar (FAD), deterioro cognitivo avanzado de la demencia debido a la enfermedad de Alzheimer (Jack, *et al.* (2011), *Alzheimer's Dement.*, 7(3):257-262), y enfermedades asociadas con la presencia del alelo ApoE4. Por tanto, el kit y el método *in vitro* pueden utilizarse en el diagnóstico de una cualquiera de estas enfermedades o trastornos.

La invención se describirá con más detalle mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

### Ejemplo 1: Preparación de A $\beta$

A $\beta$ 1-40 y A $\beta$ 1-42 (péptido 1-40 de  $\beta$ -amiloide, péptido 1-42 de  $\beta$ -amiloide) se obtuvieron en American Peptide Co. (Sunnyvale, CA).

35 *Preparación de los monómeros.* Para generar preparaciones de monómeros, A $\beta$ 1-40 o A $\beta$ 1-42 se disolvieron en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para eliminar cualquier estructura secundaria preexistente que pudiera actuar como "semilla" para la agregación. El HFIP se retiró mediante evaporación para formar una película de péptido A $\beta$ 1-40 o A $\beta$ 1-42. La película de péptido A $\beta$ 1-40 o A $\beta$ 1-42 a temperatura ambiente se disolvió en 2 ml de tampón borato 25 mM (pH 8,5) por mg de péptido, se dividió en partes alícuotas y se congeló a -70 °C hasta su uso.

40 *Preparación de ADDL.* La película de péptido A $\beta$ 42 film (1 mg de A $\beta$ 42 secado desde 100% de disolvente HFIP) se disolvió en 44  $\mu$ l de DMSO, a los cuales se le añadieron 1956  $\mu$ l de medio F12 frío (GIBCO®, Invitrogen, Carlsbad, CA) con mezclado suave. La mezcla se incubó a la temperatura ambiente durante 18 a 24 horas. Las muestras se centrifugaron a 14.200 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se trasladó a un tubo nuevo y se filtró a través de una columna de 0,5 ml de tubos de filtro YM-50 (Millipore, Bedford MA; 0,5 ml) mediante centrifugación a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El retenido se recogió invirtiendo el inserto del filtro, se introdujo en un nuevo tubo de recolección y se centrifugó a 4.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. La concentración de proteínas se midió antes de la filtración mediante un ensayo Bradford (BioRad, Hércules, CA) y se indica como  $\mu$ M (calculado basándose en el peso molecular del monómero de A $\beta$  (P.m. 4513)). Todas las muestras se conservaron a -80 °C hasta su uso.

45 *Preparación de ADDL biotinilados (bADDL).* Se prepararon bADDL empleando el mismo método descrito para los ADDL, con péptido 1-42 de A $\beta$  biotinilado en el N-terminal (American Peptide, Sunnyvale, CA) como material de partida.

50 *Preparación de fibrillas.* Las preparaciones de fibrillas se realizaron añadiendo 2 ml de ácido clorhídrico 10 mM por mg de película de péptido A $\beta$ 1-42. La disolución se mezcló en un mezclador de vórtice a la velocidad más baja durante cinco a diez minutos, y la preparación resultante se conservó a 37 °C durante 18 a 24 horas antes del uso.

**Ejemplo 2: Preparación de anticuerpos 3B3 madurados por afinidad**

*Inmunoadsorción de un banco de anticuerpos humanizados.* Se construyó un banco madurado por afinidad del anticuerpo anti-ADDL humanizado h3B3, (véanse las patentes de EE. UU. n.ºs 7.811.563 y 7.780.963), en el que parte de la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera se sometió a una mutagénesis aleatoria. Para cubrir la región CDR3 completa, se construyeron dos sub-bancos. Un banco estaba compuesto de la región variable de cadena pesada de origen y aminoácidos mutados en la mitad izquierda de la CDR3 de cadena ligera, y el otro en la mitad derecha de la CDR3 de cadena ligera. Se empleó una estrategia similar para la mutagénesis aleatoria de las CDR de cadena pesada con tres sub-bancos.

El 3B3 humanizado se sometió a una maduración por afinidad empleando métodos conocidos en la técnica. Las regiones variables de h3B3 se clonaron en un vector de presentación de Fab (pFab3D). En este vector, las regiones variables de las cadenas pesada y ligera se insertaron dentro de marco para que se correspondieran con el dominio CH1 de la región constante y la región constante kappa, respectivamente. En Fab3D, el epitopo myc y seis restos aminoácidos de histidina consecutivos siguen a la secuencia CH1, que después se une a la proteína de fago pIII para su presentación. Todas las posiciones en las CDR3 de cadena pesada y ligera se mutagenizaron aleatoriamente empleando secuencias de oligonucleótidos degenerados incorporadas en los cebadores de PCR. Para adaptarse al tamaño físico se construyeron los sub-bancos, y cada uno de ellos se centra en 5-6 restos aminoácidos. Se empleó el vector de ADN de h3B3 como ADN molde para amplificar las cadenas pesada y ligera con los cebadores de PCR mutados (tabla 2). Después de la amplificación con PCR, los fragmentos de ADN sintetizados se separaron en un gel de agarosa al 1,3%, los cebadores se retiraron y los fragmentos variables se digirieron con enzimas de restricción: sitios de clonación *BsWI* y *XbaI* para la clonación de la región variable de cadena ligera, *XhoI* y *Apal* para la clonación de la región variable de cadena pesada.

Tabla 2

Banco de maduración por afinidad 3B3	Cebador	Secuencia del cebador	SEQ ID NO:
Bancos de cadena ligera	Directo	tatggcttctagagatggtgatg	17
	Inverso	tgcagccaccgtacgcttgatctcc agcttggtgccctggccaaaggtgg ggggca cmnnmnnmnnmnnmnnngca gtagtag	18
		tgcagccaccgtacgcttgatctcc agcttggtgccctggccaaamnnmn nmnnmnnmngctgccctgg	19
Bancos de cadena pesada	Directo	aggggccctcgaggaggtgcagc	20
	Inverso	agaccgatgggcccttggtggaggc gctggacacggtcaccaggggtgcc tggccccamnnmnnmnnmnnmnnngg tgatgcc	21
		agaccgatgggcccttggtggaggc gctggacacggtcaccaggggtgcc tggccccagtagtccagmnnmnnmn nmnnmnnccgggcacag	22
M = A/C, N = A/C/G/T.			

Para construir un banco de maduración por afinidad en el vector de presentación de fagos pFab3D, el ADN de pFab3D-3B3 se digirió con la misma pareja de enzimas de restricción, se purificó, y los fragmentos de PCR para las regiones variables de cadena pesada o ligera se acoplaron con ligasa T4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante la noche a 16 °C. Los productos del acoplamiento después se transfetaron en células competentes para la electroporación TG1 de *E. coli* (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA), y partes alicuotas del cultivo

bacteriano se cultivaron en placas de agar LB-carbenicilina (50 µg/ml) para titular el tamaño del banco. Los cultivos remanentes se cultivaron en una placa grande con carbenicilina y se incubaron a 30 °C durante la noche para obtener una disolución madre del banco de *E. coli* o se infectaron con el fago auxiliar M13K07 (Invitrogen, Carlsbad, CA; 10<sup>11</sup> pfu/ml) mediante una incubación a temperatura ambiente y 37 °C durante diez minutos. Después se añadió medio 2TY con carbenicilina (50 µg/ml) y el cultivo se incubó a 37 °C durante una hora con agitación. Después se añadió kanamicina (70 µg/ml) y los cultivos se dejaron crecer durante la noche a 30 °C con agitación. El sobrenadante del cultivo de fagos se tituló y se concentró mediante precipitación con PEG (polietilenglicol) al 20% (en v/v)/NaCl, se resuspendió en PBS, se esterilizó con un filtro de 0,22 µm, y se formaron partes alícuotas para la inmunoadsorción del banco de fagos.

Después se realizó la inmunoadsorción del banco de fagos como se resume en la tabla 3.

Tabla 3

Rondas de inmunoadsorción	Ronda 1	Ronda 2	Ronda 3	Ronda 4
Concentración de antígeno	180 nM	60 nM	20 nM	10 nM

La entrada de fagos desde los bancos de fagos de presentación de Fab (100 µl, aproximadamente 10<sup>11-12</sup> pfu) se bloqueó con 900 µl de disolución de bloqueo (leche desnatada en polvo al 3% en PBS) para reducir la unión no específica a la superficie del fago. Se prepararon esferas revestidas con estreptavidina recogiendo 200 µl de la suspensión de esferas en un separador magnético y eliminando los sobrenadantes. Las esferas después se suspendieron en 1 ml de disolución de bloqueo y se introdujeron en un mezclador rotatorio durante 30 minutos. Para eliminar el fago de unión a estreptavidina no específico, el banco de fagos bloqueado se mezcló con las esferas revestidas de estreptavidina bloqueadas y se colocaron en un mezclador rotatorio durante treinta minutos. Las suspensiones de fagos del proceso de desección se trasladaron a un nuevo tubo y se añadieron 200 µl de antígeno, bADDL al 10%, y se incubó durante dos horas para la unión del antígeno y el anticuerpo. Después de la incubación, la mezcla se añadió a las esferas revestidas con estreptavidina bloqueadas y se incubó en un mezclador rotatorio durante una hora para capturar el complejo de antígeno/anticuerpo sobre las esferas de estreptavidina. Las esferas con los complejos de bADDL al 10%/fago capturado se lavaron cinco veces con PBS/TWEEN 20 al 0,05% y después dos veces solo con PBS. Los fagos unidos se eluyeron de bADDL con 200 µl de TEA 100 mM y se incubaron durante veinte minutos. El fago eluido después se trasladó a un tubo de 50 ml, se neutralizó con 100 µl de Tris-HCl 1 M, pH 7,5, y se añadió a 10 ml de células *E. coli* TG1 con una DO600 nm de entre 0,6-0,8. Después de una incubación a 37 °C con agitación durante una hora, partes alícuotas del cultivo se cultivaron en placas de agar LB-carbenicilina (50 µg/ml) para titular el número de fagos de salida, y el resto de las bacterias se centrifugaron y se suspendieron en 500 µl de medio 2xYT (Teknova, Hollister, CA), se cultivaron en placas de bioensayo de agar YT (Teknova, Hollister, CA) que contenían ampicilina 100 µg/ml y glucosa al 1%. Las placas de bioensayo se cultivaron durante la noche a 30 °C.

Después de cada ronda de inmunoadsorción se escogieron aleatoriamente colonias individuales para producir fagos en placas de 96 pocillos. El procedimiento para la preparación de los fagos en placas de 96 pocillos es similar al descrito anteriormente, excepto que no se empleó la etapa de precipitación de fagos. Las placas de cultivo que contienen las colonias cultivadas en 120 µl de medio 2xYT (16 g de BACTO-triptona, 10 g de BACTO-extracto de levadura, 5 g de NaCl (todos de BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), ddH<sub>2</sub>O hasta 1 l) con ampicilina 100 µg/ml y glucosa al 0,1% se cultivaron durante la noche en un agitador HIGRO (Genomic Solutions, Ann Arbor, MI) a 30 °C con agitación a 450 rpm. Los sobrenadantes de fagos (aproximadamente 100 µl) se emplearon directamente para el análisis en el ELISA de unión de ADDL. La unión del fago a los ADDL se detectó con un anticuerpo anti-M13 conjugado con peroxidasa de rábano ("horseradish peroxidase", HRP) (Amersham Bioscience, GE Healthcare, Waukesha, WI).

### Ejemplo 3: Selección de anticuerpos 3B3 madurados por afinidad

A partir de la maduración por afinidad de la cadena ligera, un panel de siete clones (11.4, 17.1, 14.2, 13.1, 19.3, 7.2 y 9.2) mostraron unas potentes actividades de unión a ADDL cuando se comparan con h3B3 en un ELISA de fagos/Fab. La tabla 4 muestra la similitud de aminoácidos de los clones seleccionados a partir del banco de maduración por afinidad de la cadena ligera con relación al anticuerpo de origen, h3B3.

Tabla 4

Anticuerpo	11,4	17,1	14,2	13,1	19,3	7,2	9,2	LC de h3B3 humanizado
11.4	-	98	98	96	96	96	97	97
17.1	-	-	98	96	97	96	97	97
14.2	-	-	-	96	97	98	98	98
13.1	-	-	-	-	97	97	97	96
19.3	-	-	-	-	-	96	97	96
7.2	-	-	-	-	-	-	98	96
9.2	-	-	-	-	-	-	-	97

La tabla 5 resume las secuencias de aminoácidos en la CDR3 de la cadena ligera ("light chain", LC) de los clones seleccionados, comparado con la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo de origen, h3B3.

5 Tabla 5

Anticuerpo	Secuencia CDR3 de LC	SEQ ID NO:
h3B3 (de origen)	FQGSHVPPT	23
19.3	FQGSRLGPS	16
17.1	FQGSRVPAS	24
14.2	FQGSRVPPG	25
13.1	FQGSKAHPS	26
7.2	FQGSYAPPG	27
9.2	FQGSRAPPF	28
11.4	FQGSRVVVR	29

La tabla 6 proporciona la secuencia de una porción (posiciones 21-117) de las regiones variables de cadena ligera (LCVR) para los clones seleccionados y el anticuerpo de origen, h3B3. La CDR3 de clon se muestra en negrita.

Tabla 6

Ab	Secuencia de LCVR	SEQ ID NO:
h3B3	PASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKASNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYC <b>FQGSHPPT</b> FGQGT KLEIK	30
19.3	PASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKASNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYC <b>FQGSRLGPS</b> FGQGT KLEIK	31
17.1	PASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKASNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYC <b>FQGSRVPAS</b> FGQGT KLEIK	32
14.2	PASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKASNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYC <b>FQGSRVPPG</b> FGQGT KLEIK	33
13.1	PASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKASNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYC <b>FQGSKAHPS</b> FGQGT KLEIK	34
7.2	PASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKASNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYC <b>FQGSYAPPG</b> FGQGT KLEIK	35
9.2	PASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKASNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYC <b>FQGSRAPPF</b> FGQGT KLEIK	36
11.4	PASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKASNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYC <b>FQGSRVVPR</b> FGQGT KLEIK	37

#### Ejemplo 4: Conversión de IgG de anticuerpos 3B3 madurados por afinidad

5 Los siete clones de Fab principales (11.4, 17.1, 14.2, 13.1, 19.3, 7.2 y 9.2) se seleccionaron para la conversión de IgG. Las IgG convertidas se expresaron empleando vectores con una base de plásmido. Los vectores de expresión se construyeron de modo que todos contenían los componentes necesarios, excepto las regiones variables. En los vectores básicos, la expresión de las cadenas ligera y pesada es dirigida por el promotor de CMV humano y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Para los siete clones seleccionados para la conversión de IgG, la región variable de cadena pesada se condensó dentro de marco con una región constante de cadena pesada de IgG2 humana (SEQ ID NO:38 y 39), mientras que la región variable de cadena ligera se condensó dentro de marco con la región constante de cadena ligera kappa (SEQ ID NO:40 y 41). Las secuencias conductoras de cadena pesada (SEQ ID NO:42 y 43) y ligera (SEQ ID NO:44 y 45), que median en la secreción de los anticuerpos hacia el medio de cultivo, también se condensaron dentro de marco con las consiguientes regiones variables. Para los vectores de expresión de cadena pesada, la región constante puede seleccionarse a partir de una subclase de isotipo diferente, por ejemplo, IgG1 o IgG2. Entre la secuencia conductora y la región constante, se introducen las secuencias intergénicas que contienen las secuencias de clonación para una fusión dentro de marco perfectamente integrada de la región variable que se va introducir con la secuencia conductora en su extremo 5' y la región constante en su extremo 3' empleando una estrategia de clonación IN-FUSION (Clontech, Mountain View, CA). Se empleó el kit de clonación de PCR IN-FUSION Dry-Down (Clontech, Mountain View, CA) para la amplificación con PCR de las regiones variables. El kit de clonación Dry-Down contiene todos los componentes necesarios para la reacción de PCR. Se añadieron los cebadores de PCR y los ADN molde. Los vectores de expresión portan oriP del genoma vírico de EBV. La pareja oriP/EBNA1 se emplea a menudo para prolongar la presencia del vector de expresión dentro de las células transfectadas y se utiliza mucho para la extensión de la duración de la expresión

10

15

20

(Lindner, *et al.* (2007), Plasmid, 58:1-12) para la expresión prolongada en células 293EBNA, secuencias bacterianas para un marcador de selección de kanamicina, y un origen de la replicación en *E. coli*. Cuando se insertan las regiones variables, las IgG son directamente expresadas en células de mamífero. Todas las regiones variables de cadena pesada de la presente se clonaron en un vector de expresión de IgG1 (pVI JNSA-BF-HCG1) y las regiones variables de cadena ligera se clonaron en un correspondiente vector de expresión de kappa o lambda (pVI JNSA-GS-FB-LCK).

