

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 020**

51 Int. Cl.:

C12N 15/53 (2006.01) **G01N 33/573** (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 38/44 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2007** **E 12161564 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018** **EP 2514823**

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

30 Prioridad:

03.03.2006 US 778379 P

03.03.2006 US 367609

09.05.2006 US 798728 P

09.05.2006 US 798727 P

01.12.2006 US 565967

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

03.09.2018

73 Titular/es:

PROMIS NEUROSCIENCES INC. (50.0%)

1920 Yonge Street, Suite 200

Toronto, ON M4S 3E2, CA y

UNIVERSITY HEALTH NETWORK (50.0%)

72 Inventor/es:

CASHMAN, NEIL;

CHAKRABARTTY, AVIJIT;

RAKHIT, RISHI y

OSTERMANN, JOACHIM BERNHARD

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

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

ES 2 680 020 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

5 Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

10

Mal plegamiento y agregación de proteínas

Las proteínas pueden plegarse en estructuras complejas y compactas. El plegamiento no solo es fundamental para la actividad biológica, sino que el mal plegamiento de las proteínas o el mantenimiento de las mismas plegadas pueden dar lugar a enfermedades (revisado en 48). En algunos casos, el mal plegamiento puede causar la agregación de proteínas que puede dar lugar a depósitos diferenciados extracelularmente (por ejemplo, placas) o intracelularmente (por ejemplo, inclusiones en el citosol o en el núcleo).

15

Las enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (EH), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y las enfermedades priónicas se caracterizan por depósitos neuronales de proteína agregada mal plegada (revisado en 49).

20

Las enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la enfermedad de Parkinson/demencia con cuerpos de Lewy (EP, ECL) también plantean importantes desafíos para nuestra población envejecida y nuestro sistema de salud.

25

La EA, ELA y EP/ECL esporádicas están asociadas con la acumulación neuronal de multímeros patológicos de polipéptidos mal plegados (estos podrían ser fibrillas, protofilamentos y agregados amorfos), incluyendo el fragmento amiloide beta (Abeta) de la proteína precursora de amiloide (APP) en la EA; la superóxido dismutasa-1 (SOD1) en la ELA, EA y EP, y la alfa-sinucleína en la EP y ECL. Además, la polineuropatía amiloidótica familiar (PAF) se debe a la agregación de la transtiretina para formar depósitos de amiloide. Al igual que con las enfermedades priónicas, las mutaciones en los genes que codifican estos polipéptidos se asocian con formas familiares autosómicas dominantes de la EA, ELA y EP.

30

35 ELA y mal plegamiento de proteínas

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neuromuscular mortal que afecta a aproximadamente 30.000 pacientes en Norteamérica, con 5.000 nuevos casos al año. En la ELA, también conocida como "enfermedad de Lou Gehrig", los músculos de las extremidades, el habla, y la deglución y la respiración se debilitan y se atrofian, debido a la degeneración de las células nerviosas motoras que los suministran desde la médula espinal y el cerebro. La mitad de los pacientes afectados mueren en el transcurso de 3 años, con una supervivencia de más de 5 años inferior al 20 %.

40

La ELA pertenece a una familia de trastornos neurodegenerativos mortales, que incluye enfermedades priónicas, enfermedades de Alzheimer y Parkinson, y en la que se cree que las proteínas mal plegadas agregadas provocan la muerte progresiva de las células cerebrales. Aproximadamente el 20 % de la ELA familiar (heredada) se asocia a mutaciones en el gen que codifica la superóxido dismutasa 1 (SOD1), una enzima de defensa de radicales libres intracelulares (véanse 73 y la Tabla 1 para consultar la lista de mutaciones conocidas). Se han observado depósitos intracelulares de SOD1 mal plegada agregada en la ELA familiar, y también en la ELA no familiar (esporádica) más común, lo que sugiere que la agregación de SOD1 puede ser la base de todas las ELA.

50

Los experimentos realizados en cultivos celulares y en ratones transgénicos para la SOD1 mutante humana han establecido que la SOD1 mal plegada extracelular es muy tóxica para las neuronas motoras (1), en parte, por la activación de las vías de destrucción por parte de las células inmunes locales (microgliales). Recientemente, también ha quedado claro que la SOD1 mal plegada se exporta desde la célula tanto mediante mecanismos secretores como constitutivos (1, 2).

55

La agregación de SOD1 puede progresar a través de un mecanismo de plegamiento incorrecto dirigido por un molde basado en proteínas (3) similar al propuesto para las enfermedades priónicas (4). Por lo tanto, la SOD1 mal plegada en el espacio extracelular no solo es directamente tóxica para las neuronas motoras, sino que también puede participar en la propagación de la enfermedad de célula a célula en todo el sistema nervioso mediante un proceso de mal plegamiento de tipo priónico.

60

TABLA 1. Mutaciones detectadas en SOD1 en la ELA familiar

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

Enfermedad de Alzheimer

- 5 La EA es una enfermedad neurodegenerativa demencial (que afecta a la memoria y a la cognición) común asociada con la acumulación cerebral de placas extracelulares compuestas predominantemente de los péptidos Abeta (1-40), Abeta (1-42) y Abeta (1-43), siendo todos productos proteolíticos de APP (revisado en 50). Además, los ovillos neurofibrilares, compuestos principalmente de proteína tau fosforilada anormalmente (una proteína neuronal asociada a microtúbulos), se acumulan intracelularmente en las neuronas moribundas (revisado en 49). Las formas familiares de la EA pueden ser causadas por mutaciones en el gen APP, o en los genes de presenilina 1 o 2 (revisados en 51), cuyos productos proteicos participan en el procesamiento de APP a Abeta. Las variantes alélicas de la apolipoproteína E también influyen en la edad al inicio de las formas de EA tanto esporádica como familiar (revisado en 52). Abeta, tau y tau fosforilada se han detectado en la sangre y en el LCR de pacientes con EA, y en controles normales (53 - 55). La inmunización de pacientes con la enfermedad de Alzheimer con Abeta ha mostrado algunos resultados preliminares de tratamiento prometedores, aunque limitados por la meningoencefalitis autoinmune en seres humanos (56-58).

Enfermedad de Parkinson

- 20 La EP es un trastorno del movimiento neurodegenerativo, solo superado por la EA en la frecuencia (-350 por cada 100.000 habitantes; revisado en 59). Se caracteriza clínicamente por rigidez, lentitud de movimiento y temblor. La mayoría de los casos de enfermedad de Parkinson son esporádicos, pero las formas esporádica y familiar de la enfermedad se caracterizan por cuerpos de Lewy intracelulares en neuronas moribundas de la sustancia negra, una población de neuronas del mesencéfalo (-60,000) que son diezadas selectivamente en la EP. Los cuerpos de Lewy se componen predominantemente de alfa-sinucleína (60). Se han encontrado mutaciones y duplicaciones del gen que codifica alfa-sinucleína en pacientes con la enfermedad de Parkinson familiar (revisado en 61). Otro gen asociado con la EA autosómica recesiva es la parkina, que está implicada en la degradación de la alfa-sinucleína (61). Se observan cuerpos de Lewy corticales difusos compuestos de alfa-sinucleína en la enfermedad de cuerpos de Lewy (ECL), un síndrome demencial asociado con los cambios en el tono parkinsoniano, alucinaciones y fluctuación rápida de los síntomas (62). La ECL puede ser la segunda forma más común de demencia neurodegenerativa después de la EA, representando del 20 al 30 por ciento de los casos entre las personas mayores de 60 años. De forma similar al enfoque de la vacuna contra la enfermedad de Alzheimer (58-60), se han obtenido resultados prometedores en un modelo murino de la enfermedad de Parkinson/cuerpos de Lewy mediante

la inmunización con alfa sinucleína (63). Otros síndromes demenciales incluyen las demencias fronto-temporales, la enfermedad de Pick y la demencia corticobasal, y otras conocidas por la medicina neurológica.

Se ha detectado la SOD1 en agregados de proteínas de la EA y la EP

El estrés oxidativo se ha visto implicado en varias enfermedades neurodegenerativas, entre las que se incluyen la ELA, la EP y la EA. Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS respectivamente) generadas en estos entornos pueden participar en la lesión celular, incluyendo la oxidación anómala de proteínas o lípidos. Otras características patológicas de dicha enfermedad incluyen acumulaciones de restos citoesqueléticos y muerte neuronal selectiva, frecuentemente atribuidas al estrés oxidativo y a la proteína insoluble acumulada (74-81). Varias enzimas, incluyendo la SOD1, tienen funciones antioxidantes. Las alteraciones en la actividad de dichas enzimas pueden contribuir a un estado patológico neurodegenerativo.

Recientemente, Choi *et al.* (64) informaron que la SOD1 es una diana principal del daño oxidativo en los cerebros con EA y EP. Señalaron que el nivel total de SOD1 aumenta tanto en la EA como en la EP, y que la SOD1 forma agregados proteicos que están asociados con placas seniles amiloides y ovillos neurofibrilares en cerebros con EA. Choi *et al.* (64) han sugerido que la EA, la EP y la ELA pueden compartir un mecanismo patógeno común. También se ha demostrado recientemente que la SOD1 se secreta en el espacio extracelular, en una forma que es tóxica para las neuronas, pero más accesible por los agentes terapéuticos extracelulares (1).

La implicación de que la SOD1 mal plegada extracelular desempeña un papel en la patogénesis de la ELA proporciona una oportunidad para el tratamiento con anticuerpos de las enfermedades neurodegenerativas, ya que este compartimento es accesible a la neutralización de anticuerpos. En seres humanos normales, las IgG pueden atravesar la barrera hematoencefálica a niveles entre 1/100 y 1/1.000 de las concentraciones circulantes; y la transudación de las inmunoglobulinas suele aumentar en las enfermedades que afectan a la barrera hematoencefálica. Sin embargo, el tratamiento de pacientes humanos con anticuerpos o vacunas dirigidos a epítomos extracelulares accesibles sobre proteínas ubicuas puede conducir a efectos autoinmunes perjudiciales tales como los observados con Abeta en la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de composiciones y métodos para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades relacionadas con la SOD1 mal plegada, tales como la ELA, la EA y la EP.

El documento US 5.849.290 y la base de datos Geneseq (24 de febrero de 2009) "Human Cu/Zn SOD exon 2 protein fragment", obtenido del EBI con n.º de acceso GSP: AAW82448 desvela la secuencia de aminoácidos del fragmento de proteína CU/Zn SOD humana codificada por el exón 2 del gen SOD1.

El documento WO2005/019828 desvela un ensayo de protección de epítomos para su uso en el diagnóstico y pronóstico de enfermedades, por ejemplo, que implica la agregación de polipéptidos, tales como infecciones por priones. Los métodos de la invención primero bloquean el epítomo diana del polipéptido accesible con un agente bloqueante. Tras la desnaturalización del polipéptido, se usa un agente de detección para detectar la proteína con epítomo diana que fue inaccesible durante el contacto con el agente bloqueante.

Urushitani *et al.*, (2007) "Therapeutic effects of immunization with mutant superoxide dismutase in mice models of amyotrophic lateral sclerosis", *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, Vol. 104, n.º 7 páginas 2495-2500, desvela la existencia de vías secretoras para mutantes de superóxido dismutasa (SOD1) vinculados a la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y para la neurotoxicidad de SOD1 mutante extracelular, así como un estudio de los protocolos de inmunización con el objetivo de reducir la carga de mutantes SOD1 extracelulares en el tejido nervioso de modelos murinos de ELA, usando proteína mutante SOD1 recombinante purificada bacterianamente como un inmunógeno.

"SESSION 7A Protein Folding and Degradation Defects", *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, Vol. 6, n.º 4, Supl. 1: páginas 33-35 desvelan, en el sumario C45, que la SOD1 monomérica/mal plegada puede detectarse en modelos murinos de ELA usando un anticuerpo diseñado.

Sumario de la invención

La SOD1 mal plegada es tóxica para las neuronas (1) y se cree que participa en la muerte y en la disfunción de las células neuronales en la esclerosis lateral amiotrófica y otras enfermedades neurodegenerativas. Se desvelan los usos de los epítomos específicos de la enfermedad de SOD1 (DSE) como dianas para las vacunas o la inmunoterapia para la esclerosis lateral amiotrófica. También se desvelan los DSE como diana para vacunas o inmunoterapia para (ELA), enfermedad de Alzheimer (EA), Parkinson (EP) y enfermedades de cuerpos de Lewy (ECL). Se desvela el aislamiento y la dirección de epítomos que se presentan selectivamente mediante formas no nativas de SOD1 que están asociadas con la ELA. Estos epítomos no se presentan ni son accesibles en formas nativas de SOD1. Por ejemplo, los epítomos específicos de enfermedades tales como los epítomos específicos de la ELA y específicos de la EA y específicos de la EP no se presentan mediante las formas diméricas nativas de SOD1. Sin embargo, los epítomos específicos de enfermedades se presentan o son accesibles cuando el monómero de SOD1 no puede asociarse o disociarse de su estado homodimérico normal, y en otras formas no nativas de SOD1,

incluyendo los monómeros de SOD1 mal plegados, los dímeros de SOD1 mal plegados y los agregados de SOD1. Estos epítomos se presentan selectivamente o son accesibles en formas no nativas de SOD1, y son característicos de afecciones, enfermedades y trastornos relacionados con la SOD1 no nativa.

5 En la presente solicitud, los epítomos "específicos de la ELA" se refieren a epítomos que se presentan en las formas de SOD1 asociadas a la ELA, los epítomos "específicos de la EA" se refieren a epítomos que se presentan en las formas de SOD1 asociadas a la EA y los epítomos específicos de la EP se refieren a epítomos que se presentan en las formas asociadas a la EP de SOD1 que surgen de procesos tales como el mal plegamiento, la agregación o la disociación. La SOD1 mal plegada presenta muchos de los mismos epítomos en la ELA, la EA y la EP; sin embargo, por conveniencia, en el presente documento, los epítomos se describen como "específicos" de esa enfermedad, porque, en el organismo de un sujeto en particular, los epítomos solo se presentan específicamente en la SOD1 tóxica no nativa que causa, subyace o está asociada con la enfermedad neurodegenerativa. Dichos epítomos específicos de enfermedades incluyen así los epítomos sobre monómero de SOD1 que se revelan cuando el monómero de SOD1 se disocia de su estado homodimérico normal, los epítomos presentados selectivamente o accesibles en formas de SOD1 no nativas incluyendo el monómero de SOD1 mal plegado, el dímero de SOD1 mal plegado y el epítomos presentados selectivamente o accesibles en agregados de SOD1.

La presente invención proporciona composiciones para su uso en el tratamiento de la ELA, anticuerpos, inmunógenos, agentes de diagnóstico, hibridomas y métodos de obtención de dichos anticuerpos como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Se desvelan epítomos que se presentan por o son accesibles en formas no nativas de SOD1 que incluyen:

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

30 así como epítomos adicionales que se presentan o son accesibles solo en formas monoméricas de SOD1, que incluyen:

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

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

Por consiguiente, se desvela una composición útil para inhibir la agregación de SOD1 mediada por la SOD1 monomérica o mal plegada, y por lo tanto, para tratar trastornos de SOD1 que incluyen enfermedades neurodegenerativas tales como la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Alzheimer y/o la enfermedad de Parkinson. Por consiguiente, se desvela una composición para tratar una enfermedad neurodegenerativa tal como la ELA, la EA o la EP en un sujeto que comprende una cantidad eficaz de un péptido aislado que corresponde a un epítomo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 (opcionalmente denominado epítomo específico de enfermedad), o un inmunógeno que comprende dicho péptido, en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado, tal como uno farmacéuticamente aceptable. También se desvela una composición para tratar la ELA en un sujeto que comprende una cantidad eficaz de un péptido aislado correspondiente a un epítomo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1, o un análogo del mismo que genera anticuerpos endógenos que se unen a ese epítomo o un inmunógeno que comprende dicho péptido aislado, en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado, tal como uno farmacéuticamente aceptable. También se desvela una composición para tratar la EA en un sujeto, que comprende una cantidad eficaz de un péptido aislado correspondiente a un

epítopo presentado selectivamente o asociado con formas no nativas de SOD1, o un análogo del mismo que genera anticuerpos endógenos que se unen a ese epítopo o un inmunógeno que comprende dicho péptido o análogo aislado, en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado, tal como uno farmacéuticamente aceptable. También se desvela una composición para tratar la EP en un sujeto, que comprende una cantidad eficaz de un péptido aislado correspondiente a un epítopo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1, o un inmunógeno que comprende dicho péptido, en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado, tal como uno farmacéuticamente aceptable.

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

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

RLACGVIGI (SEQ ID NO: 1, DSE1);
DLGKGGNEESTKTGNAGS (SEQ ID NO: 2, DSE2);
NPLSRKHGGPKDEE; (SEQ ID NO: 3, DSE3);
IKGLTEGLHGF; SEQ ID NO: 5, DSE5);
HCIIGRTLTVH; SEQ ID NO: 6, DSE6);
RLA[Ácido cisteico]GVIGI (DSE1a); SEQ ID NO: 8, DSE1a);
KAVCVLK (DSE4); SEQ ID NO: 4, DSE4) and
GLHGFVH (DSE7) SEQ ID # NO: 7, DSE7).

Estos péptidos aislados enumerados en la Tabla 2 se denominan en el presente documento "péptidos aislados de la Tabla 2".

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

Los análogos de los péptidos aislados y los péptidos aislados modificados también son útiles. Los análogos y péptidos aislados modificados comprenden péptidos que se producen *in vivo* y diseñados molecularmente correspondientes a los epítopos presentados o accesibles en formas no nativas de SOD1 que conservan la capacidad de generar la producción de anticuerpos que reconocen específicamente a los epítopos correspondientes en formas monoméricas, mal plegadas o agregadas de SOD1. En una divulgación, el análogo peptídico aislado comprende un ácido cisteico. Se desvela un análogo de péptido aislado que corresponde a un epítopo que comprende RLAC*GVIGI (DSE1a), en el que * indica una cisteína oxidada, en forma de ácido cisteico.

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

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

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

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

Las composiciones son útiles, en particular, para tratar una enfermedad neurodegenerativa usando inmunoterapia dirigida a un epítipo presentado en SOD1 mal plegada, comprendiendo el tratamiento inmunoterapia activa, es decir, terapia basada en vacuna, en la que el péptido aislado correspondiente a un epítipo se usa en un inmunógeno para generar anticuerpos que reconozcan a la SOD1 monomérica o mal plegada en el receptor, o comprenden inmunoterapia pasiva, en la que se administra al receptor un anticuerpo contra el péptido aislado correspondiente al epítipo. La composición normalmente es una composición farmacéutica.

Por consiguiente, se desvela una composición para generar una respuesta inmune en un animal que comprende una cantidad eficaz de un péptido aislado correspondiente a un epítipo presentado en formas no nativas de SOD1 en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado. La afección, la enfermedad o el trastorno incluye, aunque sin limitación, esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

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

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

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

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

Estas composiciones son útiles para generar una respuesta inmune en un animal y son útiles en métodos para generar una respuesta inmune en un animal frente a formas no nativas de SOD1, incluyendo una respuesta inmune contra epítipos específicos de la esclerosis lateral amiotrófica, epítipos específicos de la enfermedad de Alzheimer y/o epítipos específicos de la enfermedad de Parkinson.

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

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

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

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

Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos y/o fragmentos de unión a epítomos y análogos de los mismos. Se desvelan hibridomas que producen anticuerpos contra DSE2 y DSE5. Se desvelan los hibridomas en sí, así como la progenie de los mismos, las fusiones posteriores con los mismos, y el ADN y ARN endógeno que codifica el anticuerpo SOD1. Se desvela un método de producción de anticuerpos SOD1, que comprende la etapa de cultivar los hibridomas. Estos anticuerpos son útiles para tratar la esclerosis lateral amiotrófica mediante inmunización pasiva. Por ejemplo, inhiben o neutralizan el efecto tóxico de estas especies de SOD1 mal plegadas sobre las neuronas y/o evitan la progresión de la enfermedad mediante el aclaramiento inmunológico de los agregados de SOD tóxicos, inhibiendo la agregación de SOD1 mediada por SOD1 mal plegada y/o bloqueando proceso de mal plegamiento dirigido por el molde de SOD1. Por lo tanto, la invención incluye composiciones útiles para tratar la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto que comprenden una cantidad eficaz de un anticuerpo específico de una mezcla de epítopoína específica de la esclerosis lateral amiotrófica con un diluyente o vehículo adecuado.

Además de los anticuerpos, también se desvelan otros agentes que se unen específicamente a epítomos presentados o accesibles en formas no nativas de SOD1, y que no se presentan ni son accesibles en formas nativas de SOD1. Los agentes que se unen incluyen polipéptidos, moléculas pequeñas, aptámeros peptídicos y nucleicos, anticuerpos y anticualinas.

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

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

Estos anticuerpos son útiles para detectar formas no nativas de formas monoméricas, diméricas o agregadas de SOD1, y, por lo tanto, son útiles para diagnosticar la esclerosis lateral amiotrófica. Se desvela un método para detectar o diagnosticar la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto que comprende las etapas de:

- (a) poner en contacto una muestra de ensayo de dicho sujeto con un anticuerpo específico de un epítomo específico de la esclerosis lateral amiotrófica, en el que el anticuerpo se une a un epítomo específico de la esclerosis lateral amiotrófica para producir un complejo de anticuerpo-antígeno;
- (b) medir la cantidad del complejo de anticuerpo-antígeno en la muestra de ensayo; y
- (c) comparar la cantidad de complejo de antígeno-anticuerpo de la muestra de ensayo con un control en el que una diferencia en la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno en la muestra de ensayo en comparación con el control es indicativa de esclerosis lateral amiotrófica. Opcionalmente, y en caso de que el epítomo de SOD1 mal plegado se enmascare dentro de una agregación de SOD1, el método proporciona la etapa de tratar la muestra para potenciar la desagregación del agregado de SOD1 para dejar al descubierto el epítomo diana antes del etapa (a).

Estos anticuerpos y/o fragmentos de unión de los mismos se conjugan útilmente a marcadores para producir un agente de diagnóstico.

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

También se desvelan nuevos péptidos aislados. En una divulgación, los nuevos péptidos aislados comprenden péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- RLACGVIGI (SEQ ID NO: 1, DSE1)
- ACGVIGI (SEQ ID NO:9, análogo de DSE1)
- Ac-GG-RLACGVIG-GGKG (SEQ ID NO:10, análogo de DSE1)
- CDLGKGGNEESTKTGNAGS (SEQ ID NO: 11, análogo de DSE2)
- CNPLSRKHGGPKDEE (SEQ ID NO:12, análogo de DSE3)
- CIKGLTEGLHGF (SEQ ID NO:14, análogo de DSE5)

RLA[Ácido cisteico]GVIGI (SEQ ID NO: 8, DSE1a)
 A[Ácido cisteico]GVIGI (SEQ ID NO: 13, análogo de DSE1a)
 C-GGG-RLA[Ácido cisteico]GVIGI- GSG (SEQ ID NO: 15, análogo de DSE1a)
 KAVCVLK (SEQ ID NO: 4, DSE4);
 5 GGSGNGSG (SEQ ID NO: 16, análogo de DSE 4); y
 GLHGFHVH (SEQ ID NO: 7, DSE7).

Se desvelan péptidos aislados modificados que comprenden RLA[Ácido cisteico]GVIGI (SEQ ID NO:8, DSE1a), en los que el resto de cisteína es ácido cisteico.

En divulgaciones relacionadas, estos péptidos se proporcionan en forma marcada, o como conjugados o fusiones, por ejemplo, "inmunógenos" útiles para generar anticuerpos o detectar SOD1 y para otros usos diagnósticos y terapéuticos. Dichos inmunógenos comprenden los péptidos acoplados, por ejemplo, a antígeno KLH o MAP.

Ciertas divulgaciones se refieren a un método de i) generar una respuesta inmune en un sujeto y/o ii) tratar una afección, enfermedad o trastorno mediado por una forma mal plegada de superóxido dismutasa (SOD) en un sujeto que necesita tratamiento, que comprende administrar una composición que comprende un ácido nucleico que codifica para un inmunógeno específico de la esclerosis lateral amiotrófica aislado (por ejemplo, péptido) de la invención en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado al sujeto. Como es evidente, dichos ácidos nucleicos solo codificarán aquellas formas de los epítomos y péptidos que consisten en aminoácidos genéticamente codificados, pero los ácidos nucleicos también pueden producir, endógenamente, análogos de los epítomos codificados que, después de expresarse como tales, se modifican *in vivo* tal como por nitración, oxidación, carbonilación y similares por el entorno endógeno. En la presente solicitud, se exponen secuencias de nucleótidos de ARN y ADN adecuadas (otras secuencias de ADN que tienen identidad de secuencia o equivalentes de codón sinónimos también son útiles en los métodos). Algunos ejemplos de afecciones, enfermedades o trastornos incluyen la ELA, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de cuerpos de Lewy o la enfermedad de Alzheimer.

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

Se desvela un método para tratar una afección, enfermedad o trastorno mediado por una forma mal plegada de superóxido dismutasa (SOD) en un sujeto que necesita tratamiento, método que comprende administrar al sujeto que necesita tratamiento un agente (tal como un anticuerpo o inmunógeno exógeno (por ejemplo, péptido) desvelado en el presente documento que i) produzca el aclaramiento inmunológico de los agregados de SOD; ii) reduzca la agregación de SOD1 mediada por SOD1 mal plegada; y/o iii) reduzca el mal plegamiento dirigido por el molde de SOD1. También se desvelan métodos para tratar afecciones, enfermedades o trastornos descritos en el presente documento administrando a un sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo específico de los epítomos descritos en el presente documento que se presentan selectivamente o son accesibles en formas no nativas de SOD1.

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

Breve descripción de las figuras

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

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

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

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

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

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

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

La Figura 5A es un corte cerebral humano del hipocampo normal de una mujer de 52 años teñido con un anticuerpo contra DSE2.

La Figura 5B es un material compuesto de cortes de hipocampo humano de una mujer de 78 años de edad con enfermedad de Alzheimer en fase tardía probada con anticuerpo monoclonal anti-DSE2.

La Figura 6 (A-F) es un material compuesto de cortes cerebrales de una mujer de 79 años con demencia probada con anticuerpo monoclonal anti-DSE2.

Descripción detallada de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Se desvelan composiciones y métodos inmunoterapéuticos que se dirigen específicamente a especies de SOD1 tóxicas, incluyendo los confómeros de SOD1 que pueden asociarse con enfermedades neurodegenerativas, tales como la ELA, la EA y la EP, identificando y aprovechando la ventaja terapéutica de los epítomos inmunológicos (sitios de unión de anticuerpos) expuestos en el superficie molecular de SOD1 mal plegada y agregada. Estos epítomos no se presentan en SOD1 nativa plegada de manera normal. Se desvelan epítomos previamente desconocidos que son útiles como dianas para diseñar compuestos o generar anticuerpos para terapia o diagnósticos. También se desvela el uso inmunoterapéutico de epítomos identificados previamente como los presentados en formas de SOD1 mal plegadas y agregadas, pero que no se presentan en formas nativas de SOD1 (véase 3 y el documento WO 2005/019828). Estos epítomos son dianas útiles para la inmunoterapia pasiva o activa para prevenir la progresión de la enfermedad. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, estos epítomos previenen la progresión de la enfermedad mediante la eliminación inmunológica o el secuestro de agregados de SOD1 tóxicos, bloquean el proceso de plegamiento incorrecto dirigido por el molde de SOD1, neutralizan el efecto tóxico de estas especies de SOD1 mal plegadas en las neuronas e/o inhiben el estrés oxidativo mediado por SOD1 mal plegada.

Composiciones y usos de los epítomos específicos de la enfermedad

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

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

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

La "SOD mutante" se refiere a formas de SOD y, en particular, a formas endógenas de SOD, que se producen como resultado de una mutación genética que da lugar, por ejemplo, a la sustitución de aminoácidos, tal como las sustituciones características, por ejemplo, de la ELA familiar. Dichas sustituciones incluyen las enumeradas en la Tabla 1.

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

En determinadas realizaciones, en caso de que la SOD1 no nativa sea una SOD1 mutante tal como una forma de SOD1 que comprende variaciones de secuencia características de la ELA familiar, el mutante de SOD1 no nativo es distinto de un mutante en el que uno o más de los aminoácidos A4, G37, G85 o G93 están mutados.

5 Un "epítipo", como se usa en el presente documento, significa una región de una proteína que es reconocida por un receptor de linfocitos B o de linfocitos T, o un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo. El epítipo se representa opcionalmente en el presente documento por la secuencia de aminoácidos lineal o la región de la proteína reconocida por el anticuerpo. Los "péptidos aislados correspondientes a un epítipo" se denominan
 10 opcionalmente ellos mismos un "epítipo".

Un epítipo es "accesible" en el contexto de la presente memoria cuando es accesible a la unión por un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo. Un epítipo específico de una enfermedad de la invención puede dejarse al descubierto parcial o completamente en la superficie molecular de una proteína mal plegada en una forma accesible para la unión del anticuerpo, y oscurecerse parcial o completamente desde el reconocimiento del anticuerpo en la isoforma plegada de forma nativa de la proteína. Dicho epítipo se presenta o ser accesible selectivamente en una configuración mal plegada o no nativa de una proteína, y no se presenta ni es accesible en la configuración nativa de la proteína. "Presentado selectivamente o accesible" se usa, según el contexto, para indicar que el epítipo al que se hace referencia está disponible para unirse a un anticuerpo o a otra proteína de unión en SOD1 mal plegada y no está disponible para la unión al anticuerpo en formas nativas de SOD1. El epítipo específico de la enfermedad es suficientemente diferente de una parte correspondiente de SOD1 nativa plegada correctamente (es decir, SOD1 que tiene actividad de SOD1 normal no patógena), habitualmente en términos de su configuración, de modo que un anticuerpo pueda unirse selectivamente al epítipo.

Un epítipo comprende uno o más determinantes antigénicos. Por ejemplo, un anticuerpo generado contra un péptido aislado que corresponde a un epítipo específico de una enfermedad reconoce parte o la totalidad de dicha secuencia epitópica. Por consiguiente, se desvela una parte de un péptido aislado que corresponde a un epítipo presentado o accesible en SOD1 mal plegada que conserva un determinante antigénico que se usa para generar anticuerpos contra dicho epítipo.

