



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 189**

51 Int. Cl.:  
**C12N 7/00** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00954883 .5**  
96 Fecha de presentación : **31.08.2000**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1180938**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.02.2002**

54 Título: **Agentes, composiciones y métodos que los utilizan útiles en el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer.**

30 Prioridad: **03.09.1999 US 152417 P**  
**29.12.1999 US 473653**  
**31.07.2000 US 629971**

73 Titular/es: **Ramot University Authority for Applied  
Research & Industrial Development Ltd.**  
**32 Haim Levanon Street, P.O. Box 39296**  
**Tel Aviv 61392, IL**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**20.08.2010**

72 Inventor/es: **Solomon, Beka;**  
**Frenkel, Dan y**  
**Hanan, Eilat**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**20.08.2010**

74 Agente: **Trigo Peces, José Ramón**

ES 2 344 189 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

Agentes, composiciones y métodos que los utilizan útiles en el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer.

### Campo y antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden un soporte farmacéuticamente aceptable y, como ingrediente activo, un vehículo viral de presentación que es una partícula viral no apta para la propagación *in vivo*, presentando dicho vehículo de presentación un polipéptido, en el que dicho polipéptido comprende al menos un epítipo de beta-amiloide ( $A\beta$ ), y en el que dicho epítipo genera anticuerpos de unión a  $A\beta$  contra dicho epítipo cuando se administra a un sujeto y en el que dichos anticuerpos inhiben la agregación de dicho beta-amiloide.

Las enfermedades que forman placas se caracterizan por la presencia de depósitos de placas amiloides en el cerebro así como por la degeneración neuronal. Los depósitos amiloides se forman por péptidos agregados a una masa insoluble. La naturaleza del péptido varía según las enfermedades pero en la mayoría de los casos, el agregado tiene una estructura de lámina beta y se tiñe con tinción Rojo del Congo. Además de la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Alzheimer de aparición precoz, la enfermedad de Alzheimer de aparición tardía, la enfermedad de Alzheimer presintomática, otras enfermedades caracterizadas por depósitos amiloides son, por ejemplo, la amiloidosis SAA, el síndrome islandés hereditario, el mieloma múltiple, y las enfermedades priónicas. La enfermedad priónica más común en animales son el temblor epidémico (escrapie) de ovejas y cabras y la encefalopatía espongiiforme (BSE) del ganado (Wilesmith y Wells (1991) *Curr Top Microbiol Immunol* 172: 21-38).

En los humanos se han identificado cuatro enfermedades priónicas: (i) kuru, (ii) la enfermedad Creutzfeldt-Jakob (CJD), (iii) la enfermedad Gerstmann-Straussler-Sheinker (GSS), y (iv) y el insomnio familiar fatal (FFI) (Gajdusek (1977) *Science* 197: 943-960; Medori, Tritschler *et al.* (1992) *N Engl J Med* 326: 444-449).

#### *Etiología de enfermedades priónicas*

Las enfermedades priónicas implican la conversión de la proteína priónica celular normal ( $PrP^C$ ) en la correspondiente isoforma escrapie ( $PrP^{Sc}$ ). Las mediciones espectroscópicas demuestran que la conversión de  $PrP^C$  en la isoforma escrapie ( $PrP^{Sc}$ ) supone una importante transición de conformación, implicando que las enfermedades priónicas, como otras enfermedades amiloidogénicas, son trastornos de la conformación proteínica. La transición de  $PrP^C$  a  $PrP^{Sc}$  está acompañada de una disminución de la estructura secundaria  $\alpha$ -helicoidal (del 42% al 30%) y de un notable incremento del contenido en lámina beta (del 3% al 43%) (Caughey *et al.* 1991, Pan *et al.* 1993). Esta reestructuración está asociada a propiedades fisicoquímicas anormales, incluyendo la insolubilidad de detergentes no desnaturizantes y la resistencia parcial a la proteólisis. Estudios anteriores han mostrado que un péptido sintético homólogo a residuos 106-126 de PrP humano (PrP 106-126) muestra algunas de las propiedades fisicoquímicas y patogénicas de  $PrP^{Sc}$  (Selvaggini *et al.* 1993, Tagliavini *et al.* 1993, Forloni, *et al.* 1993). El péptido muestra un notable polimorfismo conformacional, adquiriendo diferentes estructuras secundarias en diversos entornos (De Gioia *et al.* 1994). Tiende a adoptar una conformación de lámina beta en soluciones tamponadas y se acumula en fibrillas amiloides que son resistentes en parte a la digestión con proteasa. Recientemente, los estudios cristalográficos por rayos x de un complejo de anticuerpos 3F4 y su epítipo péptido (PrP 104-113) han proporcionado una visión estructural de esta flexible región que se considera es un componente de la reestructuración conformacional esencial para el desarrollo de una enfermedad priónica (Kanyo *et al.* 1999). La identificación de clases de secuencias que participan en los procesos de plegado-desplegado y/o solubilización-agregación puede abrir una nueva vía en el tratamiento de enfermedades que forman placas, basada en la prevención de la agregación y/o la inducción de la desagregación (Silen y Agard, 1989, Frenkel *et al.* 1998, Horiuchi y Caughey, 1999).

#### *Enfermedad de Alzheimer - consideraciones clínicas*

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno progresivo que tiene como resultado la demencia senil. De manera general, la enfermedad presenta dos categorías: la aparición tardía que se produce en la vejez (normalmente pasados los 65 años) y la aparición precoz que se desarrolla mucho antes del periodo senil, entre los 35 y 60 años por ejemplo. En ambos tipos de enfermedad, la patología es similar, pero las anomalías tienden a ser más graves y generalizadas en los casos que comienzan a una edad temprana. La enfermedad se caracteriza por dos tipos de lesiones del cerebro, las placas seniles y los nudos neurofibrilares. Las placas seniles son áreas de neutrófilos desorganizados de hasta 150 nm con depósitos amiloides extracelulares en el centro, visibles mediante análisis microscópico de secciones de tejido cerebral. Los nudos neurofibrilares son depósitos intracelulares de proteína tau consistentes en dos filamentos enrollados entre sí en parejas.

#### *Placas seniles y otras enfermedades amiloides*

El principal componente de las placas seniles es un péptido denominado  $A\beta$  o péptido beta-amiloide ( $\beta AP$ ). El péptido beta-amiloide es un fragmento interno de 39-43 aminoácidos de una proteína precursora denominada proteína precursora de amiloide (PPA). Varias mutaciones de la proteína PPA han sido correlacionadas con la presencia de la

enfermedad de Alzheimer (Ver, por ej., Goate *et al.*, Nature 349,704, 1991, valina<sup>717</sup> a isoleucina; Chartier Harían *et al.* Nature 353, 844, 1991, valina<sup>717</sup> a glicina; Murrell *et al.*, Science 254, 97, 1991, valina<sup>717</sup> fenilalanina; Mullan *et al.*, Nature Genet. 1, 345, 1992, una mutación doble, cambiando lisina<sup>595</sup>-metionina<sup>596</sup> por asparagina<sup>595</sup>-leucina<sup>596</sup>).

5 Se cree que tales mutaciones causan la enfermedad de Alzheimer por el procesamiento incrementado o alterado de la PPA en beta-amiloide, en particular, por el procesamiento de la PPA en cantidades mayores de la forma larga del beta-amiloide (es decir, A $\beta$ 1-42 y A $\beta$ 1-43). Se cree que las mutaciones en otros genes, como los genes de la presenilina, PS1 y PS2, afectan indirectamente el procesamiento de la PPA generando mayores cantidades del beta-amiloide de forma larga (ver Hardy, TINS 20, 154, 1997). Estas observaciones indican que el beta-amiloide y en particular su forma larga, es un elemento causativo de la enfermedad de Alzheimer.

15 También se conocen otros péptidos o proteínas de los que hay pruebas de auto-agregación, como por ejemplo, sin ánimo de ser exhaustivos, la amilina (Young AA. *et al.*, 1994, FEBS Lett, 343(3);237-41); bombesina, ceruleína, octapéptido de colecistokinina, eledoisina, pentapéptido relacionado con la gastrina, tetrapéptido de gastrina, somatostatina (reducida), sustancia P; y péptido, hormona que libera la hormona luteinizante, somatostatina N-Tyr (Banks y Kastin, Prog Brain Res., 91:139-4, 1992).

20 La unión de anticuerpos monoclonales de elevada afinidad (mAbs) a dichas regiones puede alterar la dinámica molecular de todo el conjunto o cadena de proteínas. Mediante la selección adecuada, se ha descubierto que los anticuerpos monoclonales (mAbs) reconocen epítomos incompletamente plegados y que inducen la conformación nativa en proteínas parcial o incorrectamente plegadas (Frauenfelder *et al.* 1979, Blond y Goldberg 1987, Karplus y Petsko 1990, Carlson y Yarmush 1992, Solomon y Schwartz 1995).

### 25 *Tratamiento*

La Patente U.S. N° 5.688.561 Solomon enseña métodos de identificar anticuerpos monoclonales eficaces para desagregar agregados de proteínas e impedir la agregación de dichas proteínas. Específicamente, la Patente US N° 5.688.561 muestra anticuerpos monoclonales anti-beta-amiloides eficaces para desagregar placas beta-amiloides e impedir la formación de placas beta-amiloides *in vitro*. La Patente U.S. N° 5.688.561 estipula el uso *in vivo* de dichos anticuerpos para impedir la formación de placas por agregación de placas beta-amiloides o para desagregar placas beta-amiloides que ya se hayan formado. Sin embargo, estas demostraciones no identifican un epítomo que se pueda emplear para generar dichos anticuerpos. Además, estas demostraciones no proporcionan medios para permitir la penetración de dichos anticuerpos en el cerebro a través de la barrera hematoencefálica (BHE). Además, esta patente no muestra el uso de la tecnología de visualización del fago como método para suministrar antígenos o anticuerpos. Y aún más, la Patente US N° 5.688.561 no muestra resultados experimentales de la efectividad *in vivo* de dichos anticuerpos.

40 La EP 526511 de McMichael muestra la administración de dosis homeopáticas (menos de o igual a 10<sup>-2</sup> mg/día) de beta-amiloide a pacientes con EA preestablecida. En un ser humano típico con unos 5 litros de plasma, incluso el límite superior de esta dosis debería generar una concentración de no más de 2 pg/ml. La concentración normal del beta-amiloide en el plasma humano se encuentra por lo general en el rango de 50-200 pg/ml (Seubert *et al.*, Nature 359, 325-327 1992). Dado que esta dosis propuesta apenas alteraría el nivel del beta-amiloide endógeno en circulación y dado que la EP 526511 no recomienda el uso de un coadyuvante, no parece plausible que resulte de ella ningún beneficio terapéutico.

45 PCT/US98/25386 de Schenk y un artículo en *Nature* de Schenk *et al.* (Nature, 400:173-177, 1999) muestran la administración de inmunógenos beta-amiloides a un paciente a fin de generar anticuerpos para prevenir la formación de placas o disolver las placas existentes. Según Schenk, se necesita de 50 a 100 mg de antígeno, de 1 a 10 mg si se emplea un coadyuvante. Estas enseñanzas también estipulan que se puede lograr un efecto similar con la administración directa de anticuerpos contra el beta-amiloide, sin tener en cuenta en ambos casos la barrera hematoencefálica que, en circunstancias normales, impide la penetración de anticuerpos en el cerebro.

55 También es importante observar que estas enseñanzas están normalmente restringidas al uso de "...cualquiera de las formas que se producen de manera natural del péptido beta-amiloide y particularmente las formas humanas (es decir, A $\beta$ 39, A $\beta$ 40, A $\beta$ 41, A $\beta$ 42 o A $\beta$ 43)" o "...polipéptidos más largos que incluyen, por ejemplo, un péptido beta-amiloide, fragmento o análogo activo junto con otros aminoácidos", o "multímeros de agentes inmunogénicos monoméricos".

60 Estas enseñanzas ignoran, sin embargo, datos anteriores que muestran que los primeros 28 aminoácidos del beta-amiloide son suficientes para provocar anticuerpos que desagregan o inhiben la agregación de placas beta-amiloides *in vitro* (Hanan y Solomon, Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest. 3:130-133, 1996; Solomon *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:452-455, 1996; Solomon *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:4109-4112, 1997).

65 Schenk and Schenk *et al.* no logran mostrar el uso del epítomo N-terminal de placas beta-amiloides del que se sabe que es un epítomo secuencial compuesto de solamente cuatro residuos aminoácidos (EFRH, SEC N° ID:1) situados en posiciones 3-6 del péptido beta-amiloide (Frenkel D., J. Neuroimmunol., 88:85-90, 1998). Posteriormente se ha demostrado que los anticuerpos contra este epítomo desagregan las fibrillas beta-amiloides, restauran la solubilización de placas beta-amiloides e impiden los efectos neurotóxicos sobre las células PC 12 (Solomon, B. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94:4109-4112, 1997; y Solomon, B., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93:452-455, 1996).

Este epítipo ha sido independientemente confirmado como el epítipo unido por anticuerpos anti-agregantes utilizando presentación de fago de hexapéptido combinatoria aleatoria (Frenkel y Solomon, J. of Neuroimmunol. 88:85-90, 1998).

5 El epítipo EFRH (SEC N° ID:1) está disponible para la unión de anticuerpos cuando el péptido beta-amiloide se encuentra tanto en solución como en agregados. El bloqueo de este epítipo por un anticuerpo monoclonal impide la auto-agregación y permite la resolubilización de agregados ya formados.