#### Ejemplo 5: Clonación y expresión del anticuerpo 3B3 madurado por afinidad

Los siete clones principales (11.4, 17.1, 14.2, 13.1, 19.3, 7.2 y 9.2) se produjeron como anticuerpos monoclonales y se purificaron para su posterior caracterización. El procedimiento de clonación para los vectores de expresión de anticuerpos resultantes fue el siguiente. Las regiones variables se amplificaron con PCR, en la que las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 25  $\mu$ l que contenía una mezcla maestra de PCR de alta fidelidad, el molde (1  $\mu$ l), y los cebadores directos e inversos (1  $\mu$ l de cada uno). Condiciones de la PCR: 1 ciclo de 94 °C, 2 minutos; 25 ciclos de 94 °C, 1,5 minutos; 60 °C, 1,5 minutos; 72 °C, 1,5 minutos, y 72 °C, 7 minutos; 4 °C hasta la retirada. Los productos de la PCR después se digirieron con *DpnI* y se purificaron con el kit de placa QIAQUICK (Qiagen, Venlo, Países Bajos). Se reasociaron cien nanogramos de los correspondientes vectores de cadena pesada o de cadena ligera previamente linealizados con 10 ng del fragmento de PCR con una reacción IN-FUSION (kit de clonación IN-FUSION Dry-Down, Clontech, Mountain View, CA). La mezcla de reacción se transformó en células XL2 Blue MRF' competentes y se cultivaron durante la noche en placas de agar que contenían kanamicina 50  $\mu$ g/ml. Las construcciones de cadena ligera se digirieron con *HindIII* + *NotI* y las construcciones de cadena pesada se digirieron con *AspI* + *HindIII* para comprobar la estructura mediante análisis de restricción. Las secuencias de ADN de todos los clones se confirmaron mediante análisis de secuencia.

Las construcciones de ADN de cadena ligera y de cadena pesada con la secuencia confirmada se transfectaron en células 293 FREESTYLE™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células 293 FREESTYLE™ se transfectaron empleando 293 transfectina (Invitrogen, Carlsbad, CA). La monocapa de células EBNA se transfectó utilizando reactivos de transfección a base de polietilenimina. Las células transfectadas se incubaron a 37 °C/5% de CO<sub>2</sub> durante siete días en medio sin suero OPTI-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA). El medio se recogió, se centrifugó, se filtró a través de un sistema de filtración de 0,22  $\mu$ m (Millipore, Billerica, MA), y después se concentró mediante un filtro de centrifuga CENTRICON™ (Millipore, Billerica, MA). El medio concentrado se mezcló 1:1 con tampón de unión (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL), y después se cargó sobre una columna de proteína A/G preequilibrada (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) o HI-TRAP rProteína A FF (GE Healthcare, Waukesha, WI). La columna cargada se lavó con tampón de unión y se eluyó con tampón de elución (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). El anticuerpo eluido se neutralizó inmediatamente y se dializó contra tampón PBS durante la noche. El anticuerpo dializado se concentró con un filtro de centrifuga AMICON (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) y se determinó la concentración de proteínas a DO280 nm con un coeficiente de extinción de 1,34 mg/ml. El anticuerpo purificado se analizó empleando SDS-PAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA), o LABCHIP™ de proteínas (Caliper LifeSciences, Hopkinton, MA). La SDS-PAGE se realizó bajo condiciones no reductoras.

#### Ejemplo 6: Caracterización de los anticuerpos 3B3 madurados por afinidad

*ELISA*. Los anticuerpos anti-ADDL seleccionados, es decir, los anticuerpos derivados del anticuerpo de origen h3B3, primero se evaluaron en un ELISA de A $\beta$  de tres enfoques para evaluar la unión del anticuerpo al monómero de A $\beta$ , ADDL, y A $\beta$  fibrilar. La IgG anti-ADDL policlonal (M90/1; Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX) se cultivó en placa a 0,25 mg/pocillo en tiras IMMULON 3 REMOVAWELL™ (Dynatech Labs, Chantilly, VA) durante 2 horas a temperatura ambiente, y los pocillos se bloquearon con BSA al 2% en TBS. Se añadieron las muestras (A $\beta$  monomérico, ADDL, o A $\beta$  fibrilar) diluidas con BSA al 1% en F12 a los pocillos, se dejó que se unieran durante 2 horas a 4 °C, y se lavaron 3X con BSA/TBS a temperatura ambiente. Los anticuerpos monoclonales diluidos en BSA/TBS se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente y se detectaron con un kit VECTASTAIN® ABC contra IgG de ratón. El marcador de HRP se visualizó con un sustrato de peroxidasa BIO-RAD y se leyó a 405 nm en un lector de microplacas Dynex™ MRX-TC.

Tal como se muestra en la figura 1, con la excepción del anticuerpo 9.2, todos los anticuerpos anti-ADDL mostraron una unión preferente a ADDL con relación a h3B3, los comparadores selectivos (Comp 1 y 3: se unen solo a ADDL) y no selectivos (Comp 2: se une a todas las formas de A $\beta$  evaluadas), y un control (sin anticuerpo). El anticuerpo 9.2 muestra poca unión a todas las formas de A $\beta$ , lo cual sugiere que su afinidad de unión se vio afectada de modo adverso durante la conversión de IgG y/o la producción de anticuerpos. En la tabla 7 se presenta un resumen de la proporción de la unión de los anticuerpos a ADDL:monómero y ADDL:fibrilar en este ensayo.

Tabla 7

Anticuerpo	ADDL:monómero	ADDL:fibrilar
h3B3	3,2	2,2
14.2	4,2	2,3
7.2	3,2	2,1
11.4	2,4	2,4
9.2	4,0	0,5
13.1	2,4	2,0
17.1	3,2	2,1
19.3	2,5	2,0

Se generó una curva de titulación total para cada anticuerpo y h3B3 para determinar su afinidad de unión por ADDL, comparado con el monómero de A $\beta$ . Se añadieron ADDL biotinilados (50 pmol/pocillo) o monómero A $\beta$ 1-40 (100 pmol/pocillo) a una placa revestida con estreptavidina de alta capacidad (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron en PBS con TWEEN al 0,05% (seis veces) y después con PBS solo (tres veces) antes de bloquear los pocillos con leche en polvo desnatada al 5% en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Los pocillos después se lavaron y se añadió una dilución en serie de muestras de anticuerpo a las placas y se dejó que se uniesen durante dos horas a temperatura ambiente. Después de la incubación y de un lavado, se detectó la unión del anticuerpo con un anticuerpo secundario anti-Fc-IgG humana de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (1:1000; una hora a temperatura ambiente). El marcador de HRP se visualizó con tetrametilbencidina (Virolabs, Chantilly, VA) como sustrato y se leyó a 450 nm en un lector de microplacas. Este análisis confirmó que seis de los siete anticuerpos madurados por afinidad mostraron una unión preferente a ADDL. Véase la figura 2, que compara la unión preferente de h3B3 y 19.3 a ADDL frente a A $\beta$ 1-40 monomérico.

*Ensayo de unión basado en células.* Se ha demostrado que algunos de los anticuerpos anti-ADDL presentan una unión preferente a ADDL, pero no pueden evitar la unión de ADDL a neuronas primarias del hipocampo (Shughrue, *et al.* (2010), *Neurobiol. Aging*, 31:189-202). Para demostrar que los anticuerpos anti-ADDL pueden bloquear la unión de ADDL a neuronas, se realizó un ensayo de unión basado en células. Los anticuerpos anti-ADDL se mezclaron con bADDL 500 nM, con unas concentraciones finales del anticuerpo que varían de 1,8 nM a 450 nM. Como control, la misma concentración de anticuerpo desnaturalizado con calor (98 °C durante 30 minutos) se mezcló con bADDL. Las mezclas de anticuerpo-bADDL se incubaron en tubos de microcentrifuga siliconizados (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA) a 37 °C durante una hora con rotación constante de extremo a extremo a baja velocidad. Las mezclas después se aplicaron a cultivos corticales y/o de hipocampo primarios y se incubaron a 37 °C durante una hora. La incubación terminó retirando el medio de cultivo. Las células se sometieron a tratamientos de fijación y postfijación. Después las células se incubaron con fosfatasa alcalina (AP) conjugada con estreptavidina a 4 °C durante la noche, se lavaron cinco veces con PBS y se hicieron reaccionar con el sustrato quimioluminiscente TROPIC CDP-Star (Life Technologies, Carlsbad, CA) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se midió la intensidad de unión de bADDL y se registró con un lector de microplacas ENVISION (PerkinElmer, Waltham, MA).

Los resultados de este estudio demuestran que los anticuerpos anti-ADDL de la presente, de modo específico el anticuerpo 19.3, reducen notablemente la unión de ADDL a las neuronas (figura 3). Sin embargo, se observó una marcada reducción en la actividad del anticuerpo en este ensayo cuando los anticuerpos se desnaturalizaron con calor (figura 3).

*Unión a FcRn in vitro de anticuerpos anti-ADDL.* Para caracterizar la capacidad de los anticuerpos anti-ADDL para unirse y disociar FcRn humana inmovilizada, los siete anticuerpos anti-ADDL variantes de h3B3 se evaluaron en un ensayo de unión de FcRn BIACORE, un sistema sustituto empleado para evaluar la PK de anticuerpo y predecir la semivida terminal ( $t_{1/2}$ ) de anticuerpos en primates no humanos. Brevemente, la proteína FcRn humana purificada se inmovilizó sobre un chip biodetector BIACORE CM5 y se empleó PBSP (NaPO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 150 mM y TWEEN 20 al 0,05% (en v/v)), pH 7,3, como tampón de ensayo. Los anticuerpos monoclonales se diluyeron con PBSP, pH 6,0, hasta 100 nM, se dejó que se unieran a FcRn durante 3 minutos hasta alcanzar el equilibrio y se disociaron en



tampón de ensayo a pH 7,3. Se insertó un punto indicador (estabilidad) a los 5 segundos tras finalizar la unión del anticuerpo y se calculó el "porcentaje unido" como  $RU_{estabilidad}/RU_{unión}$  (%). Este análisis indicó que los anticuerpos monoclonales (mAb) con idéntica secuencia de Fc, pero diferentes dominios Fab, pueden unirse y disociarse de FcRn con considerables diferencias.

- 5 Se realizó una comparación de los siete anticuerpos anti-ADDL variantes de h3B3, junto con h3B3, dos anticuerpos que prefieren ADDL (Comp 1 y 3) y un comparador no selectivo (Comp 2: se une a todas las formas de Aβ evaluadas) en el ensayo de unión a FcRn. Se generó un sensograma (figura 4) que muestra la unión inicial del anticuerpo a pH 6,0 y después la disociación del anticuerpo a pH 7,3 en 180 segundos. Tal como se muestra en la figura 4, existe una diferencia apreciable entre h3B3 y los otros anticuerpos ensayados. Mientras que un alto porcentaje de h3B3 se unió a FcRn, los siete anticuerpos anti-ADDL descritos en la presente, así como los dos anticuerpos comparadores, mostraron una unión considerablemente más baja.

**Ejemplo 7: Afinidad de unión del anticuerpo anti-ADDL 19.3**

15 El anticuerpo madurado por afinidad 19.3 se seleccionó para su posterior caracterización. Se determinó la secuencia de ADN completa y la secuencia de aminoácidos deducida para la región variable de la cadena ligera. Se realizaron análisis BIACORE™ (GE Healthcare, Waukesha, WI) y KINEXA™ (Sapidyne, Boise, ID) para determinar la afinidad de unión del anticuerpo anti-ADDL 19.3 a ADDL y para determinar la selectividad de 19.3 por ADDL frente al monómero de Aβ. Las tecnologías basadas en BIACORE™ y KINEXA™ se emplean mucho para la medición de la afinidad de unión entre macromoléculas, tales como anticuerpos y dianas de proteínas.

20 *BIACORE™*. En la tecnología de la resonancia de plasmón de superficie ("Surface Plasmon Resonance", SPR) en la que basa BIACORE™, las mediciones cuantitativas de la interacción de unión entre una o más moléculas dependen de la inmovilización de una molécula diana a la superficie de un chip detector. Los compañeros de unión a la diana pueden capturarse a medida que pasan sobre el chip. La SPR detecta cambios en la masa en la capa acuosa cercana a la superficie del chip detector midiendo los cambios en el índice de refracción. Cuando las moléculas en la disolución de ensayo se unen a una molécula diana, la masa aumenta ( $k_a$ ), y cuando se disocian la masa disminuye ( $k_d$ ). Este sencillo principio es la base del sensograma, es decir, el control continuo a tiempo real de la asociación y la disociación de las moléculas que interaccionan. El sensograma proporciona información cuantitativa a tiempo real sobre la especificidad de unión, la concentración activa de moléculas en una muestra, la cinética y la afinidad.

30 *KINEXA™*. La tecnología KINEXA™ (Sapidyne Instruments, Boise, Idaho) mide las constantes de unión para caracterizar los acontecimientos de unión biomoleculares en la fase de disolución, no los acontecimientos de unión entre una fase de disolución y una fase sólida. En disolución, los acontecimientos de unión alcanzan el equilibrio después de una incubación suficiente. Las moléculas no unidas se cuantifican con una titulación, que refleja la porción de moléculas unidas a los compañeros. El método KINEXA no requiere la modificación de las moléculas que se están estudiando. Con KINEXA™, la reacción que se está midiendo se produce entre moléculas no modificadas en disolución. Por tanto, se eliminan los problemas con respecto a cómo la modificación altera las reacciones de unión "nativas". El método KINEXA permite un mayor intervalo de constantes de unión tan estrecho como  $10^{-13}$  M. El programa informático de KINEXA realiza el análisis de los datos, que se basan en soluciones exactas a ecuaciones de unión clásicas (matemática de la  $K^d$ ), y no aproximaciones de pseudoprimer orden. KINEXA no requiere manipulaciones de datos arbitrarias ni selecciones de intervalos.

40 Tal como se muestra en la tabla 8, el anticuerpo 19.3 tiene una afinidad de 4,8 nM por los ADDL, comparado con una afinidad de 150 nM por el monómero de Aβ en el ensayo BIACORE™. La selectividad treinta veces mayor del anticuerpo 19.3 por los ADDL frente al monómero de Aβ fue muchísimo mejor que la observada para el anticuerpo de origen, h3B3, que muestra una preferencia de tan solo 10 veces por los ADDL frente al monómero de Aβ.

Tabla 8

Anticuerpo	ADDL (nM)	Aβ1-40 (nM)	Proporción (monómero de Aβ/ADDL)
3B3	10,0	104,6	aproximadamente 10
19.3	4,8	150,0	aproximadamente 31

45 De modo similar, el anticuerpo 19.3 se evaluó mediante una medición de la constante de equilibrio basada en KINEXA™. Tal como se muestra en la tabla 9, el anticuerpo 19.3 presenta una constante de equilibrio de 2,7 nM, que representa una preferencia seis veces mayor por la unión a oligómeros de ADDL frente al monómero de Aβ40 en el mismo ensayo.

Tabla 9

Anticuerpo	ADDL (nM)	A $\beta$ 1-40 (nM)	Proporción (monómero de A $\beta$ /ADDL)
3B3	3,3	45,0	aproximadamente 13,6
19.3	2,7	16,7	aproximadamente 6,2

5 *CE<sub>50</sub> de 19,3 para los oligómeros de A $\beta$  y A $\beta$ 1-40 en un ensayo ELISA unilateral.* La *CE<sub>50</sub>* representa la unión al oligómero de A $\beta$  total semimáxima. Placas de unión para un alto contenido en proteínas se revistieron con A $\beta$ 1-40 100 pmol/pocillo u oligómeros de A $\beta$  50 pmol/pocillos en PBS durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron cinco veces con PBS + TWEEN 20 al 0,05% y se bloquearon durante la noche con tampón de bloqueo de caseína (Thermo Scientific, Waltham, MA) y TWEEN 20 al 0,05%. El anticuerpo 19.3 se ensayó de 0 a 15  $\mu$ g/ml en una serie de diluciones en tres veces de 12 puntos. Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron y se añadió anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina (ThermoScientific, Waltham, MA) a 0,08  $\mu$ g/ml. Después de una incubación durante 45 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavaron y se añadió TROPIX CDP Star (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se detectó la luminiscencia después de 30 minutos en un lector de placas ENVISION (PerkinElmer, Waltham, MA). Se completaron los ajustes de la curva empleando el programa informático GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Este análisis indicó que el anticuerpo 19.3 (isotipo IgG2) presenta una *CE<sub>50</sub>* de aproximadamente 1,6 nM y 4,3 nM para los oligómeros de A $\beta$  y el monómero A $\beta$ 1-40, respectivamente, en un ensayo ELISA unilateral (figura 5A). En este formato, el anticuerpo 19.3 demuestra una unión máxima aproximadamente tres veces mayor con los oligómeros de A $\beta$ , comparado con el monómero A $\beta$ 40, mientras que la potencia es aproximadamente 3,7 veces mayor.

20 *Ensayos de unión competitiva con oligómeros de A $\beta$  y monómeros de A $\beta$ .* Para representar de modo más preciso una muestra de CSF *in vivo*, en la que estarían presentes oligómeros de A $\beta$  y monómeros de A $\beta$ , se ensayó la afinidad de 19.3 por oligómeros de A $\beta$  en presencia del monómero A $\beta$ 1-40 en un formato de ELISA competitivo.

25 La placa de ELISA se preparó mediante un primer revestimiento con una preparación de oligómeros de A $\beta$  a 50 pmol por pocillo y añadiendo después el anticuerpo 19.3 a una concentración final de 2 nM a cada pocillo. Esta concentración de 19.3, concretamente, 2 nM, representa la concentración de *CE<sub>50</sub>* para la unión a oligómeros de A $\beta$  determinada en el ELISA unilateral (figura 5A). La adición del monómero A $\beta$ 1-40 en una curva de titulación para eliminar competitivamente el 19.3 de la superficie revestida con el oligómero de A $\beta$  produjo una *CE<sub>50</sub>* de 5,5  $\mu$ M. Las placas revestidas con el monómero A $\beta$ 1-40 se prepararon de la misma manera, empleando 100 pmol/pocillo. El anticuerpo 19.3 se aplicó a 4 nM a cada pocillo en la matriz de tampón de bloqueo de caseína y se dejó que interaccionase con los oligómeros de A $\beta$  o con A $\beta$ 1-40 durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se aplicó una curva de concentración en tres veces de 12 puntos, comenzando en 10  $\mu$ M, para los oligómeros de A $\beta$  o para A $\beta$ 1-40, a los pocillos que contenían anticuerpo. Para las placas revestidas con los oligómeros de A $\beta$ , se añadió A $\beta$ 1-40 a los pocillos; para las placas con A $\beta$ 1-40, se añadieron los oligómeros de A $\beta$  a los pocillos. Las placas se incubaron durante una hora y media a temperatura ambiente. Se determinó la detección de la unión del anticuerpo residual y los cálculos de la *CE<sub>50</sub>* como en el ensayo ELISA unilateral.