30 Cuando se hace referencia a epítipos de SOD1 presentados selectivamente en la ELA, los epítipos se denominan opcionalmente epítipos específicos de la ELA; cuando se hace referencia a epítipos presentados selectivamente en la enfermedad de Alzheimer, los epítipos se denominan opcionalmente epítipos específicos de la EA y, de manera similar, cuando se hace referencia a epítipos presentados selectivamente en la enfermedad de Parkinson, los epítipos se denominan opcionalmente epítipos específicos de la EP para facilitar la referencia a la enfermedad
 35 nombrada. Sin embargo, se entiende que los epítipos específicos de la ELA de SOD1 no se limitan a la ELA, sino que se presentan opcionalmente en otras enfermedades neurodegenerativas tales como la EA y la EP; los epítipos específicos de LA EA de SOD1 no se limitan a LA EA, sino que se presentan opcionalmente en otras enfermedades neurodegenerativas tales como la ELA y la EP; y los epítipos de SOD1 específicos de la EP no se limitan a la EP, sino que se presentan opcionalmente en otras enfermedades neurodegenerativas tales como la EA y la ELA. Los epítipos que son accesibles selectivamente en formas de SOD1 que están asociadas con afecciones, enfermedades y trastornos mediados por SOD1 se denominan opcionalmente epítipos específicos de la enfermedad.

Un epítipo puede ser reconocido selectivamente por un anticuerpo en una configuración de una proteína y no en una segunda configuración de la proteína. "Selectivo" se usa, según el contexto, para caracterizar las propiedades de unión de un anticuerpo. Un anticuerpo que se une selectivamente a un epítipo determinado se unirá a ese epítipo con mayor avidez o con más especificidad, en relación con otros epítipos diferentes presentados por la misma molécula. Por ejemplo, un anticuerpo se une selectivamente a un epítipo específico de una enfermedad si se une a SOD1 mal plegada en la que es accesible el epítipo específico de la enfermedad, con el doble de eficacia que con la que se une a SOD1 nativa en la que el epítipo específico de la enfermedad no es accesible. En otras realizaciones, el anticuerpo se une de 3 a 5 veces, de 5 a 7 veces, de 7 a 10, de 10 a 15, de 5 a 15 o de 5 a 30 veces más eficazmente.

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

Debido a la especificidad por la enfermedad mediada por SOD1 de estos epítipos, son dianas útiles para tratar trastornos, enfermedades y afecciones mediados por SOD1, tales como la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson, o para generar una respuesta inmune en un animal. Por ejemplo, la vacunación de sujetos diagnosticados con esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson con una composición que comprende péptidos aislados correspondientes a epítipos específicos de esclerosis lateral amiotrófica, epítipos específicos de la enfermedad de Alzheimer o epítipos específicos de la enfermedad de Parkinson, respectivamente, inhibe la formación de agregados de SOD1 en la enfermedad bloqueando la participación de especies moleculares de SOD1 mal plegadas en el proceso de
 65

agregación y/o bloqueando el mal plegamiento dirigido por el molde de SOD1, o induciendo la eliminación basada en el complejo inmune de formas unidas a anticuerpos de las SOD1 neurotóxicas mal plegadas y/o agregados.

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

10 La expresión "epítomo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1", como se usa en el presente documento, se refiere a un epítomo que se presenta selectivamente o que es accesible en SOD1 monomérica o SOD1 mal plegada en formas monoméricas, diméricas o agregadas, pero no en la superficie molecular de la forma nativa, correctamente plegada, homodimérica de SOD1. En otros términos, los epítomos pueden caracterizarse como aquellos que dan lugar a anticuerpos que se unen selectivamente a formas de SOD1 asociadas con enfermedades relacionadas con SOD1 mal plegadas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y/o la esclerosis lateral amiotrófica, en relación con la forma homodimérica nativa de SOD1.

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

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

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

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

45 Una persona experta en la técnica apreciará que el epítomo específico de la enfermedad de Alzheimer puede ser la totalidad o parte de las secuencias anteriores. La expresión "parte de", como se usa en el presente documento, se refiere a la secuencia que conserva la actividad epitópica de unir un anticuerpo selectivo para formas no nativas de SOD1, generándose el anticuerpo opcionalmente por inmunización con un péptido aislado correspondiente a la totalidad o parte de dicho epítomo en un animal. También se desvelan análogos de las secuencias anteriores.

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

55 El experto en la materia apreciará que el epítomo específico de la enfermedad de Parkinson puede ser la totalidad o parte de las secuencias anteriores. La expresión "parte de", como se usa en el presente documento, se refiere a la secuencia que conserva la actividad epitópica de unir un anticuerpo selectivo para formas no nativas de SOD1, generándose el anticuerpo opcionalmente por inmunización con un péptido aislado correspondiente a dicho epítomo en un animal. También se desvelan análogos de las secuencias anteriores.

60 La expresión "epítomo específico de la esclerosis lateral amiotrófica", como se usa en el presente documento, se refiere a un epítomo que está presente selectivamente o que es accesible en SOD1 monomérica o SOD1 mal plegada en forma monomérica, dimérica o agregada, pero no en la forma homodimérica nativa de SOD1. En otros términos, los epítomos se pueden caracterizar como aquellos que dan lugar a anticuerpos que se unen selectivamente a formas de SOD1 asociadas a ELA, en relación con la forma homodimérica nativa de SOD1. El

experto en la materia apreciará que el epítipo específico de la esclerosis lateral amiotrófica puede ser la totalidad o parte de las secuencias anteriores. La expresión "parte de", como se usa en el presente documento, se refiere a la secuencia que conserva la actividad epitópica de unir un anticuerpo selectivo para formas no nativas de SOD1, generándose el anticuerpo opcionalmente por inmunización con un péptido aislado correspondiente a dicho epítipo en un animal. También se desvelan análogos de las secuencias anteriores.

El término "análogo", como se usa en el presente documento, incluye partes, extensiones, sustituciones, variantes, modificaciones o equivalentes químicos y sus derivados de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos descritas en el presente documento que realizan esencialmente la misma función que las moléculas de péptido, proteína o ácido nucleico desveladas en el presente documento esencialmente de la misma manera. Por ejemplo, los análogos de péptidos y proteínas incluyen, sin limitación, sustituciones conservativas de aminoácidos. Los análogos de péptidos también incluyen la modificación del ácido cisteico de un aminoácido, como en RLAC*GVIGI (DSE1a). Por ejemplo, un aminoácido está opcionalmente acetilado (Ac-). Los análogos de péptidos y proteínas también incluyen adiciones y eliminaciones en los péptidos y las proteínas desvelados en el presente documento. Los análogos de ácidos nucleicos incluyen sustituciones de nucleótidos degenerados que codifican un péptido aislado como se desvela en el presente documento. Además, los análogos de péptidos y las secuencias de nucleótidos de los análogos incluyen derivados de los mismos.

Una "sustitución de aminoácidos conservativa", como se usa en el presente documento, es aquella en la que un resto de aminoácido se reemplaza por otro resto de aminoácido sin eliminar las propiedades deseadas del péptido.

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

El estrés oxidativo puede generar daños en las proteínas, el ADN y los lípidos celulares. Se ha informado de estrés oxidativo en la EA y la EP (64). Los inventores han demostrado que los anticuerpos selectivos de DSE1a que comprenden una cisteína oxidada en forma de ácido cisteico tienen una alta afinidad por la SOD1 mal plegada. Otros aminoácidos también se pueden oxidar o nitrar como resultado del estrés oxidativo. Por ejemplo, la histidina, la arginina y la lisina pueden formar grupos carbonilo, la metionina se puede oxidar a metionulfóxido y la fenilalanina puede nitrarse a nitrotriptofano. Además, la cisteína se puede oxidar a ácido cisteína-sulfínico.

Por consiguiente, se desvelan epítipos que comprenden uno o más aminoácidos oxidados o nitrados. El epítipo de SOD1 puede comprender un aminoácido oxidado o nitrado, en particular, cisteína oxidada, es decir, ácido cisteico.

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

Los péptidos aislados correspondientes a epítipos que son útiles en la presente invención son, por tanto, opcionalmente péptidos que tienen incorporada la secuencia correspondiente a tramos de aminoácidos contiguos dentro de la secuencia de SOD1 humana que forman epítipos accesibles selectivamente solo en las formas monoméricas de SOD, o en cualquier forma de SOD1 que se ha plegado mal o que no es nativa. Los epítipos que se han identificado como accesibles selectivamente en la SOD1 no nativa comprenden los siguientes tramos de aminoácidos de hSOD1:

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

Para servir como un inmunógeno útil para la inmunoterapia activa o para generar anticuerpos para su uso, por ejemplo, en inmunoterapia pasiva, es deseable que el péptido tenga un mínimo de aproximadamente 3, 4, 5, 6 o 7

restos de epítomos específicos de la enfermedad relacionada con SOD1. En una realización, es deseable que el péptido aislado correspondiente a un epítomo comprenda al menos 8 restos de SOD1. Por lo general, el péptido no requerirá más de aproximadamente 50 restos de SOD1, y más habitualmente se encontrará dentro de un tramo de SOD1 que será inferior a aproximadamente 40 restos, por ejemplo, aproximadamente 30 restos e incluso más habitualmente inferior a aproximadamente 20 restos. Es posible usar péptidos que comprendan una parte incluso mayor de SOD1, que posiblemente den lugar a múltiples anticuerpos, siendo necesaria la selección de aquellos que se unan selectivamente a un epítomo característico de SOD1 mal plegada.

Las secuencias de SOD1 útiles para ser dirigidas de acuerdo con la presente divulgación incluyen las regiones de hSOD1 que tienen los restos 3-9, restos 35-45, restos 41-48, restos 65-78, restos 125-142, restos 143-151 y restos 145-151. Como se ha indicado, dicha secuencia peptídica correspondiente a los epítomos de SOD1 mal plegada puede truncarse para que tenga un mínimo de 5, 6 o 7 restos de las regiones indicadas. Por ejemplo, DSE1, que tiene la secuencia RLACGVIGI, se puede truncar eliminando los dos primeros aminoácidos "RL". Además, estas regiones pueden extenderse, según se indica, para que tengan restos de SOD1 flanqueantes adicionales hasta un número máximo de restos que alcance cualquier equilibrio deseado entre el coste de producción de péptidos o vacunas, y la especificidad deseada y otras propiedades del anticuerpo resultante.

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

Los péptidos correspondientes a estos epítomos pueden comprender además restos de aminoácidos no SOD1 adicionales, en particular, en los flancos N y C terminales, que pueden ser útiles para conjugar el péptido con un agente útil, por ejemplo, para generar una respuesta inmune, o un agente que sirva como marcador útil en la producción del péptido o para controlar su presencia. Por ejemplo, el péptido puede comprender además un resto Cys N-terminal para ayudar con el acoplamiento a KLH o similares. El péptido puede comprender además uno, dos, tres o más restos de glicina flanqueantes, o una combinación de glicina/serina o glicina/lisina tal como GSG o GGKG, para mejorar la respuesta inmune aumentando la longitud del péptido sin cambiar la especificidad de los anticuerpos que están formados. El péptido correspondiente al epítomo puede comprender además un enlazador eficaz para acoplar el péptido en tándem a otra copia del mismo péptido o un péptido diferente correspondiente al mismo epítomo o a un epítomo diferente. Como alternativa, el péptido correspondiente a un epítomo puede comprender además un marcador de polihistidina o de Flag. En otra realización, los péptidos pueden comprender aminoácidos adicionales que potencian la inmunogenicidad o solubilidad del péptido. En una realización, los aminoácidos adicionales son de 1 a aproximadamente 10, preferentemente de 1 a 8, más preferentemente de 1 a 5. De manera importante, los restos adicionales no afectan materialmente a la configuración del péptido. En una divulgación, el péptido aislado correspondiente al epítomo específico de la esclerosis lateral amiotrófica comprende 6 aminoácidos adicionales, y comprende la secuencia GGRLACGVIGIGGKG. En otra divulgación, el péptido aislado correspondiente al epítomo específico de la esclerosis lateral amiotrófica comprende 4 aminoácidos adicionales, y comprende la secuencia GGRLACGVIGIAQ.

En una divulgación, las secuencias de aminoácidos de análogos de péptido aislado correspondiente a epítomos específicos de una enfermedad presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 normalmente tienen al menos: un 60 %, un 70 %, un 80 % o un 90 % de identidad de secuencia con las secuencias anteriores. En otra divulgación, las secuencias de aminoácidos de análogos de péptido aislado correspondiente a epítomos específicos de la ELA, epítomos específicos de la EP o epítomos específicos de la EA tienen al menos: un 60 %, un 70 %, un 80 % o un 90 % de identidad de secuencia con las secuencias anteriores. La expresión "identidad de secuencia" como se usa en el presente documento se refiere al porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias polipeptídicas. Para determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias polipeptídicas, las secuencias de aminoácidos de dichas dos secuencias se alinean, preferentemente usando el algoritmo Clustal W (9), junto con la matriz de puntuación BLOSUM 62 (10) y una penalización de abertura de hueco de 10 y penalización de extensión de hueco de 0,1, de modo que la coincidencia de mayor orden se obtiene entre dos secuencias en las que al menos el 50 % de la longitud total de una de las secuencias participa en la alineación. Otros métodos que pueden usarse para alinear secuencias son el método de alineación de Needleman y Wunsch (11), revisado por Smith y Waterman (12), de modo que se obtiene la coincidencia de mayor orden entre las dos secuencias y se determina el número de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias. Otros métodos para calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se reconocen, en general, en la técnica, e incluyen, por ejemplo, los descritos por Carillo y Lipton (13) y los descritos en Computational Molecular Biology (14). En general, para dichos cálculos, se emplearán programas informáticos. Los programas informáticos que se pueden usar en este sentido incluyen, pero sin limitación, GCG (15) BLASTP, BLASTN y FASTA (16).

Por lo tanto, aunque las dianas de epítomo preferidas comprenden la secuencia que se encuentra en hSOD1, se desvelan análogos de estas secuencias de epítomo que, como se ha señalado anteriormente, incluyen, derivados, extensiones, truncamientos, aminoácidos modificados y similares. Dichas formas de los péptidos aislados correspondientes a epítomos específicos de una enfermedad están abarcados por el término "análogos". Dichos análogos también son útiles para generar anticuerpos que se unan a los epítomos presentes en la SOD mal plegada o monomérica, por ejemplo, a uno de los siete epítomos identificados anteriormente.

Por lo tanto, con relación a los epítomos preferidos identificados anteriormente, los péptidos aislados útiles que corresponden a un análogo de epítomo, incluyen péptidos aislados que comprenden, pero sin limitación:

Para RLACGVIGI:

el truncamiento N-terminal de R o RL; la extensión N-terminal con G o GG o acetyl-GG y/o la extensión C-terminal con G, GG, GGK o GGKG, por ejemplo, para llegar a acetyl-RLACGVIVIVGGKG; con o sin oxidación de C para producir ácido cisteico, para llegar a AC*GVIVIVG, incluyendo CGGRLAC*GVIGIGSG; RLAC*GVIGIGSG and CRLAC*GVIGIGSG; (en la que C* indica ácido cisteico).

Para DLGKGGNEESTKTGNAGS;

Truncamiento N-terminal de D, DL, DLG, DLGK y/o truncamiento C-terminal de S, GS, AGS, NAGS; extensión N-terminal con C o con G, GG o GGG; extensión C-terminal con G, GG, GS o GSG; por ejemplo, para llegar a CDLGKGGNEESTKTGNAGS, con o sin la modificación interna por carbonilación de uno o dos restos K, por ejemplo; e incluyendo péptidos tales como LGKGGNEESTKTGNAGS DLGKGGNEESTKTGNAG, GKGGNEESTKTGNAGS, DLGKGGNEESTKTGNA, KGGNEESTKTGNAGS, DLGKGGNEESTKTGN, GGNEESTKTGNAGS, DLGKGGNEESTKTG, LGKGGNEESTKTGNAG, GKGGNEESTKTGNA o KGGNEESTKTGN.

Para NPLSRKHGGPKDEE;

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

Para IKGLTEGLHGF;

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

y para HCIIGRTLTVH;

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

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

Tabla 2A. Péptidos DSE aislados y análogos

ACGVIGI (SEQ ID NO:9, análogo de DSE1);
 Ac-GG-RLACGVIG-GGKG (SEQ ID NO:10, análogo de DSE1);
 CDLGKGGNEESTKTGNAGS (SEQ ID NO: 11, análogo de DSE2);
 DYKDDDDK (SEQ ID NO: 12; análogo de DSE3);
 CIKGLTEGLHGF (SEQ ID NO:14, análogo de DSE5);
 RLA[Ácido cisteico]GVIGI (SEQ ID NO: 8, DSE1a);
 A[Ácido cisteico]GVIGI (SEQ ID NO: 13, análogo de DSE1a);
 C-GGG-RLA[Ácido cisteico]GVIGI- GSG (SEQ ID NO: 15, análogo de DSE1a); y
 GSGKAVCLK (SEQ ID NO: 16, análogo de DSE 4).

Como se ha señalado anteriormente, se desvela un epítomo DSE1, un péptido aislado que corresponde al epítomo y un anticuerpo dirigido contra el epítomo. Los experimentos caracterizaron además DSE1. Los inventores prepararon anticuerpos dirigidos contra epítomos encontrados en formas no nativas de SOD1. Los inventores detectaron SOD1 mal plegada de los tejidos espinales de los modelos de ratón de ELA G85R, G93A y G37R mediante inmunoprecipitación usando el anticuerpo SED1. Los inventores también detectaron SOD1 mal plegada en cortes espinales de modelos de ratón de ELA G93A, G37R y de un paciente humano con ELA, usando el anticuerpo SED1 como sonda. Los inventores usaron SED1 para determinar la localización subcelular de SOD1 mal plegada en la que se determinó que el sitio principal de la deposición de SOD1 mal plegada es la mitocondria vacuolada del interior de las neuronas motoras del cuerno ventral. Además, se detectó SOD1 mal plegada tanto en fracciones de la médula espinal mitocondrial como citoplasmática pero solo se inmunoprecipitaron cantidades menores a partir de fracciones similares de tejidos hepáticos y cerebrales de ratón G93A. En ratones G85R, la SOD1 mal plegada se enriqueció en la médula espinal y las mitocondrias cerebrales en comparación con la cantidad recuperada del citosol. Los inventores también demostraron que la SOD1 mal plegada estaba inicialmente ausente, pero se detectó antes del inicio de la enfermedad, y se correlaciona con la pérdida de la neurona motora en ratones del modelo de ELA.

En caso de que el péptido aislado correspondiente a un epítipo en sí o su análogo no sea suficientemente inmunogénico, incluso cuando se administre con adyuvantes convencionales, el péptido aislado o el análogo peptídico aislado se pueden administrar en forma de un "inmunógeno", en el que el péptido aislado correspondiente al epítipo o al análogo está fusionado o conjugado con un agente que potencia la inmunogenicidad del péptido. Por lo tanto, la inmunogenicidad o la eficacia de la composición para tratar la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Alzheimer y/o la enfermedad de Parkinson, o para generar una respuesta inmune también se puede potenciar conjugando el péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de la enfermedad (por ejemplo, un epítipo específico de la esclerosis lateral amiotrófica) bien directamente, tal como a través de un enlace de amida, o indirectamente a través de un enlazador químico tal como carbodiimida o cualquier secuencia espaciadora peptídica tal como una secuencia de glicina o glicina-serina incluyendo Gly4-S, a una molécula que potencie la inmunogenicidad del péptido correspondiente al epítipo. Por ejemplo, un péptido aislado que corresponde a un epítipo específico de la esclerosis lateral amiotrófica se puede conjugar con antígeno MAP o hemocianina de lapa californiana (KLH). La KLH es una proteína respiratoria que se encuentra en los moluscos. Su gran tamaño la hace muy inmunogénica, y la gran cantidad de restos de lisina disponibles para la conjugación la hace muy útil para unirse a un polipéptido, tal como un péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de la esclerosis lateral amiotrófica. La conjugación de KLH puede realizarse a través de un resto Cys N-terminal añadido al péptido aislado correspondiente al epítipo, si no hay otro sitio conveniente disponible sobre el péptido para la conjugación de KLH.

Por lo tanto, la composición para generar una respuesta inmune puede comprender un inmunógeno. Un "inmunógeno", como se usa en el presente documento, significa una sustancia que genera una respuesta inmune y/o genera la producción de un anticuerpo. Además de los péptidos, conjugados y fusiones aislados descritos en el presente documento, son útiles miméticos peptídicos que generen anticuerpos de reacción cruzada contra los epítopos específicos de la enfermedad de SOD1 (véase 82).

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

Se desvela un método para identificar epítopos específicos de una enfermedad en proteínas no nativas asociadas a enfermedades. La razón para seleccionar epítopos específicos de la enfermedad se basa en varias consideraciones. Los epítopos peptídicos lineales seleccionados deberían oscurecerse en un estado inaccesible de anticuerpo en la isoforma normal de la proteína diana, pero expuestos en la superficie en la isoforma mal plegada de la enfermedad tal que los epítopos peptídicos lineales pueden estar unidos por un anticuerpo específico para el epítipo oscurecido de manera normal. Otras consideraciones incluyen el papel predicho o definido experimentalmente del epítipo específico definido en la formación de agregados, y la longitud adecuada e inmunogenicidad de un péptido correspondiente al epítipo como diana para la inmunización o inmunoterapia. Los epítopos específicos de una enfermedad óptimos se benefician de la seguridad de la respuesta inmune contra un antígeno no nativo, con la reducción al mínimo de la autoinmunidad y la eficacia comparativa de los regímenes mínimos de adyuvantes para las vacunas terapéuticas. Los epítopos óptimos específicos de la enfermedad también se benefician de la eficacia de neutralización e inhibición de la actividad tóxica y dirigida por el molde de proteínas mal plegadas mediante la unión de anticuerpos. La neutralización también puede acelerar la degradación de las especies proteicas mal plegadas por sistemas tales como el sistema reticuloendotelial y por las células efectoras inmunes del SNC residentes tales como las células microgliales.

Composiciones que comprenden epítopos para tratar enfermedades neurodegenerativas mediadas por SOD1

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

Un "péptido aislado correspondiente a un epítipo" como se usa en el presente documento se refiere al péptido producido que comprende el epítipo o una región del epítipo, y es la misma secuencia o similar a un epítipo específico de la enfermedad en SOD1 no nativa. El "epítipo" se usa opcionalmente para referirse al péptido aislado producido que corresponde al epítipo en SOD1 presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1.

En caso de que el péptido aislado correspondiente al epítipo específico de la enfermedad, en sí no sea suficientemente inmunogénico, incluso cuando se administre con adyuvantes convencionales, el péptido aislado se puede administrar en forma de un inmunógeno, en el que el péptido aislado está fusionado o conjugado con un agente que potencia la inmunogenicidad de dicho péptido. Se desvela el péptido aislado que corresponde a un epítipo presentado selectivamente o accesible en una forma no nativa de SOD1 que comprende la totalidad o parte de un péptido aislado de la Tabla 2 o la Tabla 2A al que se hace referencia anteriormente en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la propiedad de inhibir o reducir la formación de agregados de SOD1 se revela como una reducción de la velocidad de formación, número o tamaño de los agregados neurotóxicos de SOD1, según se revela usando ensayos establecidos para este fin, y como se ilustra en el presente documento.

Se desvela una composición útil para tratar la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto que comprende una cantidad eficaz de un péptido aislado correspondiente al epítipo específico de la esclerosis lateral amiotrófica en mezcla con un diluyente o vehículo aceptable, tal como uno farmacéuticamente aceptable, tal como vehículos farmacéuticamente aceptables. En otras divulgaciones, el péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de la esclerosis lateral amiotrófica comprende la secuencia de un péptido aislado de la Tabla 2 o la Tabla 2A mencionado anteriormente.

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

Composiciones que comprenden epítipos para generar respuesta inmune

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

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

La expresión "generar una respuesta inmune" se define como iniciar, desencadenar, causar, potenciar, mejorar o aumentar cualquier respuesta del sistema inmune, por ejemplo, de naturaleza humoral o mediada por células. El inicio o la potenciación de una respuesta inmune se puede evaluar usando ensayos conocidos por los expertos en la materia que incluyen, pero sin limitación, ensayos de anticuerpos (por ejemplo, ensayos ELISA), ensayos de citotoxicidad específicos del antígeno y la producción de citocinas (por ejemplo, ensayos ELISPOT).

La composición para generar una respuesta inmune puede comprender un inmunógeno. Un "inmunógeno", como se usa en el presente documento, significa una sustancia que genera una respuesta inmune y/o genera la producción de un anticuerpo. Se desvela el inmunógeno que comprende un péptido aislado seleccionado de los péptidos aislados proporcionados en la Tabla 2 o la Tabla 2A. Se desvela el péptido aislado que se conjuga con un vehículo adecuado tal como KLH. Además de los péptidos aislados descritos en el presente documento, son útiles los miméticos peptídicos que generan anticuerpos de reacción cruzada contra los epítipos específicos de la enfermedad de SOD1. La expresión "animal" o "sujeto", como se usa en el presente documento, incluye todos los miembros del reino animal incluyendo mamíferos, preferentemente, seres humanos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" significa una cantidad eficaz, a las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios para lograr un resultado deseado. Las cantidades eficaces pueden variar de acuerdo con factores tales como el estado patológico, la edad, el sexo, y el peso del animal. Las pautas posológicas se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.

Composiciones farmacéuticas que comprenden péptidos aislados correspondientes a epítipos específicos de la enfermedad

Las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse mediante métodos conocidos en sí para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que pueden administrarse a sujetos, opcionalmente como una vacuna, de modo que una cantidad eficaz de la sustancia activa se combine en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se describen vehículos adecuados, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences(17). Basándose en esto, las composiciones incluyen, aunque no exclusivamente, soluciones de las sustancias en asociación con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, y contenidas en soluciones tamponadas con un pH adecuado e isoosmótico con los fluidos fisiológicos.

- Las composiciones farmacéuticas incluyen, sin limitación, polvos liofilizados, o soluciones o suspensiones inyectables estériles acuosas o no acuosas, que pueden contener además antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que las composiciones sean sustancialmente compatibles con los tejidos o la sangre de un receptor. Otros componentes que pueden estar presentes en dichas composiciones incluyen agua, tensioactivos (tales como Tween), alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, por ejemplo. Se pueden preparar soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos, comprimidos, o soluciones o suspensiones concentradas estériles. La composición puede suministrarse, por ejemplo, pero no a modo de limitación, en forma de un polvo liofilizado que se reconstituya con agua estéril o solución salina antes de la administración al paciente.
- Las composiciones farmacéuticas pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen composiciones químicas esencialmente inertes y no tóxicas que no interfieren con la eficacia de la actividad biológica de la composición farmacéutica. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados incluyen, pero sin limitación, agua, soluciones salinas, soluciones de glicerol, etanol, cloruro de *N*-(1(2,3-dioleiloxi)propil)*N,N,N*-trimetilamonio (DOTMA), diolesilfosfodil- etanolamina (DOPE) y liposomas. Dichas composiciones deberían contener una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma de administración directa al paciente.
- La composición puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable que incluye, sin limitación, las formadas con grupos amino libres tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y los formados con grupos carboxilo libres tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaína, etc.
- La inmunogenicidad puede mejorarse significativamente si el/los agente/s inmunizante/s o inmunógeno (por ejemplo, péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de la esclerosis lateral amiotrófica, o una fusión o un conjugado del mismo con un agente potenciador inmune) y/o la composición, independientemente del formato de la administración, se inmuniza junto con un adyuvante. Habitualmente, los adyuvantes se usan como una solución del 0,05 al 1,0 por ciento en solución salina tamponada con fosfato. Los adyuvantes aumentan la inmunogenicidad de un inmunógeno, pero no son necesariamente inmunogénicos por sí mismos. Los adyuvantes pueden actuar reteniendo el inmunógeno localmente cerca del sitio de administración para producir un efecto de depósito que facilite una liberación lenta y sostenida de inmunógeno a las células del sistema inmune. Los adyuvantes también pueden atraer células del sistema inmune a un depósito inmunógeno y estimular dichas células para generar respuestas inmunes. Como tales, las realizaciones de la presente invención abarcan composiciones que comprenden además adyuvantes.
- Los adyuvantes se han usado durante muchos años para mejorar las respuestas inmunes del hospedador a, por ejemplo, vacunas. Los adyuvantes intrínsecos (tales como los lipopolisacáridos) normalmente son los componentes de bacterias muertas o atenuadas usadas como vacunas. Los adyuvantes extrínsecos son inmunomoduladores que normalmente están unidos de forma no covalente a antígenos, y están formulados para potenciar la respuesta inmune del hospedador. Por lo tanto, se han identificado adyuvantes que potencian la respuesta inmune a antígenos administrados por vía parenteral. Algunos de estos adyuvantes son tóxicos, sin embargo, y pueden causar efectos secundarios no deseados que los hacen inadecuados para su uso en seres humanos y en muchos animales. De hecho, se usan rutinariamente solo el hidróxido de aluminio, el sulfato de aluminio y el fosfato de aluminio (comúnmente denominados colectivamente alumbre) como adyuvantes en vacunas humanas y veterinarias. El alumbre puede usarse con agentes inmunoestimulantes tales como MPL o 3-DMP; QS21; y aminoácidos monoméricos o poliméricos tales como ácido poliglútamico o polilisina. La eficacia del alumbre para aumentar las respuestas de los anticuerpos a los toxoides diftérico y tetánico está bien establecida. No obstante, tiene limitaciones. Por ejemplo, el alumbre es ineficaz para la vacunación contra la gripe y genera, de manera no sistemática, una respuesta inmune mediada por células con otros inmunógenos. Los anticuerpos generados por antígenos complementados con alumbre son principalmente del isotipo IgG1 en el ratón, que puede no ser óptimo para la protección de algunos agentes vacunales.
- Una amplia gama de adyuvantes extrínsecos puede provocar potentes respuestas inmunes hacia los inmunógenos. Estos incluyen saponinas tales como Stimulons (QS21, Aquila, Worcester, Mass.) o partículas generadas a partir de los mismos, tales como ISCOM y (complejos inmunoestimulantes) e ISCOMATRIX, complejos con antígenos proteicos de membrana (complejos inmunoestimulantes), polímeros plurónicos con aceite mineral, micobacterias muertas y aceite mineral, adyuvante completo de Freund, productos bacterianos tales como muramil dipéptido (MDP) y lipopolisacárido (LPS), así como lípido A y liposomas.
- Se desvelan adyuvantes útiles en cualquiera de las realizaciones de la invención descrita en la presente, y son los siguientes. Los adyuvantes para la inmunización parenteral incluyen compuestos de aluminio (tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio e hidroxifosfato de aluminio). El antígeno se puede precipitar con, o adsorber sobre, el compuesto de aluminio de acuerdo con protocolos convencionales. Otros adyuvantes tales como RIBI (ImmunoChem, Hamilton, MT) también pueden usarse en la administración parenteral.
- Los adyuvantes para la inmunización por la mucosa incluyen toxinas bacterianas (por ejemplo, la toxina del cólera (CT), la toxina termolábil (LT) de *E. coli*, la toxina A de *Clostridium difficile* y la toxina *pertussis* (PT), o

combinaciones, subunidades, toxoides o mutantes de los mismos). Por ejemplo, puede ser de utilidad un preparado purificado de la subunidad B de la toxina del cólera nativa (CTB). También son adecuados fragmentos, homólogos, derivados y la fusión a cualquiera de estas toxinas, siempre que conserven actividad adyuvante. Preferentemente, se usa un mutante que tenga toxicidad reducida. Se han descrito mutantes adecuados (por ejemplo, en el documento WO 95/17211 (mutante de CT Arg-7-Lys), el documento WO 96/6627 (mutante de LT Arg-192-Gly) y el documento WO 95/34323 (mutante de PT Arg-9-Lys y Glu -129-Gly)). Los mutantes de LT adicionales que pueden usarse en los métodos y en las composiciones de la invención incluyen, por ejemplo, mutantes Ser-63-Lys, Ala-69-Gly, Glu-110-Asp y Glu-112-Asp. Otros coadyuvantes (tales como un monofosforil lípido A bacteriano (MPLA) de diversas fuentes (por ejemplo, *E. coli*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium* o *Shigella flexneri*, saponinas o microesferas de poliláctido glicolida (PLGA)) también se pueden usar en la administración por mucosas.