10 Estos hallazgos sugieren que las enseñanzas de Schenk y sus colegas son ineficientes en el mejor de los casos. Dado que, como ya se ha mencionado más arriba, la concentración normal del beta-amiloide en el suero humano es de 50-200 pg/ml, se podría esperar que la inmunización con ese péptido produjera bajos títulos de anticuerpos o una elevada toxicidad si se utilizan fuertes coadyuvantes y por lo tanto no es aplicable para terapia. De hecho, a fin de lograr títulos significativos del suero de anticuerpos contra beta-amiloides se requirió una serie de 11 inyecciones mensuales (Schenk *et al.*, Nature, 400:173-177, 1999). El grado en que persistirán estos títulos del suero a lo largo del tiempo no se conoce todavía y este punto es especialmente crucial con respecto a la aparición precoz de la enfermedad de Alzheimer.

20 Schenk y sus colegas también enseñan que un péptido inmunogénico como el beta-amiloide puede ser presentado sobre la superficie de un virus o bacteria. Sin embargo, no logran enseñar el uso de un antígeno así presentado para lograr la inmunización. No se hace mención a un epítipo en este contexto y tampoco se proporcionan datos experimentales. Además, ni en Schenk o en Schenk *et al.* tampoco se enseña el suministro de anticuerpos en un vehículo de presentación. WO01/15655 A muestra anticuerpos contra péptidos de neurofilamentos, un importante componente del citoesqueleto neuronal que puede ser utilizado para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

25 Colectivamente, el estado de la técnica no es capaz de mostrar medios con los que se pueda generar *in vivo* un título efectivo de anticuerpos anti-agregación en un corto espacio de tiempo y/o ser introducido en el cerebro de los pacientes que sufran una enfermedad en la que se forman placas. Además, no ha sido establecida la persistencia de títulos generados a través de las enseñanzas de la técnica anterior.

30 Existe por lo tanto una necesidad ampliamente reconocida y sería altamente beneficioso contar con medios efectivos de desagregar placas amiloides *in vivo* que tuvieran un efecto duradero, elevada eficiencia, comienzo rápido, sin efectos adversos sobre el sujeto tratado y que se pudieran producir rápidamente a gran escala.

### 35 **Resumen de la invención**

Según un aspecto de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica, que comprende un soporte farmacéuticamente aceptable y, como ingrediente activo, un vehículo viral de presentación que es una partícula viral no apta para la propagación *in vivo*, presentando dicho vehículo de presentación un polipéptido, en el que dicho polipéptido comprende al menos un epítipo de beta-amiloide ( $A\beta$ ), y en el que dicho epítipo genera anticuerpos de unión a  $A\beta$  contra dicho epítipo cuando se administra a un sujeto y en el que dichos anticuerpos inhiben la agregación de dicho beta-amiloide.

45 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona el uso de la composición farmacéutica arriba mencionada en la fabricación de un medicamento para tratar la enfermedad de Alzheimer.

De acuerdo también con otra característica de la invención la enfermedad de Alzheimer se selecciona a partir del grupo que consiste en la aparición precoz de la enfermedad de Alzheimer, la aparición tardía de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Alzheimer presintomática.

50 De acuerdo con otras características de la invención el vehículo es una partícula viral no apta para la propagación *in vivo*.

55 De acuerdo también con otras características de las realizaciones preferentes de la invención descritas la partícula viral se selecciona de entre el grupo consistente en una partícula viral ADN bicatenaria, una partícula viral ADN monocatenaria, una partícula viral ARN de cadena positiva y una partícula viral ARN de cadena negativa.

60 De acuerdo también con otras características de las realizaciones preferentes de la invención descritas el vehículo de presentación es un bacteriófago.

De acuerdo también con otras características de las realizaciones preferentes de la invención descritas el vehículo de presentación es un bacteriófago filamentosos.

65 De acuerdo también con otras características de las realizaciones preferentes de la invención el vehículo de presentación bacteriófago es fd.

De acuerdo con otras características de la invención, el vehículo de presentación es incapaz de propagación *in vivo*.

## ES 2 344 189 T3

De acuerdo también con otras características de las realizaciones preferentes de la invención una triple dosis de  $10^{10}$  unidades del vehículo de presentación elegido induce un título de anticuerpos de al menos 1:50.000 a los 30 días de administración, tal como ha sido medido por ELISA.

- 5 De acuerdo también con otras características de la invención la porción inmunológica de un anticuerpo sirve para unir al menos un epítipo de beta-amiloide ( $A\beta$ ) siendo capaz dicha porción inmunológica de dicho anticuerpo de desagregar y/o impedir la agregación de dicho  $A\beta$ .

### Breve descripción de los dibujos

10

En los dibujos:

Fig. 1a es una representación esquemática de un anticuerpo IgM.

15

Fig. 1b es una fotografía de bromuro de etidio tintado al 1,5% en gel de agarosa mostrando fragmentos cADN de las cadenas ligera y pesada de IgM508. Vía 1: Kb (Escalera); Vías 2 y 3  $V_H$  y fragmentos  $V_L$ , respectivamente, como lo indican las flechas.

20

Fig. 1c es una fotografía de bromuro de etidio tintado al 1,5% en gel de agarosa mostrando fragmento ADN scFv derivado de anticuerpo IgM 508. Vía 1: Kb (Ladder); Vía 2: scFv 508 DNA (750 bp).

Fig. 1d es una representación esquemática de fago filamentoso que muestra un scFv.

Fig. 1e es una representación esquemática de un scFv soluble.

25

Fig. 2 es un mapa físico de plásmido pCC-508F que se utiliza para la producción de la proteína de fusión scFv-508-CBD (también denominada aquí como 508(Fv)-CBD) bajo control de promotor lac. Amp res - un gen que codifica la  $\beta$ -lactamasa;  $V_H$  y  $V_L$  - secuencias que codifican los dominios variables de las cadenas ligera y pesada de scFv-508, respectivamente; Lin - un gen que codifica un enlace (Gly4Ser)<sub>3</sub> (SEC N° ID:2) presente entre los dominios variables  $V_H$  y  $V_L$ . También se muestra los sitios de restricción y posiciones de los mismos.

30

Fig. 3 es un mapa físico de plásmido pFEKCA-508 que se utiliza de acuerdo con la presente invención para expresión citoplásmica de la proteína de fusión scFv-508-CBD bajo el control de un promotor T7. Amp res - un gen que codifica la  $\beta$ -lactamasa;  $V_H$  y  $V_L$  - secuencias que codifican los dominios variables de las cadenas ligera y pesada de scFv-508, respectivamente; Lin - un gen que codifica un enlace (Gly4Ser)<sub>3</sub> (SEC N° ID:2) presente entre los dominios variables  $V_H$  y  $V_L$ . Secuencias T7 de promotor y T7 terminador - T7 promotor y T7 terminador, respectivamente. También se muestra los sitios de restricción y posiciones de los mismos.

35

Fig. 4 muestra un análisis del  $\beta$ AP al que se une el anticuerpo 508(Fv)-CBD en un ensayo ELISA. Los anticuerpos analizados fueron añadidos a pocillos revestidos con  $\beta$ AP. Se detectaron anticuerpos unidos con anticuerpos secundarios conjugados con HRP. El anticuerpo 508 IgM parental fue utilizado como un control positivo. El anticuerpo anti- $\beta$ -galactosidasa Gal6(Fv)-CBD fue utilizado como control negativo.

40

Fig. 5 muestra el análisis PCR de insertos de ADN bacteriófagos. ADN aislado de pCC-508(Fv), vía 2, y pCC-Gal6(Fv), vía 3, fue amplificado por PCR y separado en un gel de agarosa al 1,5%. Se utilizó tinción de bromuro de etidio e iluminación UV para visualizar las bandas. La vía 1 contiene marcador del tamaño del ADN. La flecha indica la posición de un scFv intacto migrando a aproximadamente 750 bp.

45

Fig. 6 muestra la expresión y purificación de 508(Fv)-CBD. De 5 a 10  $\mu$ g de proteína fueron cargados en cada vía con un gel de poliacrilamida SDS al 14%. Las proteínas fueron visualizadas mediante tinción Coomassie azul brillante. La flecha marca la posición de la proteína de fusión scFv-CBD. Vía 1 - extracto total de células a partir de células BL21(DE3) no inducidas que portan el vector de expresión 508(Fv)-CBD. Vía 2 - extracto total de células a partir de células BL21(DE3) que portan el vector de expresión 508(Fv)-CBD inducido durante 3 horas con IPTG. Vía 3 - cuerpos de inclusión lavados, solubilizados y reducidos que fueron utilizados en el replegado. Vía 4 - proteína que no se unió a celulosa durante el replegado asistido por celulosa. Vía 5 - proteína separada de la celulosa con TBS. Vía 6 - proteína separada de celulosa cristalina con agua destilada. Vía 7 - 508(Fv)-CBD soluble recuperada de la celulosa por neutralización y elución de pH elevado.

55

Fig. 7 muestra la estabilidad de 508(Fv)-CBD. La proteína 508(Fv)-CBD purificada fue almacenada a 4°C durante un día (cuadrados oscuros) o una semana (círculos oscuros), y luego analizada para ver la unión  $\beta$ AP en un ensayo ELISA, tal como se describe en la leyenda de la Figura 4. El anticuerpo no relacionado Gal6(Fv)-CBD sirvió de control negativo (cuadrados abiertos).

60

Fig. 8 muestra la determinación de la afinidad-enriquecimiento de mutantes 508(Fv) por análisis de restricción del ADN y PCR. Se analizó el ADN de 19 clones de micro biblioteca 508(Fv)-mutantes antes (Figura 8a) y de 11 clones recogidos después de un ciclo de selección por afinidad (Figura 8b). El ADN fue digerido con *PvuI* y separado en un gel de agarosa al 1,5%. Una scFv-CBD no mutada aparece como un fragmento 1250 bp intacto (flecha superior). Un clon mutado está indicado por la aparición de los fragmentos 700 bp (flecha media) y 550 bp (flecha inferior). En la vía 1 se muestra un marcador de tamaño del ADN.

65

Fig. 9 muestra un análisis de la unión del  $\beta$ AP (Figura 9a) y estabilidad (Figura 9b) de derivados 508(Fv) mutados en un ensayo ELISA. Los anticuerpos analizados fueron añadidos a pocillos revestidos de  $\beta$ AP. Se detectaron anticuerpos unidos almacenados a 4°C durante un día o durante una semana tal como se describe en la leyenda de la Figura 7. 508(Fv) tipo salvaje (cuadrados abiertos), C96F (cuadrados oscuros), C96Y (círculos oscuros), C96S (triángulos oscuros). El anticuerpo Gal6 (Fv)-CBD anti- $\beta$ -galactosidasa no relacionado fue utilizado como control negativo (cuadrados abiertos).

Fig. 10 muestra un análisis de la inhibición específica de la unión del  $\beta$ AP por el anticuerpo 508F(Fv) en un ensayo ELISA competitivo. El anticuerpo fue pre-incubado con diversas concentraciones de los péptidos competitivos:  $\beta$ AP (ácidos 1-16 de SEC N° ID:3) (cuadrados negros) o el péptido no relacionado WVLD (SEC N° ID:4) (cuadrados abiertos), antes de ser añadidos a pocillos revestidos de  $\beta$ AP. Se detectaron anticuerpos unidos como se describe en la leyenda de la Figura 7.

Las Figs. 11a y 11b muestran secuencias de nucleótidos (SEC N° ID: 5) y de aminoácidos deducidas (SEC N° ID:6) de la cadena pesada de scFv 508F (Figura 11a); y la región variable y enlace de la cadena ligera (Figura 11b). La secuencia de aminoácidos está presentada por un código de tres letras; Los CDRs y el enlace están subrayados.

Fig. 12 muestra la prevención del efecto tóxico mediado por  $\beta$ AP sobre células PC 12 por 508F(Fv). Las células fueron incubadas con  $\beta$ A fibrilar únicamente o con  $\beta$ A fibrilar que había sido incubado con anticuerpos a diferente fracción molar de anticuerpo/ $\beta$ AP, tal como se indica. Se utilizó un ensayo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT) para calcular la supervivencia de las células.

Fig. 13 muestra la desagregación de  $\beta$ A fibrilar por 508F(Fv). El estado fibrilar de las fibrillas de  $\beta$ A preformadas fue medido con o sin incubación con anticuerpos a diferente fracción molar de anticuerpo/ $\beta$ AP, tal como se indica. Se utilizó la fluorescencia del reactivo tioflavina-T (ThT) en un ensayo ThT que es proporcional a las fibrillas de  $\beta$ A para evaluar la morfología de las fibrillas.

Las Figs. 14a-d muestran la detección de fago filamentoso (f88-EFRH) en secciones del cerebro vía inmunofluorescencia un día después de que fuera aplicada una sola dosis intranasalmente. Aparición de fago filamentoso en el bulbo olfatorio y secciones del hipocampo de ratones utilizando anticuerpo fluorescente de antifago de conejo (Figuras 14a y 14c, respectivamente) comparado con un cerebro de conejo no tratado (Figuras 14b y 14d, respectivamente). Las secciones fueron observadas utilizando un microscopio de fluorescencia a una ampliación final de x 10.