35 Este análisis indica que la adición del monómero A $\beta$ 1-40 en una curva de titulación para retirar competitivamente el 19.3 de la superficie revestida con el oligómero de A $\beta$  produce una *CE<sub>50</sub>* de 5,5  $\mu$ M (figura 5B). Cuando se emplean 100 pmol por pocillo de monómero A $\beta$ 1-40 para revestir la placa de ELISA y se emplean oligómeros de A $\beta$  para competir por la unión del anticuerpo, la *CE<sub>50</sub>* es de 8,7 nM. Esto indica que 19.3 tiene una afinidad por los oligómeros A $\beta$ 1-42, comparado con los monómeros A $\beta$ 1-40, de aproximadamente 630:1 en un ensayo de unión competitiva. Dicho de otra forma, la concentración A $\beta$ 1-40 requerida para desplazar 50% de 19.3 de los oligómeros de A $\beta$  es aproximadamente 600 veces mayor que la concentración de oligómeros de A $\beta$  requerida para desplazar la unión de 19.3 a A $\beta$ 1-40. Se han indicado unas concentraciones de hasta 0,2 pM de oligómeros de A $\beta$  en el CSF de pacientes con AD (Georganopoulou, *et al.* (2005), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102:2273-2276), comparado con 1500 pM del monómero de A $\beta$ . Así, la sensibilidad y la selectividad de 19.3 por los oligómeros de A $\beta$  indican una utilidad potencial en un ELISA de "sandwich" para detectar oligómeros de A $\beta$  por encima de los niveles de fondo del monómero de A $\beta$ .

50 *Ensayo ALPHALISA™.* La tecnología ALPHALISA™ (PerkinElmer) es un inmunoensayo basado en esferas diseñado para la detección de analitos en muestras biológicas. Este ensayo quimioluminiscente muestra una notable sensibilidad, un amplio intervalo dinámico y una actuación robusta, que son mejores que en el ELISA convencional. Se determinó la selectividad y la sensibilidad del anticuerpo 19.3 por los ADDL frente a A $\beta$  monomérico (A $\beta$ 1-40) en el ensayo ALPHALISA. Este análisis indica que una señal a 0,2 pM de ADDL es mayor que una señal a 1000 pM de A $\beta$ 1-40, lo cual indica una selectividad por ADDL frente a A $\beta$  monomérico de aproximadamente 5000 en este ensayo.

**Inmunohistoquímica.** Los análisis inmunohistoquímicos de tejidos de ratones Tg2576 indican que el anticuerpo 19.3 no se une a placas vasculares, no muestra fundamentalmente unión a placas centrales densas y no elimina placas en ratones Tg2576.

### Ejemplo 8: Caracterización biofísica del anticuerpo anti-ADDL 19.3

5 Se realizó una caracterización biofísica para evaluar el potencial de formación de agregados de anticuerpos para demostrar que los anticuerpos anti-ADDL son estables bajo diversas condiciones. Un anticuerpo anti-ADDL 19.3 se concentró hasta >50 mg/ml y se colocó en una serie de formulaciones con un pH que varía de 5,0 a 8,0. Se incubaron dos conjuntos de muestras a 37 °C y a 45 °C durante una semana. Se colocó un tercer conjunto de muestras a -70 °C para iniciar una serie de cinco ciclos de congelación/descongelación. Los análisis de  
10 cromatografía de exclusión molecular indican que las preparaciones de anticuerpos estaban predominantemente (>95%) en el estado de monómeros, con una pequeña cantidad de dímeros, lo cual es típico de las preparaciones de anticuerpos monoclonales. La cantidad de dímeros y oligómeros de mayor peso molecular no aumenta después del estrés de temperatura en todos los tampones, y no se observó fragmentación. Tal como se resume en la tabla 10, el análisis de la turbidez en el ultravioleta cercano también indica la falta de agregación. Las muestras estresadas con  
15 congelación/descongelación mostraron un aumento en la turbidez dependiente del tampón, que es comparable a otros anticuerpos monoclonales. La viscosidad a 50 mg/ml es menor que 2 centipoise. Una calorimetría de barrido diferencial también reveló una estabilidad térmica aceptable, con el desplegamiento del Fab a aproximadamente 72 °C y un desplegamiento del dominio CH2 menos estable por encima de 65 °C. Tomado conjuntamente, el anticuerpo 19.3 muestra una estabilidad estructural muy buena.

20 Tabla 10

Anticuerpo	Agregados iniciales (%)	Fragmentos iniciales (%)
19.3	2,2	0,0
Control 1	1,6	0,4
Control 2	2,6	0,0

### Ejemplo 9: Preparación de variantes de 19.3

Se realizó una evaluación de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 19.3 para identificar sitios de  
25 desamidación potenciales. Los restos asparagina y ácido aspártico presentes en las CDR de los anticuerpos terapéuticos pueden sufrir una desamidación y formación de isoaspartato (Valsak e Ionescu (2008), Curr. Pharm. Biotech., 9:468-481; Aswad, *et al.* (2000), J. Pharm. Biomed. Anal., 21:1129-1136), cuya formación puede alterar la potencia de unión de un anticuerpo y, a su vez, reducir la eficacia del anticuerpo para su uso como producto terapéutico. Por tanto, el resto asparagina en la posición 33 de la CDR1 de cadena ligera del anticuerpo 19.3 se altera. Se produjeron variantes del anticuerpo 19.3 (tabla 11) con la sustitución de serina, treonina o ácido glutámico por la asparagina en la posición 33 en de la CDR1. También se generó una sustitución del ácido aspártico por la  
30 asparagina en la posición 33 como control.

La mutagénesis de la asparagina en la posición 33 (N33) de la CDR1 de cadena ligera del anticuerpo 19.3 para producir N33S, N33T, N33E, o N33D se realizó mediante mutagénesis dirigida específica de sitio a partir del vector de expresión de tipo salvaje pVI JASN-GS-19.3-LCK empleando el kit de mutagénesis dirigida específica de sitio  
35 QUIKCHANGE™ II XL (Agilent Technologies, La Jolla, CA). El codón AAT para N se mutó a AGT para S en 19.3 N33S, ACT para T en 19.3 N33T, GAA para E en 19.3 N33E, o GAT para D en 19.3 N33D. También se generaron otras mutaciones en la asparagina en la posición 35 (N35) de CDR1 y se combinaron con la mutación N33S (tabla 11). Además, se prepararon mutaciones en la asparagina en la posición 58 en la CDR2 del anticuerpo 19.3 (tabla 12). Todos los codones nuevos se confirmaron mediante análisis de secuencia de ADN. Para generar anticuerpos  
40 IgG de longitud completa para estos variantes, los respectivos plásmidos de cadena ligera se aparearon con el plásmido de cadena pesada cognado, pVIJNSA-19.3-HCG2, para la transfección transitoria en células 293 FREESTYLE™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). La expresión y los métodos de purificación se han descrito anteriormente.

La tabla 11 resume la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera de los variantes, comparada con la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo de origen, 19.3. Los variantes de 19.3 cuya CDR1 de cadena ligera se  
45 indica en la siguiente tabla 11 y cuyas CDR2 y CDR3 de cadena ligera y todas las cadenas pesadas son como en el propio 19.3 se describen en la presente.

Tabla 11

Anticuerpo	Secuencia CDR1 de LC	SEQ ID NO:
19.3 (de origen)	RSSQSIVHSNGNTYLE	14
19.3 N33S	RSSQSIVHSSGNTYLE	46
19.3 N33T	RSSQSIVHSTGNTYLE	47
19.3 N33A	RSSQSIVHSAGNTYLE	48
19.3 N33E	RSSQSIVHSEGNTYLE	49
19.3 N33D	RSSQSIVHSDGNTYLE	50
19.3 N33S-N35Q	RSSQSIVHSSGQTYLE	51
19.3 N33S-N35S	RSSQSIVHSSGSTYLE	52
19.3 N33S-N35T	RSSQSIVHSSGTTYLE	53
19.3 N33S-N35A	RSSQSIVHSSGATYLE	54

5 La tabla 12 resume la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena ligera de los variantes, comparada con la CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo de origen, 19.3. Los variantes de 19.3 cuya CDR2 de cadena ligera se indica en la siguiente tabla 12 y cuyas CDR1 y CDR3 de cadena ligera y todas las cadenas pesadas son como en el propio 19.3 se describen en la presente.

Tabla 12

Anticuerpo	Secuencia CDR2 de LC	SEQ ID NO:
19.3 (de origen)	KASNRFS	15
19.3 N58Q	KASQRFS	55
19.3 N58S	KASSRFS	56
19.3 N58T	KASTRFS	57
19.3 N58A	KASARFS	58

10 Los variantes de 19.3 se evaluaron posteriormente para determinar si las mutaciones tenían algún efecto sobre la estabilidad del anticuerpo. Se incubaron partes alícuotas de anticuerpos variantes purificados, junto con el anticuerpo de origen 19.3, bajo diversas condiciones a 4 °C, 25 °C o 40 °C durante un mes antes de someterse a análisis ELISA. Se revistieron placas de unión para un alto contenido en proteínas (Costar, Corning, Lowell, MA) con el ligando diana en PBS durante la noche a 4 °C. La concentración de la proteína de revestimiento era de 50 pmol/pocillo para los ADDL. Los ADDL se generaron como se describe en el ejemplo 1. Al día siguiente, las placas se lavaron cinco veces con PBS + TWEEN 20 al 0,05% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) y se bloquearon durante la noche con tampón de bloqueo de caseína (Thermo Scientific, Waltham, MA) y TWEEN 20 al 0,05%. Se ensayaron tres anticuerpos representativos, 19.3, 19.3 N33S, y 19.3 N33T, de 15 µg/ml a 0 µg/ml en una serie de dilución en tres veces de 12 puntos. Después de dos horas de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron y se añadió anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina (ThermoScientific, Waltham, MA) a 0,08 µg/ml. Después de una incubación durante 45 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavaron y se añadió el sustrato quimioluminiscente TROPIX CDP-Star (LIFE TECHNOLOGIES, Carlsbad, CA). Se detectó la luminiscencia después

20

de 30 minutos en un lector de microplacas ENVISION (PerkinElmer, Waltham, MA). Se completaron los ajustes de la curva empleando el programa informático GRAPHPAD PRISM™ (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

- 5 Tal como se muestra en las figuras 6B y 6C, los anticuerpos 19.3 N33S y 19.3 N33T presentan una estabilidad de unión potenciada, comparado con el anticuerpo de origen 19.3 (WT, figura 6A) tras una incubación durante un mes a temperaturas variables. En la tabla 13 se proporciona un resumen de las CE<sub>50</sub> de estos anticuerpos a diversas temperaturas de incubación.

Tabla 13

Antígeno	Incubación	CE <sub>50</sub> (nM) del anticuerpo		
		19,3	19.3 N33T	19.3 N33S
bADDL	momento 0	1,1	15,5	7,8
	4°, 1 mes	1,7	11,6	8,6
	25°, 1 mes	2,1	15,7	12,8
	40°, 1 mes	5,9	23,5	10,1
Aβ1-40	momento 0	10,1	332,1	55,1
	4°, 1 mes	16,3	306,8	59,1
	25°, 1 mes	22,1	ND	24,3
	40°, 1 mes	88,8	96,3	29,9

- 10 Se determinó la CE<sub>50</sub> de varios de los variantes de 19.3 y se descubrió que los variantes mantenían la especificidad por ADDL en un ensayo ELISA (tabla 14).

Tabla 14

Anticuerpo	CE <sub>50</sub> (nM)	
	ADDL	Aβ1-42
19.3	0,8	18
19.3 N33S	1,7	150
19.3 N33T	3,1	244
19.3 N33D	0,82	28

Todos los anticuerpos eran IgG2.

**Ejemplo 10: Anticuerpos que prefieren los oligómeros de Aβ en un ELISA de "sandwich" selectivo para oligómeros de Aβ**

- 15 En una selección de parejas de anticuerpos de captura y detección en formato ELISA de "sandwich", la combinación de 19.3 como anticuerpo de captura con 7305, un anticuerpo antioligómeros de Aβ (20C2, patente de EE. UU. n.º 7.780.963) o 82E1 (Immunobiological Laboratories (IBL), Inc., Minneapolis, MN) actuaron de modo comparable en tampón de bloqueo de caseína en una curva patrón de oligómero de Aβ, y cada uno presenta un límite de detección

(LoD) menor que 4 pg/ml (figura 7A). Se ha indicado el uso de un anticuerpo antimonómero de A $\beta$  como anticuerpo de captura y de detección como un ensayo de oligómero de A $\beta$ , aunque no se han indicado niveles absolutos de sensibilidad o selectividad (6E10/6E10; Gandy, *et al.* (2010), *Ann. Neurol.* 68:220-230), o la selectividad estaba por debajo de la deseada en un ensayo para medir oligómeros de A $\beta$  en CSF humano (82E1/82E1; Xia, *et al.* (2009), *Arch. Neurol.* 66:190-199).

Para determinar la sensibilidad de 6E10 y 82E1, se emplearon estos anticuerpos en ensayos ELISA de "sandwich". En este análisis se emplearon anticuerpos idénticos como anticuerpos de captura y de detección, concretamente, 6E10/6E10 (figura 7B) y 19.3/19.3 (figura 7C), así como parejas de ensayo ELISA de "sandwich" usando 19.3 solo como anticuerpo de captura (figura 7A, con detección de 82E1). Este análisis indica que 6E10/6E10 y 19.3/19.3 demuestran ambos una sensibilidad reducida en aproximadamente cien veces comparada con 19.3/7305 o 19.3/82E1.

El ELISA de 19.3/82E1 que emplea la tecnología de detección de luminiscencia (lector de placas ENVISION Multilabel, PerkinElmer, Waltham, MA) (figura 7A) generó un LoD de aproximadamente 1,3 pg/ml. En este formato de ensayo, el límite inferior de cuantificación fiable (LLoRQ) del oligómero de A $\beta$  era de 4,2 pg/ml (con unos coeficientes de varianza menores que 20% en esta medida inferior) y el ensayo fue aproximadamente 1000 veces más selectivo para la señal de los oligómeros de A $\beta$  comparado con los monómeros de A $\beta$ 40. Aunque se empleó este ensayo para evaluar preparaciones de oligómeros de A $\beta$ , puede que no sea lo suficientemente sensible para detectar de modo fiable los niveles de oligómeros de A $\beta$  en CSF humano a los niveles que sugieren cálculos previos (Georganopoulou, *et al.* (2005), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:2273-2276).

#### **Ejemplo 11: ELISA de "sandwich" selectivo de oligómeros de A $\beta$ con mayor sensibilidad**

Se evaluaron las parejas de anticuerpos 19.3 y 7305 (19.3 x 7305) y 19.3 y 82E1 (19.3 x 82E1) en un ELISA de "sandwich" empleando un sistema de inmunoensayo de detección de micropartículas paramagnéticas, el sistema de inmunoensayo ERENNA (SINGULEX, Alameda, CA), para determinar si puede mejorarse la sensibilidad del ensayo para la medición de oligómeros de A $\beta$  en muestras de fluido de seres humanos y de primates no humanos.

*Marcaje del anticuerpo de captura.* Se logró la unión del anticuerpo de captura a DYNABEADS™ (esferas de micropartículas (MP)) retirando el sobrenadante de 50  $\mu$ l de DYNABEADS™ empleando un imán. Las DYNABEADS™ se resuspendieron en 200  $\mu$ l de un tampón de unión y lavado de anticuerpos, por ejemplo, tampón RIPA (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA) que contenía 5  $\mu$ g del anticuerpo de captura. La mezcla se incubó durante 10 minutos a la temperatura ambiente. El sobrenadante se retiró del complejo de anticuerpo de captura/esferas MP con un imán. El complejo se lavó con 200  $\mu$ l del tampón de unión y lavado.

*Acoplamiento del anticuerpo de captura a DYNABEADS™ (esferas MP).* Las esferas MP acopladas al anticuerpo de captura (5  $\mu$ g de 19.3/50  $\mu$ l de complejo de esferas MP) se lavaron dos veces en 200  $\mu$ l del tampón de conjugación (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,15 M (pH 7-9)), se colocaron sobre un imán y se rechazó el sobrenadante. El anticuerpo de captura/esferas MP se resuspendieron en 250  $\mu$ l de disolución BS3 5 mM (bis(sulfosuccinimidil)suberato en tampón de conjugación). Las esferas resuspendidas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos con inclinación/rotación. La reacción de entrecruzamiento se extinguió mediante la adición de 12,5  $\mu$ l de un tampón de extinción (Tris-HCl 1 M, pH 7,5) y después se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos con inclinación/rotación. Las esferas MP entrecruzadas se lavaron tres veces con 200  $\mu$ l de PBS-T. Las esferas MP se diluyeron hasta 100  $\mu$ g/ml en tampón de ensayo para su uso en el protocolo de ensayo.