Otros adyuvantes incluyen citocinas tales como interleucinas, por ejemplo IL-1, IL-2 y IL-12, quimiocinas, por ejemplo, CXCL10 y CCL5, factor estimulante de macrófagos y/o factor de necrosis tumoral. Otros adyuvantes que pueden usarse incluyen oligonucleótidos CpG (Davis, *Curr Top Microbiol Immunol.*, 247:171-183, 2000).

Las emulsiones de aceite en agua incluyen escualeno; aceite de cacahuete; MF59 (documento WO 90/14387); SAF (Syntex Laboratories, Palo Alto, Calif.); y RibitTM (Ribi Immunochem, Hamilton, Mont.). Las emulsiones de aceite en agua se pueden usar con agentes inmunoestimulantes tales como péptidos de muramilo (por ejemplo, *N*-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), -acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamil-L-alanin-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), *N*-acetilglucosaminil-*N*-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi-propilamida (DTP-DPP), teramida (TM)) u otros componentes de la pared celular bacteriana.

Los adyuvantes útiles para la inmunización tanto mucosal como parenteral incluyen polifosfaceno (por ejemplo, documento WO 95/2415), DC-col (3 b-(*N*-(*N*',*N*'-dimetilaminometan)-carbamoil)colesterol (por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.283.185 y el documento WO 96/14831) y QS-21 (por ejemplo, el documento WO 88/9336).

Un adyuvante se puede acoplar a un inmunógeno para su administración (Livingston, *J Immunol.*, 159: 1383-1392, 1997). Por ejemplo, un lípido tal como ácido palmítico, se puede acoplar directamente a uno o más péptidos de manera que el cambio en la configuración de los péptidos que comprenden el inmunógeno no afecte a la naturaleza de la respuesta inmune hacia el inmunógeno.

La elección de un adyuvante puede depender de una serie de factores que incluyen la vía de administración, la eficacia del adyuvante, la pauta posológica, la estabilidad de la vacuna que contiene el adyuvante y la especie que se vaya a vacunar. El adyuvante se puede administrar con un inmunógeno como composición única. Además, un adyuvante puede administrarse antes, simultáneamente o después de la administración del inmunógeno.

La inmunogenicidad o la eficacia de la composición para tratar la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Alzheimer y/o la enfermedad de Parkinson, o para generar una respuesta inmune también se puede potenciar conjugando el péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de la enfermedad (por ejemplo, un epítipo específico de la esclerosis lateral amiotrófica) bien directamente, tal como a través de un enlace de amida, o indirectamente a través de un enlazador químico tal como carbodiimida o cualquier secuencia espaciadora peptídica tal como una secuencia de glicina o glicina-serina incluyendo Gly4-S, a una molécula que potencie la inmunogenicidad del epítipo. Por ejemplo, un péptido aislado que corresponde a un epítipo específico de la esclerosis lateral amiotrófica se puede conjugar con hemocianina de lapa californiana (KLH). La KLH es una proteína respiratoria que se encuentra en los moluscos. Su gran tamaño la hace muy inmunogénica, y la gran cantidad de restos de lisina disponibles para la conjugación la hace muy útil para unirse a una proteína, tal como un péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de la esclerosis lateral amiotrófica.

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

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

Los péptidos correspondientes a los epítipos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1, que incluyen epítipos específicos de la esclerosis lateral amiotrófica, específicos de la enfermedad de Alzheimer, específicos de la enfermedad de Parkinson, también pueden producirse mediante tecnología de ADN recombinante. Para preparar péptidos correspondientes a los epítipos específicos de la esclerosis lateral amiotrófica

mediante técnicas de ADN recombinante, se debe preparar una secuencia de ADN que codifique el péptido correspondiente al epítipo específico de la esclerosis lateral amiotrófica. Por consiguiente, se desvela el uso de ácidos nucleicos purificados y aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica epítopos específicos de la esclerosis lateral amiotrófica para tratar la esclerosis lateral amiotrófica o para generar una respuesta inmune.

En una divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica los péptidos correspondientes a epítopos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 se incorpora a un vector de expresión adaptado para la transfección o transformación de una célula hospedadora. En otra divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica los péptidos correspondientes a epítopos específicos de la esclerosis lateral amiotrófica se incorpora a un vector de expresión adaptado para la transfección o transformación de una célula hospedadora. Las moléculas de ácido nucleico pueden incorporarse de manera conocida a un vector de expresión apropiado que garantice la expresión de la proteína. Los posibles vectores de expresión incluyen, pero sin limitación, cósmidos, plásmidos o virus modificados (por ejemplo, retrovirus con replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados). El vector debe ser compatible con la célula hospedadora usada. Los vectores de expresión son "adecuados para la transformación de una célula hospedadora", lo que significa que los vectores de expresión contienen una molécula de ácido nucleico que codifica los péptidos correspondientes a epítopos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1, incluyendo epítopos específicos de la esclerosis lateral amiotrófica, epítopos específicos de la enfermedad de Alzheimer y epítopos específicos de la enfermedad de Parkinson, y secuencias reguladoras seleccionadas basándose en las células hospedadoras para su uso para la expresión, que está operativamente unida a la molécula de ácido nucleico. "Unido operativamente" pretende significar que el ácido nucleico está unido a secuencias reguladoras de una manera que permita la expresión del ácido nucleico.

Las secuencias reguladoras adecuadas pueden derivarse de una variedad de fuentes, que incluyen genes bacterianos, fúngicos, víricos, de mamífero o de insectos (por ejemplo, véase las secuencias reguladoras descritas en Goeddel (20)). La selección de secuencias reguladoras apropiadas depende de la célula hospedadora escogida, como se menciona a continuación, y puede ser realizada fácilmente por un experto en la materia. Los ejemplos de dichas secuencias reguladoras incluyen: un promotor de la transcripción y potenciador o secuencia de unión a ARN polimerasa, una secuencia de unión ribosómica, que incluye una señal de inicio de la traducción. Además, dependiendo de la célula hospedadora escogida y del vector empleado, otras secuencias, tales como un origen de replicación, sitios de restricción de ADN adicionales, potenciadores y secuencias que confieren inducibilidad de la transcripción pueden incorporarse al vector de expresión.

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

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

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

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

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

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

Dadas las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, también se pueden conseguir fácilmente promotores, terminadores y métodos para introducir vectores de expresión de un tipo apropiado en células vegetales, aviares e insectos. Por ejemplo, las proteínas desveladas en el presente documento pueden expresarse a partir de células vegetales (véase Sinkar *et al.* (38)), que revisa el uso de vectores de *Agrobacterium rhizogenes*; véase también Zambryski *et al.* (39), que describe el uso de vectores de expresión para células vegetales, incluyendo, entre otros, pAS2022, pAS2023 y pAS2034).

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

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

Composiciones de ácidos nucleicos para tratar enfermedades neurodegenerativas mediadas por SOD1

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

Los ácidos nucleicos aislados desvelados que codifican los péptidos correspondientes a los epítopos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 incluyen las siguientes moléculas de ARN, equivalentes de codones sinónimos de las mismas, y sus homólogos y complementos de ADN:

ES 2 680 020 T3

Para RLACGVIGI;

AGGUUAGCUUGUGGUGUUUAUAGGUAUA (SEQ ID NO: 19).

5 Para DLGKGGNEESTKTGNAGS;

GAUUUAGGUAAGGUGGUAUGAAGAAAGUACUAAAACUGGUAUGCUGGUA
GU (SEQ ID NO: 20).

Para NPLSRKHGGPKDEE;

10

AAUCCUUUAAGUCGUAACACGGAGACCGAAGGACGAGGAG (SEQ ID NO: 21).

Para IKGLTEGLHGF;

15

AUAAAGGGGAAAACAGAAGGACUCCACGGCUUU (SEQ ID NO: 22).

Para HCIIGRTLTVH;

20

CACUGUAUUUUGGCAGGACCCUCGUUGUUCAC (SEQ ID NO: 23).

Otros ácidos nucleicos útiles incluyen:

Para RLACGVIGI (DSE1: 143-151);

25

CGUUUGGCUUGUGGUGUAAUUGGAUC (SEQ ID NO: 24).

Para ACGVIGI (DSE1: 145-151);

30

GCUUGUGGUGUAAUUGGAUC (SEQ ID NO: 25).

Para DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2: 125-142);

GACUUGGGCAAAGGUGGAAAUGAAGAAAGUACAAAGACAGGAAACGCUGGAA
GU (SEQ ID NO: 26).

35

Para NPLSRKHGGPKDEE (DSE3: 65-78);

AAUCCUCUAUCCAGAAAACACGGUGGGCCAAAGGAUGAAGAG (SEQ ID NO: 27).

Para KAVCVLK (DSE4: 3-9);

40

AAGCCGUGUGCGUGCUGAAG (SEQ ID NO: 28).

Para IKGLTEGLHGF (DSE5: 35-45);

45

AUUAAAGGACUGACUGAAGGCCUGCAUGGAUUC (SEQ ID NO: 29).

Para HCIIGRTLTVH (DSE6: 110-120);

50

CAUUGCAUCAUUGGCCGCACACUGGUGGUCCAU (SEQ ID NO: 30).

Para GLHGFHVH (DSE7: 41-48);

GGCCUGCAUGGAUCCAUGUUCAU (SEQ ID NO: 31).

55

Los ácidos nucleicos se refieren en el presente documento a "los ácidos nucleicos de la Tabla 2C".

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

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

Los ácidos nucleicos aislados desvelados que codifican los péptidos correspondientes a epítipos específicos de la esclerosis lateral amiotrófica incluyen las siguientes moléculas de ARN, equivalentes de codón sinónimos de las mismas, y sus homólogos de ADN enumeradas entre los ácidos nucleicos de la Tabla 2C.

El experto en la materia apreciará que existen varios modos de administración disponibles cuando se usa una composición que contiene una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un péptido correspondiente a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1, incluyendo un epítipo específico de la esclerosis lateral amiotrófica aislado, un epítipo específico de la enfermedad de Alzheimer aislado y un epítipo específico de la enfermedad de Parkinson aislado. Las moléculas recombinantes descritas anteriormente se pueden introducir directamente en células o tejidos *in vivo* usando vehículos de administración tales como vectores retrovíricos, vectores adenovíricos y vectores de ADN vírico. También se pueden introducir en células *in vivo* usando técnicas físicas tales como microinyección y electroporación o métodos químicos tales como coprecipitación e incorporación de ADN en liposomas. Las moléculas recombinantes también pueden administrarse en forma de un aerosol o mediante lavado. Las moléculas de ácido nucleico desveladas en el presente documento también pueden aplicarse de forma extracelular, tal como mediante inyección directa en las células.

Método de tratamiento médico de la enfermedad usando ácidos nucleicos

Los vectores que contienen las moléculas de ácido nucleico desveladas en el presente documento se administran opcionalmente al SNC de mamíferos, Preferentemente, de seres humanos, en terapia génica usando las técnicas descritas a continuación. Los polipéptidos producidos a partir de las moléculas de ácido nucleico se administran fácilmente al SNC de mamíferos, preferentemente, de seres humanos. La divulgación se refiere a un método de tratamiento médico de un mamífero, preferentemente, un ser humano, mediante la administración al mamífero de un vector de la invención o de una célula que contiene un vector desvelado en el presente documento. Las enfermedades neuronales, tales como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica se tratan como se describe en la presente solicitud o usando métodos conocidos en la técnica (patentes de EE.UU. n.º 7175840, 7157098, 7141044, 6.309.634; 6936594; solicitud de EE.UU. n.º 2006073119; 2004265283; 2002107213; 2006122116). Las enfermedades, tales como enfermedades sanguíneas o enfermedades neuronales (neurodegenerativas), se tratan como se describe en la presente solicitud y se conocen en la técnica. Las enfermedades nerviosas de células madre que se tratarán mediante trasplante de células madre neuronales incluyen enfermedades que producen daño o pérdida de células neuronales, por ejemplo parálisis, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, ELA, esclerosis múltiple). El vector de la invención es útil como marcador de células madre y para expresar genes que hacen que las células madre se diferencien (por ejemplo, factor de crecimiento).

Métodos de tratamiento usando péptidos aislados correspondientes a epítipos específicos de la enfermedad

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

Se desvela un método para tratar la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende un epítipo específico de la esclerosis lateral amiotrófica, en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado.

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

Métodos de tratamiento usando ácidos nucleicos aislados

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

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

Se desvela un método para tratar la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende un ácido nucleico que codifica un péptido correspondiente a

un epítipo específico de la esclerosis lateral amiotrófica en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado. En una divulgación, el ácido nucleico comprende un ácido nucleico seleccionado del grupo de ácidos nucleicos de la Tabla 2C.

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

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

15 Métodos para generar una respuesta inmune usando un péptido aislado correspondiente a un epítipo específico de la enfermedad

20 Las composiciones desveladas se pueden usar para generar una respuesta inmune en un animal, y se pueden usar en métodos para generar una respuesta inmune en un animal contra un epítipo presentado selectivamente o accesible en SOD1 no nativa, Incluyendo el epítipo específico de la esclerosis lateral amiotrófica, el epítipo específico de la enfermedad de Alzheimer o el epítipo específico de la enfermedad de Parkinson.

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

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

35 Método para generar una respuesta inmune usando un ácido nucleico aislado

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

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

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

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

60 Uso de un ácido nucleico aislado en la fabricación de un medicamento

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

Como se ha descrito anteriormente, la inmunogenicidad y, por lo tanto, la eficacia de una vacuna pueden mejorarse significativamente si el agente inmunizante (por ejemplo, péptido aislado correspondiente a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1) y/o sus composiciones son inmunizados junto con un adyuvante. Por consiguiente, los métodos y usos desvelados incluyen el uso de un adyuvante.

5 Uso de ácidos nucleicos aislados correspondientes a epítipos específicos de la enfermedad para tratar las enfermedades neurodegenerativas mediadas por SOD1

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

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

20 Composiciones y usos de los agentes de unión específicos de los epítipos específicos de la enfermedad que se unen a epítipos específicos de la enfermedad

25 Los epítipos presentados en SOD1 mal plegada pueden ser unidos y/o neutralizados por una serie de agentes naturales o diseñados por ingeniería genética diferentes, tales como anticuerpos, otros polipéptidos, moléculas pequeñas, aficuerpos (Wahlberg *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 100:3185-3190, 2003); anticalinas (Schlehuber y Skerra, *Biophys Chem.*, 96:213-28, 2002); y aptámeros de ácido nucleico y proteína (Cullen *et al.*, *Cell*, 58: 423-466, 1989). En ciertas divulgaciones, el agente es un anticuerpo que se une selectivamente a un epítipo específico de la enfermedad o a un análogo del mismo presentado o accesible en SOD1 no nativa.

Generación de anticuerpos

35 Los epítipos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 pueden usarse para producir anticuerpos. Se desvelan anticuerpos específicos de las moléculas de SOD1 mal plegadas, preferentemente, moléculas de SOD1 mal plegadas asociadas con la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y/o la esclerosis lateral amiotrófica.

40 En una divulgación, los epítipos específicos de la esclerosis lateral amiotrófica pueden usarse para producir anticuerpos específicos de los epítipos específicos de la esclerosis lateral amiotrófica. En una divulgación, los anticuerpos son específicos de las moléculas de SOD1 mal plegadas. En otras divulgaciones, los anticuerpos son anticuerpos aislados.

45 En otra divulgación, el anticuerpo aislado específico del epítipo específico de la esclerosis lateral amiotrófica se prepara administrando una de las composiciones desveladas en el presente documento a un animal.

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

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

65 "Anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo producido *in vivo* o *in vivo* que se ha retirado de la fuente que produjo el anticuerpo, por ejemplo, un animal, hibridoma u otra estirpe celular (tal como células recombinantes que producen

anticuerpo). El anticuerpo aislado se "purifica" opcionalmente, lo que significa al menos: un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de pureza y, opcionalmente, pureza de grado farmacéutico.

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

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

25 También se pueden generar anticuerpos específicos, o fragmentos de anticuerpos, reactivos contra determinados antígenos o moléculas, tales como epítipos presentados selectivamente o accesibles en formas mal plegadas de SOD1, incluyendo epítipos específicos de la esclerosis lateral amiotrófica, epítipos específicos de la enfermedad de Alzheimer o epítipos específicos de la enfermedad de Parkinson. Mediante la exploración de genotecas de expresión que codifican genes de inmunoglobulina, o partes de los mismos, expresados en bacterias con componentes de la superficie celular. Por ejemplo, los fragmentos Fab completos, regiones VH y regiones FV se pueden expresar en bacterias usando genotecas de expresión en fagos (véase, por ejemplo, Ward *et al.* (46); Huse *et al.* (45); y McCafferty *et al.* (47)).

30 La expresión "anticuerpo humanizado", como se usa en el presente documento, significa que el anticuerpo o fragmento comprende regiones marco conservadas humanas (denominadas, como alternativa, regiones constantes) y las regiones hipervariables (denominadas, como alternativa, dominio de unión al antígeno) son de origen no humano. Por ejemplo, la región hipervariable puede ser de un ratón, de una rata o de otra especie. La humanización de anticuerpos de especies no humanas ha sido bien descrita en la literatura. Véase, por ejemplo, los documentos EP-B1 0 239400, y Carter y Merchant 1997 (*Curr Opin Biotechnol* 8, 449-454, 1997). Los anticuerpos humanizados también se obtienen fácilmente en el mercado (por ejemplo, Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Gran Bretaña).

40 Las formas humanizadas de anticuerpos de roedor se generan fácilmente mediante el injerto de CDR (Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-327, 1988). En este enfoque, los seis bucles de CDR que comprenden el sitio de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal de roedor se unen a las regiones flanqueantes humanas correspondientes. El injerto de CDR suele producir anticuerpos con afinidad reducida, ya que los aminoácidos de las regiones marco conservadas pueden influir en el reconocimiento del antígeno (Foote y Winter. *J Mol Biol*, 224: 487-499, 1992). Para mantener la afinidad del anticuerpo, suele ser necesario reemplazar ciertos restos de la región marco conservada mediante mutagénesis dirigida u otras técnicas recombinantes, y esto se puede ayudar de la modelización informática del sitio de unión al antígeno (Co *et al.* *J Immunol*, 152: 2968-2976, 1994).

50 Las formas humanizadas de anticuerpos se obtienen opcionalmente mediante la modificación de la superficie (Pedersen *et al.*, *J Mol Biol*, 235: 959-973, 1994). En este enfoque, solo los restos superficiales de un anticuerpo de roedor están humanizados.

55 La expresión "anticuerpos humanos", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos que son, o corresponden a, anticuerpos que se producen endógenamente en un sujeto humano, sin embargo, los anticuerpos humanos también se producen opcionalmente exógenamente a través de técnicas bioquímicas. Los anticuerpos humanos específicos de un determinado antígeno se pueden identificar mediante una estrategia de presentación en fagos (Jespersen *et al.* *BioTechnology*, 12: 899-903, 1994). En un enfoque, la cadena pesada de un anticuerpo de roedor dirigido contra un antígeno específico se clona y se combina con un repertorio de cadenas ligeras humanas para presentarse como fragmentos Fab en fagos filamentosos. El fago se selecciona mediante la unión al antígeno. 60 La cadena ligera humana seleccionada se empareja posteriormente con un repertorio de cadenas pesadas humanas para presentarse en el fago, y el fago se selecciona de nuevo mediante la unión al antígeno. El resultado es un fragmento Fab de anticuerpo humano específico de un determinado antígeno. En otro enfoque, se producen genotecas de fagos cuando los miembros presentan diferentes fragmentos de anticuerpos humanos (Fab o Fv) en sus superficies externas (Dower *et al.*, WO 91/17271 y McCafferty *et al.*, WO 92/01047). Los fagos que presentan anticuerpos con una especificidad deseada se seleccionan mediante enriquecimiento por afinidad a un antígeno 65

específico. El fragmento Fab o Fv humano identificado a partir de cualquiera de los enfoques puede volverse a clonar para la expresión como un anticuerpo humano en células de mamífero.

5 Los anticuerpos humanos se obtienen opcionalmente de animales transgénicos (patentes de EE.UU. N.º 6.150.584; 6.114.598; y 5.770.429). En este enfoque, se elimina el gen (J_H) de la región de unión de la cadena pesada de un ratón mutante quimérico o de estirpe germinal. El conjunto de genes de la inmunoglobulina de la estirpe germinal humana se transfiere posteriormente a dichos ratones mutantes. El ratón transgénico resultante es capaz de generar un repertorio completo de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno.

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

20 Además, los anticuerpos específicos de los epítomos de la invención se aíslan fácilmente seleccionando genotecas de presentación en fagos de anticuerpos. Por ejemplo, una genoteca de fagos de anticuerpos se rastrea opcionalmente usando un epítomo específico de la enfermedad de la presente invención para identificar fragmentos de anticuerpos específicos del epítomo específico de la enfermedad. Los fragmentos de anticuerpo identificados se usan opcionalmente para producir una variedad de anticuerpos recombinantes que son útiles con diferentes realizaciones de la presente invención. Las genotecas de presentación en fagos de anticuerpos se encuentran disponibles en el mercado, por ejemplo, a través de Xoma (Berkeley, California). Los métodos para explorar genotecas de fagos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica.

25 También se desvelan anticuerpos que compiten selectivamente con anticuerpos generados usando un inmunógeno que comprende un péptido aislado de la Tabla 2 y la Tabla 2A, y análogos de los mismos. Se realizan ensayos de competencia para proporcionar un método para determinar si un anticuerpo de ensayo desplaza un anticuerpo descrito en el presente documento, que comprenden poner en contacto un epítomo presentado en una forma no nativa de SOD1 con un anticuerpo de ensayo y un anticuerpo generado usando un inmunógeno que comprende un péptido aislado de la Tabla 2, Tabla 2A o análogos de los mismos, y a continuación, determinar si el anticuerpo de ensayo desplaza selectivamente el anticuerpo desvelado en el presente documento para unirse al epítomo. Se considera que el anticuerpo de ensayo desplaza selectivamente el anticuerpo desvelado en el presente documento si el anticuerpo de ensayo tiene al menos 1,5 veces o al menos 2 veces mayor afinidad de unión por el epítomo.

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

45 Composiciones que comprenden anticuerpos

Se desvela una composición para tratar la esclerosis lateral amiotrófica que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo específico de epítomos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado. Se desvela el epítomo que comprende un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en los péptidos aislados de la Tabla 2 o la Tabla 2A, o un análogo de los mismos.

50 Se desvela una composición para tratar la esclerosis lateral amiotrófica que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo específico para el epítomo específico de la esclerosis lateral amiotrófica en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado.

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

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

60 Método de tratamiento: Inmunización pasiva

Se desvela un método para tratar la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo que se une a un epítomo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado.

65

Además de los anticuerpos, los epítomos presentados en SOD1 mal plegada se pueden unir y/o neutralizar mediante una serie de diferentes agentes naturales o creados por ingeniería genética tales como otros polipéptidos, moléculas pequeñas, aficuerpos (Wahlberg *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 100:3185-3190, 2003); anticalinas (Schlehuber y Skerra, *Biophys Chem.*, 96:213-28, 2002); y aptámeros de ácido nucleico y proteína (Cullen *et al.*, *Cell*, 58: 423-466, 1989).

Los aficuerpos son proteínas de unión artificiales basadas en el armazón de tres hélices del dominio Z derivado de la proteína A estafilocócica (Wahlberg *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 100:3185-3190, 2003). El dominio Z consiste en 58 restos que se unen a la parte Fc de IgG de diferentes especies (Nygren y Uhlen, *Curr Opin Struct Biol.*, 7:463-469, 1997). Aleatorizando simultáneamente 13 posiciones de aminoácidos ubicadas en las dos hélices que componen la cara de unión a Fc del dominio Z, se crea una genoteca de proteínas de unión (aficuerpos) y se usa para seleccionar la unión a las dianas deseadas mediante la tecnología de presentación en fagos (Nord, *et al. Protein Eng.*, 8:601-608, 1995; Nord *et al. Nat Biotechnol.* 15:772-777, 1997). Los aficuerpos tienen una estructura secundaria similar al dominio Z nativo, y tienen constantes de disociación de rango micromolar (KD) para sus respectivas dianas (Nord *et al.*, *Nat Biotechnol.*, 15: 772-777, 1997).

Las anticalinas son una clase de proteínas de unión al ligando artificiales derivadas del armazón proteico de lipocalina (Schlehuber y Skerra, *Biophys Chem.*, 96:213-28, 2002; Weiss y Lowman. *Chem. Biol.*, 7:R177-R184, 2000; Skerra. *J Biotechnol.*, 74:257-275, 2001). El proceso de preparación de anticalinas se describe en el documento EP1017814. El sitio de unión al ligando de las anticalinas puede volverse a crea mediante sustituciones de aminoácidos, u otros enfoques recombinantes, para alterar la especificidad de unión de la proteína. Las anticalinas son similares a los anticuerpos, ya que poseen alta afinidad y especificidad por sus ligandos prescritos. Sin embargo, las anticalinas tienen una serie de ventajas frente a los anticuerpos, entre las que se incluyen un menor tamaño; composición peptídica única; y un sitio de unión que es fácil de manipular.

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

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

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

Uso de anticuerpos para tratar enfermedades

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

Uso de anticuerpos en la fabricación de un medicamento

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

Los siguientes ejemplos se describen solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Métodos de administración de composiciones

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

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra sistémicamente.

En otras realizaciones, la composición farmacéutica se administra directamente al cerebro u otra parte del SNC. Por ejemplo, dichos métodos incluyen el uso de un catéter implantable y una bomba, que servirían para descargar una dosis predeterminada a través del catéter al sitio de infusión. El experto en la materia reconocerá además que el catéter se puede implantar mediante técnicas quirúrgicas que permitan la visualización del catéter a fin de colocar el catéter adyacente al sitio de administración o infusión deseado en el cerebro. Dichas técnicas se desvelan en Elsberry *et al.* patente de EE.UU. n.º 5.814.014 "Techniques of Treating Neurodegenerative Disorders by Brain Infusion". Los inventores también han contemplado otros métodos tales como los descritos en la solicitud de patente de EE.UU. 20060129126 (Kaplitt y During "Infusion device and method for infusing material into the brain of a patient"). Los dispositivos para administrar fármacos al cerebro y a otras partes del SNC se encuentran disponible en el mercado (por ejemplo, SynchroMed® EL Infusion System; Medtronic, Minneapolis, Minnesota)

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

Otras realizaciones contemplan la administración conjunta de los compuestos de la invención con moléculas biológicamente activas conocidas por facilitar el transporte a través de la barrera hematoencefálica.

En otra realización, los compuestos de la invención se reformulan como proteínas de fusión o quiméricas para permitir su transporte a través de la barrera hematoencefálica. Dichas tecnologías se describen en la patente de EE.UU. n.º 4902505, "Chimeric peptides for neuropeptide delivery through the blood-brain barrier".

La invención también contempla métodos adicionales para administrar los compuestos a través de la barrera hematoencefálica tales como los dirigidos a aumentar transitoriamente la permeabilidad de la barrera hematoencefálica como se describe en la patente de EE.UU. n.º 7012061 "Method for increasing the permeability of the blood brain barrier".

El experto en la materia reconocerá la variedad de métodos adecuados para administrar los compuestos de la invención directamente al cerebro o a través de la barrera hematoencefálica, y podrá modificar estos métodos para administrar de forma segura los productos de la invención.

Dosis y formulaciones

La forma farmacéutica es opcionalmente una forma farmacéutica líquida. La expresión "forma farmacéutica líquida" se refiere a formas farmacéuticas no sólidas adecuadas para, pero sin limitación, la administración parenteral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraventricular, inyección intratecal, intraorbital, oftálmica, intracapsular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerosol u oral. Se pueden preparar soluciones de un compuesto de la invención en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, DMSO y mezclas de los mismos con o sin alcohol y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estos preparados contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos. El experto en la materia sabría cómo preparar formulaciones adecuadas. Los procedimientos e ingredientes convencionales para la selección y preparación de formulaciones adecuadas se describen, por ejemplo, in "Remington's Pharmaceutical Sciences" (2003 - 20ª edición) y en "The United States Pharmacopeia: The National Formulary"(USP 24 NF19), publicado en 1999. Las formulaciones contienen opcionalmente excipientes que incluyen, pero sin limitación, agentes de tamponamiento, un antioxidante, un estabilizante, un vehículo, un diluyente y un agente para ajustar el pH.

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

El experto en la materia reconocerá que la forma farmacéutica y la formulación escogidas dependen de las características de la composición. Por ejemplo, un experto en la materia sabrá que una composición que comprenda un anticuerpo puede requerir una formulación diferente que una composición que comprenda un ácido nucleico, y escogería una formulación y una forma farmacéutica adecuada para la composición.

Otros factores adicionales que afectan a la dosis eficaz de una formulación incluyen la vía de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del sujeto, la especie del sujeto, si el tratamiento es profiláctico o terapéutico, si se administraron otros medicamentos, y si también se administra un adyuvante.