Las Figs. 15a-d muestran la desaparición del fago filamentoso (f88-EFRH) del cerebro del ratón 28 días después de una única administración intranasal. La desaparición del fago filamentoso del bulbo olfatorio y del hipocampo de ratones se demuestra en secciones de estos órganos utilizando anticuerpo fluorescente de antifago de conejo (Figuras 15a y 15c, respectivamente), en comparación con un cerebro de ratón no tratado (Figuras 15b y 15d, respectivamente). Las secciones fueron observadas utilizando un microscopio de fluorescencia a una ampliación final de x 10.

Las Figs. 16a-d muestran la histología de secciones cerebrales de ratón después de la administración del fago f88-EFRH. Secciones cerebrales del órgano olfatorio (Figura 16a) e hipocampo (Figura 16c) 28 días después de la administración del fago f88-EFRH fueron tintadas con hematoxilina y eosina, y comparadas con secciones de un cerebro no tratado (Figuras 16b y 16d, respectivamente). Las secciones tintadas fueron examinadas y fotografiadas con una ampliación final de x 40.

Las Figs. 17a-d muestran la detección por fluorescencia de biotina del fago pCC-508F acoplado a  $\beta$ AP biotinilado (ácidos 1-16 de SEQ ID NO:3) en secciones cerebrales del ratón después de una única administración intranasal. Aparición de  $\beta$ AP (ácidos 1-16, SEC N° ID:3) acoplado a fago filamentoso mostrando scFv508F en secciones del bulbo olfatorio y del hipocampo de ratones utilizando estreptavidina asociada a PE (Figuras 17a y 17c, respectivamente) en comparación con un cerebro de ratón no tratado (Figuras 17b y 17d, respectivamente). Las secciones fueron observadas utilizando un microscopio de fluorescencia a una ampliación final de x 20.

Las Figs. 18a-d muestran la histología de un cerebro de ratón después de la administración de fago pCC-508F asociado a  $\beta$ AP biotinilado (ácidos 1-16 de SEC N° ID:3). Secciones del órgano olfatorio (Figura 18a) e hipocampo (Figura 18b) un día después de la administración del fago fueron tintadas con hematoxilina y eosina, y comparadas con secciones de cerebro de ratón no tratadas (Figuras 18c y 18d, respectivamente). Las secciones tintadas fueron examinadas y fotografiadas a una ampliación final de x 40.

La Fig. 19 es un diagrama del programa de inmunización con fago filamentoso mostrando el epítipo EFRH (SEC N° ID:1) de péptido  $\beta$ -amiloide.

Las Figs. 20a y 20b muestran la inmunización con fago filamentoso f3 mostrando el epítipo EFRH (SEC N° ID: 1) de péptido  $\beta$ -amiloide como una fusión de glicoproteína III (gpIII) de fago. Título de suero IgG de diferentes sangrados de ratones inmunizados con el EFRH-fago de acuerdo con el programa de la Figura 19 contra proteínas de la capa del fago filamentoso de tipo salvaje (Figura 20a) y el epítipo N-terminal (ácidos 1-16, SEC N° ID:3) de  $\beta$ -amiloide (Figura 20b).

## ES 2 344 189 T3

La Fig. 21 muestra la inmunización de larga duración con fago filamentoso f3. Título de suero IgG de diferentes sangrados de ratones inmunizados con el EFRH-fago contra proteínas de la capa del fago filamentoso de tipo salvaje y el epítipo N-terminal (ácidos 1-16, SEC N° ID:3) de  $\beta$ -amiloide.

5 La Fig. 22 muestra la unión del anticuerpo monoclonal  $\beta$ AP anti-agregación (mAb 10D5) a un fago que presenta péptidos seleccionado de una biblioteca f88 de fagos. Se utilizó mAb 5.5 no relacionado cultivado contra receptor de acetilcolina como control negativo. Se añadieron anticuerpos a pocillos revestidos de fago y se utilizó el ensayo ELISA para detectar la unión.

10 La Fig. 23 muestra la unión de  $\beta$ AP mAb (10D5) anti-agregación a un YYEFRH (SEC N° ID:7)-fago y VHEP-HEFRHVALNPV (SEC N° ID:8)-fago. Se añadieron anticuerpos en concentración de 1 g/ml a pocillos revestidos de fago y la unión fue analizada mediante el ensayo ELISA. Se utilizó como control fago filamentoso sin insertos.

15 Las Figs. 24a-b muestran la inmunización con fago filamentoso f88 presentando el epítipo EFRH (SEC N° ID:1) del péptido  $\beta$ -amiloide como una fusión de glicoproteína VIII (gpVIII) de fago. Título de suero IgG de diferentes sangrados de ratones inmunizados con el EFRH-fago contra proteínas de la capa del fago filamentoso de tipo salvaje (Figura 24a) y el epítipo N-terminal (ácidos 1-16, SEC N° ID:3) del péptido  $\beta$ -amiloide (Figura 24b).

20 La Fig. 25 muestra la inhibición del suero de un ratón inmunizado a unirse a  $\beta$ AP por péptidos sintéticos derivados de N-terminal del péptido  $\beta$ -amiloide. El ensayo se realizó con una dilución 1:3000 de suero después de que una tercera inmunización con f88-EFRH reaccionara con los diversos péptidos en varias concentraciones por pocillo, tal como se indica. Se utilizó el péptido WVLD (SEC N° ID:4) como control negativo.

25 La Fig. 26 muestra la prevención del efecto tóxico mediado por  $\beta$ AP sobre células PC 12 por anticuerpos de suero cultivados contra f88-EFRH-fago. Las células fueron incubadas con  $\beta$ A fibrilar únicamente, o con  $\beta$ A fibrilar que había sido incubado con suero procedente del tercer sangrado a diferente concentración. El control negativo fue suero de un ratón no inmunizado. Se utilizó el ensayo MTT para estimular la supervivencia de las células.

30 La Fig. 27 muestra la interferencia con la formación de  $\beta$ -amiloide fibrilar por anticuerpos en suero cultivados contra el f88-EFRH-fago. Estimación de la fluorescencia de ThT que se correlaciona con la cantidad de  $\beta$ -amiloide fibrilar formado después de la incubación durante una semana a 37°C en presencia de muestras de suero diluidas tal como se indica. El control negativo fue suero de un ratón no inmunizado. El control positivo se hizo sin suero. La formación de fibrillas se midió mediante el ensayo ThT.

35 La Fig. 28 ilustra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la proteína priónica humana 106-126 (SEC N° ID:25) y a su homóloga en el ratón.

40 La Fig. 29 muestra el efecto de neurotoxicidad del péptido PrP medido en el ensayo MTT. Se cultivó células PC 12 en una placa de 96 pocillos en un medio DMEM complementado con insulina 2  $\mu$ M, 2M L-glutamina y 100 unidades de penicilina/estreptomocina. La viabilidad celular fue evaluada mediante el ensayo MTT después de incubación con PrP 106-126, (a diferentes concentraciones). El PrP 106-126 fue o bien preincubado durante 4 días a 37°C y luego añadido a las células durante 3 días (barras grises), o bien fue preincubado durante 4 días a 37°C y luego añadido a las células durante 5 días (barras blancas) o fue preincubado durante 7 días a 37°C y fue luego añadido a las células durante 5 días (barras negras).

45 La Fig. 30 ilustra el alcance de la agregación del péptido PrP, utilizando el ensayo de unión ThT. El PrP 106-126 (0-0.8 mg/ml) fue incubado durante 7 días a 37°C y se midió la emisión a 482 nm para determinar el alcance de la agregación.

50 La Fig. 31 muestra el efecto protector de mAbs 3-11, 2-40 sobre la neurotoxicidad del péptido PrP. Se cultivó células PC 12 en una placa de 96 pocillos en un medio DMEM complementado con insulina 2  $\mu$ M, 2M L-glutamina y 100 unidades de penicilina/estreptomocina y fueron incubadas durante tres días. Se realizaron los siguientes tratamientos: (1) Control Positivo, células no tratadas; (2) 100  $\mu$ M PrP 106-126 que fueron preincubadas durante 7 días a 37°C; (3,4,5) un péptido agregado que fue preincubado durante 1 hora antes de su exposición a las células junto con el mAbs 3-11 (tratamiento 3), 2-40 (tratamiento 4) y 3F4 (tratamiento 5). La viabilidad celular fue evaluada utilizando el ensayo MTT.

55 La Fig. 32 ilustra la modulación de la conformación del PrP por el mAbs. El PrP 106-126 (0.3 mg/ml) fue incubado durante 7 días a 37°C (1) y con mAbs 2-40, 3-11 y 3F4 (tratamientos 2, 3 y 4, respectivamente). Los anticuerpos fueron incubados con la muestra durante 24 horas o bien antes de la incubación del PrP (barras grises) o una semana después de la incubación del PrP (barras blancas). La formación de fibrillas fue evaluada mediante el ensayo de enlace ThT.

60 La Fig. 33 muestra el efecto protector dependiente de la concentración de mAb 3-11 contra la formación del agregado fibrilar PrP. El PrP 106-126 (0.3 mg/ml) fue incubado durante 7 días a 37°C con mAb 3-11 diluido (1:1, 1:10, 1:50, correspondiente a tratamientos 1, 2, y 3, respectivamente). El anticuerpo fue incubado con la muestra durante 24 horas o bien antes (barras grises), o después de (barras blancas) la semana de incubación del PrP. La formación de fibrillas amiloides se evaluó utilizando el ensayo de enlace ThT.

**Descripción de las realizaciones preferentes de la invención**

La presente invención se refiere a agentes y composiciones farmacéuticas que pueden ser utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Concretamente, la presente invención puede ser utilizada para (i) inducir la inmunidad activa a antígenos derivados de placas en un receptor por inmunización con al menos un epítipo de beta-amiloide ( $A\beta$ ) en un vehículo de presentación, de modo que los anticuerpos provocados en respuesta a la inmunización sean capaces de prevenir la formación de placas y/o de desagregar las placas existentes; y (ii) inducir la inmunidad pasiva administrando al menos una porción inmunológica de un anticuerpo que pueda unirse a al menos un epítipo de  $A\beta$  dirigido contra antígenos derivados de placas, clonado y presentado en un vehículo de presentación, capaz de evitar la formación de placas y de desagregar las placas existentes. Esta inmunidad pasiva puede ser de una duración excepcionalmente larga si el vehículo de presentación empleado es capaz de reproducirse en el receptor.

Los principios y el funcionamiento de la presente invención se pueden comprender mejor con referencia a los dibujos y descripciones que la acompañan.

Como se ilustra con más amplitud en los Ejemplos 1-15 de la sección de Ejemplos siguiente, los antígenos derivados del péptido beta-amiloide fueron presentados en la superficie de un fago filamentoso que fue utilizado para la inmunización de animales experimentales. Todos los péptidos empleados contenían el epítipo EFRH (SEC N° ID:1, residuos 3-6, SEC N° ID:3) del péptido beta-amiloide (SEC N° ID:3). El epítipo fue presentado como una proteína de fusión de glicoproteína III o VIII con capa de fago fd. Se emplearon dosis que iban de 1010 a 1012 fagos por inyección en un ratón BALB/c hembra de 8 semanas. El programa de inmunización típico incluía tres inyecciones a intervalos de 14 días, administradas intraperitoneal o intranasalmente.

Durante y después del proceso de inmunización, se analizó el título de anticuerpos en suero del ratón para la producción de anticuerpos específicos  $A\beta$  por el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) tal como se detalla en los métodos y materiales a continuación. Posteriormente se demostró que los títulos del suero persistían durante 11 meses como respuesta a un protocolo que incluía solamente 3 inmunizaciones. Mientras que todos los epítopos analizados que contenían EFRH produjeron un título, presentar el epítipo en la superficie de un vehículo de presentación produjo títulos mucho más elevados e inesperados. Se cree que estos títulos elevados son el resultado del gran número de copias presentadas al sistema inmune utilizando este método y esta idea está respaldada por resultados de ensayos de unión utilizando cantidades controladas de sueros.

Las propiedades de anti-agregación del anticuerpo policlonal obtenido dirigido contra epítopos EFRH con respecto a la formación de fibrillas beta-amiloides fueron medidas mediante el ensayo de unión ThT. El suero, a la dilución de 1:10 y 1:100, interrumpió la formación de la estructura fibrilar del  $\beta$ -amiloide con un deterioro considerable de la morfología fibrilar, tal como lo indica una reducción sustancial de fluorescencia ThT. El suero no relacionado utilizado como control (suero de un ratón no inmunizado) no inhibió de forma significativa la formación fibrilar.

También se determinó el efecto del mismo suero sobre la alteración de fibrillas  $\beta A$  ya formadas (la forma tóxica de  $\beta AP$ ). El suero de ratones inmunizados por EFRH con fibrillas  $\beta A$  preformadas alteró la estructura fibrilar. El anticuerpo de control no relacionado no tuvo un efecto significativo sobre la morfología fibrilar. Unidos, estos resultados confirman la capacidad del epítipo EFRH presentado en vehículos de presentación adecuados de provocar la producción de anticuerpos anti-agregación, que pueden inhibir o invertir el proceso de formación fibrilar.

El suero diluido producido de acuerdo con la presente invención impidió la neurotoxicidad del péptido beta amiloide. Este resultado implica la utilidad clínica potencial para impedir el deterioro cerebral de pacientes que presentan formación de placas amiloides.

Como se ilustra con más amplitud en los Ejemplos 15-21 de la sección de Ejemplos más adelante, se descubrió que los anticuerpos dirigidos (designados mAbs 3-11 y 2-40), que fueron generados contra péptidos derivados de priones, son útiles para prevenir o desagregar placas generadas por priones.