*Marcaje del anticuerpo de detección.* Se acopló ALEXA FLUOR™ 546 (Invitrogen, Carlsbad, CA) al anticuerpo de detección según el protocolo del fabricante. Brevemente, el anticuerpo de detección se diluyó hasta 1 mg/ml y se añadió una décima parte de volumen de tampón bicarbonato de sodio 1 M. Esta disolución de anticuerpo de detección (100  $\mu$ l) se añadió al vial de tinte ALEXA FLUOR™ 546, y el vial se cerró, se invirtió cuidadosamente para disolver el tinte y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Las columnas se centrifugaron para separar cualquier marcador fluorescente no marcado del anticuerpo de detección, y el anticuerpo se cargó sobre una resina de purificación por exclusión molecular fina de componente C (BIOGEL P-30, BioRad, Hércules, CA). Después de que el gel drenase se añadieron 100  $\mu$ l de volumen de reacción de tinte y anticuerpo de detección al centro de la resina en la parte superior de la columna de centrifugación y se adsorbieron en el lecho del gel. A la columna se añadieron lentamente, a temperatura ambiente, 100  $\mu$ l de un tampón de elución (fosfato de potasio 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,2, con azida de sodio 0,2 mM). Se añadió más tampón de elución y, a medida que la columna eluye, esta fue iluminada para visualizar el frente de anticuerpo teñido/marcado. La primera línea de tinte de la columna es el anticuerpo marcado. El tinte libre permaneció en el lecho de la columna y se rechazó con la columna de centrifugación.

Se realizó un ELISA de "sandwich" de oligómeros de A $\beta$  utilizando una plataforma de inmunoensayo basado en micropartículas paramagnéticas (sistema de inmunoensayo ERENNA, SINGULEX, Alameda, CA) para determinar los niveles de oligómeros en muestras de CSF o patrones de oligómeros de A $\beta$ . Se prepararon micropartículas (MP) para la captura uniendo 12,5  $\mu$ g del anticuerpo de captura por mg de MP. Las MP unidas al anticuerpo de captura se diluyeron hasta 100  $\mu$ g/ml en tampón de ensayo (tampón Tris con TRITON X-100 al 1%, d-destiobiotina, albúmina de suero bovina al 0,1%) y se añadieron 100  $\mu$ l a 100  $\mu$ l de muestra de CSF o patrones (diluidos en tampón Tris y

albúmina de suero bovina al 3%), seguido de una incubación durante dos horas a 25 °C. Las MP fueron retenidas por medio de un lecho magnético y el material no unido se retiró en una única etapa de lavado empleando diluyente de ensayo y usando el lavador de placas THYDROFLEX™ (Tecan, Männedorf, Suiza). El anticuerpo de detección marcado con ALEXA FLUOR™ se diluyó hasta una concentración final de 500 pg/ml y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm (Pall 4187, Fort Washington, NY). El anticuerpo de detección se añadió a 20 µl/pocillo de partículas de muestra individuales. Las placas de ELISA se incubaron durante una hora a 25 °C mientras se agitaba en un Jitterbug (Boekel, Feasterville, PA). Los pocillos se lavaron cuatro veces con tampón de ensayo para eliminar cualquier reactivo de detección no unido. Los complejos de MP/anticuerpo de captura/oligómero de Aβ/anticuerpo de detección se trasladaron a una nueva placa, el tampón se aspiró y se añadieron 10 µl/pocillo de tampón de elución, seguido de una incubación durante 5 minutos a 25 °C mientras se agitaba en un Jitterbug a la velocidad de 5. El anticuerpo detector marcado con flúor eluido se trasladó a una placa 384 que contenía 10 µl/pocillo de tampón de neutralización y se leyó en un detector de micropartículas paramagnéticas (ERENNA™, SINGULEX™, Alameda, CA) con un tiempo de lectura de 60 segundos por pocillo.

Aunque se han empleado inmunoensayos de micropartículas paramagnéticas, tales como el sistema de inmunoensayo ERENNA™, para biomarcadores presentes en una muestra biológica en el intervalo nanomolar (nM), tal como se ha observado para Aβ1-40 y Aβ1-42, previamente no ha sido demostrado que un sistema de inmunoensayo pueda detectar, de modo específico y fiable, un biomarcador presente en una muestra de CSF en el intervalo femtomolar (fM), tal como sucede con los oligómeros de Aβ. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, se cree y ha sido demostrado que la especificidad y la sensibilidad de los ensayos de la presente son atribuibles a la especificidad y la sensibilidad de la pareja de anticuerpos anti-ADDL seleccionados y empleados en el ELISA de "sandwich". De forma similar, aunque en la presente se emplea el sistema de inmunoensayo ERENNA™ para ilustrar el ensayo reivindicado, es posible que puedan emplearse otros sistemas de detección con sensibilidades comparables en los métodos *in vitro* de la invención.

El ELISA de "sandwich" de 19.3 x 7305 se realizó empleando el sistema de inmunoensayo ERENNA™ (SINGULEX, Alameda, CA), acoplado covalentemente el anticuerpo 19.3 a las esferas de micropartículas (MP) de ERENNA™ (en lo sucesivo "19.3/esferas MP"). El complejo de 19.3/esferas MP después se mezcló con un tampón que contenía una curva patrón de oligómero de Aβ o de Aβ40 monomérico. El complejo de 19.3/esferas MP/oligómero de Aβ o Aβ40 resultante (en lo sucesivo "complejo de oligómero de Aβ") se lavó y se unió un anticuerpo de detección marcado con fluorescencia 7305 o 82E1 al complejo de oligómero de Aβ. El instrumento ERENNA™, que emplea una tecnología de detección patentada capaz de contar moléculas individuales (véase la patente de EE. UU. n.º 7.572.640), mide el anticuerpo de detección marcado con fluorescencia tras su liberación del ELISA de "sandwich". Tal como se muestra en la tabla 15, los datos del ensayo de 19.3 x 7305, empleando una dilución en dos veces del patrón de oligómero de Aβ en tampón, se alinean con una dilución en dos veces lineal de la señal fluorescente (promedio de acontecimientos detectados). Las señales generadas por CSF de rhesus puro, o CSF en el que se introduce una curva patrón de oligómeros de Aβ, demuestran que la señal fluorescente atribuida a la unión del anticuerpo 7305 marcado es equivalente en ambos casos, mientras que el ensayo de "sandwich" de 19.3 x 82E1 es capaz de detectar oligómeros de Aβ sembrados a lo largo de la curva patrón completa. En el formato de ensayo que emplea 7305 como anticuerpo de detección, esto es indicativo de que existe una saturación del fondo no específica (de algo presente en el CSF de rhesus) a lo largo del intervalo de la serie de dilución del oligómero de Aβ que es suficiente para detectar oligómeros de Aβ en el tampón solo. Posteriormente, se descubrió que la señal fluorescente es idéntica a la de la micropartícula desnuda, incluso en ausencia de acoplamiento del anticuerpo 19.3, lo cual también es coherente con una señal no específica debida a reactividad cruzada del anticuerpo 7305.

Tabla 15

Diluyente patrón	Esperado [ADDL] pM	DE promedio	DE	CV%	Interp [ADDL] pM, promedio	DE	CV%	Recuperación
Diluyentes patrón	5,00	5579	506	9	5,1	0,5	10	103
	1,67	1942	235	12	1,7	0,2	13	100
	0,56	691	152	22	0,5	0,1	25	96
	0,19	324	43	13	0,2	0,1	17	116
	0,06	131	34	26	0,1	0,1	49	88
	0,00	72	28	39	ND			

Diluyente patrón	Esperado [ADDL] pM	DE promedio	DE	CV%	Interp [ADDL] pM, promedio	DE	CV%	Recuperación
CSF de rhesus mermado	5,00	9097	88	1				
	1,67	9112	195	2				
	0,56	8721	166	2				
	0,19	8785	269	3				
	0,06	8744	273	3				
	0,00	8678	519	6				
CSF de rhesus no mermado	5,00	10353	237	2				
	1,67	9719	495	5				
	0,56	9902	546	6				
	0,19	9971	319	3				
	0,06	9721	329	3				
	0,00	10515	282	3				

n = 3 para cada experimento.

5 Como alternativa, el anticuerpo de detección 7305 fue reemplazado por 82E1, también acoplado a un marcador fluorescente, en el ELISA de "sandwich" selectivo de oligómeros de A $\beta$  (figura 9A) revelado empleando el sistema de inmunoensayo ERENNA™. Al igual que 19.3, se ha indicado que el anticuerpo 82E1, en formatos ELISA, detecta oligómeros de A $\beta$  en cerebro AD (Xia, *et al.* (2009), Arch. Neurol. 66:190-199). Tal como se muestra en la tabla 16, este ensayo elimina la señal no específica en CSF de rhesus puro y mermado en oligómeros de A $\beta$ , lo cual sugiere además que el anticuerpo 7305 era la fuente de la señal no específica. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, se cree que la alta señal de fondo observada para la pareja de anticuerpos 19.3/7305 es debida a la unión del fibrinógeno del CSF a las esferas MP, que no había sido observada para la pareja de anticuerpos 19.3/82E1.

10 Este ensayo alternativo generó un LoD de los patrones de oligómeros de A $\beta$  a 0,04 pg/ml, un LLoRQ a 0,42 pg/ml, y una selectividad 5000 veces mayor del ensayo por oligómeros de A $\beta$  frente al monómero A $\beta$  40 (figura 8). Basándose en estos descubrimientos, se seleccionó este formato de ensayo para la posterior caracterización.

Tabla 16

Parámetro	Pareja de anticuerpos 19.3/7305	Pareja de anticuerpos 19.3/82E1
Pendiente de los acontecimientos detectados (pM)	1.200	4.000
Fondo	70	100
LoD (pM)	0,01	0,01
LLoRQ (pM)	0,16-0,49	0,12
Reactividad cruzada del monómero A $\beta$ 40	0,02 %	0,04 %
CSF de rhesus mermado (pM)	80	< 0,12
CSF de rhesus no mermado (pM)	200	0,35



**Ejemplo 12: Ensayo farmacodinámico (PD)**

Utilizando los anteriores descubrimientos, se desarrolló un ELISA de "sandwich" selectivo de oligómeros de A $\beta$ , empleando la pareja de anticuerpos 19.3 y 82E1, para detectar y medir los niveles de oligómeros de A $\beta$  en una muestra de CSF. Este ensayo se denominará ensayo farmacodinámico (PD) para su uso para evaluar los cambios en los niveles del analito, es decir, el oligómero de A $\beta$ , después de un tratamiento para inhibir la producción, el aumento en la eliminación, o cualquier otra modificación en los niveles de oligómero de A $\beta$  (figura 9B). El ensayo de PD también puede utilizarse para diferenciar pacientes con AD de pacientes sin AD, es decir, como diagnóstico, para controlar el avance de la enfermedad, es decir, como pronóstico, o para controlar el potencial terapéutico de un tratamiento modificador de la enfermedad para cambiar las concentraciones de oligómeros de A $\beta$ .

El ensayo PD, según se ha descrito en el ejemplo previo con referencia a la figura 9B, coloca el anticuerpo 19.3 acoplado a una esfera de micropartícula (MP) paramagnética (esfera MP/19.3) en un pocillo de una placa de ELISA. Al pocillo se le añadió CSF humano o un patrón de oligómero de A $\beta$  (en una dilución en serie añadida a tampón Tris y albúmina de suero bovina). Cualquier oligómero de A $\beta$  presente en el pocillo se une al complejo de 19.3/esfera MP y el exceso de disolución se lava. Se añade 82E1 marcado con fluorescencia, como anticuerpo de detección, dentro de un tampón de ensayo (tampón Tris con TRITON X-100 al 1%, d-destiobiotina, BSA), al complejo lavado de esfera MP/19.3/oligómero de A $\beta$  y se incuba para unir el complejo de oligómero de A $\beta$ . El complejo de esfera MP/19.3/oligómero de A $\beta$ /82E1 resultante se lava con un tampón de elución, y el anticuerpo marcado con fluorescencia 82E1 se eluye con el anticuerpo no unido. La detección con un detector de micropartículas paramagnéticas, tal como el instrumento ERENNA™, en el que la disolución fluye y es excitada por un láser, permite la detección de moléculas individuales (el marcador fluorescente emite fotones de una longitud de onda lumínica específica) para generar y medir una señal fluorescente, que es equivalente a las moléculas detectadas, concretamente, el oligómero de A $\beta$ . Una curva patrón de oligómeros de A $\beta$ , medidos con el instrumento ERENNA™, comparado con monómeros de A $\beta$ , se muestra en la figura 8.

**Ejemplo 13: Oligómeros de A $\beta$  en CSF humano**

Se empleó el ELISA de "sandwich" selectivo de oligómeros de A $\beta$  de 19.3 x 82E1 del ejemplo previo para medir los niveles endógenos de oligómeros de A $\beta$  en muestras de CSF humano (figuras 10A y 10B). En dos cohortes de muestras distintas, la señal fluorescente, generada por la presencia de oligómeros de A $\beta$ , aparecía significativamente elevada en CSF de AD (clínicamente diagnosticado empleando una puntuación de MMSE por debajo de 25 como AD probable), comparado con controles sanos de la misma edad o más jóvenes. Los niveles absolutos de oligómeros de A $\beta$  observados fueron  $2,1 \pm 0,61$  pg/ml en AD (n = 20) y  $0,53 \pm 0,26$  pg/ml en el control de la misma edad (n = 10) en muestras de CSF de Precision Medicine (Solana Beach, CA) con una puntuación de ensayo de la t de dos vías de Mann-Whitney de  $p < 0,0004$  (figura 10A). Los niveles absolutos de oligómeros de A $\beta$  observados fueron  $1,66 \pm 0,5$  pg/ml en AD (n = 10) y  $0,24 \pm 0,05$  pg/ml en el control (n = 10) en muestras de CSF de Bioreclamation (Hicksville, NY), con una puntuación de ensayo de la t de dos vías de Mann-Whitney de  $p < 0,0021$  (figura 10B). Combinando las dos cohortes, 90% de las muestras de CSF con AD diagnosticado estaban por encima de un LLoRQ de 0,42 pg/ml, mientras que solo 20% del control de la misma edad o 10% de los controles más jóvenes se encontraban por encima de este límite. Todos los valores se encontraban por encima de un LoD de 0,04 pg/ml. Los niveles de monómeros A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 se midieron en las muestras de CSF obtenidas de Bioreclamation (figuras 11A y 11B, respectivamente) y fueron comparables entre AD y CSF control para A $\beta$ 1-40 (figura 11A), mientras que se eran significativamente reducidos en las muestras de AD para A $\beta$ 1-42 (figura 11B). Esto ha sido previamente descrito como una característica del CSF de AD (De Meyer, *et al.* (2010), Arch. Neurol., 67:949-956; Jack, *et al.* (2010), Lancet Neurol., 9:119-128) y confirma el diagnóstico correcto de estas muestras. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, se cree que estos niveles menores de A $\beta$ 1-42 en las muestras de CSF de AD son debidos a la retención de A $\beta$ 1-42 en los depósitos amiloides del cerebro con AD. La capacidad para detectar específicamente y cuantificar estas diferencias observadas sugiere que estos biomarcadores pueden emplearse como una medición de diagnóstico y de pronóstico para la AD.

Para un ensayo de diagnóstico, la señal, es decir, el nivel de oligómeros de A $\beta$ , detectada mediante el ensayo de la presente generalmente sería mayor de tres veces en un paciente con AD (hasta un nivel de  $>0,5$  pg/ml), comparado con la señal observada para pacientes sin AD. Esto resulta coherente con los datos mostrados en la figura 10A, en la que los niveles de los oligómeros de A $\beta$  en el CSF de AD, comparado con los controles de la misma edad, fueron cuatro veces mayores, y en la figura 10B, en la que los niveles de los oligómeros de A $\beta$  en CSF de AD fueron ocho veces mayores. Estos datos también apoyan el uso del ensayo de oligómeros de A $\beta$  de la presente para identificar pacientes en estadios tempranos de la enfermedad (es decir, un ensayo de pronóstico). La edad es el mayor factor de riesgo para el desarrollo de la AD, y las diferencias observadas entre AD y los controles de la misma edad son más pequeñas que entre AD y los controles más jóvenes. De modo similar, para un ensayo de pronóstico de oligómeros de A $\beta$ , los pacientes que muestran un MMSE menor que 25 presentarían una señal de oligómeros de A $\beta$  detectada de  $>0,5$  pg/ml (de cuatro a ocho veces mayor que los pacientes con un MMSE mayor que 25/normal), comparado con la señal detectada para el monómero A $\beta$ 1-42, que es aproximadamente dos veces menor en CSF de AD comparado con los controles. Empleando una puntuación de MMSE de 25 como límite de corte (Mungas (1991), Geriatrics, 46(7):4-58), en la que una puntuación de MMSE mayor que 25 se considera "sano normal" y una puntuación menor se considera con deterioro cognitivo leve o con AD, se esperaría que un nivel de oligómeros de A $\beta$  de  $\geq 0,5$  pg/ml fuera indicativa de un paciente con una puntuación de MMSE menor que 25 (figura 12).