El momento de las vacunas varía opcionalmente de una vez al día, a una vez a la semana, a una vez al mes, a una vez al año, a una vez cada década. Una pauta típica incluye una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo a intervalos de 6 semanas. Otra pauta consiste en inmunización seguida de inyecciones de refuerzo 1, 2 y 12 meses

después. Como alternativa, las inyecciones de refuerzo variarán dependiendo de la respuesta inmune y del estado fisiológico del sujeto.

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

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

Cuando un péptido aislado que corresponde a un epítipo es demasiado pequeño para ser inmunogénico, o cuando se mejora la inmunogenicidad, el péptido está opcionalmente unido o acoplado a un vehículo adecuado. Los vehículos adecuados incluyen, pero sin limitación, hemocianina de lapa californiana, antígeno MAP, albúminas séricas, moléculas de inmunoglobulina y toxoides de bacterias patógenas. Los péptidos se pueden unir a vehículos mediante reticulación química, por ejemplo, para formar dendrímeros. Como alternativa, los péptidos inmunogénicos se pueden expresar como proteínas de fusión con vehículos.

Pueden usarse anticuerpos monoclonales tales como anticuerpo monoclonal humanizado por infusión intravenosa. La concentración terapéutica del anticuerpo humanizado DSE de SOD1 puede ser de 1 a 10 microgramos por ml de concentración local en el SNC. En el marco de una barrera hematoencefálica (BHE) no interrumpida, solo 1/100 a 1/1.000 de IgG penetra en el SNC. Por lo tanto, la concentración de anticuerpo terapéutico en la circulación periférica necesaria para alcanzar esta concentración en el SNC sería del orden de 100 microgramos/ml hasta un máximo de 10 mg/ml, cerca del nivel de pretratamiento de IgG en plasma humano. Teniendo en cuenta que el volumen de sangre humana es de aproximadamente 5 litros, la dosis de 50 gramos sería el límite superior, que es similar a la dosis de inmunoglobulina intravenosa policlonal combinada (IGIV) usada para tratar muchos trastornos inflamatorios y autoinmunes. Considerando que la degradación de la IgG humana requiere de 3 a 4 semanas, la dosis de una vez cada 3 semanas debería constituir una pauta eficaz. Sin embargo, la dosis de anticuerpos monoclonales anti-DSE humanizados podría ser mucho menor que la calculada anteriormente, basándose en los experimentos de tratamiento con ratones proporcionados en los siguientes ejemplos. Los presentes inventores han encontrado que la dosificación a ratones G93A por vía intraperitoneal de 1 mg de anticuerpo DSE2 fue terapéuticamente eficaz. Considerando que el volumen de sangre en un ratón es de 6-7 ml por cada 100 gramos de peso corporal, la concentración circulante del anticuerpo monoclonal DSE2 fue del orden de 1 mg/ml. Para la dosificación a un ser humano con ELA, esto se traduciría en 1/10 de la IgG normal circulante (comúnmente, de aproximadamente 10 mg/ml). El volumen de sangre humana es del orden de 5 litros, lo que sugeriría una dosis terapéutica eficaz de anticuerpo DSE2 humanizado del orden de 5 gramos por infusión IV. Además, se ha observado una ligera alteración de la BHE en la ELA, que presumiblemente es máxima en las regiones de mayor neuroinflamación, es decir, en aquellas regiones en las que la enfermedad es más manifiesta, tales como las neuronas motoras del cuerno anterior y las neuronas motoras corticales, así como ciertos tractos de fibra que son servidos por neuronas motoras corticales. Por lo tanto, es posible que la interrupción selectiva de la BHE en regiones de enfermedad máxima permita la eficacia terapéutica para concentraciones circulantes inferiores anticuerpos SOD1 anti-DSE.

Los anticuerpos monoclonales DSE humanizados pueden usarse para la infusión directa en el SNC a través de la vía intraventricular o por vía intratecal. Ejemplos de dispositivos médicos que se usan para este fin son fabricados por MedTronic. Como el LCR recircula varias veces al día, se requiere una infusión continua, en lugar de un pauta posológica de 3-4 semanas. La concentración final de 1-10 microgramos por ml se logrará mediante una infusión de hasta 5 mg por día en el LCR de 500 ml por día.

Terapias de combinación

Los métodos desvelados proporcionan así la aplicación inmunoterapéutica de anticuerpos SOD1 en el tratamiento de afecciones, trastornos o enfermedades marcados por la presencia de SOD1 mal plegada o monomérica.

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

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

En terapias combinadas para el tratamiento de ELA, los presentes agentes terapéuticos se puede usar en combinación con riluzol y otros inhibidores de glutamato.

Los inventores también han encontrado que el cobre se conserva en SOD1 oxidada catalizada por metal, que es una especie agregada inmunorreactiva con DSE-2. Los inventores también encuentran que la SOD1 oxidada mediante el tratamiento con peróxido de hidrógeno muestra inmunorreactividad hacia DSE2 (Figura 2). El anticuerpo DSE2, que reacciona contra el bucle electrostático de SOD1 del sitio activo, puede bloquear físicamente el acceso al cobre conservado de las especies mal plegadas y, de este modo, reducir la catálisis de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno mediante la reacción de Haber-Weiss, la reacción de Fenton y otras. De forma destacable, las altas concentraciones de ascorbato en el SNC pueden facilitar el ciclo redox del cobre unido por SOD1 mal plegada, lo que mejora su capacidad para generar ROS y RNS. El estado agregado de SOD1, que, preferentemente, se ha segregado de las neuronas (1), afecta a su aclaramiento y degradación, "atrapando" cobre en una forma neurotóxica catalíticamente activa muy cerca de las neuronas motoras en la ELA, y del hipocampo y otras neuronas en la EA. Cabe señalar la posibilidad de que Abeta pueda contribuir a este ciclo redox tóxico del cobre en la EA (83).

Por consiguiente, en una terapia de combinación particularmente útil, los presentes agentes terapéuticos se usan en combinación con un antioxidante, para el tratamiento de la ELA, la EA y la EP, así como otros trastornos en los que la SOD1 disfuncional y/o la agregación de SOD1 produce la acumulación tóxica de especies reactivas de oxígeno (ROS) o especies reactivas de nitrógeno (RNS). Los antioxidantes son un grupo bien conocido de agentes que se pueden obtener fácilmente, e incluyen vitaminas, ácido ascórbico y alfa-tocoferol, así como agentes farmacológicos tales como la N-acetilcisteína. En realizaciones del presente método, el antioxidante es una SOD sintética funcional, que imita la acción enzimática de SOD endógena para reducir la acumulación de radicales de superóxido. Los fármacos útiles relacionados incluyen aquellos que estabilizan el dímero de SOD, según lo descrito, por ejemplo, por Lansbury *et al.*, en el documento US 2006/0194821. También son útiles otros fármacos que tienen el mismo efecto. En realizaciones particulares, el antioxidante es un quelante de cobre, tal como penicilamina, clioquinol, 8-hidroxiquinolina y derivados tales como los descritos en los documentos US2006/0089380, cuprizona, compuestos a base de ácido picolínico, compuestos de molibdeno, L-taurina u otro fármaco que tenga el efecto de inhibir el ciclo redox mediado por el ión de cobre. Otros antioxidantes útiles más incluyen los neutralizadores de superóxido, neutralizadores de peróxido y neutralizadores de RNS. En una realización particular de la invención, los presentes agentes terapéuticos se usan en combinación con resveritrol, un antioxidante presente en las uvas rojas y en el vino. En una realización específica, se usa el anticuerpo o epítipo de DSE2 en combinación con resveritrol.

Cuando se usa en combinación con el presente agente terapéutico, el agente de combinación se administra de la manera prescrita para ese agente, de acuerdo con la práctica convencional.

Diagnóstico

Los anticuerpos específicos de epítipos específicos de la enfermedad de SOD1 tales como epítipos específicos de la esclerosis lateral amiotrófica también pueden usarse para diagnosticar la esclerosis lateral amiotrófica. Por lo tanto, Se desvela un método para detectar o diagnosticar la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto que comprende las etapas de:

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

(c) comparar la cantidad de complejo de antígeno-anticuerpo en la muestra de ensayo con un control

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

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

10 La expresión "detectar o controlar la esclerosis lateral amiotrófica" se refiere a un método o proceso para determinar si un sujeto tiene o no esclerosis lateral amiotrófica o el grado de la esclerosis lateral amiotrófica. Además, los anticuerpos de la invención se pueden usar para detectar o controlar el aspecto y la progresión de la agregación de SOD1 y, por consiguiente, la progresión de la enfermedad. Los anticuerpos son además útiles para controlar la progresión de la enfermedad durante el tratamiento con un método de la invención.

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

30 El término "muestra", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier fluido, célula o tejido de un sujeto que puede ensayarse para determinar la SOD1 mal plegada. En una realización, la muestra comprende, sin limitación, líquido cefalorraquídeo, plasma, suero sanguíneo, sangre completa, tejido de médula espinal, células cerebrales, neuronas motoras, una parte del cuerno dorsal, o células de sangre periférica, tales como eritrocitos, células mononucleares, linfocitos, monocitos y granulocitos.

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

40 Opcionalmente, y en caso de que el epítipo de SOD1 mal plegado se enmascare dentro de una agregación de SOD1, el método proporciona la etapa de tratar la muestra para potenciar la desagregación de los agregados de SOD1 para dejar al descubierto el epítipo diana antes del etapa (a).

45 En caso de que el epítipo esté enmascarado dentro del agregado de SOD1, el método comprende la etapa adicional de tratar la muestra en condiciones de desagregación, usando, por ejemplo, clorhidrato de guanidinio, para liberar la SOD1 mal plegada para su posterior detección. El experto en la materia apreciará que las "condiciones de desagregación" se refieren a las condiciones que potencian la disociación del agregado en unidades menores, tales como dímeros o monómeros de SOD1. Esto difiere de la desnaturalización de la proteína. Por consiguiente, el experto en la materia apreciará que pueden usarse concentraciones de clorhidrato de guanidinio (por ejemplo) que disocien, pero no desnaturalicen, los agregados de SOD1. En una divulgación, los anticuerpos se usan para determinar si la SOD1 mal plegada está presente en la muestra. En otra realización, los anticuerpos están marcados con un marcador detectable.

50 En otra divulgación, los epítipos se usan para controlar el aspecto y el título de los anticuerpos introducidos en o generados dentro de un receptor. En dicha divulgación, una muestra de paciente se mezcla con el epítipo, y preferentemente un epítipo marcado, y se determina la presencia o cantidad de anticuerpo unido.

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

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

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

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

5 El experto en la materia apreciará que se puede usar una serie de métodos para determinar si la SOD1 mal plegada está presente en una muestra usando los anticuerpos de la invención, incluyendo inmunoensayos tales como citometría de flujo, transferencia Western, ELISA e inmunoprecipitación seguidas por la inmunocitoquímica de SDS-PAGE.

10 En una divulgación, una enfermedad relacionada con la SOD1 mal plegada, tal como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de cuerpos de Lewy y/o la esclerosis lateral amiotrófica se detectan o controlan en un sujeto usando citometría de flujo de una muestra del sujeto, que incluye células de sangre periférica, tales como eritrocitos, células mononucleares, linfocitos, monocitos y/o granulocitos, o células mononucleares que se encuentran en el líquido cefalorraquídeo. En una realización adicional, las células ensayadas usando citometría de flujo pueden permeabilizarse usando reactivos conocidos por los expertos en la materia que incluyen, sin limitación, detergentes, etanol, metanol y paraformaldehído.

20 En una divulgación, una enfermedad relacionada con la SOD1 mal plegada, tal como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y/o la enfermedad de cuerpos de Lewy se puede detectar o controlar en un sujeto usando citometría de flujo de una muestra del sujeto, que incluye células de sangre periférica, tales como eritrocitos, células mononucleares, linfocitos, monocitos y/o granulocitos, o células mononucleares que se encuentran en el líquido cefalorraquídeo. En una realización adicional, las células ensayadas usando citometría de flujo pueden permeabilizarse usando reactivos conocidos por los expertos en la materia que incluyen, sin limitación, detergentes, etanol, metanol y paraformaldehído.

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

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

35 Cualquiera de los métodos desvelados para diagnosticar, detectar o controlar la agregación de SOD1 y el desarrollo de la esclerosis lateral amiotrófica se puede usar, además o en combinación con técnicas de diagnóstico tradicionales para la esclerosis lateral amiotrófica. Las técnicas de diagnóstico tradicionales para la esclerosis lateral amiotrófica incluyen exámenes físicos y neurológicos, y pueden incluir ensayos de electromiografía, ensayos de velocidad de la afección nerviosa y generación de imágenes por resonancia magnética.

40 El diagnóstico de la enfermedad neurodegenerativa, y el control de la progresión de estos trastornos, no es satisfactorio en este momento. El diagnóstico definitivo solo puede hacerse mediante examen tisular en la evaluación necrópsica tras la muerte, o mediante biopsia (casi nunca se utiliza en enfermedades neurodegenerativas). No es exagerado afirmar que el diagnóstico presuntivo *antemortem* de ELA, EA y EP se realiza basándose de las características clínicas, que a menudo se comparten con otras enfermedades, y al intentar excluir otros trastornos que imitan la enfermedad en cuestión. El "diagnóstico por exclusión" se realiza mediante neuroimágenes (imágenes por resonancia magnética y tomografía axial computerizada) y análisis de sangre para descartar diagnósticos de confusión (tales como análisis de la función tiroidea). Los ensayos especializados para los trastornos neurodegenerativos separados (tales como la evaluación neuropsicológica para la EA, el escaneo PET para la EP y la electromiografía para la ELA, junto con el examen clínico, predicen el diagnóstico de autopsia en del 70 al 90 % de los pacientes con EA y EP, y en general, en más del 90 % de los pacientes con ELA.

50 Los anticuerpos de la invención se desvelan como útiles para el diagnóstico, y se desvelan para su uso a la concentración de bajas cantidades de proteínas mal plegadas presentes en los fluidos y tejidos de pacientes mediante procedimientos de concentración tales como inmunoprecipitación. En una divulgación, se usa un anticuerpo que reconoce un epítipo presentado selectivamente en formas no nativas de SOD1 para inmunoprecipitar SOD1 de sangre periférica. La presencia de SOD1 inmunoprecipitada se puede detectar opcionalmente mediante ELISA.

55 La invención también incluye kits para diagnosticar la esclerosis lateral amiotrófica que comprenden un anticuerpo de la invención y las instrucciones para su uso. El experto en la materia apreciará que el anticuerpo puede marcarse con un marcador detectable.

60

65

Se desvelan kits para diagnosticar la ELA, EA y/o E, que comprenden uno o más péptidos aislados correspondientes a epítomos específicos de la enfermedad. En una divulgación, el kit comprende un péptido aislado que corresponde a los epítomos específicos de la enfermedad seleccionados del grupo que comprende: DSE1, DSE1a, DSE2, DSE3, DSE4, DSE5, DSE6 y DSE7.

Los péptidos aislados se pueden incluir además de un anticuerpo que se una a dicho epítomo. En una divulgación, el péptido aislado es un control positivo. Como alternativa, el péptido aislado puede ser útil en sí para explorar una muestra a fin de detectar cualquier anticuerpo DSE presente, por ejemplo, en un paciente sometido a inmunoterapia activa o pasiva basada en dichos péptidos y anticuerpos.

Detección de fármacos

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

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

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

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

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

El experto en la materia apreciará que se puede rastrear un banco de moléculas controlando el efecto de los compuestos candidatos sobre la inhibición de la conversión de SOD1 a una configuración mal plegada o específica de enfermedad.

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

Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de realizaciones de la presente invención.

Ejemplos

Los inmunógenos que comprenden péptidos aislados correspondientes a epítomos específicos de la enfermedad, por ejemplo, DSE1a, se pueden denominar en los siguientes ejemplos secuencias de DSE análogas (por ejemplo, GGGRLAC*GVIGIGSG análoga de DSE1a que comprende secuencias N-terminales G adicionales) como el número DSE (por ejemplo, DSE1) relacionado al análogo.

Ejemplo 1

Generación de anticuerpos monoclonales DSE2

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

La pareja de fusión usada fue Sp 2/0-Ag14 (ATCC n.º CRL-1581). La fusión entre la pareja de fusión SP2/0 y las células del bazo se realizó a una proporción de 1:5 ($2,0 \times 10^7$: $1,0 \times 10^8$) en 1 ml de PEG previamente calentado (PM de 1450: Sigma, n.º de cat. P7181). Se volvieron a suspender las células de fusión en 50 ml de DMEM con FBS al 10 %, y se sembraron en 5 placas de 96 pocillos a 100 µl/pocillo. Se añadieron 100 µl/pocillo de medios 2 x HAT DMEM a las células de fusión después de 24 horas. Los medios se cambiaron los días 5 y 7 con medios 1 x HAT nuevos. El día 10-12, se recogieron 50 µl de sobrenadante de cada pocillo para la primera selección mediante ELISA. Los clones positivos se transfirieron a placas de 24 pocillos. Tras la confluencia, se exploraron los sobrenadantes de anticuerpos mediante ELISA con el antígeno usado para inmunizar los ratones y un antígeno no relacionado (transferrina humana). Los clones positivos se transfirieron a placas de 6 pocillos para la expansión o subclonación de hibridomas. La subclonación se realizó mediante dilución limitante a 50-70 células/placa de 96 pocillos.

Ejemplo 2

Producción de anticuerpos monoclonales a gran escala

Para la producción de anticuerpos a gran escala, se inyectaron 0,2-0,5 ml de Pristane (Sigma, n.º de cat. T-7640) o IFA a cada ratón (BALB/c) por vía ip para la sensibilización. El día 7-14, se inyectaron a cada ratón de 500.000 a 5.000.000 de células de hibridoma en 0,5 ml de 1 x PBS en fase logarítmica por vía ip. Se dejó que se acumulara líquido ascítico durante 1-2 semanas. Se pueden extraer 2-5 ml de ascitis de cada ratón, con una concentración de IgG de aproximadamente 1-9 mg/ml. La proteína A se usó para la purificación de IgG2 y 3, y la proteína G, para IgG1.

El clon de anticuerpo monoclonal IgG se designó 10E11C11. Este anticuerpo muestra propiedades constantes con su reconocimiento de un epítipo específico de la enfermedad para la SOD1 mal plegada. Este anticuerpo monoclonal se une a SOD1 desnaturalizada en membranas de inmunotransferencia, reconociendo a la SOD1 desnaturalizada monomérica (no estructurada). El anticuerpo monoclonal no reconoce a la SOD1 dimérica en la inmunotransferencia. En inmunoprecipitaciones mediadas por perlas magnéticas conjugadas con 10E11C11, no hay unión detectable de SOD1 nativa del cerebro humano normal, o del cerebro y la médula espinal de un ratón. El anticuerpo monoclonal inmunoprecipita eficazmente la SOD1 deliberadamente mal plegada mediante el bajo pH, el caotropro guanidina, o ambos. Lo que es más importante, 10E11C11 inmunoprecipita eficazmente la SOD1 mal plegada en un modelo de ratón de ELA causada por la sobreexpresión transgénica de SOD1 mutante (G93A). De forma destacable, la SOD1 endógena de ratón presente en el mismo tejido no está inmunoprecipitada, lo que sugiere que la SOD1 mutante humana mal plegada no "se recluta junto con" la SOD de ratón normal en este modelo de enfermedad.

Los anticuerpos también se produjeron de manera similar al epítipo NPLSRKHGGPKDEE, portador de un resto de Cys N-terminal.

Dichos anticuerpos están disponibles y se pueden obtener de Neil Cashman en el Brain Research Center, UBC Hospital, 2211 Wesbrook Mall, Vancouver, British Columbia, V6T 2B5, Canadá (neil.cashman@utoronto.ca).

Ejemplo 3

Método 2 de generación de anticuerpos monoclonales DSE2

Generación de anticuerpos monoclonales de ratón: se inmunizaron inicialmente 4 ratones hembra BALB/c mediante inyecciones intraperitoneales con 25 µg de KLH acoplada al péptido correspondiente a DSE2 (DLGKGGNEESTKTGNAGS, más una cisteína N terminal para acoplarse a KLH mediante la formación de puentes disulfuro) por ratón en adyuvante completo de Freund. Se administraron cuatro refuerzos posteriores como se ha indicado anteriormente, en intervalos de 3 semanas, con adyuvante incompleto de Freund. Cuando el título del suero hubo aumentado más de 10 veces a partir de una muestra de suero preinmune, según lo determinado por ELISA, los 2 ratones con respuesta más alta recibieron cada uno un refuerzo por vía intravenosa con 10 µg de antígeno de proteína peptídica acoplada KLH, en 100 µl de PBS estéril a pH 7,4. Tres días después, se sacrificaron los ratones donantes, y se extrajeron y agruparon las células del bazo. Se realizó la fusión de los esplenocitos con células de mieloma parentales SP2/0 BALB/c como se ha descrito anteriormente (véase el Ejemplo 1 anterior), excepto que la selección en una sola etapa y la clonación de los hibridomas se realizó en medio Clone EZ. Este medio semisólido permite la selección y clonación de HAT en una sola etapa y elimina el crecimiento excesivo de clones deseables de crecimiento más lento mediante hibridomas de crecimiento más rápido, quizás hibridomas no deseados. Los clones se recogieron 11 días después de la fusión y se volvieron a suspender en pocillos de placas de cultivo tisular de 96 pocillos en: 200 µl de medio D-MEM (Invitogen) que contenía un suero bovino fetal al 20 %. Después de 4 días, se exploraron los sobrenadantes mediante ELISA indirecto para determinar la actividad del anticuerpo en placas recubiertas con 1 µg/pocillo de péptido acoplado a BSA.

Condiciones del ELISA:

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

Para ensayar el antígeno de control negativo: se recubrió la placa con 0,5 µg/pocillo de antígeno de HT (transferrina humana) en dH₂O a 50 µl/pocillo y se secó durante la noche a 37 °C.

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

1° anticuerpo: se añadió sobrenadante de cultivo tisular de hibridoma anti-DSE-2 de ratón y controles monoclonales de ratón añadidos a 100 µl puro por pocillo para la exploración, y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación.

2° anticuerpo usado para la exploración y el ensayo: se usó 1/10.000 de Fc de IgG anti-ratón de cabra conjugado con HRP diluido en PBS-Tween (pH 7,4), se añadieron a 100 µl/pocillo y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con agitación.

Sustrato: se añadió tampón TMB (n.º de cat. BioF_x TMBW-1000-01) a 50 µl por pocillo y se incubó a oscuras a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 50 µl de HCl 1 M por pocillo después de 15 minutos y se leyó a DO_{450 nm}.

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

25 TABLA 3: Exploración mediante ELISA de clones de hibridoma para anticuerpos dirigidos contra DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2)

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

El clon de hibridoma 3H1 (número de acceso 220207-02) se depositó con la Autoridad Depositaria Internacional de Canadá ubicada en Winnipeg, Canadá, el 22 de febrero de 2007.

Ejemplo 4

30 Anticuerpos policlonales DSE1 Generación y purificación de anticuerpos

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

Se sintetizó un péptido lineal con secuencia idéntica al antígeno en una resina TentaGel-SH [no escindible] (Advanced ChemTech). Esta resina se desprotegió y se empaquetó en columnas desechables (Evergreen Scientific, Los Angeles, CA) para la purificación de antisuero. El antisuero se purificó previamente por centrifugación (16.000 xg) y se diluyó a 1:10 en solución salina tamponada con tris (TBS) antes de la purificación. Se volvió a hacer circular el suero diluido sobre la columna de purificación de afinidad x 3 a un caudal de ~1 ml/min a temperatura ambiente para la unión. La columna unida a anticuerpo se lavó con un mínimo de 100 ml de TBS (~1 ml/min), hasta que el eluyente de lavado no tuvo proteína ($A_{280} = 0$). Las fracciones de anticuerpo se eluyeron con glicina 50 mM, pH 2,8 en 1/5 volumen de Tris 1,5 M enfriado con hielo, NaCl 150 mM, pH 8,0, se mezclaron y se colocaron inmediatamente en hielo. Estas las fracciones se centrifugaron a 16.000 xg, y se determinó la concentración del anticuerpo en el sobrenadante usando un $\epsilon_{280} = 220.000$ y un peso molecular IgG de 150.000 Da. La columna de purificación se regeneró mediante lavado en exceso con glicina 50 mM, pH 2,8, seguido de tratamiento con HCl de guisidina saturado, Tris 50 mM, pH 8,0. La columna se equilibró con TBS antes de la aplicación de antisuero. Solo se usó suero de la tercera hemorragia o posterior. En todos los casos, el anticuerpo se purificó inmediatamente antes de su uso y se almacenó con 2 mg/ml de BSA para estabilizar el anticuerpo.

SDS-PAGE y transferencia Western

La SDS-PAGE se realizó usando el sistema de tampón Tris-Glicina con geles de gradiente de acrilamida al 4-20 % previamente vertidos (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para geles parcialmente desnaturizantes, se hirvió SOD1 eritrocítica humana (Sigma) durante 15 minutos con betamercaptoetanol al 4 % (Aldrich) en tampón de carga de SDS o se mantuvo en hielo durante 15 minutos en tampón de carga de SDS. Se procesaron 1-5 μg de SOD1 en cada carril con resultados equivalentes. Para la transferencia Western, los geles se transfirieron a membrana de PVDF, se bloquearon durante la noche en leche con TBST al 5 % (solución salina tamponada con Tris, Tween-20 al 0,05 %). Se usaron 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (nota: hasta 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ como mínimo arrojaron resultados equivalentes) de anticuerpo SEDI SOD (anti-DSE1 policlonal) diluido en leche-TBST al 5 % como anticuerpo primario, y se usó una dilución a 1:5.000 de IgG-HRP anti-conejo (Stressgen, Victoria, Canadá) como el anticuerpo secundario. Las transferencias Western se desarrollaron usando ECL-Plus (Amersham, Buckinghamshire, RU) y se visualizaron en una película Kodak. Para los experimentos de competición de péptidos, el anticuerpo SEDI SOD diluido se preincubó con un exceso x500 (molar) de péptido lineal libre con la misma secuencia que el antígeno a 4 °C durante la noche o 1 hora a temperatura ambiente antes de su uso.

Resultados

Diseño y validación de anticuerpos

La investigación de la configuración proteica *in vivo* es un todo un desafío. Una posible estrategia es diseñar un anticuerpo que reconozca las configuraciones mal plegadas específicas, pero no la proteína nativa. Este enfoque basado en la hipótesis se ha aplicado previamente a otros trastornos neurodegenerativos que implican agregación de proteínas, pero estos diseños se han basado en información biofísica de baja resolución sobre la estructura de la proteína mal plegada. El enfoque de los inventores emplea el uso de datos detallados de la estructura cristalina de rayos X para diseñar un anticuerpo contra SOD1 mal plegada (6, 71). Se formuló la hipótesis de que un anticuerpo que reconoce un epítipo inaccesible en SOD1 dimérico nativo pero expuesto en agregados de SOD1 y productos intermedios de agregación, sería capaz de detectar selectivamente SOD1 mal plegada *in vivo*. El examen de la estructura de rayos X del dímero SOD1 nativo (código pdb: 1SPD) (72) muestra que los restos 145-151 (ACGVIGI) están secuestrados en la superficie de contacto del dímero SOD1, y son inaccesibles en SOD1 nativa. Se presume que un anticuerpo producido contra este epítipo reconoce formas mal plegadas de SOD1 en las que la superficie de contacto del dímero nativo se ve alterada y expuesta, tales como en monómeros y oligómeros no nativos. Por consiguiente, los inventores han denominado a esto el anticuerpo de la superficie de contacto del dímero SOD1 (anticuerpo SEDI, también denominado anticuerpo policlonal anti-DSE1). Los inventores sintetizaron un péptido antigénico múltiple en el que cada rama del dendrímero tenía la secuencia ggRLACGVIGIggk; la secuencia en mayúsculas es parte de la secuencia SOD1 (restos 143-151). Los restos 143 y 144 de SOD1 se añadieron al péptido antigénico para aumentar su solubilidad; los enlazadores Gly/Lys N-terminal y C-terminal se añadieron para contextualizar el epítipo en una secuencia interna, aumentar la solubilidad y aumentar el peso molecular para una inmunogenicidad potenciada. El antisuero de conejo producido a partir de la inmunización con este antígeno se purificó por afinidad usando un péptido lineal inmovilizado con una secuencia idéntica al antígeno. Se realizaron transferencias Western para examinar si el anticuerpo podía diferenciar entre SOD1 dimérica y SOD1 monomérica con el epítipo seleccionado expuesto. La SOD1 nativa es lo suficientemente estable para que, en condiciones reductoras, SOD1 se procese principalmente como un dímero en SDS-PAGE. Cuando se reduce en condiciones de desnaturización, se procesa predominantemente como el monómero, pero con algún dímero aún detectable. En estos geles, el anticuerpo SEDI reacciona solo con SOD1 monomérica, y no con SOD1 dimérica nativa. Este anticuerpo reaccionará así con los confórmers de SOD1 en los que el epítipo seleccionado está expuesto, pero no con SOD1 nativa. Esto contrasta con los anticuerpos SOD1 disponibles en el mercado, que detectan SOD1 nativa y mal plegada indiscriminadamente. La competencia con el péptido antigénico confirmó la especificidad del anticuerpo. El anticuerpo SEDI satisface los criterios de diseño y proporciona un inol selectivamente presentado o accesible para probar las hipótesis *in vivo*.

Ejemplo 5

Generación de anticuerpos monoclonales DSE1

5 Generación de anticuerpos monoclonales de ratón: se inmunizaron inicialmente 4 ratones hembra BALB/c mediante inyecciones intraperitoneales con 25 µg de antígeno de proteína por ratón en adyuvante completo de Freund. Se administraron cuatro refuerzos posteriores como se ha indicado anteriormente, en intervalos de 3 semanas, con adyuvante incompleto de Freund. Cuando el título del suero hubo aumentado más de 10 veces a partir de una muestra de suero preinmune, según lo determinado por ELISA, los 2 ratones con respuesta más alta recibieron cada uno un refuerzo por vía intravenosa con 10 µg de antígeno de proteína, en 100 µl de PBS estéril a pH 7,4. Tres días después, se sacrifican los ratones donantes, y se extraen y agrupan las células del bazo. La fusión de los esplenocitos con células de mieloma parentales SP2/0 BALB/c se realiza como se ha descrito previamente en el Ejemplo 1 anterior, excepto que la selección en una sola etapa y la clonación de los hibridomas se realiza en medio Clone EZ. Este medio semisólido permite la selección y clonación de HAT en una sola etapa y elimina el crecimiento excesivo de clones deseables de crecimiento más lento mediante hibridomas de crecimiento más rápido, quizás hibridomas no deseados. Los clones se recogen 11 días después de la fusión y se vuelven a suspender en pocillos de placas de cultivo tisular de 96 pocillos en: 200 µl de medio D-MEM (Invitogen) que contenía un suero bovino fetal al 20 %. Después de 4 días, se exploran los sobrenadantes mediante ELISA indirecto para determinar la actividad del anticuerpo en placas recubiertas con 1 µg/pocillo de antígeno de proteína.