La unión del péptido derivado de príon (PrP 106-126) a estos mAbs produjo un efecto altamente protector contra la agregación tal como fue medido por los ensayos ThT y MTT. Los mAbs generados por la presente invención también redujeron de manera significativa la agregación fibrilar del péptido y convirtieron la forma agregada en una conformación desagregada tal como se determinó en el ensayo de unión ThT.

La unión de mAbs 3-11 y 2-40 al péptido PrP ya sea en solución o al agregado sugiere que este epítipo está implicado en el proceso de agregación y puede actuar como un centro regulador controlando tanto la solubilización como el proceso de desagregación del péptido PrP y tal vez de toda la proteína PrP.

Según un aspecto de la presente invención se suministra un agente para tratar la enfermedad de Alzheimer. El agente según este aspecto de la presente invención comprende un vehículo de presentación que presenta un polipéptido, siendo el vehículo de presentación una partícula viral no apta para la propagación *in vivo*, representando el polipéptido al menos un epítipo de beta-Amiloide ( $A\beta$ ), y siendo capaz dicho epítipo de provocar anticuerpos capaces de desagregar y/o impedir la agregación de  $A\beta$ .

## ES 2 344 189 T3

Según otro aspecto más de la presente invención se suministra una composición farmacéutica para tratar la enfermedad de Alzheimer. La composición de acuerdo con este aspecto de la presente invención comprende una cantidad efectiva de un vehículo de presentación que presenta un polipéptido, siendo el vehículo de presentación una partícula viral no apta para la propagación *in vivo*, representando el polipéptido al menos un epítipo de A $\beta$ , siendo capaz dicho epítipo de provocar una cantidad efectiva de anticuerpos capaces de desagregar y/o impedir la agregación de A $\beta$ , y un soporte farmacéuticamente aceptable.

El uso de antígenos de péptido beta amiloide en conjunción con coadyuvantes para efectuar la inmunización ha sido difícil hasta ahora debido a la combinación de elevada toxicidad y títulos bajos resultantes. Utilizando métodos del estado anterior de la técnica como punto de partida, se llevó a cabo la inmunización de un ratón con un péptido beta-amiloide de 16 aminoácidos conjugado KLH (SEC N° ID:9). Esta inmunización produjo un título bajo pero mensurable contra beta-amiloide.

La esplenectomía del ratón inmunizado facilitó la preparación del hibridoma IgM 508 expresando scFvAb con especificidad para beta-amiloide. A continuación se extrajo el ARN de este hibridoma y se empleó para la clonación de anticuerpos. El hibridoma IgM 508 mostró actividad específica en A $\beta$ , para impedir su efecto tóxico sobre células PC 12 (Anavi, S. 1998, M. Se. tesis del departamento de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Universidad de Tel-Aviv, Israel). Se clonaron separadamente las secuencias V<sub>H</sub> y V de IgM 508 y se unieron utilizando un vector disponible en el mercado para formar un anticuerpo monocatenario con especificidad anti-beta-amiloide. Este anticuerpo monocatenario fue expresado a continuación como una proteína de fusión en una biblioteca de presentación de fagos y se seleccionaron clones con una actividad anti beta-amiloide para propagación en *E. coli*.

Otra realización de la invención fue demostrada al determinar las constantes de unión aparentes del anticuerpo purificado que presentaban fago a beta amiloide y que fueron medidas por el procedimiento ELISA y se obtuvo la unión media-máxima a una concentración de anticuerpos de 340 ng/ml, correspondiente a  $8 \times 10^{-6}$  M. Este resultado anticipa que el anticuerpo monocatenario preparado será efectivo en condiciones *in vivo*. Este fago también será capaz de alterar las estructuras fibrilares ya formadas confirmando que el anticuerpo monocatenario purificado es biológicamente activo, tal como lo sugiere la determinación de la constante de unión.

Al llevar otro aspecto de la presente invención a la práctica se descubrió que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra una secuencia de péptidos de una proteína priónica eran eficaces para desagregar o impedir la formación de placas priónicas.

Un modelo para evaluar la toxicidad del PrP 106-126 fue establecido por los presentes inventores y lo utilizaron para someter a prueba la efectividad de dos clones de inmunoglobulina [designados mAb 3-11 (IgM) y mAb 2-40 (IgG1)] en cuanto a sus capacidades neuroprotectoras y desagregadoras.

Como se detalla con más amplitud en los Ejemplos 15-21, ambos mAb 3-11 y mAb 2-40 redujeron de manera significativa los efectos tóxicos dosis-dependientes del PrP 106-126 sobre células PC-12. La co-incubación de mAb 3-11 con PrP 106-126 impidió la agregación fibrilar, mientras que la administración de mAb 3-11 a agregados ya formados, tuvo como resultado la desagregación del 50% de las fibrillas amiloides (Ejemplo 21).

A efectos de esta especificación y las reivindicaciones que la acompañan los términos “paciente”, “sujeto” y “receptor” se utilizan de manera intercambiable. Incluyen humanos y otros mamíferos que son el objeto de tratamiento profiláctico, experimental o terapéutico.

A efectos de esta especificación y las reivindicaciones que la acompañan los términos “péptido beta amiloide” es sinónimo de “péptido  $\beta$ -amiloide”, “ $\beta$ AP”, “ $\beta$ A”, y “A $\beta$ ”. Todos estos términos se refieren a péptidos que forman placas derivados de la proteína precursora de amiloide.

Tal como se utiliza aquí, “proteína PrP”, “PrP”, “prión” y “proteína priónica” se refieren a polipéptidos que son capaces, bajo las condiciones apropiadas, de inducir la formación de agregados responsables de enfermedades provocadas por placas. Por ejemplo, la proteína priónica celular normal (PrPC) se convierte en tales condiciones en la correspondiente isoforma escrapie (PrP<sup>Sc</sup>) que es responsable de enfermedades por la formación de placas como, sin ánimo de exhaustividad, la encefalopatía espongiforme bovina (EEB), o enfermedad de las vacas locas, la encefalopatía espongiforme felina de los gatos, kuru, la enfermedad Creutzfeldt-Jakob (CJD), la enfermedad Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), y el insomnio familiar fatal (IFF).

Tal como se utiliza en la especificación y en las reivindicaciones, el término “desagregación” se refiere a la solubilización de proteínas agregadas unidas normalmente por enlaces no covalentes.

A efectos de esta especificación y las reivindicaciones que la acompañan los términos “comprendiendo” se refieren a la inclusión de uno o más elementos enumerados pero no excluyen otros elementos no específicamente enumerados. Por ejemplo, una composición que comprende el péptido A $\beta$  abarca un péptido aislado A $\beta$  y un péptido A $\beta$  como componente de una secuencia de polipéptidos más grande. De manera similar, una porción inmunológica de un anticuerpo puede ser incluida como parte más grande del anticuerpo, es decir, todo el anticuerpo.

Tal como se utiliza en la especificación y en la sección de reivindicaciones que sigue, el término “tratamiento” incluye fundamentalmente inhibir, ralentizar e invertir la progresión de una enfermedad, especialmente la mejora de los síntomas clínicos de una enfermedad o impedir la aparición de síntomas clínicos de una enfermedad.

5 Dado que las placas amiloides asociadas a las enfermedades descritas aquí están localizadas en el cerebro, cualquier modalidad de tratamiento propuesto debe demostrar una capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) así como una capacidad de disolver las placas amiloides. Normalmente, el tamaño medio de moléculas capaz de penetrar la barrera hematoencefálica es aproximadamente 2 kDa. Los anticuerpos monoclonales se encuentran normalmente en el rango de 135-900 kDa. Por lo tanto, el futuro uso terapéutico de anticuerpos en el tratamiento de enfermedades de placas amiloides debe basarse o bien en la reducción de su tamaño concurrente con la retención de actividad o bien en el desarrollo de nuevas estrategias de suministro.

15 Los pequeños péptidos sintéticos consistentes en epítopos de antígenos, como el epítipo EFRH (SEC N° ID:1) de A $\beta$  o el péptido PrP 106-126 (SEC N° ID:25) descritos aquí, son por lo general malos antígenos y necesitan ser acoplados a un soporte más grande. Incluso después de acoplarse pueden inducir sólo una respuesta inmune de baja afinidad. Por ejemplo, la inyección de A $\beta$ -KLH o fibrilla-A $\beta$  provoca una respuesta inmune muy lenta (Anavi, S., 1998, M. Se. tesis del departamento de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Universidad de Tel-Aviv, Israel) y se han realizado muchos esfuerzos para evitar la respuesta de baja afinidad con éxito limitado.

20 Dado que los efectos patológicos de los polipéptidos que forman placas se mantienen solamente en el sistema nervioso central (SNC), la capacidad de Abs altamente específicos de prevenir dichas placas *in vivo* depende de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE). Por ejemplo, en la etapa progresiva de la EA, las pruebas demuestran la alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, que puede conducir al suministro directo de dicho anticuerpo desde la periferia al SNC para desagregar placas ya formadas y minimizar otros efectos tóxicos (Schenk *et al.*, Nature 1999, 100:173-177). Realizaciones preferentes de la presente invención incluyen el suministro directo de Abs monoclonales presentados en vehículos de presentación al cerebro a través de la barrera hematoencefálica.

30 Un creciente conjunto de pruebas muestra que las carencias olfativas y cambios degenerativos en las vías olfativas centrales se ven tempranamente afectados durante el desarrollo clínico de la EA. Además, los patrones anatómicos implicados en la EA sugieren que las vías olfativas pueden ser la etapa inicial del desarrollo de la EA.

35 Las neuronas receptoras olfativas son células bipolares que residen en el revestimiento epitelial de la cavidad nasal. Sus axones atraviesan la placa cribiforme y se proyectan hacia la primera sinapsis de la vía olfativa en la vía olfativa del bulbo olfatorio del cerebro. Esta configuración los convierte en una autopista por la que los virus y otras sustancias transportadas pueden tener acceso al SNC a través de la barrera hematoencefálica.

40 En las primeras etapas de la EA, la BHE puede limitar la entrada de anticuerpos que circulan por la periferia del SNC. En cambio, los anticuerpos anti-agregación A $\beta$  presentados sobre una superficie de fago tienen el potencial no sólo de ser directamente suministrados al SNC por administración intranasal sino también de impedir los daños olfativos permanentes causados por el  $\beta$ A en los pacientes. Como se ha indicado previamente, la administración intranasal (Mathison *et al.*, J. Drug Target, 1998) 5(6), 415-441; Chou *et al.*, Biopharm Drug Dispos. 1997) 18(4):335-46; *et al.*, Gene Therapy 1995) 2:418-423) permite la entrada directa de virus y macromoléculas en el LCR (líquido cefalorraquídeo) o SNC.

45 El uso de neuronas receptoras olfativas como punto de suministro de un vector de adenovirus está recogido en la bibliografía. Se dice que este método provoca la expresión de un gen indicador en el cerebro durante 12 días sin toxicidad aparente (Draghia *et al.*, Gene Therapy 2:418-423, 1995).

50 Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, un vehículo que presenta una porción inmunológica de un anticuerpo capaz de desagregar, o impedir la formación de un agregado de polipéptidos asociado a la enfermedad de Alzheimer es suministrado a través de esta ruta al cerebro en el que el vehículo de presentación es una partícula viral no apta para la propagación *in vivo*.

55 Dado que A $\beta$  es continuamente producido por células en tejidos periféricos que atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE) produciendo efectos tóxicos localizados en poblaciones neuronales específicas, la administración intranasal de dicho vehículo puede impedir también la progresión de la enfermedad minimizando la cantidad de A $\beta$  periférico disponible para formar placas.

60 El uso de vehículos de presentación tales como fagos filamentosos como sistema de suministro de medicamentos al SNC abre nuevos horizontes a enfoques terapéuticos para la enfermedad de Alzheimer, así como para otras enfermedades neurodegenerativas que impliquen la agregación extracelular tóxica de péptidos humanos tales como por ejemplo, enfermedades generadas por priones.

65 El vehículo de presentación de acuerdo con la presente invención es de tipo viral (por ej., bacteriófago, como un bacteriófago filamentosos, fd, por ejemplo). Por lo tanto, el vehículo de presentación puede ser un virus de ADN bicatenario, un virus de ADN monocatenario, un virus ARN (cadena positiva o negativa). El vehículo de presentación es una partícula no apta para la propagación *in vivo*.

El fago o vehículo viral está pensado como un enfoque terapéutico *in vivo* dirigible. Aunque se han expresado preocupaciones sobre la posible infección de la flora natural intestinal (Delmastro *et al.*, Vaccine 1997, 15: 1276-1285; Willis *et al.*, Gene. 1993, 128:79-83; Poul *et al.*, J. Mol. Biol. 1999, 288, 203-211), la inactivación UV del fago mostró (Delmastro *et al.*, Vaccine 1997, 15: 1276-1285) que son tan inmunogénicos como sus homólogos infecciosos. El uso de fago inactivado puede impedir la incorporación de transgenes codificados del fago en el núcleo para su expresión subsiguiente en células anfitrionas (Larocca *et al.*, 1998, Hum. Gene Ther. 9:2393-2399), una importante consideración práctica. Por lo tanto, los vehículos de presentación empleados en la presente invención son no replicantes.