**Ejemplo 14: Ensayo de unión a la diana (TE)**

Empleando los anteriores descubrimientos, se desarrolló un ensayo de TE ("target engagement") para medir los oligómeros de A $\beta$  unidos *in vivo* a un anticuerpo terapéutico (de captura). Como tal, el ensayo de TE puede emplearse para medir los niveles de oligómeros de A $\beta$  unidos a un anticuerpo terapéutico para confirmar la unión del oligómero de A $\beta$  al anticuerpo terapéutico. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, se cree que el nivel de oligómeros de A $\beta$  unidos a un anticuerpo antioligómeros de A $\beta$  terapéutico será menor en las muestras de CSF procedentes de sujetos que han sido tratados a lo largo del tiempo con dicho anticuerpo terapéutico. Unos niveles de oligómeros de A $\beta$  unidos que aumentan o que permanecen sin cambios después de la administración sugieren que el anticuerpo terapéutico no es adecuado para el tratamiento de la AD. Como alternativa, puede darse el caso de que simplemente secuestrando los oligómeros de A $\beta$  y uniéndolos al anticuerpo terapéutico, se obtenga un beneficio en la actuación aguda, debido a una menor interacción con las neuronas en el cerebro. Sin embargo, este beneficio puede no estar asociado con un cambio en los oligómeros de A $\beta$  *per se*. El ensayo de unión a la diana evalúa, como mínimo, la capacidad de un anticuerpo terapéutico para unirse a oligómeros de A $\beta$  dentro del CSF.

En este ensayo se emplea una pareja de anticuerpo anti-IgG2 humana x anticuerpo 82E1 para detectar y cuantificar niveles de oligómeros de A $\beta$  unidos en una muestra de CSF procedente de un paciente tratado con el anticuerpo antioligómeros de A $\beta$  19.3 (IgG2), es decir, un anticuerpo terapéutico (figura 9B). Para demostrar la capacidad de anticuerpos específicos de oligómeros de A $\beta$  para unirse a oligómeros de A $\beta$  en una matriz de CSF humano, se generaron complejos de 19.3/oligómeros de A $\beta$  dentro de CSF humano sembrando el CSF con el anticuerpo antioligómeros de A $\beta$  19.3 a unos niveles que se cree que están presentes a las 24 horas en mono rhesus dosificado por vía intravenosa con 20 mg/kg (100 ng/ml, figura 13). A esta muestra de CSF humano sembrado con 19.3 se le añadió una cantidad creciente de patrones de oligómeros de A $\beta$ , que es equivalente a las concentraciones de oligómeros de A $\beta$  endógenas (0,1-5,0 pg/ml) (figuras 10A y 10B) y que también las aumentan significativamente por encima de los intervalos normales. Los complejos de 19.3 x oligómeros de A $\beta$  formados en el CSF humano se capturaron sobre placas de ELISA de 96 pocillos revestidos con anticuerpo contra cadena ligera kappa humana o anticuerpo contra IgG2 humana (ambos de Southern Biotech, Birmingham, AL) a 0,5  $\mu$ g por pocillo en tampón bicarbonato de sodio a 4 °C (paquete de tampón carbonato-bicarbonato BupH, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham MA). Al día siguiente, los pocillos se lavaron con PBS-T y se bloquearon durante la noche a 4 °C con 200  $\mu$ l/pocillo de tampón de caseína en PBS con TWEEN 20 al 0,1% añadido. El anticuerpo 19.3 se sembró en un tampón de caseína (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham MA) o CSF humano en tubos de microcentrífuga (Axygen, Inc., Union City, CA). Los oligómeros de A $\beta$  se sembraron a concentraciones variables para producir una curva patrón, manteniendo constantes los niveles de 19.3. Las muestras se agitaron a 4 °C durante una hora para permitir la formación de los complejos de anticuerpo (19.3)/oligómero de A $\beta$ . Se aplicaron cien  $\mu$ l de muestra/pocillo a una placa revestida con anti-IgG2 humana o anti-kappa humana (n = 3) y se incubó durante la noche a 4 °C en un agitador de placas. Al día siguiente, las placas se lavaron cinco veces con PBS-T y se añadió biotina-82E1 (IBL, Minneapolis, MN) a 100  $\mu$ l/pocillo, diluida 1:5000 en tampón de bloqueo de caseína (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), TWEEN 20 al 0,1% durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se volvieron a lavar con PBS-T, y se diluyó neutravidina-AP (ThermoFisher, Waltham, MA) 1:20000 en tampón de caseína y después se añadió durante 30 minutos a temperatura ambiente. A más lavados con PBS-T le siguió la aplicación de un sustrato luminiscente TROPIC Star (Applied Biosystems, Foster City, CA) durante 30 minutos. La luminiscencia se cuantificó en un lector de placas ENVISION (PerkinElmer, Waltham, MA).

El anticuerpo antioligómeros de A $\beta$  19.3 fue suficientemente reconocido por anti-kappa humana y anti-IgG2 humana en tampón (figuras 14A y 14B, triángulos negros), puesto que el anticuerpo contiene ambas características. Tal como se muestra en la figura 14A (círculos negros, CSF), el ensayo que emplea anti-IgG2 humana como anticuerpo de captura y 82E1 como anticuerpo de detección para detectar y medir el complejo de 19.3/oligómero de A $\beta$  produjo una sensibilidad significativamente menor en CSF humano, comparado con el ensayo que emplea anti-kappa humana como anticuerpo de captura (círculos negros, CSF, figura 14B). Ambos ensayos presentan una sensibilidad equivalente en tampón de caseína. El uso de anti-kappa humana para capturar el complejo de 19.3/oligómero de A $\beta$  produjo menos sensibilidad, hasta un LoD de 42 pg/ml de oligómero de A $\beta$  unido a 100 ng/ml de 19.3, quizás debido a un mayor nivel de fondo de las especies de IgG con una cadena ligera kappa en CSF humano, comparado con las especies de IgG2, que produjeron una mayor sensibilidad en el formato de ensayo que emplea un anti-IgG2. Después de la dosificación de seres humanos o animales experimentales con 19.3 o un anticuerpo antioligómeros de A $\beta$  de IgG2 relacionado como anticuerpo terapéutico, podría esperarse que el anticuerpo terapéutico estuviese representado en el CSF a 0,1-0,2% del nivel dosificado (Thompson (2005), *Proteins of the Cerebrospinal Fluid*, Elsevier Academic Press, Nueva York, NY). El anticuerpo terapéutico presente en el CSF se unirá a oligómeros de A $\beta$  disponibles, los complejos de 19.3 (IgG2)/oligómero de A $\beta$  serían capturados por el anticuerpo de captura anti-IgG2 a través de anticuerpo anti-IgG2 humana 19.3, y los complejos de oligómeros de A $\beta$  serían detectados con 82E1. La sensibilidad de esta plataforma probablemente puede aumentar empleando un sistema de detección de micropartículas paramagnéticas, tal como el sistema de inmunoensayo ERENNA™ (SINGULEX, Alameda, CA), utilizado en el ensayo de PD de la presente.

A lo largo del tiempo, tras un tratamiento terapéutico con un anticuerpo antioligómeros de A $\beta$ , se esperaría que la señal detectada para los complejos de 19.3/oligómeros de A $\beta$  se redujera (comparado con los niveles de pretratamiento). La cantidad de oligómero de A $\beta$  unido, tanto si se mide agudamente para estos complejos como si se mide a lo largo de un periodo de tratamiento terapéutico, representa la proporción del anticuerpo terapéutico

unido a la diana, es decir, los oligómeros de A $\beta$ , y puede actuar como sustituto para la eficacia del anticuerpo terapéutico.

**Ejemplo 15: Caracterización adicional del anticuerpo**

Se empleó un ensayo de unión basado en una disolución para determinar la especificidad y la afinidad de anticuerpos anti-ADDL por diferentes preparaciones de péptidos de beta-amiloides (ADDL, fibrillas, A $\beta$ 1-40, A $\beta$ 1-20). Se empleó un ELISA cuantitativo que era capaz de capturar el intervalo lineal de dosis-respuesta de anticuerpos monoclonales contra ADDL revestidos sobre placas NUNC. Basándose en esta información, se seleccionó una concentración fija de anticuerpo monoclonal que pueda producir señales de DO constantes en un ELISA justo por encima del ruido del ensayo (lectura de DO450 nm de aproximadamente 0,2 a 0,5). Después el anticuerpo anti-ADDL a esta concentración fija se incubó con diferentes sustratos de péptidos de beta-amiloides (ADDL, fibrillas, A $\beta$ 1-40, A $\beta$ 1-20) en 20 puntos de titulación en disolución a temperatura ambiente durante la noche para alcanzar el equilibrio. La cantidad de anticuerpo anti-ADDL libre dentro de la mezcla se determinó al día siguiente en un ELISA cuantitativo con una hora de incubación en placas ELISA normales. La fracción de anticuerpo anti-ADDL unido se calculó y se emplearon las correlaciones de anticuerpo anti-ADDL unido a la titulación de ligando libre (sustratos) para obtener la K<sub>D</sub>, empleando el programa GRAFIT (Erihtacus Software, Surrey, UK). Así, la preferencia de sustrato de cada anticuerpo por diferentes preparaciones de péptidos beta-amiloides se presenta como valores de afinidad intrínseca (K<sub>D</sub>).

Empleando este formato de ensayo, la interacción del anticuerpo y el sustrato se produce en fase de disolución y, por tanto, no existe restricción de ninguna superficie sólida. Además, se dejó que las interacciones alcanzasen el equilibrio. Por tanto, la interacción del anticuerpo anti-ADDL y el sustrato se produce a concentraciones limitantes de ambos componentes sin que existan problemas de precipitación del anticuerpo anti-ADDL o una oligomerización de péptidos de beta-amiloides adicional debido a la alta concentración experimental. Además, la lectura del ensayo es independiente del antígeno en la disolución; así, cualquier heterología del beta-amiloides en diferentes preparaciones de péptidos (por ejemplo, ADDL o fibrillas) no interferiría con la interpretación de los datos y la construcción de modelos matemáticos. La sensibilidad del ensayo se limita a los límites de detección del ensayo ELISA, que permite que este ensayo evalúe anticuerpos monoclonales con unos valores de K<sub>D</sub> en el intervalo nanomolar.

Se determinaron las cantidades de anticuerpo anti-ADDL libre mediante una curva patrón y se representaron gráficamente frente a titulaciones de diferentes sustratos. Las cantidades de anticuerpo anti-ADDL unido con diferentes sustratos se representaron gráficamente y la información se empleó en GRAFIT para el ajuste de la curva con modelos matemáticos apropiados. El resumen de la K<sub>D</sub>, expresada en intervalos nM, para el panel de anticuerpos monoclonales anti-ADDL se presenta en la tabla 17.

Tabla 17

Anticuerpo*	ADDL		Fibrillas		A $\beta$ 1-40		A $\beta$ 1-20	
	K <sub>D</sub>	EE	K <sub>D</sub>	EE	K <sub>D</sub>	EE	K <sub>D</sub>	EE
20C2	0,92	0,09	3,62	0,47	30,48	5,05	71,35	24,41
2A10	2,29	0,25	6,72	0,99	14,69	2,64	22,40	2,43
2B4	2,09	0,24	10,50	1,26	27,57	4,88	1,63	0,26
2D6	5,05	0,52	14,41	2,40	25,66	5,84	30,17	7,07
5F10	11,90	1,63	28,95	5,78	23,54	6,21	6,10	4,39
4E2	4,26	0,42	9,40	1,60	20,24	2,07	28,40	3,23
4C2	8,08	1,03	19,17	3,69	21,89	4,14	28,40	3,23
1F4	9,24	0,84	12,52	1,66	NC	NC	NC	NC
1F6	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
2E12	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

Anticuerpo*	ADDL		Fibrillas		Aβ1-40		Aβ1-20	
	K <sub>D</sub>	EE	K <sub>D</sub>	EE	K <sub>D</sub>	EE	K <sub>D</sub>	EE
WO-2	0,57	0,042	1,15	0,12	6,15	0,62	19,26	3,53

\*Todos los anticuerpos eran IgG.

Los valores listados en cursiva tiene un SE alto y no se ajustan bien.

NC: datos no concluyentes.

N/E: no ensayado.

**Lista de secuencias**

- 5 <110> Acumen Pharmaceuticals, Inc.  
Merck Sharp & Dohme Corp.  
Goure, William F.  
Gaspar, Renee C.  
McCampbell, Alexander
- 10 Savage, Mary J.  
Shughrue, Paul J.  
Wang, Fubao  
Wang, Weirong  
Wolfe, Abigail L.  
Zhang, Ningyan
- 15 Zhao, Wei-Qin
  
- <120> ANTICUERPOS, KIT Y MÉTODO PARA DETECTAR BETA-OLIGÓMEROS AMILOIDES
  
- 20 <130> API0025WO
- <150> PCT/US2011/043866
- <151> 13-07-2011
  
- 25 <150> 61/507.332
- <151> 13-07-2011
  
- <160> 58
  
- 30 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 16
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
- <223> Péptido sintético
  
- 40 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA\_MISC
- <222> (10)..(10)
- <223> Xaa indica N, S, T, A, D o E; o Xaa indica T, A, D, o E.
  
- 45 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA\_MISC
- <222> (12)..(12)
- <223> Xaa indica N, H, Q, S, T, A o D; o Xaa indica T.
  
- 50 <400> 1



ES 2 666 840 T3

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His  
 1 5 10

5

<210> 5  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 5

15

Tyr Ile Ser Arg Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 6  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> Péptido sintético

25

<400> 6

Gly Ile Thr Thr Ala Leu Asp Tyr  
 1 5

30

<210> 7  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

35

<400> 7

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
 20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala  
 35 40

40

<210> 8  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

45

<400> 8

Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu  
 1 5

50

<210> 9

<211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 9

**Glu Phe Arg His Asp Ser**

10 1 5

<210> 10  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Péptido sintético

20 <400> 10

**Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala**

1 5 10

<210> 11  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Péptido sintético

30 <400> 11

**Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser**

35 1 5

<210> 12  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Péptido sintético

45 <400> 12

**Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr**

1 5

<210> 13  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Péptido sintético

55 <400> 13

**Asp Ala Glu Phe Arg**

1 5

60 <210> 14  
 <211> 16  
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5 <400> 14

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

10 <210> 15  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 15

**Lys Ala Ser Asn Arg Phe Ser**  
**1 5**

20 <210> 16  
 <211> 9  
 <212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

30 <400> 16

**Phe Gln Gly Ser Arg Leu Gly Pro Ser**  
**1 5**

35 <210> 17  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 17

tatggcttct agagatgtgg tgatg 25

45 <210> 18  
 <211> 82  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>

55 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (59)..(60)  
 <223> n es a, c, g, o t

<220>

60 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (62)..(63)  
 <223> n es a, c, g, o t



<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (65)..(66)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 5  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (68)..(69)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 10  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (71)..(72)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 15  
 <400> 18  
  
 tgcagccacc gtacgcttga tctccagctt ggtgccctgg ccaaaggtgg ggggcacmnn 60  
 mnnmnnmnnm nngcagtagt ag 82  
 20 <210> 19  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (47)..(48)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 30  
  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (50)..(51)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 35  
  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (53)..(54)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 40  
  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (56)..(57)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 45  
  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (59)..(60)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 50  
  
 <400> 19  
  
 tgcagccacc gtacgcttga tctccagctt ggtgccctgg ccaaamnnm nnnmnnmnn 60  
 55 gctgccctgg 70  
  
 <210> 20  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
 <220>

<223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 20

5 aggcggccct cgaggagtg cagc 24

<210> 21  
 <211> 83  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

15 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (60)..(61)  
 <223> n es a, c, g, o t

20 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (63)..(64)  
 <223> n es a, c, g, o t

25 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (66)..(67)  
 <223> n es a, c, g, o t

30 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (69)..(70)  
 <223> n es a, c, g, o t

35 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (72)..(73)  
 <223> n es a, c, g, o t

40 <400> 21

agaccgatgg gcccttggtg gaggcgctgg acacggtcac cagggtgccc tggccccamn 60

nnnnnnnnnn mnnngtgatg ccc 83

<210> 22  
 <211> 92  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 50 <223> Oligonucleótido sintético

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (69)..(70)  
 55 <223> n es a, c, g, o t

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (72)..(73)  
 60 <223> n es a, c, g, o t

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (75)..(76)

<223> n e s a , c , g , o t

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 5 <222> (78)..(79)  
 <223> n e s a , c , g , o t

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 10 <222> (81)..(82)  
 <223> n e s a , c , g , o t

<400> 22

agaccgatgg gcccttgggtg gaggcgctgg acacggtcac cagggtgccc tggccccagt 60

15 agtccagmnn mnnmnnmnm ncccgggcac ag 92

<210> 23  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

25 <400> 23

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr  
 1 5

<210> 24  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

35 <400> 24

Phe Gln Gly Ser Arg Val Pro Ala Ser  
 1 5

40 <210> 25  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 25

50 Phe Gln Gly Ser Arg Val Pro Pro Gly  
 1 5

<210> 26  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 55 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

60 <400> 26



ES 2 666 840 T3

Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn  
1 5 10 15

Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
20 25 30

Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp  
35 40 45

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser  
50 55 60

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser  
65 70 75 80

His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
85 90 95

<210> 31  
<211> 95  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Péptido sintético

<400> 31

Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn  
1 5 10 15

Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
20 25 30

Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp  
35 40 45

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser  
50 55 60

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser  
65 70 75 80

Arg Leu Gly Pro Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
85 90 95

15 <210> 32  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Péptido sintético

<400> 32

ES 2 666 840 T3

Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn  
1 5 10 15

Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
20 25 30

Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp  
35 40 45

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser  
50 55 60

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser  
65 70 75 80

Arg Val Pro Ala Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
85 90 95

<210> 33  
<211> 95  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Péptido sintético

<400> 33

Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn  
1 5 10 15

Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
20 25 30

Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp  
35 40 45

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser  
50 55 60

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser  
65 70 75 80

Arg Val Pro Pro Gly Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
85 90 95

15 <210> 34  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Péptido sintético