Condiciones del ELISA:

25 *Para la exploración y el ensayo:* se recubre con el antígeno DSE-1-BSA la placa en dH₂O a 1 g/pocillo y se seca durante la noche a 37 °C.

30 *Para ensayar el antígeno de control negativo:* se recubre la placa con 0,5 µg/pocillo de antígeno de HT (transferrina humana) en dH₂O a 50 µl/pocillo y se seca durante la noche a 37 °C.

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

35 *1º anticuerpo:* se añade sobrenadante de cultivo tisular de hibridoma anti-DSE-1 de ratón y controles monoclonales de ratón a 100 µl puro por pocillo para la exploración, Se añaden el suero inmune anti-DSE-1a de ratón y el suero preinmune de ratón diluido 1/800 en sobrenadante de cultivo tisular SP2/0 a 100 µl/pocillo y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación.

2º anticuerpo usado para la exploración y el ensayo: Se usa Fc de IgG de cabra anti-ratón a 1/10.000 conjugado con HRP. Se diluye anticuerpo secundario en PBS-Tween (pH 7,4), se añade a 100 µl/pocillo y se incuba durante 1 hora a 37 °C con agitación.

Sustrato: se añade tampón TMB (n.º de cat. BioF_x TMBW-1000-01) a 50 µl por pocillo y se incuba a oscuras a temperatura ambiente. La reacción se detiene con 50 µl de HCl 1 M por pocillo después de 15 minutos y se lee a DO_{450 nm}.

Ejemplo 6

Producción de anticuerpos DSE1a

45 El péptido aislado correspondiente al epítipo DSE1a (GGRLAC*GVIGIGSG) se conjugó con KLH para la inmunización de ratones BALB/c, y con BSA para el examen ELISA.

50 Generación de anticuerpos monoclonales de ratón: se inmunizaron inicialmente 4 ratones hembra BALB/c mediante inyecciones intraperitoneales con 25 µg de antígeno de proteína por ratón en adyuvante completo de Freund. Se administraron cuatro refuerzos posteriores como se ha indicado anteriormente, en intervalos de 3 semanas, con adyuvante incompleto de Freund. Cuando el título del suero hubo aumentado más de 10 veces a partir de una muestra de suero preinmune, según lo determinado por ELISA, los 2 ratones con respuesta más alta recibieron cada uno un refuerzo por vía intravenosa con 10 µg de antígeno proteico, en 100 µl de PBS estéril a pH 7,4. Tres días después, se sacrificaron los ratones donantes, y se extrajeron y agruparon las células del bazo. Se realizó la fusión de los esplenocitos con células de mieloma parentales SP2/0 BALB/c como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1 anterior, excepto que la selección en una sola etapa y la clonación de los hibridomas se realizó en medio Clone EZ. Este medio semisólido permite la selección y clonación de HAT en una sola etapa y elimina el crecimiento excesivo de clones deseables de crecimiento más lento mediante hibridomas de crecimiento más rápido, quizás hibridomas no deseados. Los clones se recogieron 11 días después de la fusión y se volvieron a suspender en pocillos de placas de cultivo tisular de 96 pocillos en: 200 µl de medio D-MEM (Invitrogen) que contenía un suero bovino fetal al 20 %. Después de 4 días, se exploraron los sobrenadantes mediante ELISA indirecto para determinar la actividad del anticuerpo en placas recubiertas con 1 µg/pocillo de antígeno de proteína.

Condiciones del ELISA:

65 *Para la exploración y el ensayo:* se recubrió con el antígeno DSE-1a-BSA la placa en dH₂O a 1 g/pocillo y se secó durante la noche a 37 °C.

Para ensayar el antígeno de control negativo: se recubrió la placa con 05 µg/pocillo de antígeno de HT (transferrina humana) en dH²O a 50 µl/pocillo y se seca durante la noche a 37 °C.

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

1° anticuerpo: se añade sobrenadante de cultivo tisular de hibridoma anti-DSE-1a de ratón y controles monoclonales de ratón a 100 µl puro por pocillo para la exploración. Se añadieron el suero inmune anti-DSE-1a de ratón y el suero preinmune de ratón diluido 1/800 en sobrenadante de cultivo tisular SP2/0 a 100 µl/pocillo y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación.

2° anticuerpo usado para la exploración y el ensayo: Se usó Fc de IgG de cabra anti-ratón a 1/10.000 conjugado con HRP. Se diluyó anticuerpo secundario en PBS-Tween (pH 7,4), se añade a 100 µl/pocillo y se incubaba durante 1 hora a 37 °C con agitación.

Sustrato: se añadió tampón TMB (n.º de cat. BioF_x TMBW-1000-01) a 50 µl por pocillo y se incubaba a oscuras a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 50 µl de HCl 1 M por pocillo después de 15 minutos y se leyó a DO_{450 nm}.

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

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

Clon	Exp n.º 1 Antígeno DSE-1a-BsA	Exp n.º 2 Antígeno DSE-1a-BsA	Antígeno HT	Isotipo
3C1	0,484	0,265	0,105	IgG
3C11	0,702	0,186	0,093	IgG
3D2	1,542	1,035	0,058	IgG
3F1	3,072	2,143	0,080	IgG
4B5	0,506	0,238	0,065	IgG
4H6	1,244	0,957	0,085	IgG
5F6	0,862	0,663	0,089	IgG
6D8	2,690	2,186	0,089	IgG
9A4	2,538	2,313	0,071	IgG
9A8	1,489	0,884	0,100	IgG
10C3	2,446	2,200	0,067	IgG
10C12	2,867	2,016	0,089	IgG

El clon de hibridoma 6D8 (número de acceso 220207-01) se depositó con la Autoridad de Depósito Internacional de Canadá ubicada en Winnipeg, Canadá, el 22 de febrero de 2007.

Se generan anticuerpos contra DSE 4, 6 y 7 usando técnicas similares.

Ejemplo 7

Los anticuerpos dirigidos contra DSE1a no reconocen al péptido DSE1.

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

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

Cuando se inmunizaron ratones con el péptido DSE1, se formaron principalmente anticuerpos de isotipo IgM. Un anticuerpo IgM probablemente tiene una afinidad menor por el epítipo que los anticuerpos DSE1a generados como

se ha indicado anteriormente, que son del isotipo IgG. La modificación de DSE1 para que comprenda una cisteína oxidada dio lugar a la producción de anticuerpos con avidez operativamente superior.

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

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

Ejemplo 8

Producción de anticuerpos DSE5

10 Generación de anticuerpos monoclonales de ratón: 4 ratones hembra BALB/c se inmunizaron inicialmente mediante inyecciones intraperitoneales con 25 µg de inmunógeno que comprende el péptido (IKGLTEGLHGF) correspondiente a DSE5 acoplado a KLH mediante formación de disulfuro con una cisteína que se añadió al N por ratón en adyuvante completo de Freund. Se administraron cuatro refuerzos posteriores como se ha indicado
 15 anteriormente, en intervalos de 3 semanas, con adyuvante incompleto de Freund. Cuando el título del suero hubo aumentado más de 10 veces a partir de una muestra de suero preinmune, según lo determinado por ELISA, los dos ratones con respuesta más alta recibieron cada uno un refuerzo por vía intravenosa con 10 µg de antígeno proteico,

en 100 µl de PBS estéril a pH 7,4. Tres días después, se sacrificaron los ratones donantes, y se extrajeron y agruparon las células del bazo. Se realizó la fusión de los esplenocitos con células de mieloma parentales SP2/0 BALB/c como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1 anterior, excepto que la selección en una sola etapa y la clonación de los hibridomas se realizó en medio Clone EZ. Este medio semisólido permite la selección y clonación de HAT en una sola etapa y elimina el crecimiento excesivo de clones deseables de crecimiento más lento mediante hibridomas de crecimiento más rápido, quizás hibridomas no deseados. Los clones se recogieron 11 días después de la fusión y se volvieron a suspender en pocillos de placas de cultivo tisular de 96 pocillos en: 200 µl de medio D-MEM (Invitrogen) que contenía un suero bovino fetal al 20 %. Después de 4 días, se exploraron los sobrenadantes mediante ELISA indirecto para determinar la actividad del anticuerpo en placas recubiertas con 1 µg/pocillo de antígeno de proteína.

Condiciones del ELISA:

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

Para ensayar el antígeno de control negativo: se recubrió la placa con 0,5 µg/pocillo de antígeno de HT (transferrina humana) en dH₂O a 50 µl/pocillo y se secó durante la noche a 37 °C.

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

1ª anticuerpo: se añadieron sobrenadante de cultivo tisular de hibridoma anti-DSE5 de ratón y controles monoclonales de ratón a 100 µl puro por pocillo para la exploración, Se añadieron el suero inmune anti-DSE-5 de ratón y el suero preinmune de ratón diluido 1/800 en sobrenadante de cultivo tisular SP2/0 a 100 µl/pocillo y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación.

2º anticuerpo usado para la exploración y el ensayo: Se usó Fc de IgG de cabra anti-ratón a 1/10.000 conjugado con HRP. Se diluyó anticuerpo secundario en PBS-Tween (pH 7,4), se añade a 100 µl/pocillo y se incubaba durante 1 hora a 37 °C con agitación.

Sustrato: se añadió tampón TMB (n.º de cat. BioF_x TMBW-1000-01) a 50 µl por pocillo y se incubó a oscuras a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 50 µl de HCl 1 M por pocillo después de 15 minutos y se leyó a DO_{450 nm}.

La Tabla 6 muestra el examen de ELISA de clones de hibridoma para anticuerpos dirigidos contra el epítipo específico de la enfermedad (IKGLTEGLHGF). Los anticuerpos generados por varios de los clones de hibridoma eran altamente específicos del péptido correspondiente al epítipo y no reconocieron detectablemente el antígeno de control HT (transferrina humana). Estos resultados muestran que los anticuerpos monoclonales se pueden producir contra péptidos que corresponden a epítipos identificados como presentados selectivamente o accesibles en formas mal plegadas de SOD1.

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

Clon	Exp. n.º 1 Antígeno DSE-5-BSA	Exp. n.º 2 Antígeno DSE-5-BSA	Antígeno HT	Isotipo
5C6	2,779	1,787	0,079	IgG

El clon de hibridoma 5C6 (número de acceso 280207-01) se depositó con la Autoridad Depositaria Internacional de Canadá ubicada en Winnipeg, Canadá, el 28 de febrero de 2007.

Ejemplo 9

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

Se conjuga un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 con KLH para la inmunización de ratones BALB/c a fin de generar linfocitos B reactivos con el epítipo. El epítipo para la inmunización se selecciona del grupo de péptidos que consiste en: GGGRLACGVIGIGSG (DSE1); GGGRLAC*GVIGIGSG (DSE1a); CDLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2); CNPLSRKHGGPKDEE (DSE3); CIKGLTEGLHGF (DSE5); GSGKAVCVLK (DSE4); y CGLHGFHVH (DSE7). Como alternativa, se conjuga una parte de cualquiera de los péptidos mencionados anteriormente que comprende uno o más determinantes antigénicos con KLH, que comprende mínimamente de 3 o 5 aminoácidos contiguos de cualquiera de la secuencia peptídica que es inmunogénica sola o cuando se acopla a KLH.

Generación de anticuerpos monoclonales de ratón: se inmunizan inicialmente 4 ratones hembra BALB/c mediante inyecciones intraperitoneales con 25 µg de antígeno de proteína por ratón en adyuvante completo de Freund. Se administran cuatro refuerzos posteriores como se ha indicado anteriormente, en intervalos de 3 semanas, con adyuvante incompleto de Freund. Cuando el título del suero hubo aumentado más de 10 veces a partir de una muestra de suero preinmune, según lo determinado por ELISA, los dos ratones con respuesta más alta recibieron

5 cada uno un refuerzo por vía intravenosa con 10 µg de antígeno proteico, en 100 µl de PBS estéril a pH 7,4. Tres días después, se sacrifican los ratones donantes, y se extraen y agrupan las células del bazo. Se realiza la fusión de los esplenocitos con células de mieloma parentales SP2/0 BALB/c como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1 anterior, a excepción de que la selección en una sola etapa y la clonación de los hibridomas se realiza en medio Clon EZ. Este medio semisólido permite la selección y clonación de HAT en una sola etapa y elimina el crecimiento excesivo de clones deseables de crecimiento más lento mediante hibridomas de crecimiento más rápido, quizás hibridomas no deseados. Los clones se recogen 11 días después de la fusión y se vuelven a suspender en pocillos de placas de cultivo tisular de 96 pocillos en: 200 µl de medio D-MEM (Invitogen) que contenía un suero bovino fetal al 20 %. Después de 4 días, se exploran los sobrenadantes mediante ELISA indirecto para determinar la actividad del anticuerpo en placas recubiertas con 1 µg/pocillo de antígeno de proteína.

Condiciones del ELISA:

15 *Para la exploración y el ensayo:* se recubre con el antígeno DSE-BSA la placa en dH₂O a 1 g/pocillo y se secó durante la noche a 37 °C.

Para ensayar el antígeno de control negativo: se recubre la placa con 0,5 µg/pocillo de antígeno de HT (transferrina humana) en dH₂O a 50 µl/pocillo y se seca durante la noche a 37 °C.

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

20 *1º anticuerpo:* se añade sobrenadante de cultivo tisular de hibridoma anti-DSE de ratón y controles monoclonales de ratón a 100 µl puro por pocillo para la exploración, Se añaden el suero inmune anti-DSE-1a de ratón y el suero preinmune de ratón diluido 1/800 en sobrenadante de cultivo tisular SP2/0 a 100 µl/pocillo y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación.

25 *2º anticuerpo usado para la exploración y el ensayo:* Se usa Fc de IgG de cabra anti-ratón a 1/10.000 conjugado con HRP. Se diluye anticuerpo secundario en PBS-Tween (pH 7,4), se añade a 100 µl/pocillo y se incuba durante 1 hora a 37 °C con agitación.

30 *Sustrato:* se añade tampón TMB (n.º de cat. BioF_x TMBW-1000-01) a 50 µl por pocillo y se incuba a oscuras a temperatura ambiente. La reacción se detiene con 50 µl de HCl 1 M por pocillo después de 15 minutos y se leyó a DO_{450 nm}.

Ejemplo 10

35 Ensayo de ELISA de anticuerpo dirigidos contra DSE1a por afinidad a SOD1 desnaturalizada

Se exploraron clones de hibridoma productores de anticuerpos dirigidos contra DSE1a (GGGRLAC*GVIGIGSG) por ELISA para determinar la reactividad específica a SOD1 plegada de forma nativa (SOD1 en PBS) desnaturalizada o SOD1 mal plegada (SOD1 en tampón de desnaturalización con HCl de Gdn 6 M) o control de BSA plegada de forma nativa y mal plegada.

40 La Tabla 7 muestra la afinidad de los clones de hibridoma por SOD1 plegada de manera nativa y mal plegada. Se detectó la absorbancia de cada muestra a 450 nm (columnas 2-5). Se ensayó cada muestra por duplicado. Los valores de las columnas 6-9 proporcionan los valores medios de la afinidad de cada clon y el % de diferencia entre las dos muestras. La columna 10 representa la afinidad específica del anticuerpo hacia la SOD1 plegada de forma nativa (es decir, la afinidad del anticuerpo por SOD1 menos la unión no específica a la proteína irrelevante BSA). La columna 11 representa la afinidad específica del anticuerpo por la SOD1 no plegada (es decir, la afinidad del anticuerpo por SOD1 menos la unión inespecífica para BSA). La columna 12 proporciona el aumento de la afinidad específica por SOD1 mal plegada frente a la SOD1 plegada de forma nativa. Estos resultados demuestran la afinidad específica de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el epítipo DSE1a por SOD1 y que los anticuerpos se dirigen preferentemente a formas mal plegadas diana de SOD1 con una afinidad de 2 a 4 veces mayor que para la forma plegada de forma nativa.

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

55 TABLA 7: Ensayo de ELISA de clones de hibridoma de DSE1a hacia SOD1 desnaturalizada

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Clon	SOD1 PBS	HCl de Gdn	BSA PBS	HCl de Gdn	SOD1 PBS	HCl de Gdn	BSA PBS	HCl de Gdn	S-N (F)	S-N (U)	U/F
3C1	0,423 0,410	0,712 0,612	0,144 0,145	0,170 0,185	0,417 2 %	0,662 11 %	0,145 0 %	0,178 6 %	0,256	0,501	1,961
3C11	0,352 0,357	0,693 0,642	0,153 0,155	0,155 0,144	0,355 1 %	0,668 5 %	0,154 1 %	0,150 5 %	0,203	0,516	2,544

ES 2 680 020 T3

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

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

Ejemplo 11

Ensayo de ELISA de anticuerpo dirigidos contra DSE2 por afinidad a SOD1 desnaturalizada

5 Se exploraron clones de hibridoma productores de anticuerpos dirigidos contra DSE2 (DLGKGGNEESTKTGNAGS) por ELISA para determinar la reactividad específica a SOD1 plegada de forma nativa (SOD1 en PBS) desnaturalizada o SOD1 mal plegada (SOD1 en tampón de desnaturalización con HCl de Gdn 6 M) o control de BSA plegada de forma nativa y mal plegada.

10 La Tabla 8 muestra la afinidad de los clones de hibridoma por SOD1 plegada de manera nativa y no plegada. Se detectó la absorbancia de cada muestra a 450 nm (columnas 2-5). Se ensayó cada muestra por duplicado. Los valores de las columnas 6-9 proporcionan los valores medios de la afinidad de cada clon y el % de diferencia entre las dos muestras. La columna 10 representa la afinidad específica del anticuerpo hacia la SOD1 plegada de forma nativa (es decir, la afinidad del anticuerpo por SOD1 menos la unión a BSA). La columna 11 representa la afinidad específica del anticuerpo por la SOD1 mal plegada (es decir, la afinidad del anticuerpo por SOD1 menos la unión inespecífica a BSA). La columna 12 proporciona el aumento de la afinidad específica por SOD1 mal plegada frente a la SOD1 plegada de forma nativa. Estos resultados demuestran la afinidad específica de los anticuerpos

ES 2 680 020 T3

monoclonales dirigidos contra el epítipo DSE2 por SOD1 y que los anticuerpos se dirigen preferentemente a formas no plegadas diana de SOD1.

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

5

TTABLA 8: Ensayo de ELISA de clones de hibridoma de DSE2 hacia SOD1 desnaturalizada

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
	SOD1 PBS	HCl Gdn	de	BSA PBS	HCl Gdn	de	SOD1 PBS	HCl Gdn	de	BSA PBS	HCl Gdn	de	S-N (F)	S-N (U)	U/F
2A9	0,321 0,31	0,593 0,584		0,125 0,107	0,137 0,145		0,316 2 %	0,589 1 %		0,116 11 %	0,141 4 %		0,187	0,460	2,460
2A11	0,345 0,348	0,71 0,727		0,119 0,108	0,124 0,156		0,347 1 %	0,719 2 %		0,114 7 %	0,140 16 %		0,220	0,592	2,693
3H1	0,257 0,563	2,189 2,101		0,161 0,15	0,165 0,162		0,410 53 %	2,145 3 %		0,156 5 %	0,164 1 %		0,251	1,986	7,926
5G5	0,308 0,306	1,032 0,725		0,22 0,122	0,145 0,152		0,307 0 %	0,879 25 %		0,171 41 %	0,149 3 %		0,147	0,719	4,881
5G12	0,346 0,272	0,604 0,562		0,124 0,145	0,131 0,113		0,309 17 %	0,583 5 %		0,135 11 %	0,122 10 %		0,181	0,455	2,516
6C3	0,325 0,309	0,67 0,676		0,129 0,122	0,126 0,145		0,317 4 %	0,673 1 %		0,126 4 %	0,136 10 %		0,187	0,543	2,909
6G12	0,29 0,295	0,414 0,701		0,125 0,099	0,114 0,107		0,293 1 %	0,558 36 %		0,112 16 %	0,111 4 %		0,181	0,446	2,462
7E10	0,34 0,321	0,787 0,735		0,199 0,142	0,179 0,137		0,331 4 %	0,761 5 %		0,171 24 %	0,158 19 %		0,166	0,597	3,589
7F8	0,366 0,288	0,605 0,619		0,131 0,138	0,121 0,121		0,327 17 %	0,612 2 %		0,135 4 %	0,121 0 %		0,199	0,484	2,430
8C9	0,354 0,339	0,701 0,724		0,131 0,113	0,132 0,138		0,347 3 %	0,713 2 %		0,122 10 %	0,135 3 %		0,218	0,584	2,679
8D1	0,516 0,413	1,626 1,909		0,185 0,161	0,167 0,192		0,465 16 %	1,768 11 %		0,173 10 %	0,180 10 %		0,288	1,591	5,520
10F2	0,263 0,563	0,632 0,689		0,119 0,116	0,172 0,175		0,413 51 %	0,661 6 %		0,118 2 %	0,174 1 %		0,268	0,515	1,925
Bkg	0,112 0,132	0,142 0,144		0,117 0,118	0,151 0,143		0,122 12 %	0,143 1 %		0,118 1 %	0,147 4 %				

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

Ejemplo 12

Ensayo de ELISA de anticuerpo dirigidos contra DSE5 por afinidad a SOD1 desnaturalizada

5 Se exploraron clones de hibridoma productores de anticuerpos dirigidos contra DSE5 (IKGLTEGLHGF) por ELISA para determinar la reactividad específica a SOD1 plegada de forma nativa (SOD1 en PBS) desnaturalizada o SOD1 mal plegada (SOD1 en tampón de desnaturalización con HCl de Gdn) o control de BSA plegada de forma nativa y mal plegada.

10 La Tabla 9 muestra la afinidad de los clones de hibridoma por SOD1 plegada de manera nativa y mal plegada. Se detectó la absorbancia de cada muestra a 450 nm (columnas 2-5). Se ensayó cada muestra por duplicado. Los valores de las columnas 6-9 proporcionan los valores medios de la afinidad de cada clon y el % de diferencia entre las dos muestras. La columna 10 representa la afinidad específica del anticuerpo hacia la SOD1 plegada de forma nativa (es decir, la afinidad del anticuerpo por SOD1 menos la afinidad inespecífica hacia BSA). La columna 11 representa la afinidad específica del anticuerpo por la SOD1 mal plegada (es decir, la afinidad del anticuerpo por SOD1 menos la afinidad inespecífica hacia BSA). Y la columna 12 proporciona el aumento de la afinidad específica por SOD1 no plegada frente a la SOD1 plegada de forma nativa. Estos resultados demuestran la afinidad específica de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el epítipo DSE5 por SOD1 y que los anticuerpos se dirigen preferentemente a formas mal plegadas diana de SOD1.

20 TABLA 9: Ensayo de ELISA de clon de hibridoma hacia SOD1 desnaturalizada

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

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

Ejemplo 13

Reconocimiento de SOD1 oxidada por anticuerpos dirigidos contra DSE2

25 El daño oxidativo de las enzimas se produce en enfermedades neurodegenerativas, y el daño oxidativo a SOD1 da lugar a un mal plegamiento y a la formación de SOD1 agregada. Los inventores demostraron que los anticuerpos dirigidos contra el epítipo DSE2 (clones de hibridoma 10E11C11 y 3H1) reconocen dicha SOD1 modificada oxidativamente incubando SOD1 purificada con H₂O₂ 100 um a 10 mM o con una mezcla de ascorbato y cloruro de cobre. Ambos tratamientos son conocidos por oxidar aminoácidos en SOD1. Posteriormente, Los presentes inventores dejaron que la SOD1 oxidada se uniera a los pocillos de la placa de microtitulación y se añadió uno de los dos anticuerpos anti-DSE2 diferentes. A efectos de comparación, se recubrieron los pocillos de microtitulación con SOD1 no tratada y plegada de manera normal en tampón, o con SOD1 que se desnaturalizó con una solución de un agente caotrópico (cloruro de guanidinio, HCl de Gdn). Como se muestra en la Figura 2, los anticuerpos anti-DSE2 se unen preferentemente a SOD1 mal plegada en HCl de Gdn, pero mucho menos bien a la SOD1 plegada de forma nativa en tampón. Sin embargo, tras la oxidación, SOD1 es reconocida de forma eficaz por los anticuerpos anti-DSE2. Esto demuestra que los anticuerpos anti-DSE2 (tanto 10E11C11 como 3H1) reconocen el tipo de SOD1 modificada oxidativamente que se produce en pacientes con enfermedades neurodegenerativas. Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 10.

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

Tratamiento	Clones			Tratamiento	Clones		
	PBST	10E11C11	3H1		PBST	10E11C11	3H1
SOD-PBS	0,088	0,357	0,34	SOD-Gnd	0,118	1,243	2,29
	0,094	0,362	0,335		0,092	1,254	2,295
	0,082	0,389			0,086	1,225	
Promedio	0,088	0,369333333	0,3375	Promedio	0,098666667	1,240666 667	2,2925
Desv. típica rel.	6,82 %	4,66 %	1,05 %	Desv. típica rel.	17,24 %	1,18 %	0,15 %

	PBST	10E11C11	3H1		PBST	10E11C11	3H1
CuCl 6 h	0,082	1,044	1,379	CuCl 3 h	0,087	1,061	1,717
	0,093	0,987	1,489		0,101	1,06	1,621
	0,089	1,042			0,088	1,076	
Promedio	0,088	1,024333333	1,434	Promedio	0,092	1,065666667	1,669
Desv. típica rel.	6,33%,	3,16%,	5,42%,	Desv. típica rel.	8,49%,	0,84%,	4,07%,

	PBST	10E11C11	3H1		PBST	10E11C11	3H1
CuCl 1 h	0,075	1,023	1,592	CuCl 0 h	0,073	0,67	0,527
	0,083	1,035	1,435		0,087	0,669	0,59
	0,072	1,026			0,071	0,664	
Promedio	0,076666667	1,028	1,5135	Promedio	0,077	0,667666667	0,5585
Desv. típica rel.	7,42 %,	0,61 %,	7,34 %,	Desv. típica rel.	11,32 %,	0,48 %,	7,98 %,

	PBST	10E11C11	3H1		PBST	10E11C11	3H1
BSA-PBS	0,073	0,12	0,078	H ₂ O ₂ 100 uM	0,071	0,489	0,436
	0,083	0,098	0,076		0,086	0,476	0,425
	0,073	0,091			0,107	0,453	
Promedio	0,076333333	0,103	0,077	Promedio	0,088	0,472666667	0,4305

	PBST	10E11C11	3H1		PBST	10E11C11	3H1
H ₂ O ₂ 1 mM	0,074	0,776	0,744	H ₂ O ₂ 10 mM	0,078	0,836	0,763
	0,081	0,752	0,717		0,092	0,84	0,726
	0,074	0,781			0,083	0,878	
Promedio	0,076333333	0,769666667	0,7305	Promedio	0,084333333	0,851333333	0,7445
Desv. típica rel.	5,29 %,	2,01 %,	2,61 %,	Desv. típica rel.	8,41 %,	2,72 %,	3,51 %,

Ejemplo 14

5 Predicción, síntesis y perfeccionamiento de epítomos específicos de la ELA

Los epítomos presentados por SOD1 mal plegada y no presentados por SOD1 nativa se pueden determinar analizando la estructura de SOD1 nativa para regiones de secuencia que están ocultas por la configuración nativa plegada de manera normal de SOD1. Por ejemplo, los bucles DSE2 y DSE3 son inaccesibles para la unión de anticuerpos en la estructura nativa de SOD1, pero se demostró que se extruían desde el sitio activo de SOD1 en fibrillas de amiloide y estructuras de nanotubos (84). Por lo tanto, la exposición de estos bucles puede ser un marcador de mal plegamiento de SOD1, pero también pueden constituir "dominios de reclutamiento" de SOD1 que están implicados en el mal plegamiento de SOD1 dirigido por molde. Los inventores identificaron DSE1, DSE4 y DSE7 como secuencias supuestamente ocultas que podrían ser accesibles tras un mal plegamiento de SOD1.

Los epítomos presentados por SOD1 mal plegada y no presentados por SOD1 nativa pueden predecirse mediante el análisis de regiones de secuencias que tienen una estructura restringida. Las estructuras restringidas son menos capaces de acomodar cualquier cambio en el plegamiento, dando lugar a cambios de configuración en la región de la secuencia y la presentación de epítomos accesibles que no están presentes en la estructura contraída. Los epítomos DSE2, 3, 5 y 6 se predijeron basándose en esto.

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

- 25 RLACGVIGI (DSE1);
- DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2);
- NPLSRKHGGPKDEE (DSE 3);

IKGLTEGLHGF (DSE5);
 HCIIGRTLTVH (DSE6);
 GSGKAVCVLK (DSE4); y
 CGLHGFHVH (DSE7).

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

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

15 Los epítipos identificados pueden tener múltiples determinantes antigénicos. Los epítipos se analizan además para determinar las subpartes de los péptidos (por ejemplo, epítipos diferenciados) que son inmunogénicas. El análisis de inmunogenicidad de SOD1 que incluye la representación de la antigenicidad se usa para identificar epítipos diferenciados, se sintetizan péptidos aislados correspondientes a estos epítipos diferenciados, y se usa un inmunógeno que comprende el péptido aislado correspondiente a uno o más de estos epítipos diferenciados para generar anticuerpos. Los anticuerpos se generan y ensayan como se describe en otros ejemplos.

20 Se proporciona un ejemplo de un gráfico de antigenicidad en la Figura 3. La secuencia de aminoácidos de SOD1 se sometió al método informatizado de Hopps y Woods disponible públicamente para predecir las ubicaciones de determinantes antigénicos de proteínas (Figura 3A). Además, se sometió la secuencia SOD1 al método de Kolaskar y Tongaonkar (85) de predicción de determinación antigénica (Figura 3B). Este último método identificó los aminoácidos 4-11 (AVCVLKGD), los aminoácidos 27-33 (GPVKVWG), los aminoácidos 42-48 (LHGFHVH), los aminoácidos 93-121 GVADVSIEDSVISLSGDHCIIIGRTLTVHE y los aminoácidos 142 -149 (SRLACGVI) de SOD1 (SEQ ID NO: 17) como antigénicos.