El fago o presentación del virus implica la expresión de clones cADN como proteínas de fusión con fago o proteínas de membrana viral. Si los cADNs seleccionados para expresión codifican antígenos, el fago o virus puede ser empleado como un vehículo de presentación de antígenos que puede replicarse opcionalmente dentro de un receptor.

Como se ha descrito anteriormente, de acuerdo con las realizaciones preferentes de la presente invención, los antígenos presentados por un fago o virus pueden ser utilizados directamente para vacunación, sin purificación de los antígenos. En este caso, el grueso de las proteínas con envoltura sirve para estimular una respuesta general inmune porque son “no autónomas” con respecto al sujeto vacunado. La fusión proteína de membrana-antígeno provoca un anticuerpo específico contra epítopos en el producto genético cADN presentado.

La presentación viral o fago de anticuerpos se lleva a cabo, por ejemplo, fusionando la secuencia de codificación de las regiones variables del anticuerpo a un fago o proteína de membrana viral. Para ello, el mRNA de regiones (V) variables ( $V_H$  y  $V_L$ ), aislado de las células que producen anticuerpos es transcrito a la inversa en cADN y las cadenas pesadas y ligeras ensambladas al azar para codificar Fv de cadena sencilla (scFv). Estas casetes son clonadas directamente en un vector adecuado como un vector fagémido para expresión y presentación en el fago o superficie del virus. Esta conexión entre genotipo del anticuerpo y el fenotipo permite el enriquecimiento del fago específico de antígenos o anticuerpos del virus, utilizando antígeno etiquetado o inmovilizado. El fago o virus que presenta un anticuerpo relevante será retenido sobre una superficie revestida con antígeno, mientras que los fagos o virus no adherentes serán eliminados. Los fagos o virus unidos pueden ser recuperados de la superficie, re infectados en células anfitrionas adecuadas y recultivados para proseguir su enriquecimiento y finalmente para análisis de unión.

El éxito de la presentación de virus o fago con anticuerpo radica en la combinación de este método de presentación y enriquecimiento. Los genes de anticuerpos del virus o fago pueden ser secuenciados, mutados y filtrados para mejorar la unión del antígeno.

Es posible reordenar los genes que codifican las diversas regiones de una molécula de anticuerpo de manera que su especificidad y afinidad con un antígeno se vean alteradas. El anticuerpo puede ser mantenido en la superficie del fago o virus para seguir con su manipulación o ser liberado como fragmento soluble scFv (~25 kDa).

Desde su invención al principio de la década de 1990, la presentación de fago con anticuerpos ha revolucionado la generación de anticuerpos monoclonales y su utilización. Ello se debe a que la presentación del fago permite a los anticuerpos ser realizados completamente *in vitro*, evitando el sistema inmunológico y el procedimiento de inmunización y permitiendo el diseño *in vitro* de la afinidad y especificidad del anticuerpo. Se ha previsto por lo tanto que las estrategias de desarrollo de vacunas más eficientes utilizarán esta tecnología.

Se puede añadir características adicionales al vector para garantizar su seguridad y/o mejorar su eficacia terapéutica. Dichas características incluyen, por ejemplo, marcadores que pueden ser utilizados para seleccionar negativamente contra células infectadas con el virus recombinante como sensibilidad antibiótica. La selección negativa es por lo tanto un medio con el que se puede controlar la infección porque suministra el suicidio inducible a través de la adición de un antibiótico. Dicha protección garantiza que si, por ejemplo, surgen mutaciones que producen formas alteradas del vector viral o secuencia recombinante, no se producirá transformación celular. También se puede incluir características que limitan la expresión a tipos particulares de células. Dichas características incluyen, por ejemplo, elementos promotores y reguladores que sean específicos para el tipo de célula deseado.

Los virus son agentes infecciosos muy especializados que han evolucionado en muchos casos para eludir los mecanismos de defensa del anfitrión. Normalmente, los virus infectan y se propagan en tipos específicos de células. La especificidad de destino de los vectores virales utiliza su especificidad natural para dirigirse específicamente a tipos de células predeterminados e introducir de ese modo un gen recombinante en la célula infectada.

Como se utiliza en esta especificación y en las reivindicaciones que siguen, el término polipéptido se refiere a un tramo de aminoácidos covalentemente unidos a través de enlaces peptídicos. Diferentes polipéptidos tienen diferentes funcionalidades de acuerdo con la presente invención. Mientras que de acuerdo con un aspecto de la invención un polipéptido se deriva de un inmunógeno designado para inducir una respuesta inmune activa en un receptor, de acuerdo con otro aspecto, un polipéptido se deriva de un anticuerpo que se produce como resultado de la provocación de una respuesta inmune activa, en por ejemplo, un animal y que puede servir para inducir una respuesta inmune pasiva en el receptor. En ambos casos, sin embargo, el polipéptido está codificado por un polinucleótido de acuerdo con cualquier uso posible de un codón.

Tal como se utiliza aquí, la frase “respuesta inmune” o su equivalente “respuesta inmunológica” se refiere al desarrollo de una respuesta beneficiosa humoral (mediada por anticuerpo) y/o celular (mediada por células T específicas

de antígeno o sus productos de secreción) dirigida contra una proteína de agregación (péptido que forma placas) en un paciente receptor. Dicha respuesta puede ser una respuesta activa inducida por la administración de inmunógenos o una respuesta pasiva inducida por la administración de anticuerpos o células T cebadas. Una respuesta inmune celular es provocada por la presentación de epítomos de polipéptido en asociación con moléculas MHC Clase I o Clase II, para activar células T CD4<sup>+</sup> coadyuvantes específicas de antígenos y/o células T citotóxicas CD8<sup>+</sup>. La respuesta puede también implicar la activación de monocitos, macrófagos, NK, células, basófilos, células dendríticas, astrositos, células de la microglia, eosinófilas u otros componentes de inmunidad innata.

Tal como se utiliza aquí “inmunidad activa” se refiere a cualquier inmunidad conferida a un sujeto por la administración de un antígeno.

Tal como se utiliza aquí “inmunidad pasiva” se refiere a cualquier inmunidad conferida a un sujeto sin la administración de un antígeno. La “inmunidad pasiva” incluye por lo tanto, la administración de un vehículo de presentación replicante que incluya una porción inmunológica de un anticuerpo presentado en su superficie a un receptor. Aunque la replicación de dicho vehículo sea activa, la respuesta inmune es pasiva desde el punto de vista del receptor.

A efectos de esta especificación y de las reivindicaciones que la acompañan, los términos “epítomo” y “determinante antigénico” se utilizan manera intercambiable para referirse a un sitio en un antígeno al que responden células T y/o B. Los epítomos de células-B pueden formarse de aminoácidos contiguos o de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegado terciario de una proteína. Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen normalmente por exposición a disolventes desnaturizantes mientras que los epítomos formados por plegado terciario se pierden normalmente en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítomo incluye normalmente al menos 3, y de manera más general, al menos 5 o 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Entre los métodos para determinar la conformación espacial de epítomos se incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Ver, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996). Se puede identificar anticuerpos que reconocen el mismo epítomo en un inmunoensayo simple mostrando la capacidad de un anticuerpo de bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno de destino. Las células-T reconocen epítomos continuos de aproximadamente nueve aminoácidos para células CD8 o aproximadamente de 13 a 15 aminoácidos para células CD4. Las células T que reconocen el epítomo pueden ser identificadas por ensayos *in vitro* que miden la proliferación dependiente de antígenos, como lo determina la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina por las células T cebadas en respuesta a un epítomo (Burke *et al.*, J. Inf. Dis. 170, 1110-19, 1994), por destrucción dependiente de antígenos (ensayo de linfocitos T citotóxicos, Tigges *et al.*, J. Immunol. 156, 3901-3910) o por secreción de citoquinas.

La presencia de una respuesta inmunológica mediada por células puede ser determinada por ensayos de proliferación (células T CD4<sup>+</sup>) o ensayos CTL (ensayo de linfocitos T citotóxicos). Las contribuciones relativas de las respuestas humoral y celular al efecto protector o terapéutico de un inmunógeno pueden distinguirse aislando separadamente IgG y células T de un animal singéneo inmunizado y midiendo el efecto protector o terapéutico en un segundo sujeto.

Tal como se utiliza aquí y en las reivindicaciones, los términos “anticuerpo” o “inmunoglobulina” se utilizan de manera intercambiable y se refieren a cualquiera de las varias clases de proteínas estructuralmente relacionadas que funcionan como parte de la respuesta inmune de un animal o receptor, las cuales incluyen las proteínas IgG, IgD, IgE, IgA, IgM y proteínas relacionadas.

En condiciones fisiológicas normales los anticuerpos se encuentran en plasma y en otros fluidos corporales y en la membrana de ciertas células y son producidos por linfocitos del tipo denotado células B o su equivalente funcional. Los anticuerpos de la clase IgG se componen de cuatro cadenas de polipéptidos unidas entre sí por enlaces de disulfuro. Las cuatro cadenas de moléculas IgG intactas son cadenas idénticas pesadas denominadas cadenas-H y dos cadenas ligeras idénticas denominadas cadenas-L.

A fin de producir anticuerpos policlonales, se inmuniza a un huésped, como un conejo o una cabra, con el antígeno o fragmento de antígeno, generalmente con un coadyuvante y, si fuera necesario, acoplado a un soporte. Los anticuerpos del antígeno son recogidos a continuación del suero del huésped. El anticuerpo policlonal puede ser purificado en afinidad contra el antígeno volviéndolo mono-específico. Las experiencias anteriores han demostrado que la producción estándar de anticuerpos policlonales no es el método preferente para la preparación de anticuerpos de desagregación para péptidos que forman placas debido a problemas de toxicidad.

A fin de producir anticuerpos monoclonales, se lleva a cabo la hiperinmunización de un donante adecuado, por lo general un ratón, con el antígeno. A continuación se realiza el aislamiento de células que producen anticuerpos esplénicos. Estas células se fusionan con una célula caracterizada por la inmortalidad, como una célula mieloma, para proporcionar un híbrido de célula fusionada (hibridoma) que puede ser mantenida en cultivo y que secreta el anticuerpo monoclonal requerido. Las células son cultivadas a continuación, a granel, y los anticuerpos monoclonales son cosechados de los medios de cultivo para su uso. Por definición, los anticuerpos monoclonales son específicos de un epítomo sencillo. Los anticuerpos monoclonales tienen a menudo constantes de afinidad más bajas que los anticuerpos policlonales dirigidos contra antígenos similares por esta razón.

Los anticuerpos monoclonales también pueden ser producidos *ex-vivo* utilizando cultivos primarios de células esplénicas o líneas de células derivadas del bazo (Anavi, S., 1998. *Locking the N-terminal of the Alzheimer  $\beta$ -amyloid peptide prevents the neurotoxicity in cell cultures*, M. Se. Thesis). Para producir anticuerpos recombinantes (ver en general Huston *et al*, 1991; Johnson y Bird, 1991; Mernaugh y Mernaugh, 1995), los ARNs mensajeros de linfocitos-B que producen anticuerpos de animales, o hibridomas son transcritos a la inversa para obtener ADN complementarios (cADNs). El cDNA del anticuerpo, que puede ser de longitud total o longitud parcial, es amplificado y clonado en un fago o plásmida. El cAD puede ser una longitud parcial de cADN de cadena ligera y pesada, separado o conectado por un enlace. El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, se expresa utilizando un sistema de expresión adecuado para obtener anticuerpos recombinantes. El cADN de anticuerpos también puede obtenerse filtrando las bibliotecas de expresión pertinentes.

El anticuerpo puede estar unido a un sustrato de soporte sólido o conjugado con una fracción detectable o estar unido y conjugado al mismo tiempo como se conoce en la técnica. Para un debate general de conjugación de fracciones enzimáticas o fluorescentes ver Johnstone & Thorpe, *Immunochemistry in Practice*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1982. La unión de anticuerpos a un sustrato de soporte sólido también es algo bien conocido por la técnica. Ver, para un debate general, Harlow & Lañe *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Publications, New York, 1988 y Borrebaeck, *Antibody Engineering - A Practical Guide*, W.H. Freeman and Co., 1992.

Tal como se utiliza aquí y en las reivindicaciones, la frase “una porción inmunológica de un anticuerpo” incluye un fragmento F(ab’)<sub>2</sub> de un anticuerpo, un fragmento Fab de un anticuerpo, un fragmento Fv de un anticuerpo, una cadena pesada de un anticuerpo, una cadena ligera de un anticuerpo, una mezcla no asociada de cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo, un heterodímero consistente en una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo, un dominio catalítico de una cadena pesada de un anticuerpo, un dominio catalítico de una cadena ligera de un anticuerpo, un fragmento variable de una cadena ligera de un anticuerpo, un fragmento variable de una cadena pesada de un anticuerpo, y una variante de cadena sencilla de un anticuerpo que también es conocida como scFv. Además, el término incluye inmunoglobulinas quiméricas que son los productos de expresión de genes fusionados derivados de diferentes especies, una de las cuales puede ser humana, en cuyo caso se dice que una inmunoglobulina quimérica está humanizada. Normalmente, una porción inmunológica de un anticuerpo compite con el anticuerpo intacto del que fue derivado para la unión específica a un antígeno.

Opcionalmente, un anticuerpo o preferentemente, una porción inmunológica de un anticuerpo, puede ser químicamente conjugado con o expresado como una proteína de fusión con otras proteínas. A efectos de esta especificación y las reivindicaciones que la acompañan, dichas proteínas fusionadas están incluidas en la definición de anticuerpos o una porción inmunológica de un anticuerpo.