<400> 34

ES 2 666 840 T3

Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn  
1 5 10 15

Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
20 25 30

Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp  
35 40 45

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser  
50 55 60

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser  
65 70 75 80

Lys Ala His Pro Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
85 90 95

<210> 35

<211> 95

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido sintético

<400> 35

Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn  
1 5 10 15

Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
20 25 30

Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp  
35 40 45

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser  
50 55 60

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser  
65 70 75 80

Tyr Ala Pro Pro Gly Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
85 90 95

15 <210> 36

<211> 95

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 36

ES 2 666 840 T3

Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn  
1 5 10 15

Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
20 25 30

Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp  
35 40 45

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser  
50 55 60

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser  
65 70 75 80

Arg Ala Pro Pro Phe Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
85 90 95

5 <210> 37  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Péptido sintético

<400> 37

Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn  
1 5 10 15

Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
20 25 30

Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp  
35 40 45

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser  
50 55 60

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser  
65 70 75 80

15 Arg Val Pro Val Arg Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
85 90 95

<210> 38  
<211> 981  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Polinucleótido sintético

25 <400> 38



# ES 2 666 840 T3

```

gcatccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag      60
agcacagccg ccctgggctg cctgggcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcc     120
tggaactctg gcgccctgac ctctggcgtg cacaccttcc ctgctgtgct gcaatcctct     180
ggcctgtact ccctgtcctc tgtggtgaca gtgccatcct ccaacttcgg cacccagacc     240
tacacatgca atgtggacca caagccatcc aacaccaagg tggacaagac agtggagcgg      300
aagtgtgtg tggagtgcc cccatgccct gccccccctg tggctggccc atctgtgttc     360
ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg atgatctccc ggaccctga ggtgacctgt     420
gtggtggtgg acgtgtccca tgaggaccct gaggtgcagt tcaactggta tgtggatggc     480
gtggagggtg acaatgccaa gaccaagccc cgggaggagc agttcaactc caccttccgg     540
gtggtgtctg tgctgacagt ggtgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc     600
aagggtgtca acaagggcct gcctgcccc atcgagaaga ccatctccaa gaccaagggc     660
cagccccggg agccccaggt gtacaccctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac     720
caggtgtccc tgacctgcct ggtgaagggc ttctaccat ccgacattgc tgtggagtgg     780
gagtccaatg gccagcctga gaacaactac aagaccacc ccccatgct ggactctgat     840
ggctccttct tcctgtactc caagctgaca gtggacaagt cccggtggca gcagggcaat     900
gtgttctcct gctctgtgat gcatgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtccctg     960
tcctgtccc ctggcaagtg a                                           981

```

- 5 <210> 39
- <211> 326
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> Polipéptido sintético
  
- <400> 39

ES 2 666 840 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 115 120 125

ES 2 666 840 T3

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp  
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325

<210> 40

<211> 324

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

10

<400> 40

Cys Gly Thr Ala Cys Gly Gly Thr Gly Gly Cys Thr Gly Cys Ala Cys



ES 2 666 840 T3

Cys Cys Thr Gly Cys Gly Ala Ala Gly Thr Cys Ala Cys Cys Cys Ala  
 260 265 270

Thr Cys Ala Gly Gly Gly Cys Cys Thr Gly Ala Gly Cys Thr Cys Gly  
 275 280 285

Cys Cys Cys Gly Thr Cys Ala Cys Ala Ala Ala Gly Ala Gly Cys Thr  
 290 295 300

Thr Cys Ala Ala Cys Ala Gly Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Thr Gly  
 305 310 315 320

Thr Thr Ala Gly

<210> 41

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido sintético

<400> 41

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

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105

15 <210> 42

<211> 57

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 42

25 atggaatgga gctgggtctt tctctcttc ctgtcagtaa ctacaggtgt ccaactcg 57

<210> 43

<211> 19

ES 2 666 840 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Péptido sintético

<400> 43

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly  
 1 5 10 15

Val His Ser

10 <210> 44  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 44

20 atgagtgtgc cactcaggt cctgggggtg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgc 60

<210> 45  
 <211> 20

25 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

30 <400> 45

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

Asp Ala Arg Cys  
 20

35 <210> 46  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 46

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

<210> 47  
 <211> 16  
 <212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

55 <400> 47



ES 2 666 840 T3

<210> 53  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
  
 10 <400> 53  
  
**Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Leu Glu**  
 1 5 10 15  
  
 <210> 54  
 15 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Péptido sintético  
  
 <400> 54  
  
**Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Ala Thr Tyr Leu Glu**  
 1 5 10 15  
  
 25 <210> 55  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Péptido sintético  
  
 <400> 55  
  
 35 **Lys Ala Ser Gln Arg Phe Ser**  
 1 5  
  
 <210> 56  
 <211> 7  
 40 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
  
 45 <400> 56  
  
**Lys Ala Ser Ser Arg Phe Ser**  
 1 5  
  
 50 <210> 57  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 55 <220>  
 <223> Péptido sintético  
  
 <400> 57  
  
**Lys Ala Ser Thr Arg Phe Ser**  
 60 1 5  
  
 <210> 58



<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Péptido sintético

<400> 58

10 **Lys Ala Ser Ala Arg Phe Ser**  
1 5

## REIVINDICACIONES

1.- Un kit para detectar oligómeros de beta-amiloides, que comprende:

(a) un anticuerpo de captura que tiene una región variable de cadena ligera con una CDR1 que tiene la secuencia Arg-Ser-Ser-Gln-Ser-Ile-Val-His-Ser-Asn-Gly-Asn-Thr-Tyr-Leu-Glu (SEQ ID NO:14), una CDR2 que tiene la secuencia Lys-Ala-Ser-Asn-Arg-Phe-Ser (SEQ ID NO:15), y una CDR3 que tiene la secuencia Phe-Gln-Gly-Ser-Arg-Leu-Gly-Pro-Ser (SEQ ID NO:16); y una región variable de cadena pesada con una CDR1 que tiene la secuencia Gly-Phe-Thr-Phe-Ser-Ser-Phe-Gly-Met-His (SEQ ID NO:4), una CDR2 que tiene la secuencia Tyr-Ile-Ser-Arg-Gly-Ser-Ser-Thr-Ile-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Thr-Val-Lys-Gly (SEQ ID NO:5), y una CDR3 que tiene la secuencia Gly-Ile-Thr-Thr-Ala-Leu-Asp-Tyr (SEQ ID NO:6);

y

(b) un anticuerpo de detección que reconoce un epítipo lineal N-terminal del péptido beta-amiloide 1-42 que es 82E1.

2.- Un método *in vitro* para detectar oligómeros de beta-amiloides, que comprende:

(a) poner en contacto una muestra biológica procedente de un animal, conteniendo dicha muestra biológica oligómeros de beta-amiloides, con un anticuerpo de captura bajo condiciones suficientes para formar un complejo de anticuerpo de captura/oligómero de beta-amiloide, en el que el anticuerpo de captura tiene una región variable de cadena ligera con una CDR1 que tiene la secuencia Arg-Ser-Ser-Gln-Ser-Ile-Val-His-Ser-Asn-Gly-Asn-Thr-Tyr-Leu-Glu (SEQ ID NO:14), una CDR2 que tiene la secuencia Lys-Ala-Ser-Asn-Arg-Phe-Ser (SEQ ID NO:15), y una CDR3 que tiene la secuencia Phe-Gln-Gly-Ser-Arg-Leu-Gly-Pro-Ser (SEQ ID NO:16); y una región variable de cadena pesada con una CDR1 que tiene la secuencia Gly-Phe-Thr-Phe-Ser-Ser-Phe-Gly-Met-His (SEQ ID NO:4), una CDR2 que tiene la secuencia Tyr-Ile-Ser-Arg-Gly-Ser-Ser-Thr-Ile-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Thr-Val-Lys-Gly (SEQ ID NO:5), y una CDR3 que tiene la secuencia Gly-Ile-Thr-Thr-Ala-Leu-Asp-Tyr (SEQ ID NO:6);

(b) poner en contacto el complejo de la etapa (a) con un anticuerpo de detección bajo condiciones suficientes para formar un complejo de anticuerpo de captura/oligómero de beta-amiloide/anticuerpo de detección, en el que el anticuerpo de detección reconoce un epítipo lineal N-terminal del péptido de beta-amiloide 1-42 y es 82E1; y

(c) detectar el complejo de la etapa (b).

3.- Un método de la reivindicación 2, en el que el animal es un ser humano.

4.- El kit de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2 o 3, en los que la afinidad del anticuerpo de captura por los oligómeros de beta-amiloides 1-42, comparado con los monómeros de beta-amiloides 1-40, en un ensayo de unión competitiva es al menos 500:1.

5.- El kit de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2 o 3, en los que la afinidad del anticuerpo de captura por los oligómeros de beta-amiloides 1-42, comparado con los monómeros de beta-amiloides 1-42, en un ensayo de ELISA de "sandwich" es al menos 500:1; en los que, opcionalmente, la afinidad del anticuerpo de captura por los oligómeros del beta-amiloide 1-42, comparada con monómeros del beta-amiloide 1-42 en un ensayo de ELISA de "sandwich" es al menos 1000:1.

6.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que la muestra biológica comprende fluido cerebroespinal.

7.- El kit de la reivindicación 1, 4 o 5 o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en los que el nivel de detección de los oligómeros de beta-amiloides 1-42 por dicho kit es menor que 5 pg/ml, o en los que dicho método es capaz de detectar menos de 5 pg/ml de oligómeros de beta-amiloides 1-42 en el fluido cerebroespinal; en los que, opcionalmente, el nivel de detección de oligómeros de beta-amiloides 1-42 por dicho kit es menor que 3 pg/ml, o dicho método es capaz de detectar menos de 3 pg/ml de oligómeros de beta-amiloides 1-42 en el fluido cerebroespinal.

8.- El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 4, 5 o 7 o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en los que el anticuerpo de detección comprende además un marcador; y en los que, opcionalmente, el marcador es un marcador fluorescente.

9.- El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 4, 5, 7 u 8, que comprende además un medio para concentrar un complejo de antígeno-anticuerpo.

10.- El kit de la reivindicación 9, en el que el medio para concentrar un complejo de antígeno-anticuerpo comprende una esfera magnética o paramagnética.

11.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, que comprende además la etapa de concentrar el complejo de anticuerpo de captura/oligómero de beta-amiloide/anticuerpo de detección antes de detectar el

complejo.

12.- El método de la reivindicación 11, en el que el medio para concentrar un complejo de antígeno-anticuerpo comprende una esfera magnética o paramagnética.