25 Se realizan modificaciones adicionales a las secuencias de péptidos aisladas correspondientes a los epítipos desvelados o a los epítipos diferenciados identificados para potenciar la inmunogenicidad. Por ejemplo, un resto de cisteína dentro del péptido aislado se puede oxidar a ácido cisteico. Un ejemplo es DSE1a, en el que la cisteína presente en DSE1 se reemplaza por cisteína oxidada en forma de ácido cisteico y se usa para generar anticuerpos.

30 Ejemplo 15

Epítipos análogos

35 Los péptidos epítípicos análogos se sintetizan incorporando uno o más aminoácidos oxidados o nitrados según la siguiente lista. El resto de cisteína (C) de DSE1 se oxida a ácido cisteín-sulfínico o ácido cisteico (es decir, DSE1a). El resto de lisina (K) de DSE2 se oxida a un grupo carbonilo. Uno o más de los restos de arginina (R), lisina (K) e histidina (H) de DSE3 se oxidan para formar un grupo carbonilo. En DSE4, la lisina (K) se oxida a un grupo carbonilo y/o la cisteína (C) se oxida a ácido cisteín-sulfínico o ácido cisteico. En DSE5, uno o más de K y H, se oxidan a un grupo carbonilo y/o la fenilalanina se nitra a nitrotriptófano. En DSE6, uno o más de H o R se oxida a un grupo carbonilo y/o C se oxida a ácido cisteín-sulfínico o ácido cisteico. En DSE7, H se oxida a un grupo carbonilo y/o F se nitra a nitrotriptófano.

40 DSE1: 145-151, RLACGVIGI: C
 DSE2: 125-142, DLGKGGNEESTKTGNAGS: K
 DSE3: 65-78, NPLSRKHGGPKDEE: R, K, H
 DSE4: 3-9, KAVCVLK: K, C
 DSE5: 35-45, IKGLTEGLHGF: K, H, F
 DSE6: 110-120, HCIIGRTLTVH: H, C, R
 DSE7: 41-48, GLHGFHVH: H, F
 C: cisteína, se oxida a ácido cisteína-sulfínico, y luego se oxida más a ácido cisteico.
 H, R, K: formación de carbonilo
 M: oxidación, metionulfóxido
 F: nitración, nitrotriptófano.

45 Los análogos de péptidos sintetizados se usan como inmunógenos para producir anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales y para tratar individuos que tengan una enfermedad mediada por SOD-1 mal plegada tal como ELA, EA y EP. Los anticuerpos se exploran frente al análogo de péptido de inmunización para la especificidad. Los clones positivos se ensayan además para determinar su capacidad para reconocer SOD1 mal plegada. Los anticuerpos que reconocen específicamente SOD1 se humanizan y se usan para tratar individuos que tengan una enfermedad mediada por SOD-1 mal plegada, tal como ELA, EA y EP.

Ejemplo 16

Inmunoprecipitación del tejido cerebral

5 Se obtiene tejido cerebral de pacientes diagnosticados con enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o ELA, y controles emparejados. Las muestras se congelan inmediatamente en hielo seco y se pesan. El tejido congelado se corta en trozos más pequeños y se homogeneiza (10 % p/v) en tampón de lisis (NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, Tris 10 mM, desoxicolato al 0,5%, NP-40 al 0,5 %, pH 7,4) y 1 x solución de inhibidor de proteasa completo exento de EDTA de Roche (Roche) con un homogenizador de mano de mortero de microgránulos. Se centrifuga esta fracción homogenizada a 2000 xg; el sobrenadante se denomina "fracción soluble" y la fracción de microgránulos se denomina "fracción insoluble". Se forman alícuotas de las fracciones homogenizadas tisulares inmediatamente y se congelan a -80 °C antes de su uso. Para experimentos con la fracción insoluble, se vuelven a suspender los microgránulos en tampón de lisis. La concentración de proteína se determina usando el ensayo de proteína BCA (Pierce). Se inmunoprecipitan 100 µg de proteína diluida a 1 ml con PBS que contiene 1 x inhibidores de proteasa con 5-10 µg de un anticuerpo monoclonal que se une a epítopos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 acopladas a perlas magnéticas Dynabeads M-280 activadas con tosilo (DynaL Biotech, Oslo, Noruega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

20 Los anticuerpos que se unen a epítopos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 incluyen SEDI SOD (anti-DSE1) desvelado en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 60/741.462. Este anticuerpo es específico del epítipo que comprende la secuencia RLACGVIGI.

25 En resumen, se dializan 100 µg de SEDI SOD IgG frente a 3 cambios de PBS. Esto se incuba con 300 µl de perlas magnéticas de reserva previamente lavadas en PBS a 4 °C durante un mínimo de 96 horas. A esto, le sigue el bloqueo con BSA al 0,1 % en Tris 0,2 M, pH 8,5 durante 24 horas a 4 °C. En un protocolo alternativo, se usan las perlas de Protein G Sepharose (Sigma) para precipitar SEDI SOD IgG.

30 En un protocolo alternativo, se usan otros anticuerpos que se unen a epítopos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 en los experimentos de inmunoprecipitación, que incluyen los epítopos desvelados en el documento WO 2005/019828 (DLGKGGNEESTKTGNAGS y NPLSRKHGGPKDEE), y sus anticuerpos, generados, por ejemplo, como se desvela en la solicitud de patente de EE.UU. N.º 60/778.379, presentada el 3 de marzo de 2006, y los epítopos desvelados en Khare *et al.* (8) (IKGLTEGLHGF y HCIIGRTLTVH).

Ejemplo 17

35 Inmunoprecipitación y detección de SOD1 mal plegada del tejido cerebral

40 Se obtuvieron tejidos cerebrales de un paciente humano normal, un ratón de tipo silvestre, un ratón transgénico que sobreexpresaba SOD1 humana de tipo silvestre y un ratón modelo G93A para ELA, que expresaba una forma mal plegada de SOD1. Las muestras se congelaron inmediatamente en hielo seco y se pesaron. El tejido congelado se cortó en trozos más pequeños y se homogenizó (10 % p/v) en tampón de lisis (NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, Tris 10 mM, desoxicolato al 0,5%, NP-40 al 0,5 %, pH 7,4) y 1 x solución de inhibidor de proteasa completo exento de EDTA de Roche (Roche) con un homogenizador de mano de mortero de microgránulos. Se centrifugó esta fracción homogenizada a 2000 xg; el sobrenadante se denominó "fracción soluble" y la fracción de microgránulos se denominó "fracción insoluble". Se formaron alícuotas de las fracciones homogenizadas tisulares inmediatamente y se congelaron a -80 °C antes de su uso. Para experimentos con la fracción insoluble, se volvieron a suspender los microgránulos en tampón de lisis. La concentración de proteína se determinó usando el ensayo de proteína BCA (Pierce). Se inmunoprecipitaron 100 µg de proteína, diluidos a 1 ml con PBS que contenía 1 x inhibidores de proteasa, con 5-10 µg de un anticuerpo monoclonal unido a DLGKGGNEESTKTGNAGS, un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1, acoplado a perlas magnéticas activadas con tosilo Dynabeads M-280 (DynaL Biotech, Oslo, Noruega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

55 Para la inmunotransferencia, se usó un anticuerpo dirigido contra DLGKGGNEESTKTGNAGS para detectar SOD1 de proteínas celulares de muestras de tejido cerebral que se han resuelto mediante electroforesis en gel.

60 Como se muestra en la Figura 4, un anticuerpo dirigido contra DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) inmunoprecipitó una forma mal plegada de SOD1 en tejidos cerebrales de ratones mutantes G93A, y, en un grado mucho menor, sobreexpresó SOD1 humana de tipo silvestre. Este anticuerpo no inmunoprecipitó formas nativas de SOD1 humana o de ratón. Sin embargo, el anticuerpo dirigido contra DSE2 reconoció la SOD1 humana y de ratón desnaturalizada por inmunotransferencia directa.

65 En un protocolo alternativo, se usan otros anticuerpos que se unen a epítopos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 en los experimentos de inmunoprecipitación, que incluyen los epítopos desvelados en el documento WO 2005/019828 (NPLSRKHGGPKDEE), y sus anticuerpos, generados, por ejemplo, como se desvela en la solicitud de patente de EE.UU. N.º 60/778.379, presentada el 3 de marzo de 2006, y los epítopos desvelados en Khare *et al.* (8) (IKGLTEGLHGF y HCIIGRTLTVH).

Ejemplo 18

Inmunohistoquímica del tejido cerebral

5 Se obtiene tejido cerebral de pacientes diagnosticados con enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o ELA, y controles emparejados. Las muestras se incuban con formol tamponado con fosfato libre de metanol al 10 % (Fisher Scientific). Las muestras de tejido se cortan, se embeben en parafina y se realizan cortes de 6 µm, ya sea longitudinal o transversalmente, usando un micrótopo giratorio. Todos los cortes para la inmunohistoquímica se tratan con H₂O₂ al 3 % (v/v) y tampón de citrato sódico 10 mM, pH 6,0 antes del marcaje. Se usan anticuerpos que se unen a epítomos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1. En todos los casos, los anticuerpos primarios se dejan reaccionar durante la noche a 4 °C. Los cortes se desarrollan usando el sistema DakoCytomation Envision™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando 3,3'-diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. Para el doble marcaje, se usa el kit DakoCytomation Envision™ DoubleStain con nitro-azul de tetrazolio (NBT) como cromógeno. Los iones teñidos se visualizan usando un microscopio Leica DM 6000 y las imágenes digitales se obtienen con una cámara digital en color Micropublisher 3.3 RTV (Qimaging).

Ejemplo 19

Inmunohistoquímica del tejido cerebral con enfermedad de Alzheimer

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

30 Los portaobjetos se incubaron con un bloque de proteína durante 20 minutos, se sondearon con anticuerpo primario durante 45 minutos y se enjuagaron con TBST. Los portaobjetos se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado durante 30 minutos y luego se enjuagaron con TBST. Los portaobjetos se incubaron a continuación en estreptavidina y fosfatasa alcalina durante 30 minutos, se enjuagaron en TBST y se incubaron con sustrato durante 30 minutos. Después de enjuagar en agua destilada, los portaobjetos se examinaron por microscopía.

35 Se obtuvieron tejido de hipocampo cerebral de la autopsia de una paciente de 78 años diagnosticada con la enfermedad de Alzheimer y tejido de hipocampo normal de control de una mujer de 52 años. Las muestras se incubaron con formol tamponado con fosfato libre de metanol al 10 % (Fisher Scientific). Las muestras de tejido se cortaron, se embebieron en parafina y se realizaron cortes de 6 µm, ya sea longitudinal o transversalmente, usando un micrótopo giratorio. Todas las secciones para la inmunohistoquímica se trataron con H₂O₂ al 3 % (v/v) y tampón de citrato de sodio 10 mM, pH 6,0 antes del marcaje. Se usó un anticuerpo específico del epítomo DLGKGGNEESTKTGNAGS específico de la enfermedad de Alzheimer (DSE2) como el anticuerpo primario para teñir los cortes de tejido a una concentración de 5 µg/ml (Figura 5). Los anticuerpos primarios se dejaron reaccionar durante la noche a 4 °C. Los cortes se desarrollan usando el sistema DakoCytomation Envision™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando 3,3'-diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. Para el doble marcaje, se usó el kit DakoCytomation Envision™ DoubleStain con nitro-azul de tetrazolio (NBT) como cromógeno. Los iones teñidos se visualizaron usando un microscopio Leica DM 6000 y las imágenes digitales se obtuvieron con una cámara digital en color Micropublisher 3.3 RTV (Qimaging). El corte de hipocampo obtenido de una mujer de 78 años con enfermedad de Alzheimer en etapa avanzada mostró una fuerte tinción de placas seniles en el cerebro con Alzheimer con el anticuerpo dirigido contra DSE2 (Figura 5B, panel izquierdo), así como una mayor tinción dentro de los subconjuntos de neuronas del corte del hipocampo con Alzheimer (Figura 5B, panel derecho) en comparación con el hipocampo normal (Figura 5A).

50 Estos datos demuestran que SOD1 mal plegada está presente intracelular y extracelularmente en cerebros de pacientes con Alzheimer, y que el anticuerpo dirigido contra el epítomo DSE2 CDLGKGGNEESTKTGNAGS reconoce proteínas SOD1 mal plegadas que se encuentran en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo 20

Inmunohistoquímica del tejido cerebral con enfermedad de Parkinson

60 Los tejidos se prepararon por fijación con formalina y se incluyeron en parafina. Los tejidos se seccionaron (4 micrómetros), se montaron en portaobjetos de microscopio cargados y se calentaron en un horno de secado de tejidos durante 45 minutos a 60 °C. Los portaobjetos se desparafinizaron lavándolos en xileno (3 x 5 min) y se rehidrataron lavándolos a concentraciones decrecientes de alcohol (3 x 3 min usando alcohol al 100 %, 2 x 3 min usando alcohol al 95 %, 1 x 3 min usando alcohol al 80 %) y agua destilada. Los portaobjetos se sometieron al vapor

en tampón de citrato de sodio 0,01 M, a pH 6,0 a 99-100 °C durante 20 min y se incubaron a TA durante 20 min. Se volvieron a enjuagar los portaobjetos en 1 x TBS con Tween (TBST) durante 1 minuto a TA.

5 Los portaobjetos se incubaron con un bloque de proteína durante 20 minutos, se sondearon con anticuerpo primario durante 45 minutos y se enjuagaron con TBST. Los portaobjetos se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado durante 30 minutos y luego se enjuagaron con TBST. Los portaobjetos se incubaron a continuación en estreptavidina y fosfatasa alcalina durante 30 minutos, se enjuagaron en TBST y se incubaron con sustrato durante 30 minutos. Después de enjuagar en agua destilada, los portaobjetos se examinaron por microscopía.

10 Se obtuvo una muestra de cerebro de una mujer de 79 años con demencia. La sección teñida con H & E (Figura 6, panel A) mostró sustancia negra con neuronas dopaminérgicas que mostraron cuerpos de Lewy ocasionales coincidentes con la enfermedad de Parkinson. El anticuerpo anti-DSE2 mostró tinción casi negativa a rara y tiene en neuronas pigmentadas y no pigmentadas dentro de la sustancia negra (Figura 6, panel B, C, D y E). Los cuerpos de Lewy fueron negativos (Figura 6, panel B). El neuropil adyacente fue levemente positivo, y los astrocitos fueron de leve a ocasionalmente moderadamente positivos. Los *corpora amyloacea* fueron muy positivos. Esta muestra mostró raras placas seniles en la materia gris adyacente que eran fuertemente positivas (Figura 6, panel F). Se evaluaron cortes en serie adyacentes en ausencia de anticuerpo primario como control, y todos fueron negativos.

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

Ejemplo 21

25 Inmunorreactividad de DSE2 de SOD1 en la enfermedad

Los inventores han detectado la inmunorreactividad de DSE2 en todos los tipos de ELA (formas esporádicas, así como ELA familiar asociada a SOD1 y ELA familiar sin mutaciones de SOD1). La inmunorreactividad es detectable como depósitos diferenciados y densos dentro de algunas neuronas motoras de la médula espinal, incluyendo los axones motores de la raíz ventral, así como los depósitos puntuales extracelulares dentro de los cuernos anteriores de la médula espinal, y dentro de los axones del tracto motor. Además, la inmunorreactividad de DSE2 es detectable intracelularmente en neuronas del hipocampo en individuos con EA, pero no en individuos normales de la misma edad. Además, la inmunorreactividad de DSE2 también se observa en placas seniles difusas a nivel regional y depósitos punteados extracelularmente del hipocampo. La SOD1 mal plegada extracelular en enfermedades neurodegenerativas es claramente una diana para la inmunoterapia, que puede "neutralizar" la actividad tóxica de las especies mal plegadas acelerando la degradación por microglia, y/o bloqueando la actividad enzimática anómala de esta proteína mal plegada.

Ejemplo 22

40 Inmunización de epítipos específicos de la ELA de modelo de ratones con ELA

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

45 Se inmunizan por vía ip ratones transgénicos que expresan SOD1 mutante humana G93A y G37R con epítipos y péptidos de control específicos de la esclerosis lateral amiotrófica acoplados a KLH cada mes antes del inicio de la enfermedad de las neuronas motoras (4 meses y 6 meses, respectivamente). El retraso o la eliminación de la agregación de SOD y el comienzo de la enfermedad se produce para los epítipos terapéuticamente activos, y se controlan las posibles manifestaciones autoinmunes para los epítipos específicos de la esclerosis lateral amiotrófica y los epítipos de control.

Estos métodos se usan con ratones del modelo G93A y G37R. Los ratones del modelo G93A y G37R expresan ciertas formas mutantes de la proteína SOD1 humana, y desarrollan una enfermedad de tipo ELA de forma clínica y neuropatológica. Se usan setenta y dos de cada modelo de ratones para este estudio. Se ensayan siete epítipos peptídicos específicos de la ELA diferentes contra formas no nativas de SOD1, y se comparan con 2 grupos de control (uno sin tratar y el otro tratado solo con adyuvante). Cada grupo consistía en 8 animales.

55 Se transfieren aleatoriamente ratones transgénicos hemicigóticos de cuatro semanas de vida (transgén y número de copias confirmados por PCR y transferencia de Southern) a uno de nueve grupos para la inmunización: sin inmunización (NI); hemocianina de lapa californiana (KLH) sola más adyuvante; o una de las siete secuencias peptídicas de DSE de SOD1. Todos los péptidos son sintetizados, purificados y acoplados a KLH usando SMCC-Sulfolink. Todos los ratones se inmunizan inicialmente por inyección intraperitoneal (IP) con 100 µg de péptido acoplado a KLH o KLH sola, emulsionado 1:1 en adyuvante completo de Freund (FCA), en un volumen total inyectado de 100 µl. Tres semanas después, se administra a los ratones una inyección subcutánea de péptido acoplado a KLH emulsionado en adyuvante de Freund incompleto (IFA). Tras ello, los ratones reciben inyecciones

subcutáneas mensuales de péptido acoplado a KLH emulsionado en IFA. Tras 4 inmunizaciones, se extraen 100 µl de sangre de la vena safena y se determinan los títulos de anticuerpos en plasma.

5 Los animales se pesan 2-3 veces a la semana. Se evalúa el reflejo de extensión de la pata cuando los animales son levantados por la base de la cola y retirados de su jaula para pesarlos. La reducción de la extensión de la pata es un déficit temprano observado en ratones transgénicos SOD1 mutantes. El comportamiento de los ratones se controla semanalmente mediante ensayos de campo abierto (EthoVision, Noldus Information Technology, Leesburg, VA, EE. UU.) y el análisis de la marcha se realiza semanalmente con DigiGait. Las evaluaciones iniciales del comportamiento y la marcha se completan justo antes de la primera vacunación, y sirven como datos de referencia.

10 El cerebro, la médula espinal y otros sistemas orgánicos que no son del SNC se analizan post mórtem para índices morfológicos y bioquímicos de neurodegeneración.

15 Los animales son pesados y controlados regularmente para determinar los efectos adversos tales como signos de dolor y angustia que podrían deberse a las inmunizaciones. La autoinmunidad también se controla.

20 La vacunación con epítomos peptídicos específicos de la ELA previene la enfermedad neurodegenerativa esclerosis lateral amiotrófica (ELA). El retraso o la eliminación de la agregación de SOD y el inicio de la enfermedad se producen para los epítomos terapéuticamente activos, y no para los controles.

Ejemplo 23

Inmunización de epítomos específicos de la ELA de modelo de ratones con ELA

25 Ratones del modelo G93A o G37R de cuatro semanas se distribuyen aleatoriamente en uno de siete grupos para la inmunización: solución salina; hemocianina de lapa californiana (KLH); DSE1; DSE1a; DSE2; DSE5; y DSE1a + DSE2 + DSE5. Todos los péptidos están conjugados a KLH. Toda la inmunización se administra junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 Se evalúan en los animales los cambios en el reflejo de extensión de la pata, el comportamiento y la marcha. El cerebro, la médula espinal y otros sistemas orgánicos que no son del SNC se analizan post mórtem para índices morfológicos y bioquímicos de neurodegeneración.

35 La vacunación con un ácido nucleico que codifica un epítomo específico de la ELA previene la enfermedad neurodegenerativa esclerosis lateral amiotrófica (ELA). El retraso o la eliminación de la agregación de SOD y el inicio de la enfermedad se producen para los ácidos nucleicos terapéuticamente activos, y no para los controles

Ejemplo 24

40 Inmunización de ratones del modelo de ELA con ácido nucleico.

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

45 Se evalúan en los animales los cambios en el reflejo de extensión de la pata, el comportamiento y la marcha. El cerebro, la médula espinal y otros sistemas orgánicos que no son del SNC se analizan post mórtem para índices morfológicos y bioquímicos de neurodegeneración.

50 La vacunación con un ácido nucleico que codifica un epítomo específico de la ELA previene la enfermedad neurodegenerativa esclerosis lateral amiotrófica (ELA). El retraso o la eliminación de la agregación de SOD y el inicio de la enfermedad se producen para los ácidos nucleicos terapéuticamente activos, y no para los controles

Ejemplo 25

55 Infusión de anticuerpos epitópicos específicos de ELA de ratones del modelo de ELA.

60 Los ratones G93A y G37R reciben mediante infusión por vía intravenosa (IV) anticuerpos monoclonales dirigidos contra los epítomos específicos de la esclerosis lateral amiotrófica al inicio de la enfermedad, para modelizar más estrechamente la inmunoterapia con ELA. Se produce la disminución o detención de la agregación de SOD y progresión de la enfermedad para los anticuerpos terapéuticamente activos, sin efecto de los anticuerpos de control de isotipo. Se controla la autoinmunidad para detectar el epítomo específico de la esclerosis lateral amiotrófica y los anticuerpos de control, Incluyendo el epítomo expuesto a la forma nativa.

65 Los ratones del modelo G93A y G37R expresan ciertas formas mutantes de la proteína SOD1 humana, y desarrollan una enfermedad de tipo ELA de forma clínica y neuropatológica. Para este estudio, se usan treinta y dos ratones de

5 cada cepa, con 8 ratones asignados al azar a cada uno de los 2 anticuerpos dirigidos a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de los grupos de tratamiento con SOD1 y 2 grupos de control. Se asignan aleatoriamente ratones de ocho semanas a uno de cuatro grupos: 1. Un anticuerpo dirigido a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 inyectado por vía intraperitoneal (IP); 2. Un anticuerpo dirigido a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 infundido por vía intracerebroventricular (ICV); 3. PBS inyectado IP (control); y 4. Solución salina tamponada con fosfato (PBS) infundida por vía ICV (control).

10 Los ratones reciben inyecciones semanales IP de 1 ml de anticuerpo purificado en PBS (250 µl/ml) o PBS solo. Para la infusión ICV, los ratones se anestesiaron con gas de isoflurano administrado por un puente nasal, y se les implantaron bombas mini-osmóticas (modelo Alzet n.º 2004; longitud: 3 cm, volumen total: 200 µl; caudal: 0,25 µl/h). Esta bomba proporciona una infusión constante de 0,125 µg/h (un total de 25 µg por semana) durante al menos 4 semanas. Se acoplan bombas que contienen anticuerpo DSE2 purificado o PBS a un kit de infusión cerebral (kit de infusión cerebral Alzet 3), usando una cánula colocada en el tercer ventrículo. Las bombas se reemplazan después de 4 semanas de uso.

15 Los ratones se pesan y se evalúan para determinar la función y el comportamiento motor antes de las inyecciones IP o la implantación de las bombas para que sirvan como datos de referencia. A partir de entonces, estos ensayos se realizan una vez a la semana. Los ensayos incluyen:

20 a.) REFLEJO DE EXTENSIÓN DE LA EXTREMIDAD POSTERIOR: la reducción en la extensión de la extremidad posterior cuando los animales son levantados por la cola es un déficit temprano observado en ratones transgénicos SOD1 mutantes. Los animales se levantan por la base de la cola, y se califican la extensión de las extremidades posteriores y los reflejos posturales. La puntuación 3 indica la extensión completa y reflejo postural normal. La puntuación 2 indica extensión moderada y reflejo postural normal. La puntuación 1 indica una extensión y un reflejo postural deficientes. La puntuación 0 indica que no hay movimiento de las extremidades posteriores.

25 b.) ENSAYOS EN CAMPO ABIERTO: los ensayos en campo abierto se realizan semanalmente usando EthoVision Pro versión 3.1 (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, EE.UU.). Los animales se colocan en una arena circular cerrada (50 cm de diámetro) con una parte superior abierta y se graban durante aproximadamente 5 minutos con una cámara de vídeo digital. Se cuantifica una serie de parámetros de comportamiento fuera de línea. Cuatro animales son controlados simultáneamente en arenas separadas.

30 c.) ANÁLISIS DE LA MARCHA: el análisis de la marcha se realiza semanalmente usando DigiGait (Mouse Specifics, Boston, MA, Estados Unidos). Los cambios en la colocación de la pata y la longitud de la zancada se presentan como los cambios funcionales más tempranos observados en ratones transgénicos G93A B6.Cg-Tg SOD1, según lo evaluado usando DigiGait.

35 A las 12 semanas de vida, se extraen 100 µl de sangre de los ratones a través de la vena safena, y se determinan los títulos de anticuerpos en plasma. Para los ratones tratados ICV, la sangre se recoge bajo anestesia cuando se reemplazan las bombas. Los ratones tratados IP también se anestesiaron con isoflurano para facilitar la extracción de sangre.

40 Los animales son pesados y controlados regularmente para determinar los efectos adversos tales como signos de dolor y angustia mientras dura el estudio. Los animales que parecen tener dolor reciben buprenorfina.

45 El cerebro, la médula espinal y otros sistemas orgánicos que no son del SNC se analizan post mórtem para índices morfológicos y bioquímicos de neurodegeneración

50 La inyección o infusión de anticuerpos dirigidos a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 es eficaz en el tratamiento de la enfermedad neurodegenerativa esclerosis lateral amiotrófica (ELA). El tratamiento de ratones del modelo G93A y G37R mediante inyección o infusión de anticuerpos dirigidos a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 ha: neutralizado y aclarado la SOD1 mutante; evitado la formación de agregados de SOD1; retrasado la aparición de la enfermedad; y/o ralentizado la progresión de la enfermedad.

55 Ejemplo 26

Tratamiento de ratones G93A con anticuerpo DSE2

60 Se infundieron ratones del modelo G93A con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la secuencia del péptido DSE2. Los ratones del modelo G93A expresan formas mutantes de la proteína SOD1 humana y desarrollan una enfermedad similar a la ELA de forma clínica y neuropatológica. El anticuerpo se administró mediante infusión intracerebroventricular (ICV), usando un catéter cerebral (Catéteres Alzet®) y una bomba implantada por vía subcutánea (Bombas Osmóticas Alzet®), o mediante inyección intraperitoneal de anticuerpo anti-DSE2.

65

Para la infusión ICV, se asignaron aleatoriamente 8 animales al grupo de tratamiento (4 animales) o al grupo de control (4 animales). Para el tratamiento, se llenaron las bombas Alzet con 200 ul de solución de anticuerpo (0,5 a 0,6 mg/ml) en solución salina, o solución salina sola para el control. El anticuerpo se administró a un caudal de 0,125 ug/h durante 4 semanas. Se infundieron 2 ratones más mediante inyección intraperitoneal (IP) con 1 mg de anticuerpo anti-DSE2, seguido de 3 inyecciones más de 1 mg de anticuerpo anti-DSE2 en solución salina en intervalos semanales. 2 ratones fueron inyectados con solución salina sin anticuerpo.

La progresión de la enfermedad en ratones tratados y no tratados se controló usando el análisis de la marcha (DigiGait, Mouse Specifics Inc, Boston, MA). El análisis con Digigait permite una medición muy precisa de los cambios en los parámetros de la marcha en este modelo de ratón, que permite una evaluación muy precisa y objetiva de la progresión de la enfermedad (Wooley C. M., Sher R. B., Kale A., Frankel W. N., Cox G. A., Seburn K. L.; "Gait analysis detects early changes in transgenic SOD1(G93A) mice". *Muscle Nerve*. julio de 2005;32(1):43-50). A medida que la enfermedad progresa, aumenta la duración de cada zancada. Los inventores han descubierto que la duración de las zancadas es un parámetro sensible para medir la progresión de la enfermedad.

La Tabla 11 muestra los resultados de las mediciones de la duración de la zancada usando el análisis Digigait de animales tratados después de 25 días de tratamiento (inyección IP) y de 28 a 35 días de tratamiento (infusión ICV). La duración de la zancada se mide en segundos, y se promedia a lo largo de todo el estudio y para las cuatro patas. La duración de la zancada media fue de 0,3238 segundos en el control de infusión ICV. La progresión de la enfermedad, medida por la duración de la zancada, se retrasa significativamente después de 35 días de tratamiento. La duración de la zancada es menor en animales tratados y se reduce a 0,2988 segundos. La duración de la zancada también se mejora en los ratones con inyección IP. La duración de la zancada media fue de 0,3366 s para los animales de control y mejoró a 0,3206 s después de 28 días de tratamiento.

Para comparar y demostrar el efecto de la progresión de la enfermedad, se determinó la duración de la zancada para ratones no tratados a un promedio de 66 y 122 días de edad (edad del animal en el mismo intervalo que los grupos de tratamiento). A los 66 días, los ratones no tratados tenían una duración media de zancada de 0,3254 s (DT = 0,0313). A los 122 días, la duración de la zancada había aumentado a 0,3492 s (DT = 0,0288). Como es evidente, en ausencia de tratamiento, este parámetro aumenta con una alta significación estadística. Los inventores encontraron que ambos métodos de tratamiento invierten el alargamiento de la duración de la zancada que se observa en los animales no tratados a lo largo del tiempo. Esto demuestra la eficacia de este tratamiento de anticuerpos para revertir el fenotipo asociado a la enfermedad del modelo de ratón de ELA.

Tabla 11. Retraso en la progresión de la enfermedad: Duración de la zancada de animales tratados con anticuerpos SOD1 específicos de la enfermedad

Estudio	Grupo		Duración de la zancada (s)	
Infusión ICV	Tratamiento	Promedio	0,2988 s	
		DT	0,0044	
	Control	Promedio	0,3238 s	
		DT	0,0449	
			Valor de <i>p</i>	4,30E-02
	Inyección IP	Tratamiento	Promedio	0,3206 s
DT			0,0044	
Control		Promedio	0,3366 s	
		DT	0,0148	
			Valor de <i>p</i>	1,82E -02
Progresión de la enfermedad		66 días	Promedio	0,3254 s
	DT		0,0313	
	122 días	Promedio	0,3492 s	
		DT	0,0288	
			Valor de <i>p</i>	1,04E-05

Ejemplo 27

Inmunización de ratones transgénicos TgCRND8

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

10 Los ratones TgCRND8 son inmunizados IP con KLH acoplada a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 o un péptido de control a las 6, 8, 12, 16 y 20 semanas.