Tal como se utilizan aquí, los términos “ agente inmunogénico” o “inmunógeno” o “antígeno” se utilizan de manera intercambiable para describir una molécula capaz de inducir una respuesta inmunológica contra sí misma durante la administración a un receptor, ya sea sola, en conjunción con un coadyuvante o presentada en un vehículo de presentación.

Tal como se utiliza aquí, el término “coadyuvante” se refiere a un compuesto que, cuando se administra en conjunción con un antígeno, aumenta la respuesta inmune al antígeno, pero cuando se administra solo no genera una respuesta inmune al antígeno. Los coadyuvantes pueden aumentar una respuesta inmune por varios mecanismos incluyendo el reclutamiento de linfocitos, la estimulación de células B y/o T y la estimulación de macrófagos.

El preparado de acuerdo con la presente invención puede ser administrado a un organismo *per se*, o en una composición farmacéutica donde está mezclado con soportes o excipientes adecuados.

Tal como se utiliza aquí una “composición farmacéutica” se refiere a un preparado de uno o más ingredientes activos descritos aquí con otros componentes químicos como soportes y excipientes fisiológicamente adecuados. El objeto de la composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

Aquí el término “ingrediente activo” se refiere al preparado responsable del efecto biológico.

En lo sucesivo, las frases “soporte fisiológicamente aceptable” y “soporte farmacéuticamente aceptable” que pueden utilizarse de manera intercambiable para referirse a un soporte o un diluyente que no cause una irritación significativa a un organismo y no suprima la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Un coadyuvante está incluido en estas frases.

Aquí el término “excipiente” se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar la administración de un ingrediente activo. Ejemplos de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de la celulosa, gelatina, aceites vegetales y glicoles de polietileno.

Se pueden encontrar técnicas para la formulación y administración de medicamentos en “Remington’s Pharmaceutical Sciences”, Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

## ES 2 344 189 T3

Vías de administración adecuadas pueden incluir por ejemplo la vía oral, rectal, transmucosal, especialmente transnasal, intestinal o administración parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

5 Alternativamente, se puede administrar un preparado de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, a través de inyección del preparado directamente en el cerebro del paciente.

10 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser fabricadas por procesos bien conocidos por la técnica, por ejemplo, por medio de procesos de mezclado, disolución, granulado, fabricación de grageas, pulverización, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

15 Las composiciones farmacéuticas a utilizar de acuerdo con la presente invención pueden por lo tanto ser formuladas de la manera convencional utilizando uno o más soportes fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesado de los ingredientes activos en preparados que, pueden ser utilizados farmacéuticamente. La formulación correcta depende de la vía de administración elegida.

20 Para su inyección, los ingredientes activos de la invención pueden ser formulados en soluciones acuosas, preferentemente en soluciones tamponadas fisiológicamente compatibles como la solución de Hank, la solución de Ringer, o solución salina fisiológica tamponada. Para la administración transmucosal, se utilizan fluidos penetrantes adecuados para la barrera a ser impregnada para la formulación. Dichos fluidos penetrantes son por lo general conocidos por la técnica.

25 Para la administración oral, los compuestos pueden ser formulados fácilmente combinando los compuestos activos con soportes farmacéuticamente aceptables bien conocidos por la técnica. Dichos soportes permiten que los compuestos de la invención sean formulados como comprimidos, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones para ingestión oral por un paciente. Los preparados farmacológicos para uso oral pueden ser realizados utilizando un excipiente sólido, opcionalmente triturando la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados si se desea, para obtener núcleos de grageas o comprimidos. Excipientes adecuados son, en particular, rellenos como azúcares, incluyendo la lactosa, sucrosa, manitol, o sorbitol; preparados de celulosa como por ejemplo almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, traga-canto goma, metilcelulosa, hidroxipropilmetil celulosa, carbometilcelulosa de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables como la polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se puede añadir agentes desintegrantes, como polivinil-pirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una de sus sales como el alginato de sodio.

35 Los núcleos de comprimidos están provistos de los revestimientos adecuados. Para ello, se pueden utilizar soluciones de azúcar concentradas que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinil pirrolidona, gel de carbopol, polietileno glicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se puede añadir a los revestimientos de comprimidos o grageas colorantes o pigmentos para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

40 Composiciones farmacéuticas que pueden ser utilizadas oralmente, incluyen cápsulas duras hechas de gelatina así como cápsulas blandas y selladas hechas de gelatina y un plastificante como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos en mezcla con un relleno como lactosa, aglutinantes como el almidón, lubricantes como el talco o el estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los ingredientes activos pueden ser disueltos o suspendidos en líquidos adecuados, como aceites grados, parafina líquida o polietilenglicol líquido. Además, se puede añadir estabilizadores. Todas las formulaciones para la administración oral deberían hacerse en dosis adecuadas para la vía elegida de administración.

50 Para administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas formulados de manera convencional.

55 Para su administración por inhalación nasal, los ingredientes activos para su uso de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en forma de un spray aerosol con nebulizador o pack presurizado que utiliza un gas propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dicloro-tetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse mediante una válvula que suministre una cantidad medida. Las cápsulas y comprimidos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un dosificador pueden formularse con una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada como lactosa o almidón.

60 Los preparados descritos aquí pueden ser formulados para administración parenteral, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosis unitarias, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis con, de manera opcional, la adición de un conservante. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos acuosos u oleosos y pueden contener agentes de formulación como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión.

65 Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas del preparado activo en forma soluble en agua. Adicionalmente, se puede preparar suspensiones de los ingredientes activos como suspensiones para inyección basadas en agua o en aceite, según sea pertinente. Vehículos o disolventes lipofílicos adecuados

## ES 2 344 189 T3

incluyen aceites grasos como el aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos como el etil oleato, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, como la celulosa carboximetil de sodio, sorbitol o dextran. De manera opcional, la suspensión puede contener también agentes o estabilizadores adecuados que incrementen la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Alternativamente, el ingrediente activo puede ser en forma de polvo para su composición con un vehículo adecuado como por ejemplo, solución estéril basada en agua exenta de pirógenos, antes de su uso.

La preparación de la presente invención también puede ser formulada en composiciones rectales como supositorios o enemas de retención, utilizando por ejemplo bases de supositorios convencionales tales como mantequilla de coco u otros glicéridos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad efectiva para lograr el propósito buscado. De manera más específica, una cantidad terapéuticamente efectiva significa una cantidad de ingredientes activos eficaz para prevenir, aliviar o mejorar síntomas de enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que está siendo tratado.

La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva no presenta problemas para quienes dominan la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada que se suministra aquí.

Para cualquier preparado utilizado en los métodos de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente efectiva puede ser inicialmente estimada a partir de ensayos con cultivos celulares e *in vitro*. Por ejemplo, una dosis puede ser formulada en modelos animales para lograr la concentración o título de anticuerpos en circulación deseados. Dicha información puede ser utilizada para determinar con mayor precisión dosis útiles en humanos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en la presente especificación pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar *in vitro*, en cultivos celulares o en animales de experimentación. Los datos obtenidos de estos ensayos con cultivos celulares e *in vitro* y de los estudios con animales pueden ser utilizados para formular una gama de dosis para su uso en humanos. La dosificación puede variar según la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, vía de administración y dosificación pueden ser elegidos por cada facultativo particular según el estado del paciente. (Ver por ejemplo, Fingí, *et al.*, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1).

La cantidad de la dosis y el intervalo pueden ser ajustados individualmente para proporcionar niveles de anticuerpos en plasma y cerebro que sean suficientes para impedir la agregación o desagregar los agregados ya existentes (concentración mínima efectiva, CME). La CME puede variar en cada preparado, pero puede calcularse a partir de datos *in vitro*. Las dosis necesarias para alcanzar la CME dependerán de las características individuales y la vía de administración. Se puede utilizar ensayos de unión para determinar las concentraciones en plasma.

También se puede determinar los intervalos de dosificación utilizando el valor CME. Los preparados deberían administrarse utilizando un régimen, que mantenga los niveles de plasma por encima de la CME durante el 10-90% del tiempo, preferentemente entre 30-90% y de manera más preferente aún entre el 50-90%.

En función de la gravedad y del grado de reacción de la enfermedad a tratar, la dosificación puede ser una administración única o una pluralidad de ellas, durando el tratamiento desde varios días a varias semanas o hasta que la cura se produzca o se logre la mejoría de la enfermedad.

La cantidad de composición a administrar dependerá, evidentemente, del sujeto que se trate, de la gravedad de la enfermedad, de la forma de administración, de la opinión del médico que receta, etc.

Las composiciones de la presente invención pueden, si se desea, presentarse en un envase o en un dispositivo dosificador, como un kit autorizado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosis unitarias que contengan el ingrediente activo. El envase puede, por ejemplo, comprender lámina metalizada o plástica como un envase ampolla. El envase o dosificador puede estar acompañado de instrucciones de utilización. El envase o dosificador también puede estar acompañado de un aviso asociado al recipiente con una forma prescrita por una agencia del gobierno que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, el cual refleje la autorización por la agencia de la forma de las composiciones o su administración para uso humano o veterinario. Dicho aviso, por ejemplo, puede ser sobre el etiquetado autorizado por la FDA sobre medicamentos con receta o de una etiqueta de producto autorizado. También pueden prepararse composiciones que comprendan un preparado de la invención formuladas en un soporte farmacéuticamente compatible, colocadas en un recipiente adecuado y etiquetadas para el tratamiento de una enfermedad indicada, como se detalla más arriba.

## Ejemplos

De manera general, la nomenclatura utilizada aquí y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas de ADN recombinantes, moleculares, bioquímicas y microbiológicas. Dichas técnicas están ampliamente explicadas en la bibliografía. Ver por ejemplo, “Molecular Cloning: A laboratory Manual” Sambrook *et al.*, (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, New York (1988); Watson *et al.*, “Recombinant DNA”, Scientific American Books, New York; Birren *et al.* (eds) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologías tal como las establecidas en la U.S. Pat. Nos. 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 y 5,272,057; “Cell Biology: A Laboratory Handbook”, Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); “Current Protocols in Immunology” Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *et al.* (eds), “Basic and Clinical Immunology” (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), “Selected Methods in Cellular Immunology”, W. H. Freeman and Co., New York (1980); los inmunoensayos disponibles están ampliamente descritos en la bibliografía científica y sobre patentes, ver por ejemplo, U.S. Pat. Nos. 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 y 5,281,521; “Oligonucleotide Synthesis” Gait, M. J., ed. (1984); “Nucleic Acid Hybridization” Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); “Transcription and Translation” Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); “Animal Cell Culture” Freshney, R. I., ed. (1986); “Immobilized Cells and Enzymes” IRL Press, (1986); “A Practical Guide to Molecular Cloning” Perbal, B., (1984) and “Methods in Enzymology” Vol. 1-317, Academic Press; “PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications”, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, “Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual” CSHL Press (1996) En este documento se proporcionan otras referencias generales. Los procedimientos indicados son bien conocidos por la técnica y se aportan en beneficio del lector.

Se hace referencia a los siguientes materiales y métodos que fueron empleados en los experimentos descritos en los siguientes ejemplos.

## 30 Materiales y métodos experimentales

Para llevar la presente invención a la práctica se emplearon materiales y métodos experimentales tal como se demuestra en los ejemplos que siguen:

### 35 *Técnicas generales de fago y ADN recombinante*

Las técnicas de ADN recombinante fueron realizadas esencialmente como se describen (Sambrook *et al.*, 1989). Los protocolos generales de tecnología de presentación de fago-anticuerpos son de Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden) Recombinant Phage Antibody System (RPAS).

### *Construcción de 508 scFv en la presentación del fago*

Los hibridomas 508 IgM utilizados como la fuente de secuencias de región-variable de anticuerpos fueron generados a partir de esplenocitos de un ratón que había sido inmunizado con un péptido correspondiente a los 16 residuos amino-terminal de  $\beta$ AP conjugados con hemocianina de lapa, utilizada como soporte. La extracción de mRNA, la síntesis de la primera cadena de cADN, ampliación PCR de las secuencias de variable pesada ( $V_H$ ) y variable ligera ( $V_L$ ), y ensamblaje de casetes scFv, se realizaron esencialmente de acuerdo con los protocolos tal como se describen (Pharmacia Biotech RPAS manual). El ADN 508 scFv ensamblado fue digerido con *Sfi*I y *Not*I, y 100 ng fueron ligados con 150 ng de vector ADN preparado por digestión de fagémidos pCC-Galó(Fv) (Berdichevsky Y *et al.*, J Immunol Methods., 31;228(1-2): 151-62,1999) con *Sfi*I y *Not*I. Este sistema de presentación de fago ha sido diseñado para expresar scFv en la proteína de fusión con dominio de unión a celulosa (CBD) derivado de *Clostridium thermocellum* (Morag E *et al.* Appl Environ Microbiol., 61(5): 1980-6, 1995). El ADN ligado fue introducido en células XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, CA) por transformación y los transformantes fueron colocados en 2 placas de Agar YT que contenían 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y 1% de glucosa para cultivo durante la noche a 37°C.