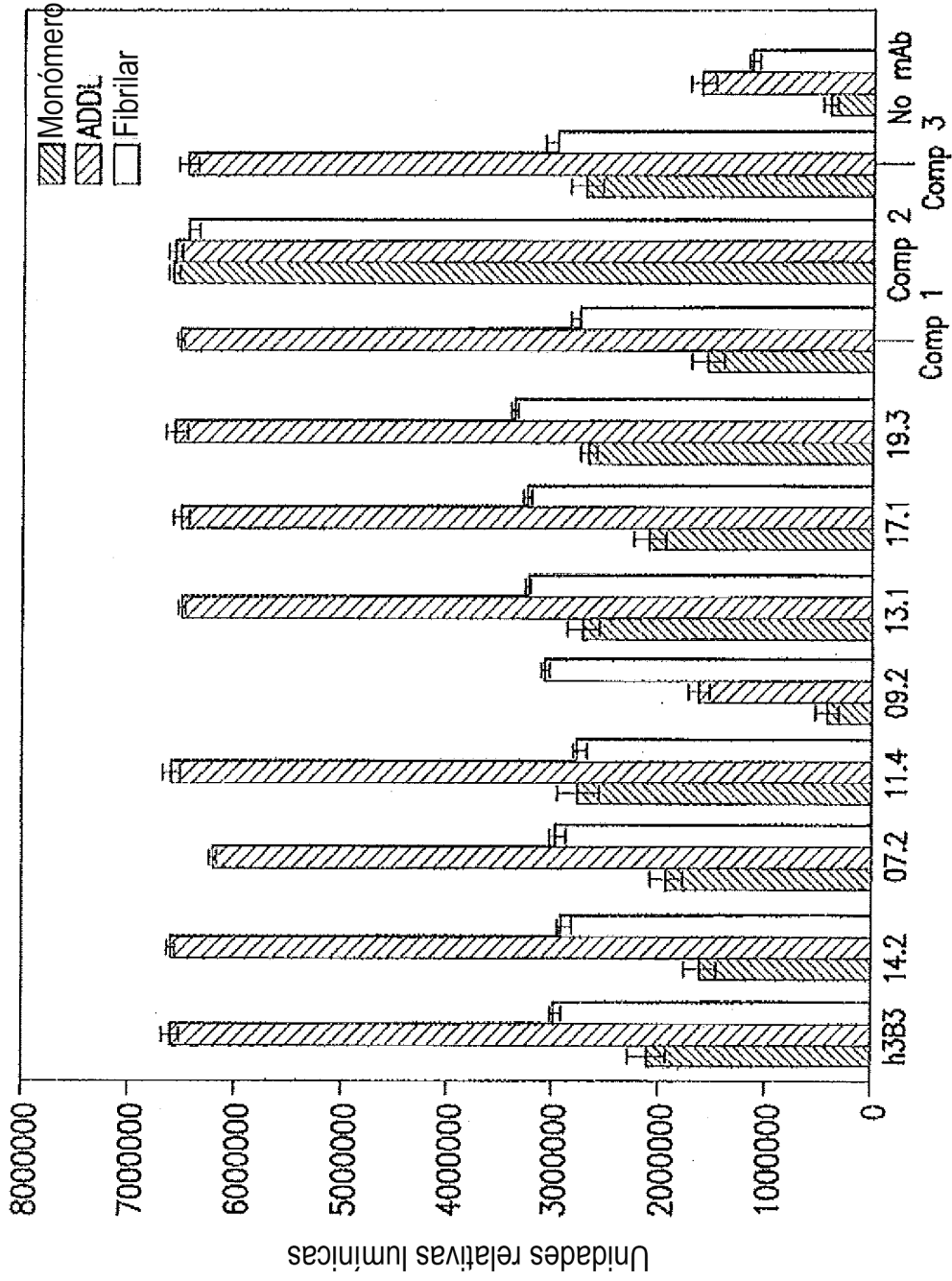


FIG. 1

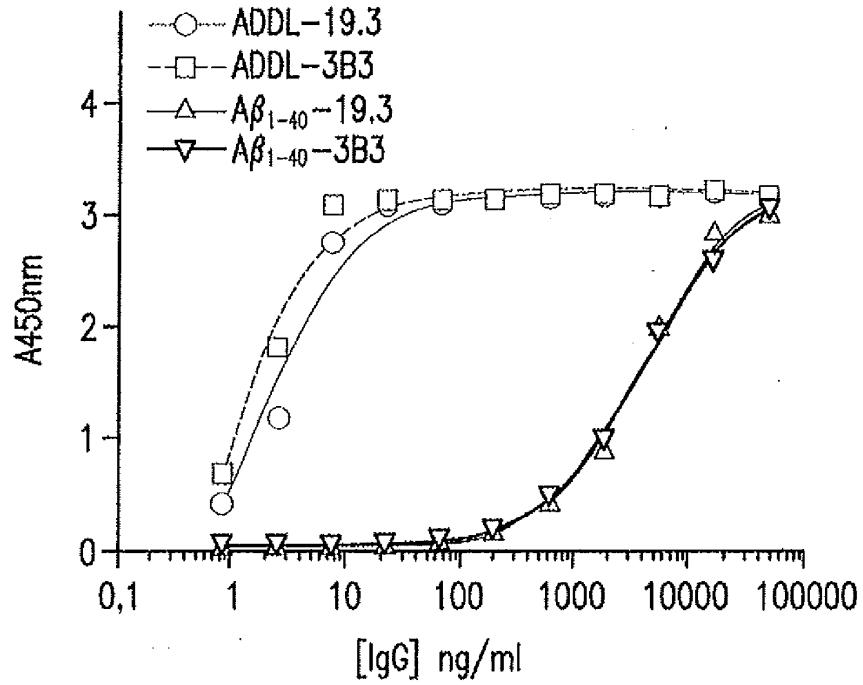


FIG. 2

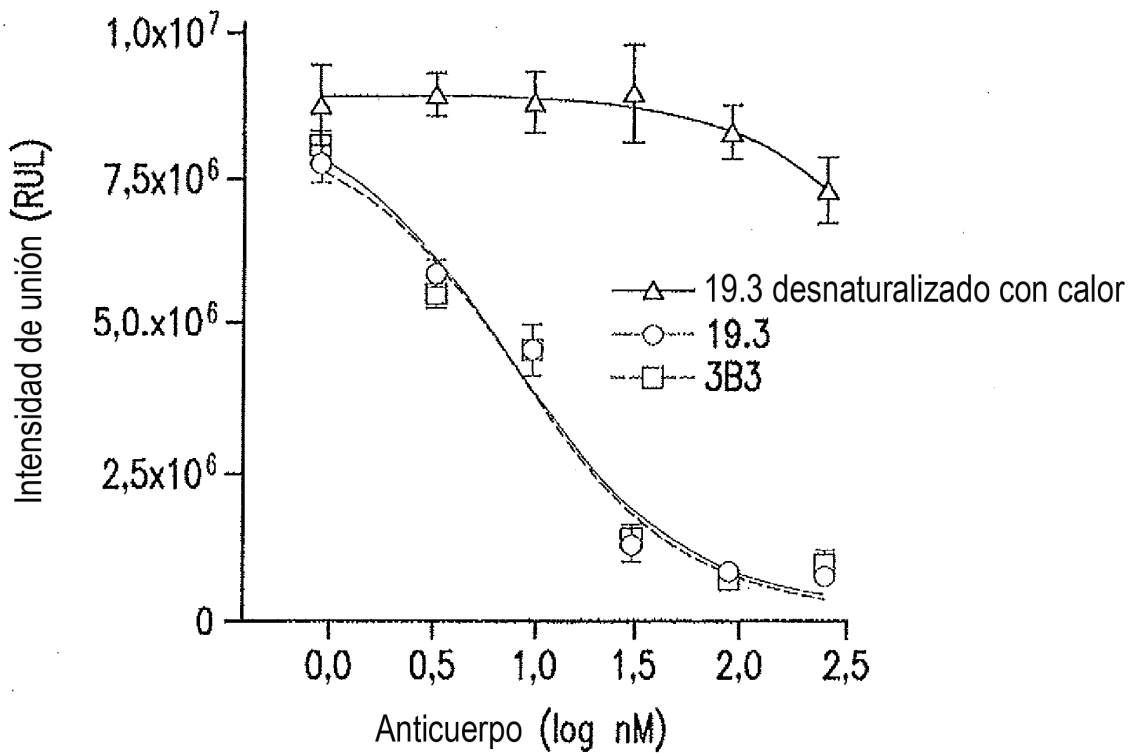


FIG. 3

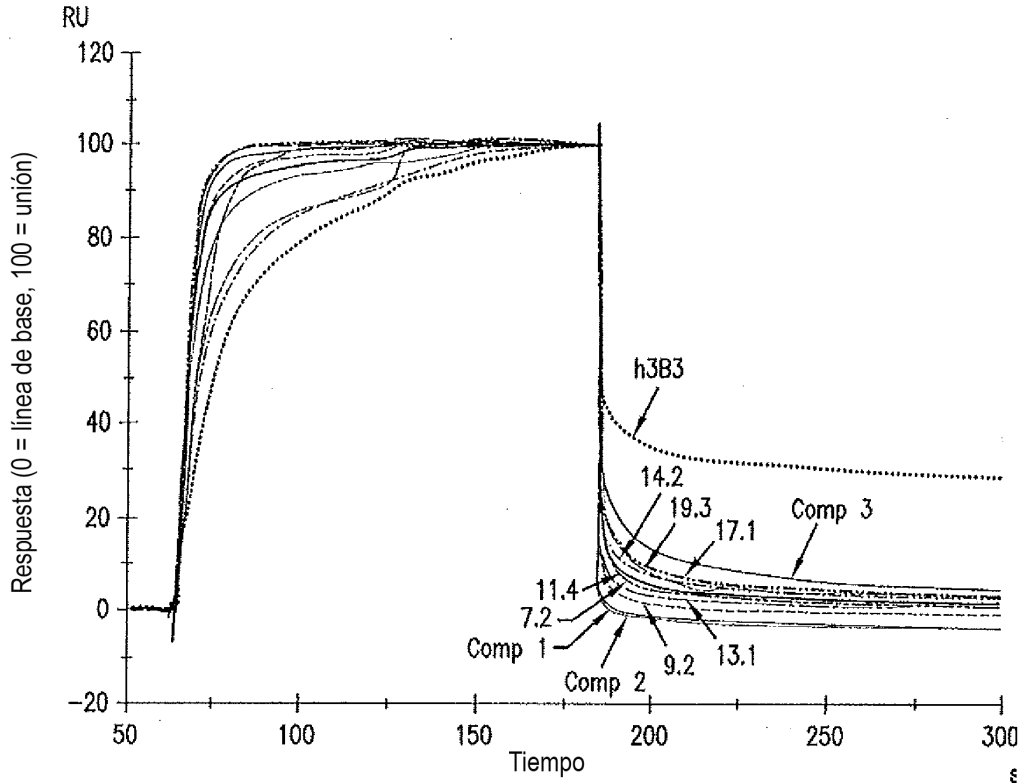


FIG. 4

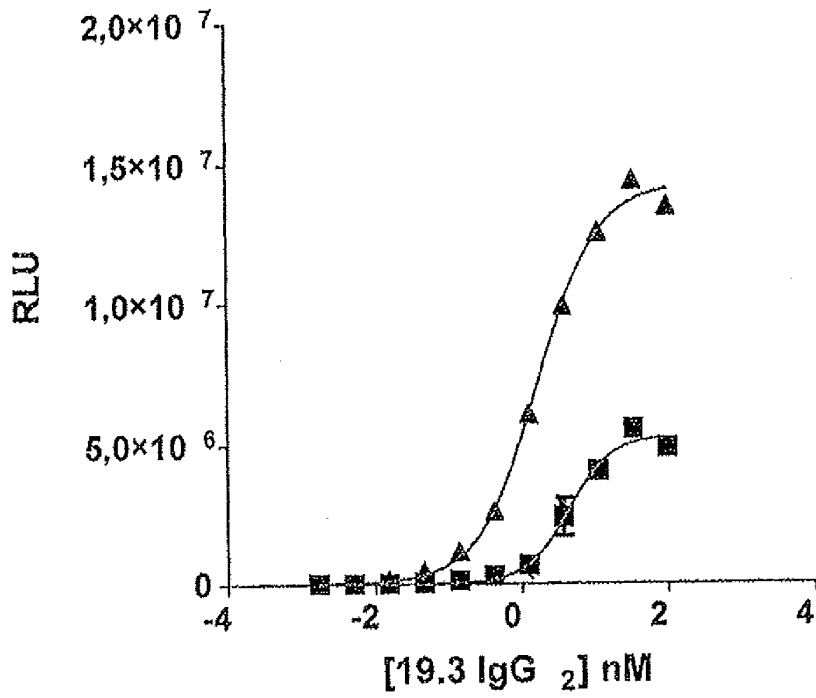


FIG. 5A

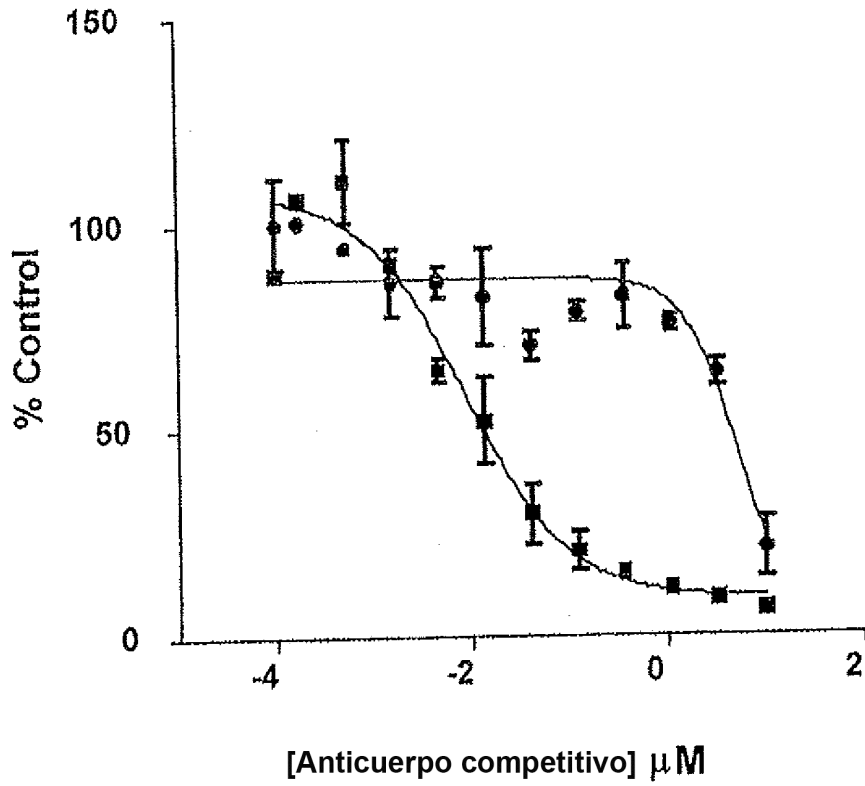


FIG. 5B

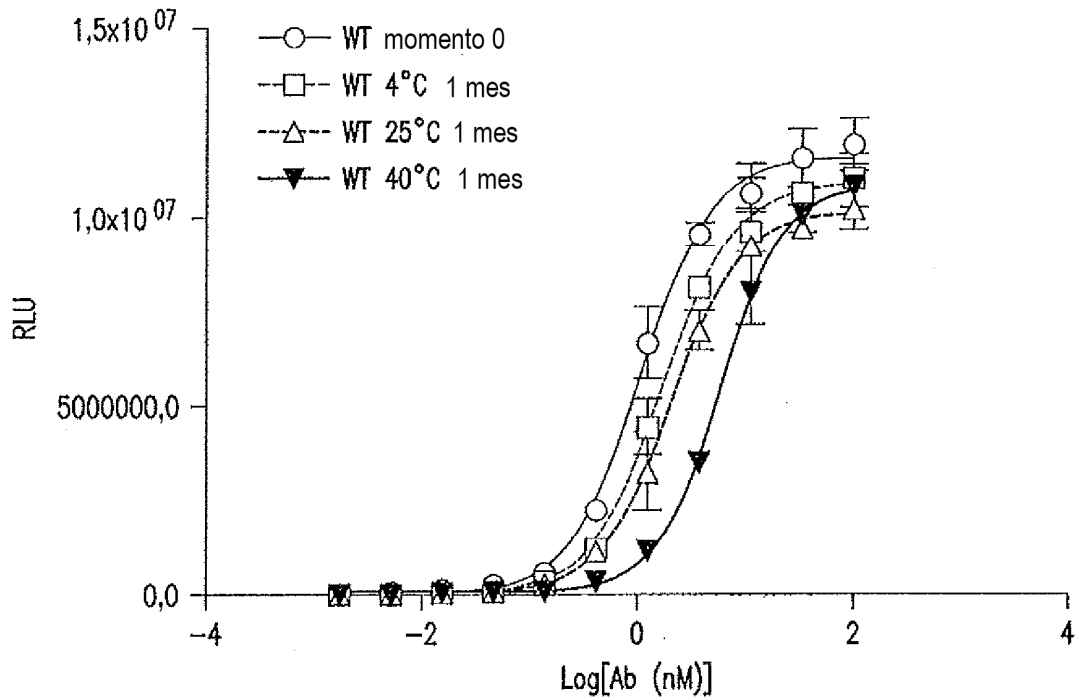


FIG. 6A

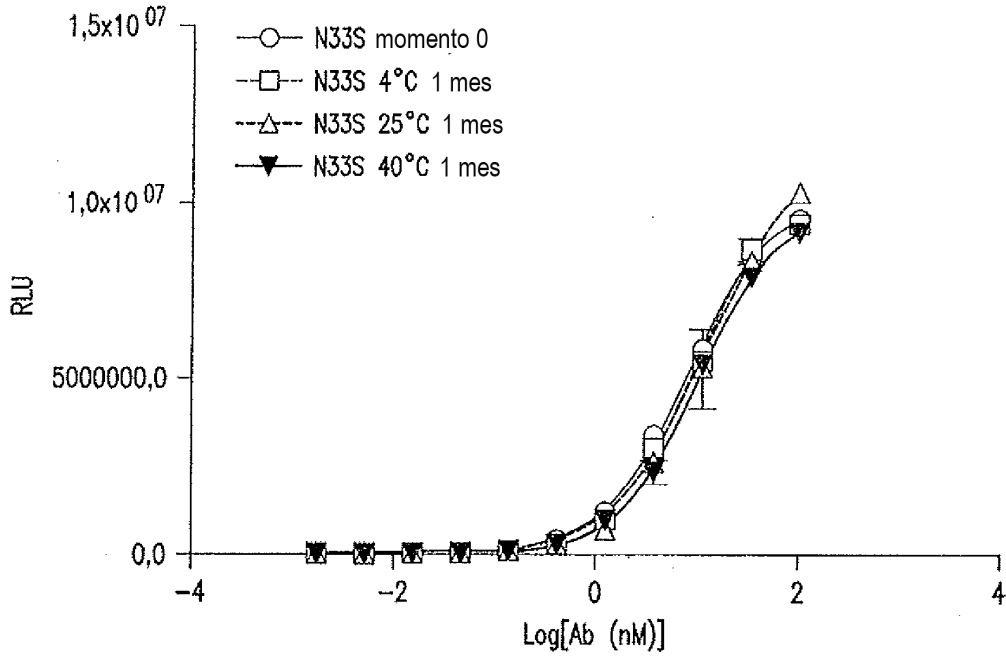


FIG. 6B

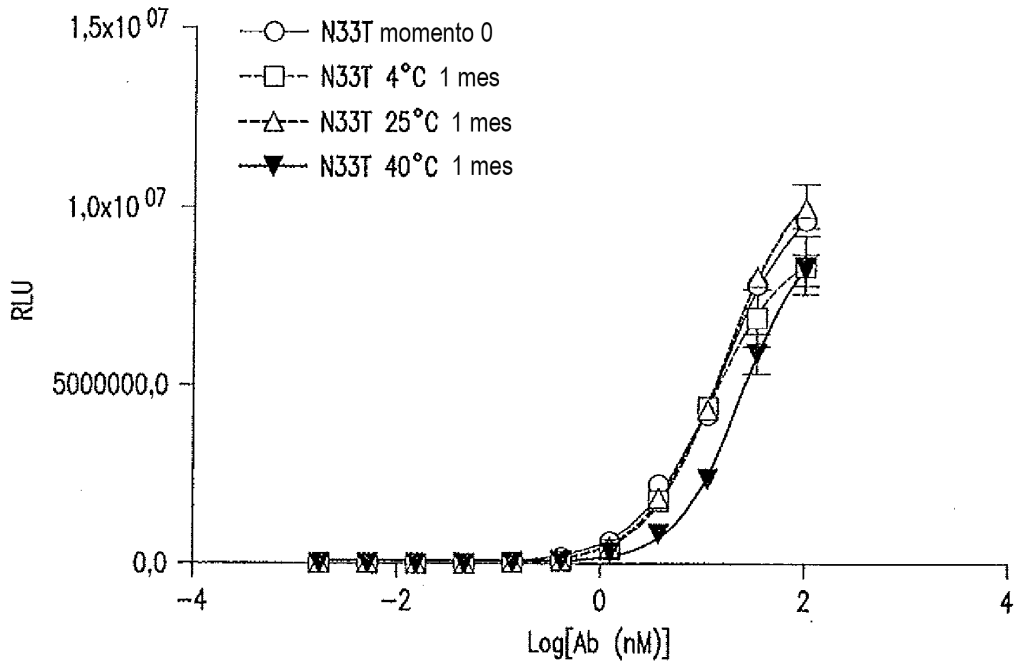


FIG. 6C



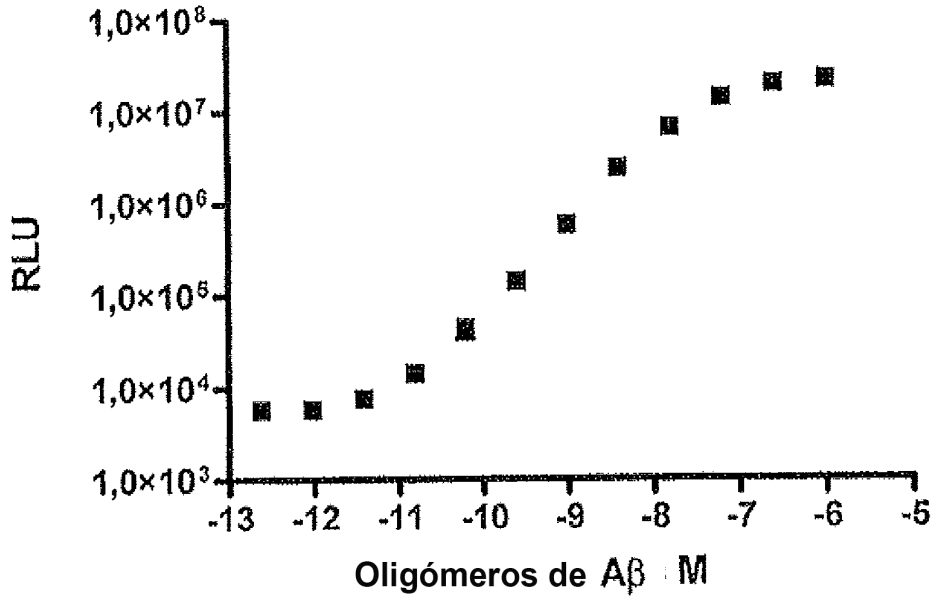


FIG. 7A

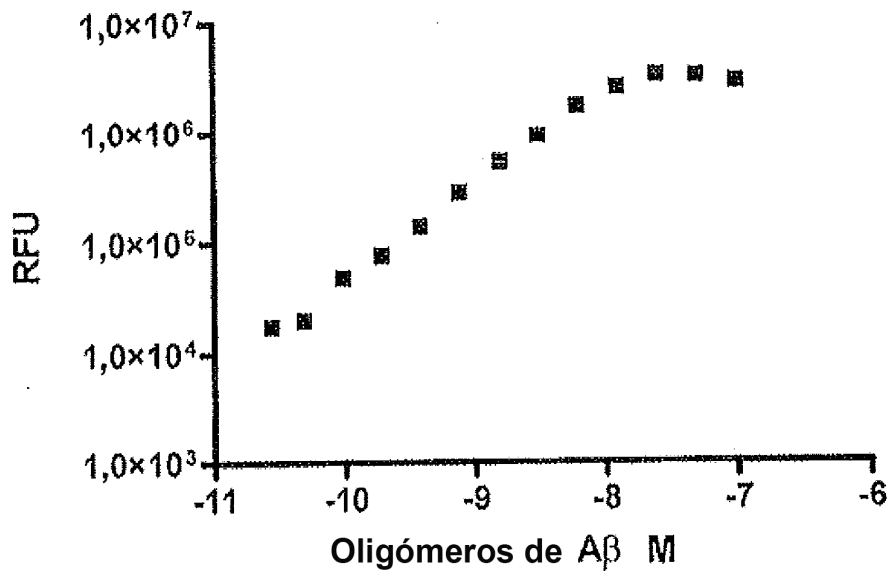


FIG. 7B

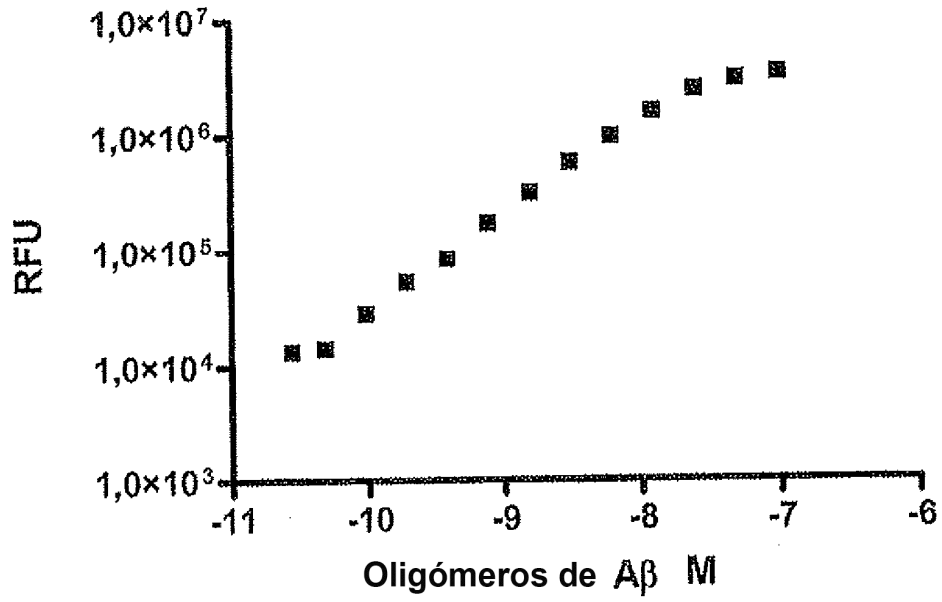


FIG. 7C