15 Los ratones se ensayan en una versión de memoria de referencia del ensayo del laberinto acuático de Morris a las 11, 15, 19 y 23 semanas (véase Janus C. *et al.* (65); Janus C. (66); Gass P. *et al.* (67); y Wehner J. M. (68)). El retraso o la eliminación de la agregación de SOD1 y el inicio de la enfermedad se producen para el epítipo terapéuticamente activo, y se controlan las manifestaciones autoinmunes. Además de la agregación de SOD1, se evalúa la deposición de A β fibrilar cerebral (véase Janus C. *et al.* (65)).

20 Ejemplo 28

Infusión de anticuerpos de ratones transgénicos TgCRND8

25 Los ratones TgCRND8 recibieron por infusión anticuerpos que se unen a epítopos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 o anticuerpos de control de isotipo. Como se ha descrito anteriormente, Los ratones se ensayan en una versión de memoria de referencia del ensayo del laberinto acuático de Morris. Se produce la ralentización o detención de la agregación de SOD1 y progresión de la enfermedad para los anticuerpos terapéuticamente activos, sin efecto de los anticuerpos de control de isotipo. La autoinmunidad se controla.

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

Ejemplo 29

35 Inmunización de ratones transgénicos TgCRND8 con ácido nucleico

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

45 Los ratones TgCRND8 son inmunizados IP con KLH acoplada a ácido nucleico que codifica un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 o un ácido nucleico de control a las 6, 8, 12, 16 y 20 semanas.

50 Los ratones se ensayan en una versión de memoria de referencia del ensayo del laberinto acuático de Morris a las 11, 15, 19 y 23 semanas (véase Janus C. *et al.* (65); Janus C. (66); Gass P. *et al.* (67); y Wehner J. M. (68)). Además de la agregación de SOD1, se puede evaluar la deposición de A β fibrilar cerebral (véase Janus C. *et al.* (65)).

55 La vacunación con un ácido nucleico que codifica un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 previene la enfermedad de Alzheimer. El retraso o la eliminación de la agregación de SOD1 y el inicio de la enfermedad se producen para los ácido nucleico terapéuticamente activos, y no para los controles

Ejemplo 30

Inmunización de ratones Ha-Syn Tg

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

65 Los ratones ha-syn tg son inmunizados IP con KLH acoplada a un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 o un péptido de control a las 2, 6, 8, 12, 16 y 20 semanas.

El retraso o la eliminación de la agregación de SOD1 y el inicio de la enfermedad se producen para el epítipo terapéuticamente activo, y se controlan las manifestaciones autoinmunes.

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

Ejemplo 31

Inmunización de ratones Ha-Syn Tg con ácido nucleico

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

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

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

25 La vacunación con un ácido nucleico que codifica un epítipo presentado selectivamente o accesible en formas no nativas de SOD1 previene la enfermedad de Parkinson. El retraso o la eliminación de la agregación de SOD1 y el inicio de la enfermedad se producen para los ácido nucleico terapéuticamente activos, y no para los controles

Ejemplo 32

Infusión de anticuerpos de ratones Ha-syn tg

30 Los ratones ha-syn tg recibieron por infusión anticuerpos que se unen a epítipos presentados selectivamente o accesibles en formas no nativas de SOD1 o anticuerpos de control de isotipo.

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

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

Ejemplo 33

45 Administración de péptidos aislados a pacientes con ELA Se administran composiciones que comprenden epítipos específicos de ELA tales como GGGRLAC*GVIGIGSG (DSE1a), DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) y IKGLTEGLHGF (DSE5) a pacientes de ELA humanos.

Las composiciones se administran a pacientes con ELA.

50 Los pacientes son controlados en busca de indicaciones de ralentización o detención de la agregación de SOD y progresión de la enfermedad.

Los sujetos se controlan regularmente para determinar los efectos adversos tales como signos de dolor y angustia que podrían deberse a las inmunizaciones. Se controlan las manifestaciones autoinmunes.

55 La administración de los epítipos específicos de ELA GGGRLAC*GVIGIGSG (DSE1a), DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) y IKGLTEGLHGF (DSE5) ralentiza la progresión de la ELA. Se produce la ralentización o detención de la agregación de SOD1 y la supresión de la progresión de la enfermedad para los epítipos terapéuticamente activos.

Ejemplo 34

60 Administración a pacientes con ELA: anticuerpos

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

Los pacientes son controlados en busca de indicaciones de ralentización o detención de la agregación de SOD y progresión de la enfermedad. También se controlan las manifestaciones autoinmunes.

5 Los sujetos se controlan regularmente para determinar los efectos adversos tales como signos de dolor y angustia que podrían deberse a las inmunizaciones. Se controlan las manifestaciones autoinmunes.

10 La administración de anticuerpos dirigidos contra los epítomos específicos de ELA GGGRLAC*GVIGIGSG (DSE1a), DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) y IKGLTEGLHGF (DSE5) ralentiza la progresión de la ELA. Se produce la ralentización o detención de la agregación de SOD1 y la supresión de la progresión de la enfermedad para los anticuerpos terapéuticamente activos.

Ejemplo 35

15 Administración de anticuerpos humanizados a pacientes con ELA

Se administran anticuerpos humanizados dirigidos contra epítomos específicos de la esclerosis lateral amiotrófica a pacientes con ELA humanos. Los pacientes son controlados en busca de indicaciones de ralentización o detención de la agregación de SOD y progresión de la enfermedad. La administración de un anticuerpo humanizado dirigido a un epítomo específico de la enfermedad ELA ralentiza la progresión de la enfermedad de ELA en pacientes. Se produce la ralentización o detención de la agregación de SOD1 y la supresión de la progresión de la enfermedad para los anticuerpos terapéuticamente activos.

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

35 Ejemplo 36

Administración intraventricular o intratecal de anticuerpos humanizados a pacientes con ELA

40 Los anticuerpos humanizados contra epítomos específicos de la ELA se administran directamente en el SNC de pacientes con ELA mediante infusión intraventricular o intratecal usando una bomba de infusión tal como las bombas de infusión producidas por MedTronics (Minneapolis, MN, EE.UU.). Los pacientes con ELA se infunden con 0,5 a 5 mg al día de anticuerpo humanizado para obtener una concentración final de 1-10 microgramos por ml en el CNS infundido a una velocidad máxima de 1 ml/h. En una pauta, la formulación comprende un anticuerpo dirigido contra un epítomo específico de la ELA. En otra pauta, la formulación comprende dos o más anticuerpos humanizados, cada uno dirigido contra un epítomo específico de la ELA diferente.

45 Cuando se administran anticuerpos humanizados a pacientes con ELA mediante inyección intratecal, se retira un volumen igual de fluido cefalorraquídeo a través de la misma aguja usada para la inyección con el fin de evitar un aumento de la presión debido al volumen de inyección. Los sujetos reciben una dosis que varía del 1 % al 10 % de la dosis sistémica correspondiente. Los sujetos reciben una sola dosis de la formulación de anticuerpo humanizado. Como alternativa, los sujetos reciben múltiples dosis de la formulación de anticuerpo humanizado. En una pauta, la formulación comprende un anticuerpo dirigido contra un epítomo específico de la ELA. En otra pauta, la formulación comprende dos o más anticuerpos humanizados, cada uno dirigido contra un epítomo específico de la ELA diferente. En pautas alternativas, la dosificación es una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez al mes. En otra pauta, la dosis varía dependiendo del estado fisiológico del sujeto y de la respuesta del sujeto al tratamiento.

50 Los pacientes son controlados en busca de indicaciones de ralentización o detención de la agregación de SOD y progresión de la enfermedad. La administración de un anticuerpo humanizado dirigido a un epítomo específico de la enfermedad ELA ralentiza la progresión de la enfermedad de ELA en pacientes. Se produce la ralentización o detención de la agregación de SOD1 y la supresión de la progresión de la enfermedad para los anticuerpos terapéuticamente activos.

60 Ejemplo 37

65 Administración a pacientes con enfermedad de Alzheimer: epítomos

Se administra el epítipo DLGKGGNEESTKTGNAGS específico de la enfermedad de Alzheimer (DSE2) a pacientes con enfermedad de Alzheimer. Los epítipos se administran a.

5 Los pacientes son controlados en busca de indicaciones de ralentización o detención de la agregación de SOD y progresión de la enfermedad. En particular, se ensaya la memoria de los sujetos y se controla su comportamiento. También se controlan las manifestaciones autoinmunes.

10 Los sujetos se controlan regularmente para determinar los efectos adversos tales como signos de dolor y angustia que podrían deberse a las inmunizaciones. También se controlan las manifestaciones autoinmunes.

15 La administración del epítipo específico de la enfermedad de Alzheimer DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) ralentiza la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Se produce la ralentización o detención de la agregación de SOD1 y la supresión de la progresión de la enfermedad para los epítipos terapéuticamente activos.

15 Ejemplo 38

Administración a pacientes con enfermedad de Alzheimer: anticuerpos

20 Se administra el anticuerpo dirigido contra epítipo DLGKGGNEESTKTGNAGS específico de la enfermedad de Alzheimer (DSE2) a pacientes con enfermedad de Alzheimer.

25 Los pacientes son controlados en busca de indicaciones de ralentización o detención de la agregación de SOD y progresión de la enfermedad. En particular, se ensaya la memoria de los sujetos y se controla su comportamiento. También se controlan las manifestaciones autoinmunes.

Los sujetos se controlan regularmente para determinar los efectos adversos tales como signos de dolor y angustia que podrían deberse a las inmunizaciones. Se controlan las manifestaciones autoinmunes.

30 La administración del anticuerpo dirigido contra el epítipo específico de la enfermedad de Alzheimer DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) ralentiza la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Se produce la ralentización o detención de la agregación de SOD1 y la supresión de la progresión de la enfermedad para los anticuerpos terapéuticamente activos.

35 Ejemplo 39

Administración de anticuerpos humanizados a pacientes con enfermedad de Alzheimer

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

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

60 Los anticuerpos humanizados se administran a pacientes con enfermedad de Alzheimer por inyección intratecal. Para evitar un aumento de la presión debido al volumen de inyección, se extrae un volumen igual de líquido cefalorraquídeo a través de la misma aguja usada para la inyección. Los sujetos reciben una dosis que varía del 1 % al 10 % de la dosis sistémica correspondiente. Los sujetos reciben una sola dosis de la formulación de anticuerpo humanizado. Como alternativa, los sujetos reciben múltiples dosis de la formulación de anticuerpo humanizado. En una pauta, la formulación comprende un anticuerpo dirigido contra un epítipo específico de la enfermedad de Alzheimer. En otra pauta, la formulación comprende dos o más anticuerpos humanizados, cada uno dirigido contra un epítipo específico de la enfermedad de Alzheimer diferente. En pautas alternativas, la dosificación es una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas

65

o una vez al mes. En otra pauta, la dosis varía dependiendo del estado fisiológico del sujeto y de la respuesta del sujeto al tratamiento.

5 Los pacientes son controlados en busca de indicaciones de ralentización o detención de la agregación de SOD y progresión de la enfermedad. La administración de un anticuerpo humanizado dirigido a un epítipo específico de la enfermedad de Alzheimer ralentiza la progresión de la enfermedad de Alzheimer en pacientes. Se produce la ralentización o detención de la agregación de SOD1 y la supresión de la progresión de la enfermedad para los anticuerpos terapéuticamente activos.

10 Ejemplo 40

Administración a pacientes con enfermedad de Parkinson: epítipos

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

Los pacientes son controlados en busca de indicaciones de ralentización o detención de la agregación de SOD y progresión de la enfermedad. En particular, se controla la marcha, el reflejo y el comportamiento de los sujetos. También se controlan las manifestaciones autoinmunes.

20 Los sujetos se controlan regularmente para determinar los efectos adversos tales como signos de dolor y angustia que podrían deberse a las inmunizaciones.

25 La administración de un epítipo específico de la enfermedad de Parkinson ralentiza la progresión de la enfermedad de Parkinson. Se produce la ralentización o detención de la agregación de SOD1 y la supresión de la progresión de la enfermedad para los epítipos terapéuticamente activos.

Ejemplo 41:

30 Administración a pacientes con enfermedad de Parkinson: anticuerpos

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

35 Los pacientes son controlados en busca de indicaciones de ralentización o detención de la agregación de SOD y progresión de la enfermedad. En particular, se controla la marcha, el reflejo y el comportamiento de los sujetos. También se controlan las manifestaciones autoinmunes.

40 Los sujetos se controlan regularmente para determinar los efectos adversos tales como signos de dolor y angustia que podrían deberse a las inmunizaciones. La administración de un anticuerpo dirigido a un epítipo específico de la enfermedad de Parkinson ralentiza la progresión de la enfermedad de Parkinson en pacientes. Se produce la ralentización o detención de la agregación de SOD1 y la supresión de la progresión de la enfermedad para los anticuerpos terapéuticamente activos

45 Ejemplo 42

Administración de anticuerpos humanizados a pacientes con enfermedad de Parkinson

50 Los anticuerpos humanizados dirigidos contra epítipos específicos de la enfermedad de Parkinson se administran a pacientes humanos con enfermedad de Parkinson. Los anticuerpos humanizados se administran por infusión intravenosa a una concentración que varía de 1 a 10 microgramos por ml de concentración local en el SNC. En una pauta, la formulación comprende un anticuerpo dirigido contra un epítipo específico de la enfermedad de Parkinson. En otra pauta, la formulación comprende dos o más anticuerpos humanizados, cada uno dirigido contra un epítipo específico de la enfermedad de Parkinson diferente. En una pauta posológica, la dosificación es una vez cada 3

55 semanas. En otras pautas, la dosificación es una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana o una vez cada 2 semanas. Como alternativa, la dosis varía dependiendo del estado fisiológico de los pacientes y de la respuesta del paciente al tratamiento.

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

65 más anticuerpos humanizados, cada uno dirigido contra un epítipo específico de la enfermedad de Parkinson diferente.

Los anticuerpos humanizados contra epítomos específicos de la enfermedad de Parkinson se administran a pacientes con enfermedad de Parkinson mediante inyección intratecal. Para evitar un aumento de la presión debido al volumen de inyección, se extrae un volumen igual de líquido cefalorraquídeo a través de la misma aguja usada para la inyección. Los sujetos reciben una dosis que varía del 1 % al 10 % de la dosis sistémica correspondiente. Los sujetos reciben una sola dosis de la formulación de anticuerpo humanizado. Como alternativa, los sujetos reciben múltiples dosis de la formulación de anticuerpo humanizado. En una pauta, la formulación comprende un anticuerpo dirigido contra un epítomo específico de la enfermedad de Parkinson. En otra pauta, la formulación comprende dos o más anticuerpos humanizados, cada uno dirigido contra un epítomo específico de la enfermedad de Parkinson diferente. En pautas alternativas, la dosificación es una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez al mes. En otra pauta, la dosis varía dependiendo del estado fisiológico del sujeto y de la respuesta del sujeto al tratamiento.

Los pacientes son controlados en busca de indicaciones de ralentización o detención de la agregación de SOD y progresión de la enfermedad. La administración de un anticuerpo humanizado dirigido a un epítomo específico de la enfermedad de Parkinson ralentiza la progresión de la enfermedad de Parkinson en pacientes. Se produce la ralentización o detención de la agregación de SOD1 y la supresión de la progresión de la enfermedad para los anticuerpos terapéuticamente activos.

Ejemplo 43

Reproducción de modelos de ratones con ELA G93A y G37R

Los animales hembra hemocigotos G93A y G37R se reproducirán con ratones hembra de tipo silvestre de la misma cepa de fondo (C57BL/6). Las hembras no fueron reproducidas más de 6 veces. Los heterocigotos G93A machos fueron retirados como reproductores a los 3 meses de edad, los ratones G37R heterocigotos fueron retirados como reproductores a los 6 meses de edad.

Quince ratones macho hemocigotos G93A (o G37R) y 30 ratones hembra C57BL/6 formaron 15 tríos reproductores. Dos de los ratones hembra se alojaron inicialmente juntos, y se indujo el estro exponiendo a las hembras al lecho sucio de su compañero (efecto Whitten). Al día siguiente, las hembras fueron introducidas en las jaulas de machos (2 hembras por macho). Las hembras fueron revisadas cada mañana en busca de tapones.

La descendencia se identificó con perforación de la oreja a las 3 semanas de vida, y el tejido perforado se usó para la genotipificación y para determinar el número de copia transgénica. Si las perforaciones en las orejas no proporcionaron suficiente material para la determinación del genotipo y el ensayo del número de copias transgénicas, entonces se realizó el corte de la cola.

El destete tuvo lugar cuando los descendientes tenían 3 semanas de edad, y los ratones hemocigotos se asignaron al azar a los grupos de tratamiento experimentales.

Después del destete, los animales se mantuvieron 4 por jaula.

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

Los ratones heterocigotos G93A desarrollaron la debilidad predominante en las extremidades posteriores aproximadamente a los 100 días. La debilidad progresó hasta un punto de parálisis de las extremidades posteriores, y los animales no pudieron alimentarse ni beber (es decir, no podían llegar a su comida ni al agua). Este punto se observó en torno a los 145 días. En este punto, los animales fueron sacrificados. Los animales fueron sacrificados antes, si su peso corporal disminuyó en un 20 %, o si mostraron otros signos de morbilidad grave.

El transgén G37R causó signos clínicos similares al transgén G93A, sin embargo, la edad de inicio de la debilidad en los heterocigotos fue de aproximadamente 300 días, desde cuyo momento la debilidad avanzó hacia la parálisis de las extremidades posteriores. Los criterios de valoración fueron los mismos que para los ratones G93A; sin embargo, los criterios de valoración en general se cumplieron en torno a los 335 días en el transgénico G37R (estirpe 29).

Los ratones de cría se pesaron semanalmente, y eran sacrificados si perdían un 15 % o más de su peso corporal. Sin embargo, una pérdida de peso inferior al 15 % combinada con otros signos de morbilidad grave, es decir, piel arrugada, aspecto encorvado, deshidratación evidente, etc., se consideraron un criterio de valoración humano para estos animales.

Ejemplo 44

Desarrollo de modelos de propagación de ELA

En la ELA, como enfermedad priónica, la muerte neuronal se "propaga" a través del neuroeje, lo que implica un mecanismo patológico para la propagación del proceso patológico de una célula a otra. Se desarrolla un modelo de propagación de mal plegamiento de SOD1 en sistemas libres de células, en ensayos celulares *in vitro* y en animales basados en sistemas modelo similares en la enfermedad priónica. Estos modelos proporcionan más sistemas "relevantes para la enfermedad" para ensayar inmunoterapias, y eludirán los posibles resultados falsos negativos y falsos positivos de los modelos actuales.

Los depósitos biológicos de estirpes celulares de hibridoma se realizaron de conformidad con el Tratado de Budapest, y se encuentran disponibles en la Autoridad Depositaria Internacional de Canadá 1015 Arlington Street, Winnipeg, Canadá R3E 3R2.

CITAS COMPLETAS DE LAS REFERENCIAS CITADAS EN LA MEMORIA DESCRIPTIVA

1. Urushitani M., Sik A., Sakurai T., Nukina N., Takahashi R., Julien J. P., "Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis". *Nat Neurosci.* enero de 2006; 9(1):108-18.

2. Turner B. J., Atkin J. D., Farg M. A., Zang da W., Rembach A., Lopes E. C., Patch J. D., Hill A. F., "Cheema SS Impaired extracellular secretion of mutant superoxide dismutase 1 associates with neurotoxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis", *J Neurosci.* 5 de enero de 2005;25(1):108-17).

3. Cashman N. R., Griffin J. K., Zou W-Q., "Allele-selective recruitment and disease progression in familial amyotrophic lateral sclerosis". *Neurology*, 2002.

4. Cashman N. R. y Caughey B. "Prion diseases--close to effective therapy?" *Nature Reviews in Drug Discovery.* octubre de 2004;3(10):874-84.

5. Rakhit R., Robertson J., Vande Velde C., Horne P., Ruth D. M., Griffin J., Cleveland D. W., Cashman N. R., Chakrabarty A. "An immunological epitope selective for pathological monomer/misfolded SOD1 in ALS". *Nature Medicine*, 2007 (en prensa)

6. Paramithiotis E., Pinard M., Lawton T., LaBoissiere S., Leathers V. L., Zou W-Q., Estey L. A., Kondejewski L. H., Francoeur G. P., Papadopoulos M., Haghghat A., Spatz S. J., Tonelli Q., Ledebur H.C., Chakrabarty A., Cashman N. R. "A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation". *Nature Medicine* 9:893-9, 2003.

7. Lehto, M. T., Ashman, D. A. y Cashman, N. R. "Treatment of ScN2a cells with prion-specific YYR antibodies". *Proc. First Intl Conf. Network Excellence: Neuroprion* (París, 2004).

8. Khare *et al*, *PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics*, 61:617-632 (2005).

9. Thompson, J. D., Higgins D. G., Gibson T. J., 1994, *Nucleic Acids Res.* 22(22): 4673-4680.

10. Henikoff S. y Henikoff J. G., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 89: 10915-10919.

11. Needleman y Wunsch. *J. Mol. Biol.*, 1970, 48:443.

12. Smith y Waterman. *Adv. Appl. Math.* 1981, 2:482.

13. Carillo y Lipton *SIAM J. Applied Math.* 1988, 48:1073.

14. "Computational Molecular Biology", Lesk, e.d. Oxford University Press, Nueva York, 1988, *Biocomputing: Informatics and Genomics Projects*.

15. Devereux *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 1984, 12:387.

16. Altschul *et al.*, *Molec. Biol.*, 1990: 215:403.

17. "Remington's Pharmaceutical Sciences", 20ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., EE. UU., 2000.

18. Merrifield, *J. Am. Chem. Assoc.* 85:2149-2154 (1964).

19. Houbenweyl, "Methods of Organic Chemistry", ed. E. Wansch, Vol. 15, pts. I y II, Thieme, Stuttgart (1987).

20. Goeddel, "Gene Expression Technology: Methods in Enzymology" 185, Academic Press, San Diego, CA 1990.

21. Sambrook *et al.* "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2.^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989).
- 5 22. Chang *et al.*, *Nature* 275:615 (1978).
23. Nichols y Yanofsky, *Meth. in Enzymology* 101:155, 1983.
24. Russell *et al.*, *Gene* 20: 231, 1982.
- 10 25. Bolivar *et al.*, *Gene* 2:9S, 1977.
26. Messing, *Meth in Enzymology* 101:20-77, 1983.
- 15 27. Vieira y Messing, *Gene* 19:259-268 (1982).
28. Amann *et al.*, *Gene* 69:301-315 (1988).
29. Studier *et al.*, "Gene Expression Technology: Methods in Enzymology" 185, Academic Press, San Diego, California, 60-89 (1990).
- 20 30. Baldari *et al.*, *Embo J.* 6:229-234 (1987).
31. Kurjan y Herskowitz, *Cell* 30:933-943 (1982).
- 25 32. Schultz *et al.*, *Gene* 54:113-123 (1987).
33. Hinnen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 75:1929 (1978).
- 30 34. Itoh *et al.*, *J. Bacteriology* 153:163 (1983).
- 35 35. Cullen *et al.* *Bio/Technology* 5:369 (1987).
36. Seed, B., *Nature* 329:840 (1987).
37. Kaufman *et al.*, *EMBO J.* 6:187-195 (1987).
38. Sinkar *et al.*, *J. Biosci (Bangalore)* 11:47-58 (1987).
- 40 39. Zambryski *et al.*, "Genetic Engineering, Principles and Methods", Hollaender y Setlow (eds.), Vol. VI, pág. 253-278, Plenum Press, Nueva York (1984).
40. Smith *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165 (1983).
- 45 41. Lucklow, V.A. y Summers, M. D., *Virology* 170:31-39 (1989).
42. Kohler y Milstein *Nature* 256:495-497 (1975).
43. Kozbor *et al.*, *Immunol. Today* 4:72 (1983).
- 50 44. Cole *et al.*, *Methods Enzymol*, 121:140-67 (1986).
45. Huse *et al.*, *Science* 246:1275 (1989).
46. Ward *et al.*, *Nature* 341:544-546 (1989).
- 55 47. McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990).
48. Dobson C. M. (2004) "Experimental investigation of protein folding and misfolding". *Methods.* 34(1):4-14. *Review.*
- 60 49. Prusiner S. B. (2001) "Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions". *N Engl J Med.* 344:1516-26.
50. Selkoe D. J., Schenk D. (2003) "Alzheimer's disease:" "molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics". *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 43:545-84.
- 65

51. St George-Hyslop PH, Petit A. (2005) "Molecular biology and genetics of Alzheimer's disease". *C R Biol*. 328(2):119-30.
- 5 52. Puglielli L., Tanzi R. E., Kovacs D. M. (2003) "Alzheimer's disease." "the cholesterol connection". *Nat Neurosci*. 6:345-51.
53. Mehta P. D., Pirttila T, Mehta S. P. (2000) "Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid beta proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease". *Arch Neurol*. 57:100-5.
- 10 54. Clark C. M., Xie S., Chittams J. *et al.* (2003) "Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid: how well do these biomarkers reflect autopsy-confirmed dementia diagnoses?" *Arch Neurol*. 60:1696-702.
55. Green A. J. (2002) "Cerebrospinal fluid brain-derived proteins in the diagnosis of Alzheimer's disease and Creutzfeldt-Jakob disease". *Neuropathol Appl Neurobiol*. 28:427-40.
- 15 56. Schenk D., Barbour R., Dunn W., Gordon G., Grajeda H., Guido T., Hu K., Huang J., Johnson-Wood K., Khan K., Kholodenko D., Lee M., Liao Z., Lieberburg I., Motter R., Mutter L., Soriano F., Shopp G., Vasquez N., Vandever C., Walker S., Wogulis M., Yednock T., Games D., Seubert P. (1999) "Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse". *Nature*. 400(6740):173-7.
- 20 57. Gilman S., Koller M., Black R. S., Jenkins L., Griffith S. G., Fox N. C., Eisner L., Kirby L., Rovira M. B., Forette F., Orgogozo J. M.; AN1792(QS-21)-201 Study Team. (2005) "Clinical effects of Abeta immunization (AN 1792) in patients with AD in an interrupted trial." *Neurology*. 64(9):1553-62.
- 25 58. Fox N. C., Black R. S., Gilman S., Rossor M. N., Griffith S. G., Jenkins L., Koller M.; AN1792(QS-21)-201 Study Team. (2005) "Effects of Abeta immunization (AN1792) on MRI measures of cerebral volume in Alzheimer disease". *Neurology*. 64(9):1563-72.
- 30 59. Olanow C. W. (2004) "The scientific basis for the current treatment of Parkinson's disease". *Annu Rev Med* 55:41-60.
60. Iwatsubo T. (2003) "Aggregation of alpha-synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease". *J Neurol* 250 Supl. 3:III11-4.
- 35 61. Eriksen J. L., Dawson T. M., Dickson D. W., Petrucelli L. (2003) "Caught in the ac:" "alpha-synuclein is the culprit in Parkinson's disease". *Neuron* 40:453-6.
62. McKeith I., Mintzer J., Aarsland D. *et al.* (2004) "Dementia with Lewy bodies". *Lancet Neurol* 3:19-28.
- 40 63. Masliah E., Rockenstein E., Adame A., Alford M., Crews L., Hashimoto M., Seubert P., Lee M., Goldstein J., Chilcote T., Games D., Schenk D. (2005) "Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease". *Neuron*. 46(6):857-68.
- 45 64. Choi J., Rees H. D., Weintraub S. T., *et al.* (2005) "Oxidative modifications and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson diseases". *J. Bio. Chem.*; 280(12): 11648-11655.
65. Janus, C. *et al.* (2000) *Nature* 408:979-982.
66. Janus, C. (2000) "Neurobiology of Aging" 21: 541-549.
- 50 67. Gass, P. *et al.* (1998) *Learn Mem*. 5:274-288.
68. Wehner, J. M. (1990) *Brain Research* 523: 181-187).
- 55 69. Masliah, E. *et al.* (2000) *Science* 287:1265-1269.
70. Masliah, E. *et al.* (2005) *Neuron* 46:857-868.
- 60 71. Kaye, R. *et al.* "Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis". *Science* 300, 486-9 (2003).
72. Deng, H. X. *et al.* "Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase". *Science* 261, 1047-51 (1993).
- 65 73. Andersen P. M. "Genetics of sporadic ALS." "Amyotroph Lateral Schler Other Motor Neuron Disord". Supl1:S37-41 (2001).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

20 83. Hensley K., Carney J. M., Mattson M. P., Aksenova M., Harris M., Wu J. F., Floyd R. A., Butterfield D. A., "A model for b-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide:" "Relevance to Alzheimer disease". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 91: 3270-3274 (1994).

84. Elam J. S., Taylor A. B., Strange R., Antonyuk S., Doucette P. A., Rodriguez J. A., Hasnain S. S., Hayward L. J., Valentine J. S., Yeates T. O., Hart P. J. *Nat Struct Biol* (2003) 10:461-7.