### 60 *Selección de proteínas de fusión scFv-CBD que se unen a $\beta$ -amiloides*

Se eligieron y cultivaron clones individuales, cada uno en 5 ml 2 X YT, 1% glucosa, 100  $\mu$ g/ml Ampicilina durante la noche a 30°C. Se añadió IPTG a 1 mM durante un periodo de inducción de 3 hr. Se aislaron proteínas de fusión scFv-CBD solubles de cada clon por sonicación de gránulos de células inducidas. A fin de identificar las 508(Fv) solubles funcionales de las no funcionales, 250 ng/pocillo de péptido  $\beta$ -amiloide fueron covalentemente unidos a placas de microtitulación revestidas con epoxy durante 16 hr a 4°C (Solomon, B., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93:452-455, 1996). Las placas fueron lavadas con PBS/0.05% - Tween 20 (PBST), y bloqueadas con una mezcla de albúmina de suero bovino al 3% y leche en polvo en PBS durante 16 hr a 4°C. Las placas fueron lavadas a continuación e incubadas con scFv-CBD soluble recuperadas de los clones durante 1 hr a 37°C. El anticuerpo unido fue detectado

## ES 2 344 189 T3

con un antisuero anti CBD de conejo seguido por anticuerpos anti conejo de cabra HRP-conjugados. Las placas fueron desarrolladas con sustrato ABTS cromogénico de peroxidasa y se registró la señal con un lector de placas de microtitulación ELISA a 405 nm. Los clones de fago positivo (pCC-508(Fv)) fueron propagados y su ADN fue secuenciado utilizando un secuenciador de ADN 373A de modelo automatizado (Applied Biosystems, USA).

5

### *Producción de proteínas de fusión 508(Fv)-CBD en E. coli*

Para expresión de alto nivel en *E. coli*, se clonaron derivados de 508(Fv) de tipo salvaje (wt) y mutados en el vector pFEKCA3 tal como se describe en (Berdichevsky Y *et al*, Protein Expr Purif., 17(2):249-59, 1999). Este vector utiliza el fuerte promotor T7 para expresión, en el que el gen de ARN polimerasa T7 es transportado como un gen inducible por IPTG controlado por lac represor en *E. coli* BL21 (DE3) (Studier, F.W., *et al.*, Methods Enzymol., 85, 60-89, 1990). Después de la inducción por IPTG, las proteínas 508(Fv)-CBD se acumularon como cuerpos de inclusión insolubles. Fueron recuperadas por el método de repliegado asistido por celulosa como se ha descrito previamente (Berdichevsky Y *et al*, Protein Expr Purif., 17(2):249-59, 1999). Se utilizó electroforesis de gel poliacrilamida SDS (SDS/PAGE) para separar proteínas de acuerdo con su peso molecular en condiciones de desnaturalización (Laemmli, U.K., Nature 227:263-270, 1970).

### *Ensayo de estabilidad de la proteína 508(Fv)-CBD purificada*

La actividad de la proteína 508(Fv)-CBD purificada fue comprobada antes y después de su almacenamiento a 4°C durante 7 días. 250 ng/pocillo de péptido  $\beta$ -amiloide fueron covalentemente unidos a pocillos revestidos de epoxy de placas de microtitulación durante 16 hr a 4°C (Solomon B. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94, 4109-4112, 1997). Los pocillos fueron bloqueados con una mezcla de albúmina de suero bovino al 3% y hemoglobina de bovino en PBS durante 2 hr a 37°C, luego lavados e incubados con la proteína 508(Fv)-CBD (0.5 g/ml o como se especifique de otro modo) durante 1 hr a 37°C. Se detectaron fragmentos de anticuerpos unidos por incubación con anticuerpos anti-ratón de conejo HRP-conjugados (BioMakor, Rehovot, Israel), diluidos a 1:5,000 y anti CBD de conejo diluidos 1:10,000 en PBST durante 1 hr a 37°C. Los fragmentos de anticuerpos unidos fueron controlados como se describe arriba.

30

### *Construcción de una biblioteca de fagos para el aislamiento de mutantes que se unen a 508(Fv) $\beta$ AP*

Se utilizó la técnica PCR *splicing overlap extensión* (SOE) (Lefenbrve, B., *et al.*, Biotechniques, 19:186-188, 1995) para reemplazar el codón de cisteína V<sub>L</sub> 96 de 508(Fv) por otros codones. Se utilizó ADN pCC-508(Fv) como plantilla. En una primera etapa, la plantilla de ADN fue amplificada con los siguientes cebadores:

El cebador antisentido 508-mut-FOR:5'-CCCCCTCCGAACGTSNATGGGTAAGTcgatcgCTGATGGCAGTA-3' (SEQ ID NO: 10) inserta un sitio de restricción *PvuI* (subrayado), donde S representa nucleótidos C o G y N representa A, C, T o G. Este cebador fue utilizado para el reemplazo del codón de cisteína 96 por fenilalanina (F), leucina (L), serina (S), tirosina (Y) o codones de triptofano. El cebador *SfiI* 5'BACK: 5'-ATCTATGCggcccagccggccATG-3' (SEC N° ID: 11) inserta un sitio *SfiI* en el extremo 5' de scFv. El producto PCR resultante (*SfiI*-508mut) corresponde a la mitad 5' de 508(Fv)-CBD. En la segunda etapa PCR, el 508(Fv)-CBD completo fue reensamblado amplificando pCC-508(Fv) ADN con el producto PCR *SfiI*-508mut de la etapa 1 actuando como el cebador del extremo 5' y CBD (BX): 5'-GTGGTGCTGAGTggatcctaTACTACACTGCCACCGGG-3' (SEC N° ID: 12) como cebador del extremo 3'. El producto PCR final (*SfiI*-508mut-BX) es un casete 508(Fv)-CBD completo con sustituciones en V<sub>L</sub> codón 96 y un sitio de restricción *PvuI* como mutación silenciosa para análisis. El ADN *SfiI*-508mut-BX fue digerido con *SfiI*, *PvuI* y *NotI* y ligado en una ligadura de tres fragmentos con *SfiI* y *NotI* linearizado pCC-Galó(Fv) ADN que es un vector fagémido utilizado para presentar un anti *E. coli*  $\beta$ -galactosidasa scFv (Berdichevsky Y *et al*, J Immunol Methods., 31;228 (1-2): 151-62, 1999). El ADN de fagémido ligado resultante fue introducido en células de *E. coli* XL-1-Blue por cultivos de electroporación. Se utilizaron cultivos de *E. coli* para producir fago de presentación por rescate con fago coadyuvante M13K07 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia).

### *Selección por afinidad de $\beta$ -amiloides que se unen a 508mut-(Fv) presentando clones de fago*

Una muestra conteniendo partículas de fago rescatado fue sometida a una ronda de selección por afinidad (ciclo de selección de fagos por afinidad) y amplificación. Para el ciclo de selección, se utilizó 0.5  $\mu$ g/ml de péptido 1-16 aminoácidos de  $\beta$ -amiloide biotinilado ( $\beta$ AP(1-16), ácidos 1-16 de SEC N° ID:3) en un volumen total de 1 ml. Los fagos fueron pre-incubados con el péptido biotinilado durante 2 horas a temperatura ambiente y la mezcla de reacción fue estratificada en platos Petri de poliestireno de 30 mm revestidos con estreptavidina. Los fagos no unidos fueron eliminados mediante lavado exhaustivo con PBST. Los fagos fijados fueron eluados con 0.3 ml de 0.1 M HCl titulado a pH 2.2 con glicina. El eluato fue neutralizado con 80  $\mu$ l de 0.5 M Tris (HCl) pH 10, y utilizado para infectar células de *E. coli* XL-1-Blue. Se utilizaron colonias de bacterias individuales que contenían partículas de fago amplificado como plantilla para colonia PCR (Novagen Madison, USA) con cebadores *SfiI*5'Back y CBD (BX). El producto PCR de aproximadamente el tamaño de un fragmento scFv-CBD intacto (aproximadamente 1250 bp) fue digerido con la enzima de restricción *PvuI* y analizado por electroforesis en gel de agarosa.

65

## ES 2 344 189 T3

### *Unión de ScFv a $\beta$ AP(1-16) biotinilado*

La unión de scFv a  $\beta$ AP(1-16) fue analizada por ELISA. Placas revestidas con 50  $\mu$ l de 1 g/ml streptavidina en 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6, fueron lavadas tres veces con PBST y 50  $\mu$ l de 6 ng/ $\mu$ l  $\beta$ AP(1-16) biotinilado fueron añadidos a continuación a los pocillos e incubados durante 30 min a 37°C. Los pocillos fueron bloqueados con una mezcla de albúmina de suero bovino al 3% y hemoglobina de bovino en PBS durante 2 hr a 37°C, luego lavados e incubados con scFv (0.5  $\mu$ g/ml o como se especifique de otro modo) durante 1 hr a 37°C. Para experimentos de inhibición, fueron pre-incubados péptidos con el anticuerpo durante 30 min a 37°C antes de su adición a los pocillos revestidos con péptidos. Después del lavado, se detectaron fragmentos de anticuerpos unidos tal como se describe arriba. Se propagaron clones de fago específicos de unión a  $\beta$ AP y se aisló y secuenció su ADN como se describe arriba.

### *Cultivo de células y ensayo de citotoxicidad $\beta$ AP*

Se cultivaron células PC 12 de feocromocitoma de rata en DMEM complementadas con suero de caballo 5%, suero fetal bovino 10%, 2 mM L-glutamina, y 100 unidades/ml penicilina/estreptomina e incubadas a 37°C bajo CO<sub>2</sub> 5%. Para el ensayo de neurotoxicidad, las células PC 12 cultivadas fueron sembradas en una placa de 96 pocillos a una densidad de 10<sup>4</sup> células/100  $\mu$ l/pocillo en un medio exento de suero complementado con 2 M de insulina. El efecto sobre la prevención de la neurotoxicidad de  $\beta$ A fue medido como sigue: 0.12 mM  $\beta$ -amiloide que fue incubado durante una semana a 37°C para la generación de fibrillas, e incubado a continuación en presencia de 508F(Fv)-CBD o con el Gal6(Fv)-CBD no relacionado a una fracción molar de  $\beta$ AP a scFv de 15:1 o 30:1 durante 24 hr. La mezcla  $\beta$ A/anticuerpo fue añadida a los pocillos que contenían células PC 12. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 2 días, después de lo cual se evaluó la viabilidad de las células midiendo la actividad redox celular con 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT), como se describe en (Sladowski, D. *et al.*, J. Immunol. Methods., 157:203-207,1993). Las placas fueron incubadas durante una noche a 37°C. se determinó la reducción MTT coloriméricamente utilizando un lector de placas de microtitulación ELISA establecido a 550 nm.

### *Agregación de péptido $\beta$ -amiloide medido por fluorimetría con Tioflavina T(ThT)*

La agregación del péptido  $\beta$ -amiloide fue medida por el ensayo de unión con tioflavina T (ThT), en el que la intensidad de la fluorescencia refleja el grado de formación de fibrillas  $\beta$ -amiloides. La ThT tinta de modo característico los depósitos de tipo amiloide (Levine, H. III, Protein Sci., 2: 404-410,1993) y exhibe una emisión de fluorescencia mejorada a 485 nm por excitación a 435 nm cuando se añade a la suspensión de preparados de lámina-beta agregados. Soluciones acuosas de 0.12 mM  $\beta$ AP en 0.1 M Tris (HCl) pH 7.1 fueron incubadas a 37°C durante 1 semana e incubadas a continuación en presencia de 508F(Fv)-CBD o con Gal6(Fv)-CBD no relacionado a una fracción molar de  $\beta$ AP a scFv de 15:1 o 30:1 durante 24 hr. La fluorescencia fue medida después de la adición de 1 ml de ThT (2 M en 50 mM Glicina, pH 9) con un espectrofluorímetro LSB-50 Perkin Elmer Ltd., UK.

### *Preparados del sistema de suministro de fagos*

Se dividió en cuatro grupos a 12 ratones Balb/c hembras de 3 ratones por grupo. Uno de los grupos fue utilizado como control. Después de administrarles intranasalmente una única dosis de 10<sup>11</sup> partículas de fago (fago fd, tomado de una biblioteca 15-mer péptidos-fago que fue suministrada por George P. Smith, University of Missouri, Columbia, MO), los ratones fueron sacrificados a intervalos de 1, 14 y 28 días en cada grupo y extraídos sus cerebros para su análisis.

### *Capacidad del fago que porta scFv de introducir/eliminar fragmentos de $\beta$ AP del cerebro*

Se utilizó la fusión de ScFv-508F a gpIII de capa menor filamentosa para investigar la capacidad del scFv de anti-agregación  $\beta$ AP de ser transportado por un sistema de presentación de fago filamentoso directamente al SNC.

Este scFv fue preparado a partir de hibridoma 508 anti-agregación tal como se describe anteriormente y se conservó su actividad de fijación específica. Nueve ratones Balb/c divididos en tres grupos fueron tratados como sigue: los ratones de un primer grupo fueron tratados con 0.2 ml de 10<sup>-3</sup> M biotina  $\beta$ A (1-16) únicamente. Los ratones de un segundo grupo fueron tratados con una mezcla de fago 10<sup>10</sup> portador de 508FscFv que fue preincubado con 0.2 ml de 10<sup>-3</sup> M biotina  $\beta$ A(1-16) durante 1 hr. Los ratones de un tercer grupo fueron utilizados como control. Después de administrarles intranasalmente una única dosis, los ratones fueron sacrificados a intervalos de 1, 14 y 28 días en cada grupo y extraídos sus cerebros para su análisis.