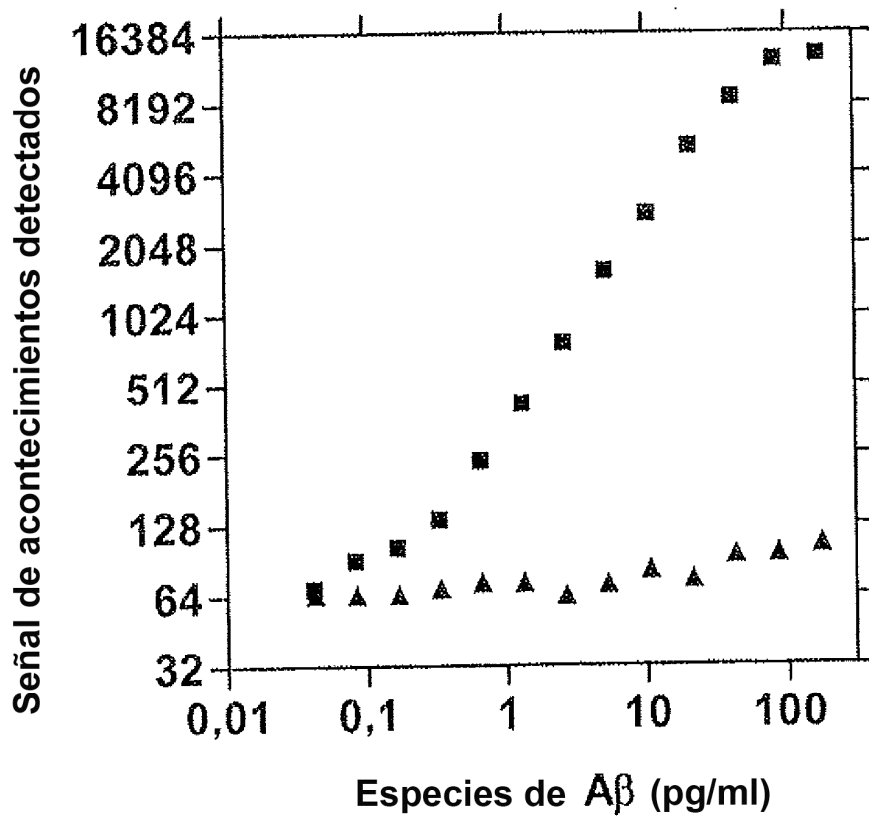
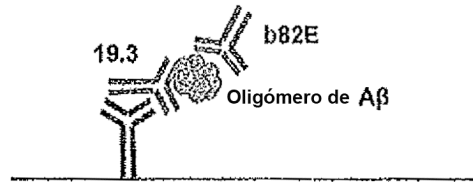
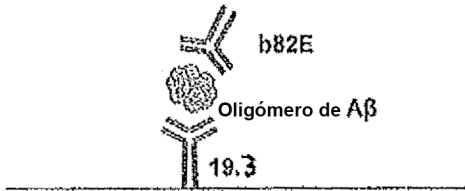


FIG. 8

ELISA de "sandwich" de oligómero de A $\beta$

ELISA de "sandwich" de anticuerpo/oligómero de A $\beta$



Ensayo farmacodinámico

Ensayo de unión a la diana

FIG. 9A

FIG. 9B

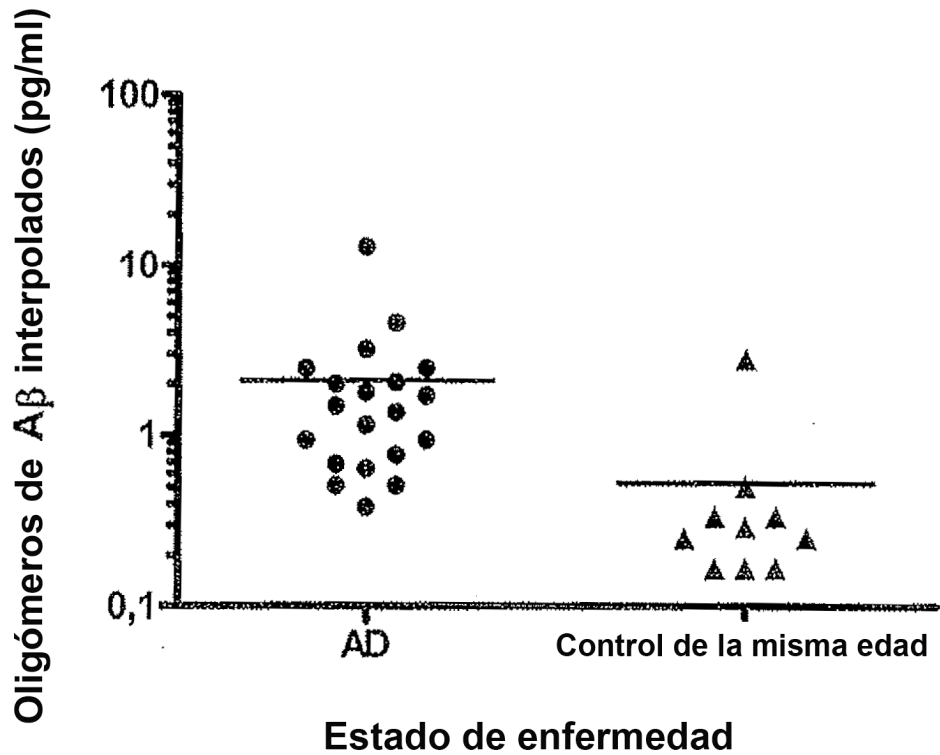


FIG. 10A

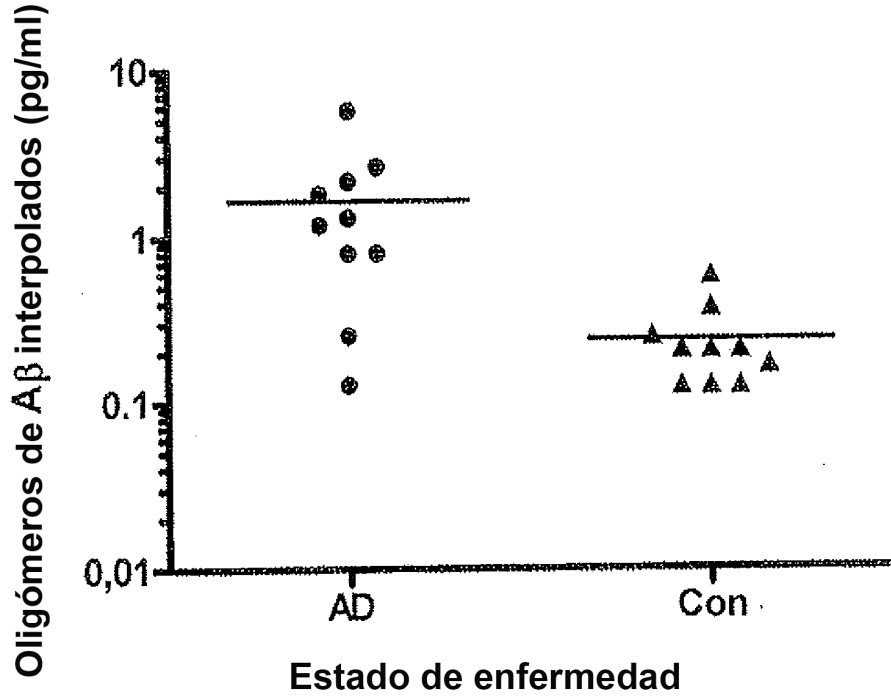


FIG. 10B

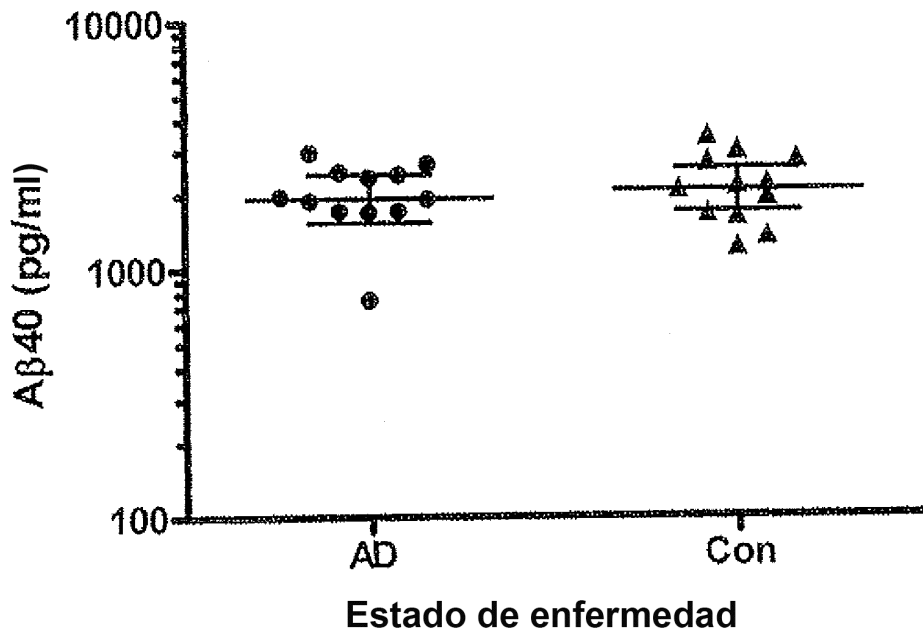


FIG. 11A



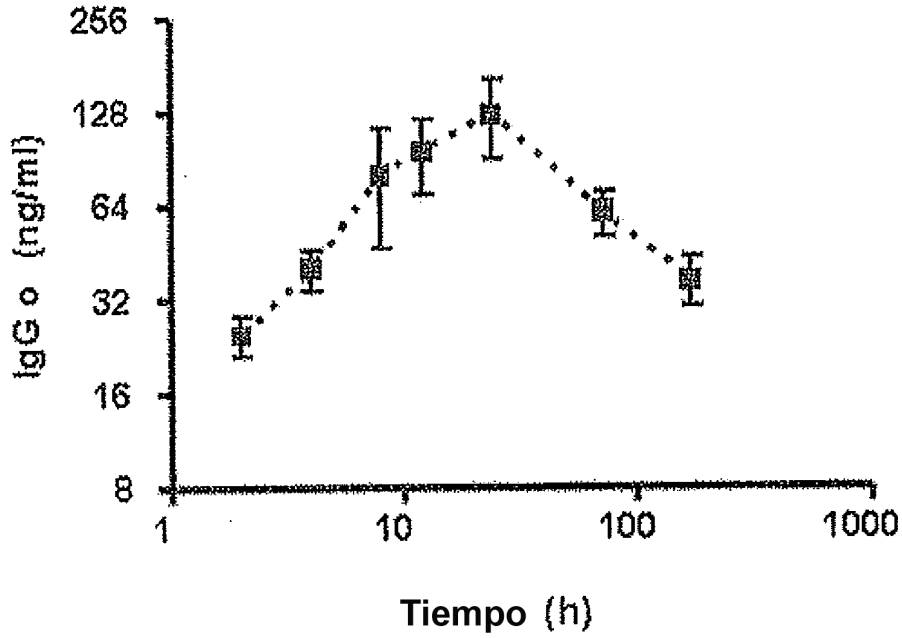


FIG. 13

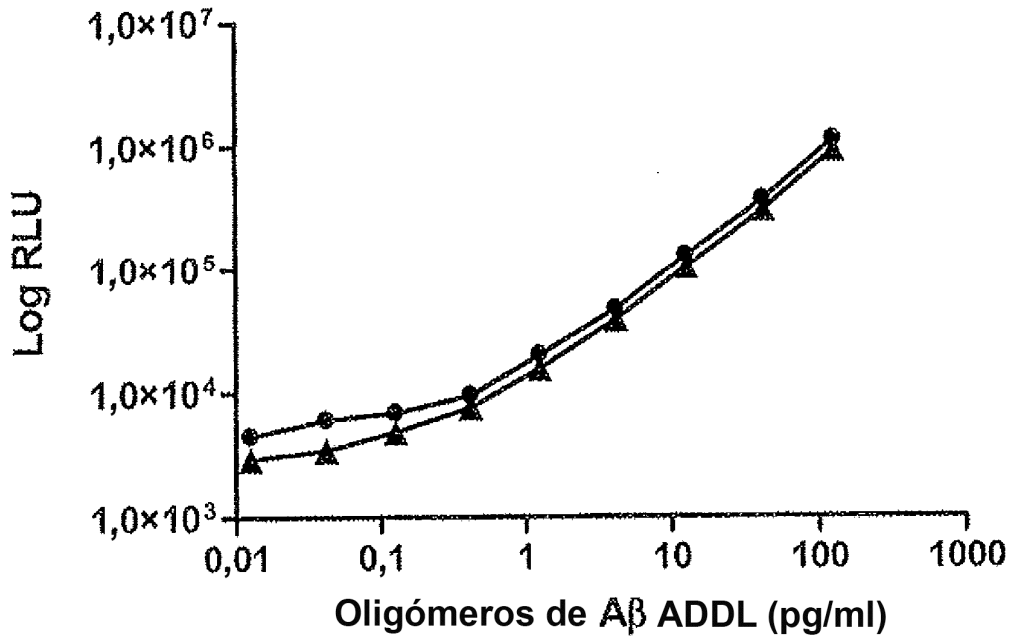
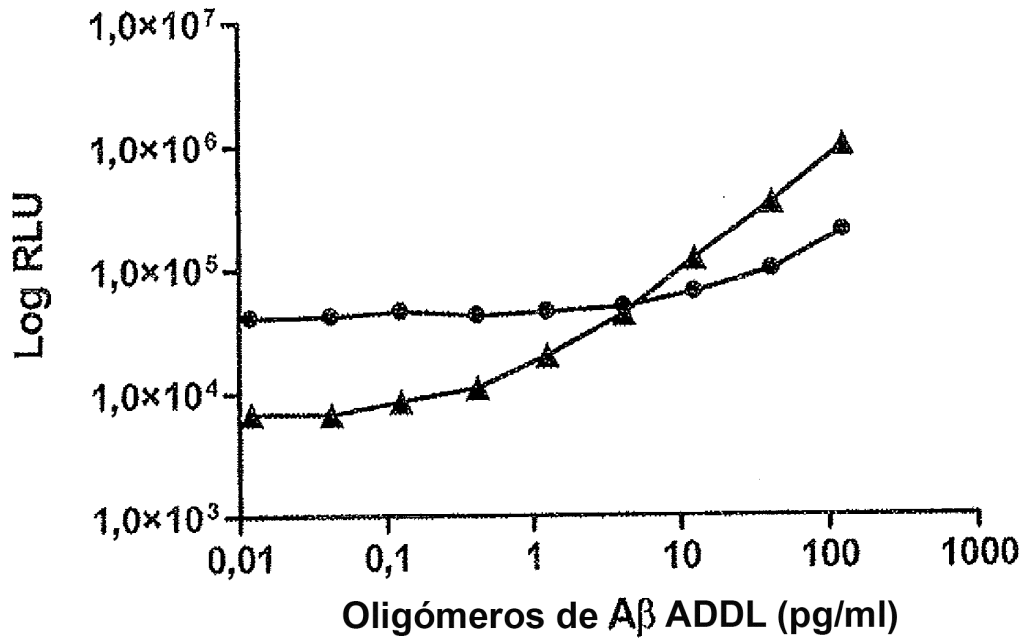


FIG. 14A



*FIG. 14B*