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

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> Amorfix Life Sciences Ltd University Health Network

<120> Métodos y composiciones para tratar y detectar enfermedades mediadas por la SOD1 mal plegada

<130> 1.10.98336/01

35 <150> US 60/798.727

<151> 09-05-2006

<150> US 60/798.728

40 <151> 09-05-2006

<150> US 60/778.379

<151> 03-03-2006

45 <150> US 11/367.609

<151> 03-03-2006

<150> US 11/565.967

<151> 01-12-2006

50 <160> 31

<170> PatentIn versión 3.3

55 <210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60 <400> 1

Arg Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile
1 5

ES 2 680 020 T3

<210> 2
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 2
 Asp Leu Gly Lys Gly Gly Asn Glu Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn Ala
 1 5 10 15
 Gly Ser
 10
 <210> 3
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 3
 Asn Pro Leu Ser Arg Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 20
 <400> 4
 Lys Ala Val Cys Val Leu Lys
 1 5
 <210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <400> 5
 Ile Lys Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <400> 6
 His Cys Ile Ile Gly Arg Thr Leu Val Val His
 1 5 10
 <210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50
 <400> 7
 Gly Leu His Gly Phe His Val His
 1 5
 55

ES 2 680 020 T3

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Cisteína oxidada a ácido cisteico
 10
 <400> 8

 Arg Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile
 1 5
 15
 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 20
 <400> 9

 Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile
 1 5
 25
 <210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN
 35
 <400> 10

 Gly Gly Arg Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Gly Gly Lys Gly
 1 5 10
 40
 <210> 11
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 11

 Cys Asp Leu Gly Lys Gly Gly Asn Glu Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn
 1 5 10 15
 45
 Ala Gly Ser
 50
 <210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12

 Cys Asn Pro Leu Ser Arg Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu
 1 5 10 15
 55

ES 2 680 020 T3

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Cisteína oxidada a ácido cisteico
 10
 <400> 13

 Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile

 1 5

 <210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 14
 20
 Cys Ile Lys Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe
 1 5 10

 <210> 15
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Cisteína oxidada a ácido cisteico
 30
 <400> 15
 Cys Gly Gly Gly Arg Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 35
 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <400> 16
 Gly Ser Gly Lys Ala Val Cys Leu Lys
 1 5
 45
 <210> 17
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50
 <400> 17

ES 2 680 020 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 18
 <211> 981
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 18

ES 2 680 020 T3

gtttggggcc agagtgggcg aggcgcggag gtctggccta taaagtagtc gcggagacgg 60
 ggtgctgggt tgcgtcgtag tctcctgcag cgtctgggggt ttccgttgca gtcctcggaa 120
 ccaggacctc ggcgtggcct agcgagttat ggcgacgaag gccgtgtgcg tgctgaaggg 180
 cgacggccca gtgcagggca tcatcaattt cgagcagaag gaaagtaatg gaccagtga 240
 ggtgtgggga agcattaaag gactgactga aggcctgcat ggattccatg ttcattgagtt 300
 tggagataat acagcaggct gtaccagtgc aggtcctcac ttaatacctc tatccagaaa 360
 acacgggtggg ccaaaggatg aagagaggca tgttggagac ttgggcaatg tgactgctga 420
 caaagatggg gtggccgatg tgtctattga agattctgtg atctcactct caggagacca 480
 ttgcatcatt ggccgcacac tgggtgtcca tgaaaaagca gatgacttgg gcaaaggtgg 540
 aatgaagaa agtacaaga caggaaacgc tggaaagtcgt ttggcttgtg gtgtaattgg 600
 gatcgcccaa taaacattcc cttggatgta gtctgaggcc ccttaactca tctgttatcc 660
 tgctagctgt agaaatgtat cctgataaac attaaactact gtaatcttaa aagtgaatt 720
 gtgtgacttt ttcagagttg ctttaaagta cctgtagtga gaaactgatt tatgatcact 780
 tggaagattt gtatagtttt ataaaactca gttaaaatgt ctgtttcaat gacctgtatt 840
 ttgccagact taaatcacag atgggtatta aacttgtcag aatttctttg tcattcaagc 900
 ctgtgaataa aaaccctgta tggcacttat tatgaggcta ttaaagaat ccaaattcaa 960
 actaaaaaaaa aaaaaaaaa a 981

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

10 <400> 19
 agguuagcuu gugguguuau agguaua 27

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

<400> 20
 gauuuaggua aaggugguaa ugaagaaagu acuaaaacug guaaugcugg uagu 54

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

25 <400> 21
 aaucuuuaa gucguaaaca cggaggaccg aaggacgagg ag 42

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

ES 2 680 020 T3

<400> 22
 auaaaagggga aaacagaagg acuccacggc uuu 33

5 <210> 23
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 23
 cacuguauua uuggcaggac ccucguuguu cac 33

15 <210> 24
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 24
 cguuuggcuu gugguguaau uggauc 27

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

30 <400> 25
 gcuuguggug uaaugggau c 21

35 <210> 26
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 26
 gacuugggca aagguggaaa ugaagaaagu acaaagacag gaaacgcugg aagu 54

45 <210> 27
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 27
 aauccucuau ccagaaaaca cggugggcca aaggaugaag ag 42

55 <210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

60 <400> 28
 aaggccgugu gcgugcugaa g 21

65 <210> 29
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

70 <400> 29
 auuaaaggac ugacugaagg ccugcaugga uuc 33

75 <210> 30
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 680 020 T3

<400> 30
cauugcauca uuggccgcac acuggugguc cau 33

5 <210> 31
<211> 24
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 31
ggccugcaug gauuccaugu ucau 24

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para su uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), comprendiendo dicha composición un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente seleccionado de:
- 10 (1) un anticuerpo exógeno aislado o fragmento del mismo que se une selectivamente a un epítipo específico de la enfermedad (DSE) seleccionado de:
- 15 i) DLGKGGNEESTKTGNAGS (SEQ ID NO:2) o CDLGKGGNEESTKTGNAGS (SEQ ID NO: 11),
 ii) CIKGLTEGLHGF (SEQ ID NO:14) o IKGLTEGLHGF (SEQ ID NO:5); y
 iii) GLHGFHVH (SEQ ID NO:7); y/o
 iv) un epítipo específico de la enfermedad de uno cualquiera de i), ii) o iii) que comprende uno o más aminoácidos oxidados o nitrados;
- 20 (2) un inmunógeno que comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 5, 7, 11, 14, comprendiendo dicho péptido hasta 50 restos de SOD1, o un inmunógeno de (2) que comprende uno o más aminoácidos oxidados o nitrados.
- 25 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el anticuerpo se une a:
- 30 i) DLGKGGNEESTKTGNAGS (SEQ ID NO:2) o CDLGKGGNEESTKTGNAGS (SEQ ID NO: 11),
 ii) CIKGLTEGLHGF (SEQ ID NO:14) o IKGLTEGLHGF (SEQ ID NO:5); o
 iii) GLHGFHVH (SEQ ID NO:7).
- 35 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el anticuerpo se une a:
- 40 a) DLGKGGNEESTKTGNAGS (SEQ ID NO:2) o CDLGKGGNEESTKTGNAGS (SEQ ID NO: 11); o
 b) DLGKGGNEESTKTGNAGS (SEQ ID NO:2) o CDLGKGGNEESTKTGNAGS (SEQ ID NO: 11), que comprende uno o más aminoácidos oxidados o nitrados.
- 45 4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el anticuerpo se une a:
- 50 a) GLHGFHVH (SEQ ID NO:7), IKGLTEGLHGF (SEQ ID NO:5) o CIKGLTEGLHGF (SEQ ID NO:14); o
 b) GLHGFHVH (SEQ ID NO:7), IKGLTEGLHGF (SEQ ID NO:5) o CIKGLTEGLHGF (SEQ ID NO:14), que comprende uno o más aminoácidos oxidados o nitrados.
- 55 5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el agente es un anticuerpo monoclonal, policlonal, quimérico o humanizado.
- 60 6. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el agente es dicho inmunógeno.
- 65 7. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicha esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es esclerosis lateral amiotrófica esporádica (ELA esporádica).
8. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 o 5, en la que el DSE se modifica por oxidación.
9. Un anticuerpo o una composición que comprende dicho anticuerpo, en el que el anticuerpo se une selectivamente a un DSE de SOD1 seleccionado entre:
- a) CIKGLTEGLHGF (SEQ ID NO:14), IKGLTEGLHGF (SEQ ID NO:5) o GLHGFHVH (SEQ ID NO:7); o
 b) CIKGLTEGLHGF (SEQ ID NO:14), IKGLTEGLHGF (SEQ ID NO:5) o GLHGFHVH (SEQ ID NO:7), que comprende uno o más aminoácidos oxidados o nitrados.
10. Un inmunógeno que comprende un péptido aislado que corresponde a un DSE de SOD1 seleccionado de:
- a) CIKGLTEGLHGF (SEQ ID NO:14), IKGLTEGLHGF (SEQ ID NO:5) o GLHGFHVH (SEQ ID NO:7); o
 b) CIKGLTEGLHGF (SEQ ID NO:14), IKGLTEGLHGF (SEQ ID NO:5) o GLHGFHVH (SEQ ID NO:7), que comprende uno o más aminoácidos oxidados o nitrados,
- en el que dicho péptido comprende hasta 50 restos de SOD1.

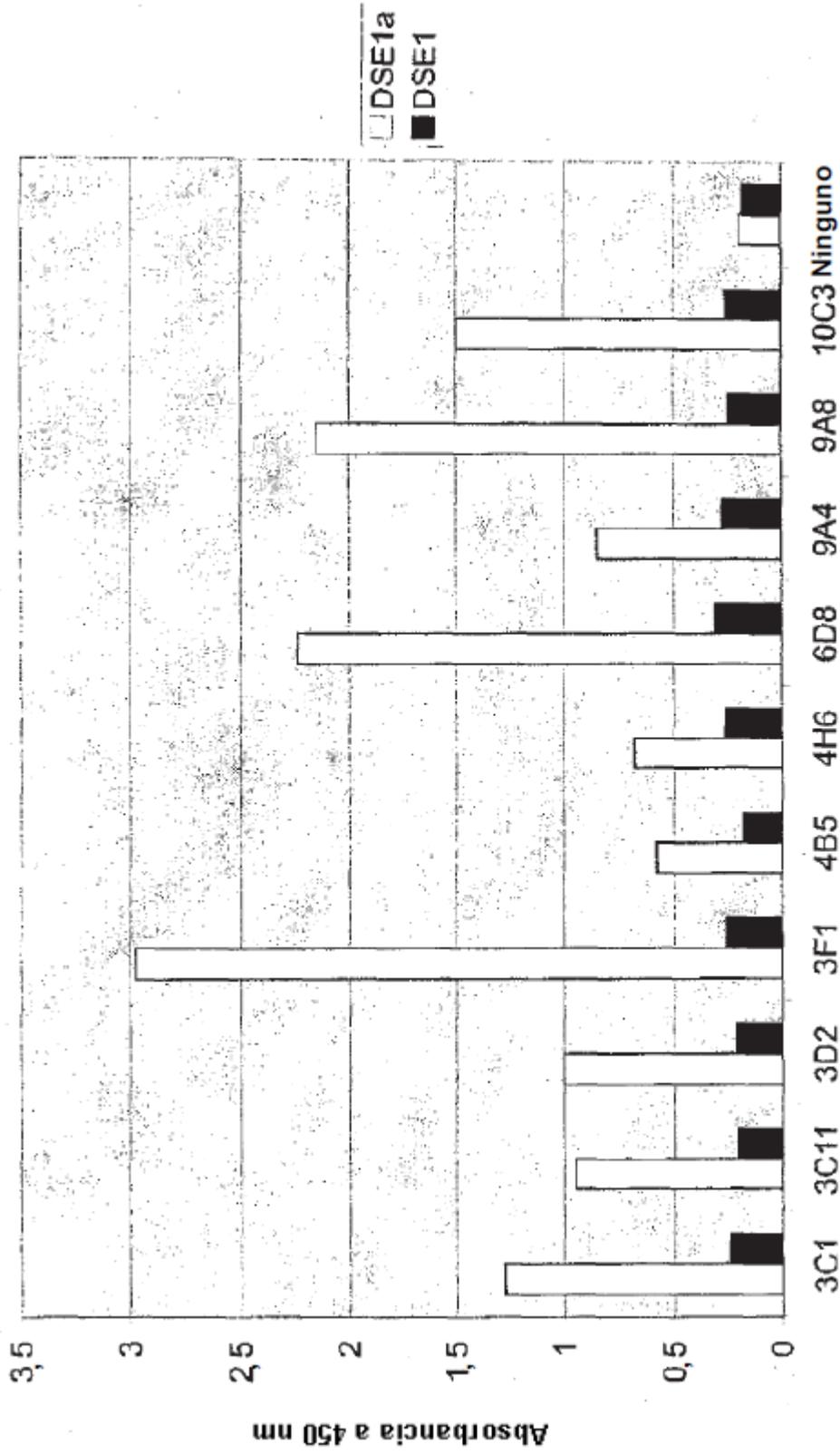
11. Un agente de diagnóstico que comprende (1) un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9 unido a (2) un marcador que produce una señal detectable, directa o indirectamente, comprendiendo el marcador opcionalmente un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto quimioluminiscente, una enzima, un agente de formación de imágenes o un ion de metal.

5 12. Un hibridoma designado 5C6 depositado con el número de acceso 280207-01 ante la Autoridad Depositaria Internacional de Canadá o un hibridoma designado 3H1 depositado con el número de acceso 220207-02 ante la Autoridad Depositaria Internacional de Canadá.

10 13. Un anticuerpo producido por el hibridoma de la reivindicación 12.

14. Un método de obtención de un anticuerpo de la reivindicación 13, que comprende cultivar el hibridoma y aislar dicho anticuerpo.

15



Clon de DSE1a

Figura 1

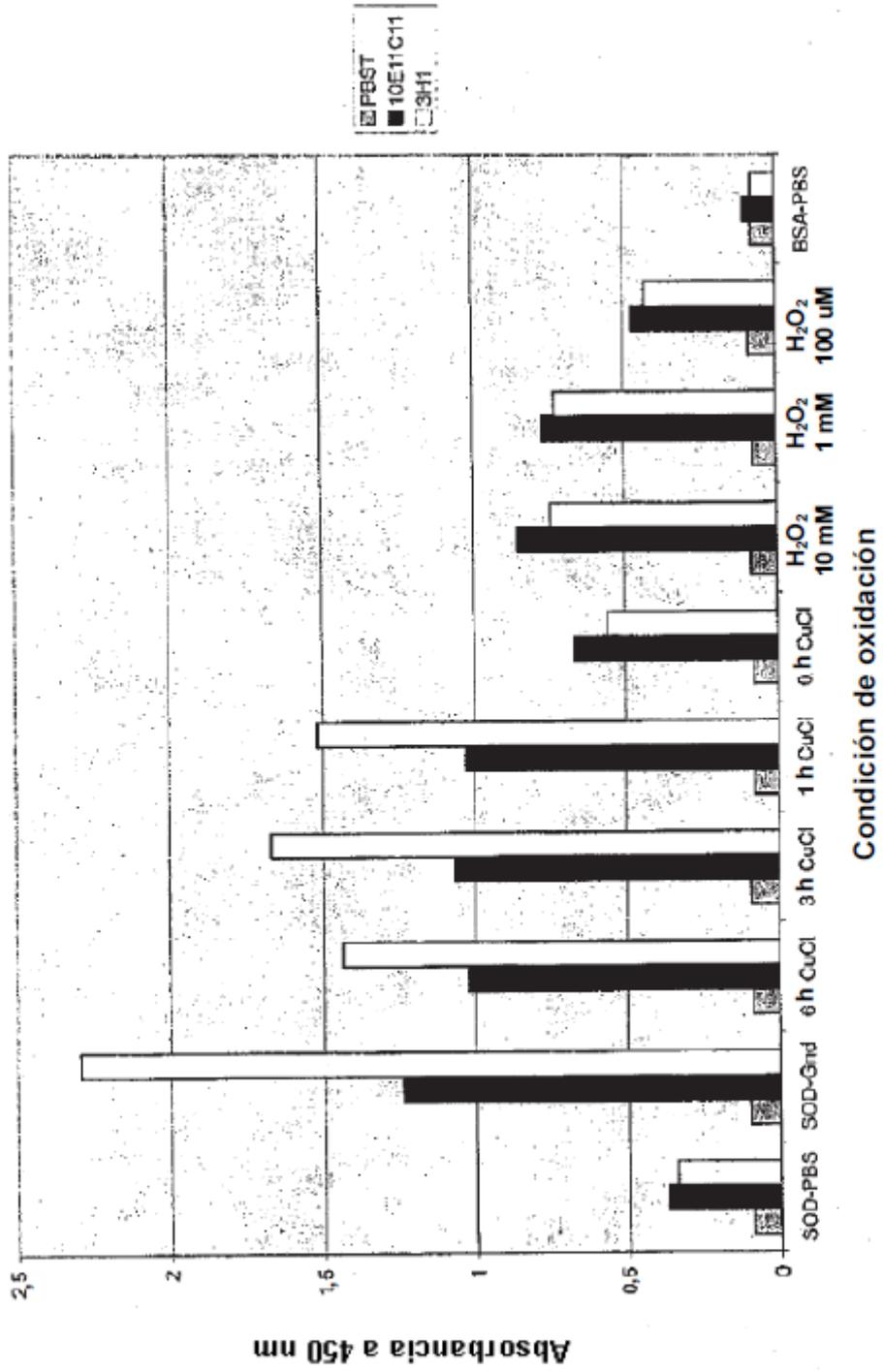
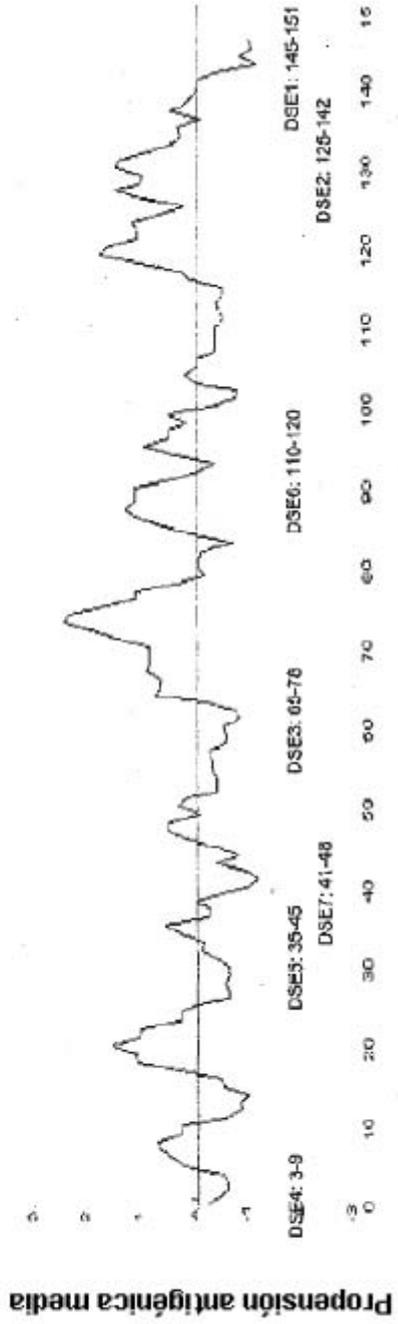
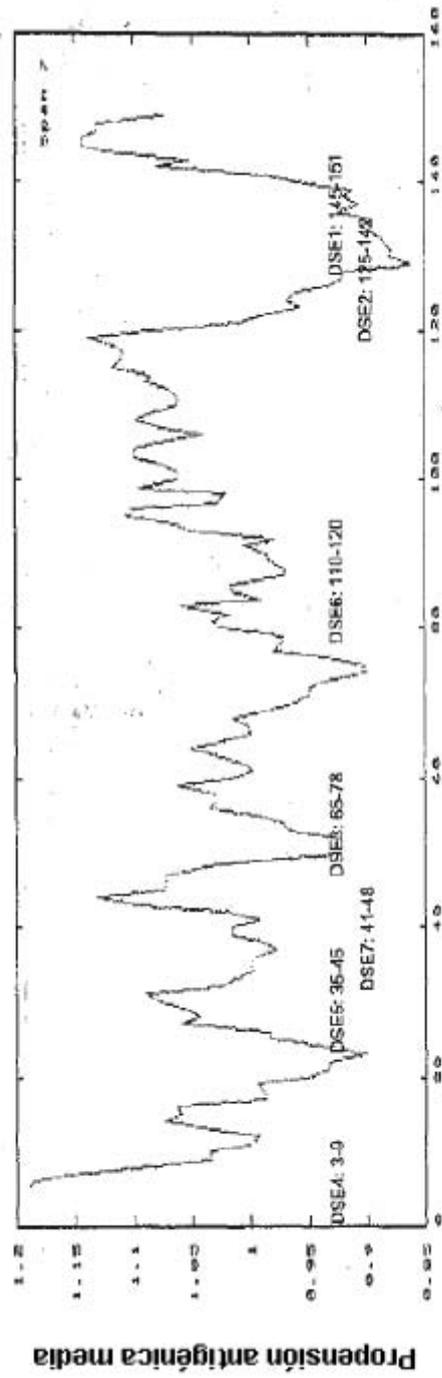


Figura 2

A



B



Número de secuencia de aminoácidos

Figura 3

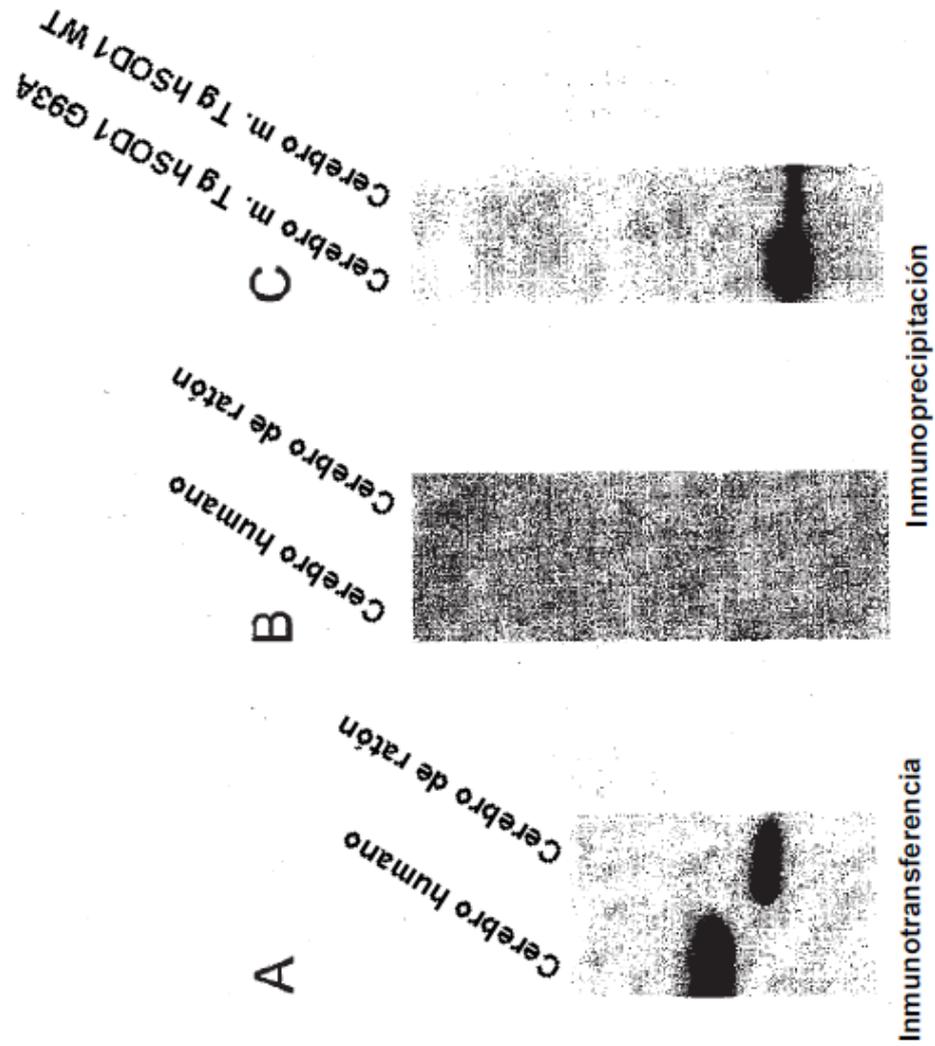
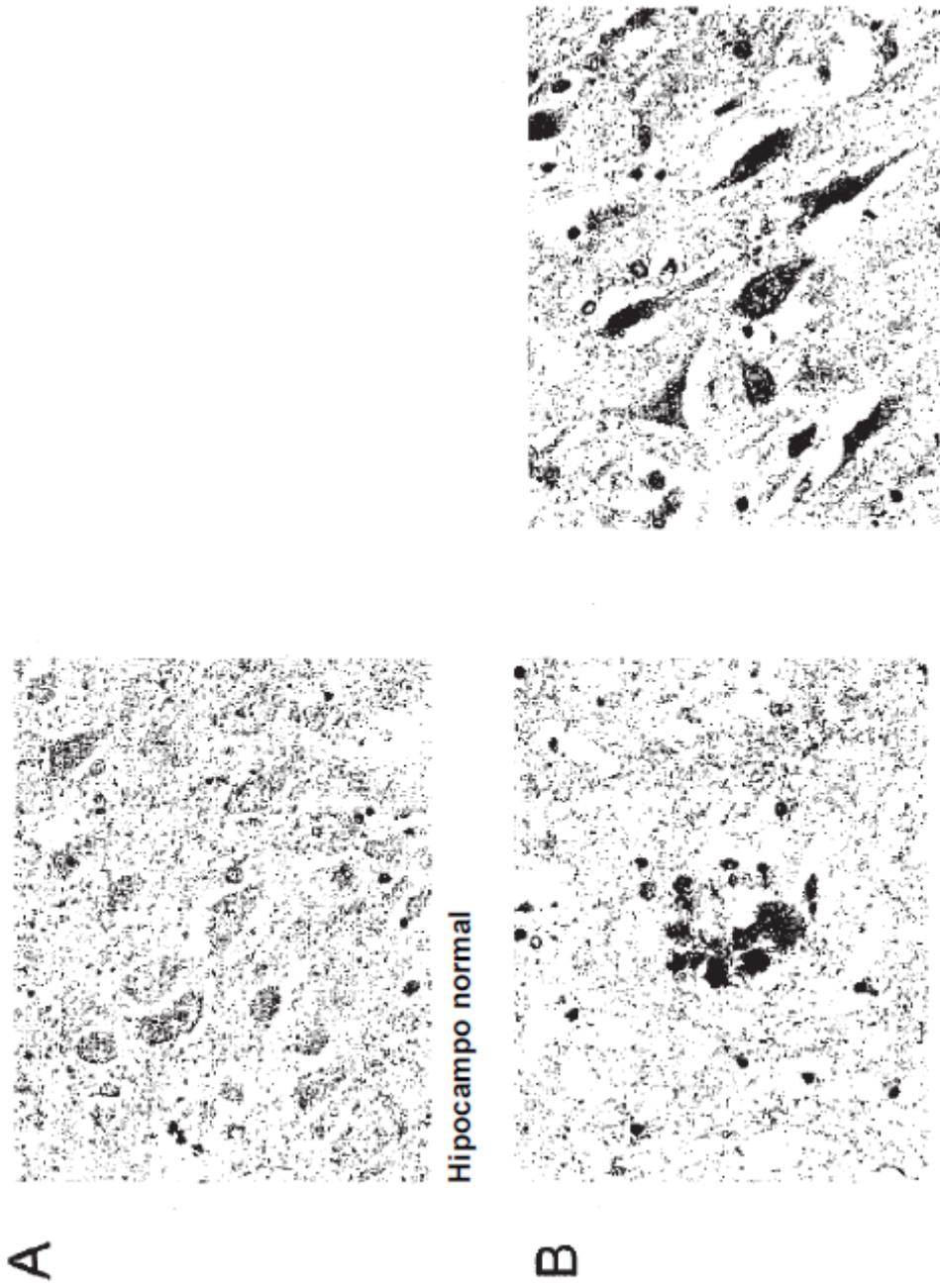


Figura 4



Hipocampo normal

Hipocampo con enfermedad de Alzheimer

Figura 5

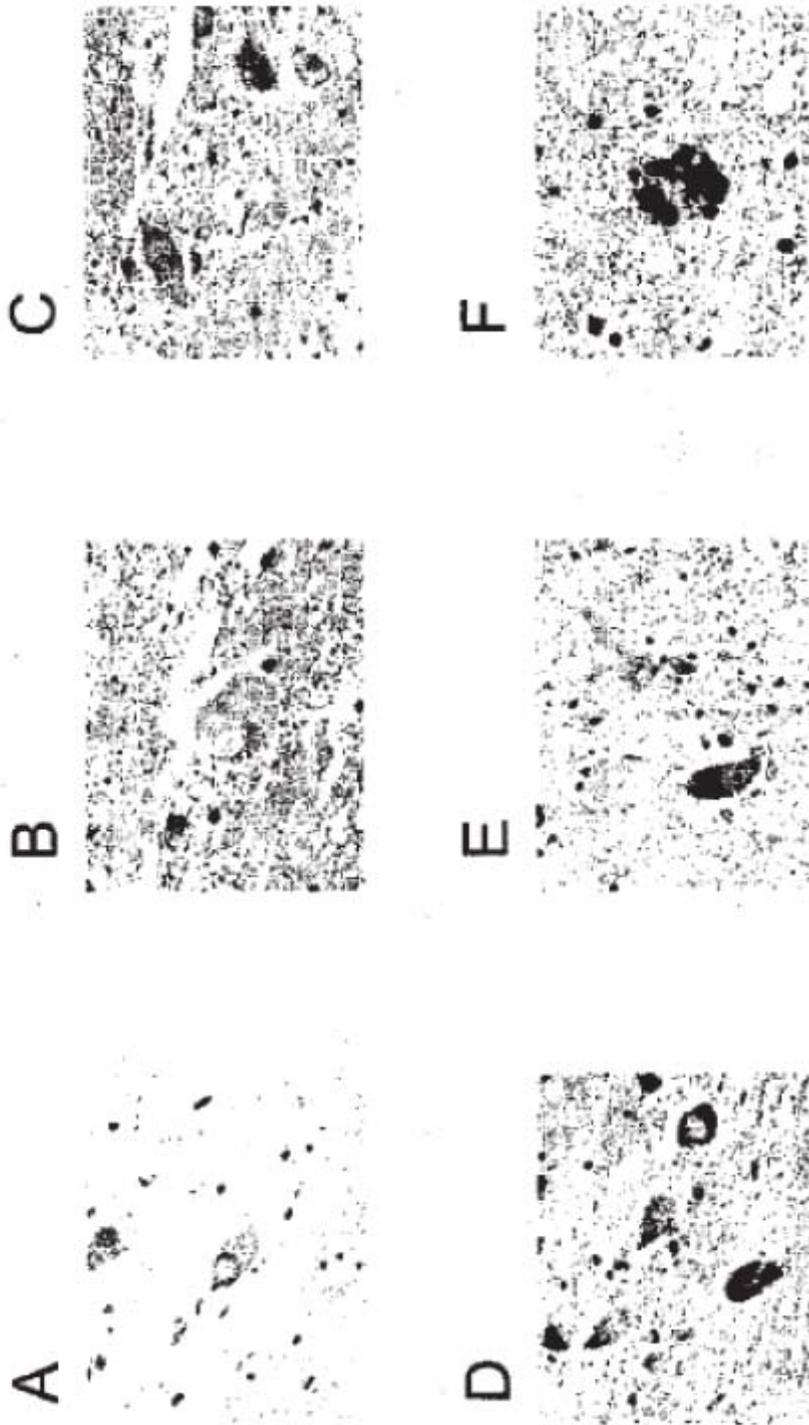


Figura 6