### *Preparados de secciones de tejidos*

Inmediatamente después de la decapitación, los cerebros fueron extraídos y cortados en dos mitades a lo largo del seno medio-sagital. De manera aleatoria, una mitad del cerebro fue fijada por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4% en solución tamponada de fosfato 0.1 M durante dos horas a 4°C y luego sumergidos para la

## ES 2 344 189 T3

protección contra el frío en sucrosa al 4.5% en PBS 0.1 M durante la noche. Las secciones fueron puestas a continuación en sucrosa al 30% durante 2 hr a 4°C. Las secciones coronales que contenían el hipocampo y el sistema olfativo fueron puestas en OCT y cortadas a espesores de 6  $\mu\text{m}$  con un criostato a -20°C, y colocadas luego sobre placas de cristal. Las placas fueron mantenidas a -70°C. Estas placas fueron utilizadas para la detección del fago utilizando una técnica de inmunofluorescencia.

La otra mitad del cerebro medio-sagital fue utilizada para preparar una sección de tejido a la parafina para histología. La sección fue fijada en paraformaldehído al 4% durante 2 horas y luego transferida a formalina salina al 10% durante 2 días a temperatura ambiente, para ser embebida en parafina a continuación y cortada a espesores de 4  $\mu\text{m}$  sobre un microtomo y colocada a continuación sobre placas de cristal. Las placas fueron mantenidas a temperatura ambiente hasta ser usadas.

### *Detección de antígeno en secciones cerebrales*

*Inmunofluorescencia:* las secciones fueron bloqueadas con albúmina de suero bovino al 3% en PBS durante 30 min. y luego incubadas con suero policlonal de conejo anti fd (1:100) o Estreptavidina acoplada con PE (sigma) durante 1 hr a 37°C. Las placas fueron lavadas a continuación tres veces, 5 min cada una, en PBS, tratadas de nuevo con solución tamponada bloqueante durante 5 minutos a temperatura ambiente, y luego reaccionada con IgG anti-conejo de burro rCy<sup>TM</sup> 3 secundario (para la detección del fago) a 1:400 (sigma) o con estreptavidina acoplada a PE, dilución 1:50, durante 1 hr a temperatura ambiente. Finalmente, los preparados fueron lavados tres veces en PBS, observados utilizando un microscopio de fluorescencia a una ampliación final de x 10, y grabados en película o utilizando una cámara digital Hamamatsu (C4742) y software informático Metamorph (Universal Imaging; West Chester, PA).

*Histología:* Se tintaron secciones de seis micrómetros con hematoxilina y eosina. Las secciones tintadas fueron examinadas y fotografiadas a una ampliación final de 40. Por último, los preparados fueron lavados tres veces en PBS, observados en un microscopio, y grabados en película.

### *Inmunización con f3-YYEFRH*

Las inmunizaciones fueron llevadas a cabo con un fago fd producido mediante ingeniería genética transportando el péptido YYEFRH (SEC N° ID:7) fusionado a su gpIII de capa menor. Se utilizaron dosis de  $10^{10}$  fagos por inyección para inmunizar a intervalos de 14 días, mediante inyecciones intraperitoneales. Se inyectó los fagos a los ratones con o sin coadyuvante completo de Freund (Difco) en la primera inyección y el coadyuvante incompleto de Freund (Difco) en la segunda inyección. A los 7 días de cada inyección, los ratones fueron sangrados y su suero fue analizado mediante ELISA para ver la reactividad de anticuerpos IgG tanto a las proteínas con capa de fago y  $\beta\text{A}$ .

### *Bibliotecas de epítomos*

La biblioteca 15-mer péptidos-fago utilizada en este estudio fue suministrada por George P. Smith (University of Missouri, Columbia, MO). La biblioteca consiste en aproximadamente  $1.9 \times 10^9$  partículas de fago y comprende un repertorio de péptidos aleatorio de residuos de 15 aminoácidos fusionados a la glicoproteína VIII del fago fd. Los experimentos con esta biblioteca fueron llevados a cabo según las instrucciones del proveedor (George P. Smith University of Missouri, Columbia, MO).

### *Biotinilación de anticuerpos*

Para la biotinilación de anticuerpos, se incubaron 100 g de cada anticuerpo en 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$ , pH 8.6, durante 2 hr a temperatura ambiente con 5  $\mu\text{g}$  de éster de N-hidroxisuccinimida biotinamidocoproato (Sigma, B 2643) de una solución stock de 1 mg/ml en dimetilformamida y dializado a 4°C contra solución salina fosfatada (PBS; 0.14M NaCl/0.01 M solución salina fosfatada, pH 7.4) durante toda la noche.

### *Aislamiento de fago que presenta epítomos a partir de una biblioteca de péptidos*

Una muestra de biblioteca conteniendo  $10^9$  partículas de fago infeccioso fue sometida a tres rondas de selección (ciclo de selección de fagos por afinidad o biopanning) y amplificación. Para cada ciclo de selección se utilizó un anticuerpo monoclonal biotinilado (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) en un volumen total de 25  $\mu\text{l}$ . Los clones de fago fueron pre incubados con el anticuerpo biotinilado durante la noche a 4°C, y las mezclas de reacción fueron estratificadas en 1 ml de PBS conteniendo Tween 20 al 0.5% sobre platos Petri de poliestireno de 30 mm revestidos de estreptavidina e incubados durante 20 min a temperatura ambiente. Los fagos no fijados fueron eliminados mediante lavado exhaustivo (10 veces durante 10 min cada uno) en PBS/0.05% Tween 20. Los fagos fijados fueron eluidos con 0.3 ml de 0.1 M HCl titrado con glicina pH 2.2. El eluato fue neutralizado y utilizado para infectar células *E. coli* K91. Después de tres rondas de selección, colonias bacterianas individuales que contenían partículas amplificadas fueron cultivadas en una placa de microtitulación y los fagos seleccionados fueron analizados por ELISA para ver su capacidad de fijarse al anticuerpo estudiado, tal como se describe más adelante.

## ES 2 344 189 T3

### *Fijación del anticuerpo a fago aislado*

La fijación de anticuerpos al fago fue analizado mediante ELISA. Pocillos de placas de microtitulación (Maxisorb, Nunc) fueron revestidos con 50  $\mu$ l (a dilución de 1:1000 en 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.6) de suero anti-fago de conejo e incubados durante toda la noche a 4°C. Los pocillos fueron bloqueados con una mezcla de albúmina de suero bovino al 3% a una proporción de 1:1 (en PBS) durante 2 hr a 37°C. Las placas revestidas fueron lavadas tres veces con PBS/Tween 20 0.05%, y 50  $\mu$ l de clones de fago enriquecidos conteniendo 10<sup>10</sup> partículas de fago fueron añadidos a los pocillos e incubados durante 1 hr a 37°C. Después del lavado, el anticuerpo estudiado fue añadido (1  $\mu$ g/ml o como se especifique de otro modo) y se dejó que se fijara a la placa revestida durante la noche a 4°C y se midió la constante de fijación del mismo. Clones de fago positivos fueron propagados y su ADN fue secuenciado en la región de inserción en la Sequencing Unit of the Weizmann Institute of Science (Rehovot, Israel) utilizando el Applied Biosystem Kit (United States, Applied Biosystem).

### 15 *Presentación de fago fd gpVIII de $\beta$ A(1-16)*

La glicoproteína VIII de capa de fago filamentoso es presentada en aproximadamente 2700 copias en la capa del fago. Se prepararon los siguientes oligonucleótidos: sentido-5'-agctccGATGCTGAATTCGGTGATAGCGGC TACGAAGTGCATCATCAGAAAcctgcag-3' (SEQ ID NO: 13); y antisentido-5'-ggTTTCTGATGATGCACTTCG TAGCCGCTATCATGACGAAATTCAGCATCgg-3' (SEC N° ID: 14). Estos oligonucleótidos fueron utilizados para formar un dúplex (68-70°C, 10 minutos, seguido de enfriamiento lento a temperatura ambiente) que codifica los aminoácidos 1-16 del  $\beta$ AP humano y contiene una mutación silenciosa de un sitio de restricción específico (EcoRI) que es útil para análisis posteriores. El dúplex fue fosforilado y ligado al fagémido f88-4 linearizado *HindIII/PstI*, que es un vector utilizado para presentar péptidos de fusión en gpVIII de fago filamentoso. El ADN del fagémido ligado resultante fue introducido en células *E. coli* K91K por transformación y los transformantes fueron colocados en 2 placas de Agar YT conteniendo 10  $\mu$ g/ml de tetraciclina y 1% de glucosa para su cultivo durante la noche a 37°C. Se utilizaron colonias bacterianas individuales conteniendo partículas de fago para inocular 2YT medio conteniendo 10  $\mu$ g/ml de tetraciclina para su cultivo durante la noche a 37°C para amplificación. El producto fagémido de ADN obtenido de cada colonia fue analizado por EcoRI. Clones positivos fueron amplificados para la preparación de antígeno.

### *Inmunización con f88-EFRH*

Se llevaron a cabo inmunizaciones con un fago fd producido mediante ingeniería genética portando el péptido VHEPHEFRHVALNPV (SEC N° ID:8) fusionado con su glicoproteína VIII de capa mayor. Se utilizaron dosis de 1010 fagos por inyección para inmunizar a intervalos de 14 días, mediante inyecciones intraperitoneales. Se inyectó el fago a los ratones con o sin coadyuvante completo de Freund (Difco) en la primera inyección y coadyuvante incompleto de Freund (Difco) en la segunda inyección. A los 7 días de las inyecciones, los ratones fueron sangrados y su suero fue analizado mediante ELISA para ver su reactividad a anticuerpos IgG de las proteínas con capa de fago y del  $\beta$ A.

### *Inhibición de la fijación de anticuerpos al péptido $\beta$ -amiloide*

La inhibición de la fijación de anticuerpos a  $\beta$ AP(1-16) por diversos pequeños péptidos fue realizada utilizando 250 ng/pocillo de péptidos  $\beta$ -amiloides (1-16) biotinilados fijados covalentemente a placas ELISA tal como se describe previamente. Las placas fueron lavadas con PBS/0.05% Tween 20 y bloqueadas con una mezcla de albúmina de suero bovino al 3% y hemoglobina, proporción 1:1 (en PBS) durante 2 hr a 37°C. Los péptidos fueron pre incubados con dilución 1:3000 de suero después de la tercera inmunización con f88-EFRH durante 30 min a 37°C antes de su adición a pocillos revestidos con  $\beta$ AP y fueron dejados toda la noche a 4°C en ellos. Después del lavado, se detectaron anticuerpos unidos por incubación con inmunoglobulina anti-ratón de conejo HRP-conjugada, tal como se describe arriba. Los resultados fueron derivados para derivar el IC<sub>50</sub>, que es la mitad de concentración molar de péptido que inhibe totalmente la fijación de anticuerpos. Los péptidos fueron sintetizados por Applied Biosystems Synergy Model 430A en la Unit for Chemical Services del Weizmann Institute of Science por fase sólida utilizando química Fmoc.

### *Cultivo de células y ensayo de citotoxicidad*

Se cultivaron células PC 12 de feocromocitoma de rata en DMEM complementadas con suero de caballo al 5%, suero de ternero fetal al 10%, 2 mM L-glutamina, y 100 unidades/ml penicilina/estreptomycina e incubaron a 37°C bajo CO<sub>2</sub> al 5%. Para el ensayo de neurotoxicidad, las células PC 12 cultivadas fueron sembradas en una placa de 96 pocillos a una densidad de 10<sup>4</sup> células/100  $\mu$ l/pocillo en un medio exento de suero complementadas con 2  $\mu$ M de insulina. El efecto sobre la prevención de la neurotoxicidad de  $\beta$ A fue medido como sigue: 0.12 mM de  $\beta$ -amiloide que fue incubado durante una semana a 37°C para la generación de fibrillas, e incubado posteriormente en presencia de suero de ratón inmunizado con fago-EFRH y suero de un ratón inmunizado con fago no relevante a diluciones de 5:1 y 10:1 durante 24 hr. La mezcla de anticuerpos  $\beta$ A fue añadida a los pocillos conteniendo células PC 12. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 2 días, después de los cuales se evaluó la viabilidad de las células midiendo

## ES 2 344 189 T3

la actividad redox celular con 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT), tal como se describe en (Sladowski, D. *et al.*, J. Immunol. Methods., 157:203-207, 1993). Las placas fueron incubadas durante la noche a 37°C. La reducción MTT fue colorimétricamente determinada utilizando el lector de placas de microtitulación ELISA ajustado a 550 nm.

5

### *Preparación de anticuerpos monoclonales contra PrP 106-126*

Ratones inmunizados con péptido sintético correspondiente a la secuencia de PrP 106-126 humano (SEC N° ID:25) (suministrado por Chiron Technologies, Claton Victoria, Australia) acoplado al soporte KLH de mayor tamaño fueron utilizados para generar anticuerpos monoclonales siguiendo las técnicas de fusión de Kohler y Milstein (Kohler and Milstein 1975). Se ensayaron hibridomas para la producción de anticuerpos específicos de péptidos mediante ELISA, de la manera siguiente: el péptido PrP 106-126 fue covalentemente unido a los grupos epoxy de placas de 96 pocillos revestidas de Eupergit-C (Solomon *et al.* 1992, 1993). Los grupos epoxy residuales fueron bloqueados incubando las placas con leche desnatada al 3% (solución de bloqueo). Los sobrenadantes de hibridomas no diluidos fueron aplicados durante 1 hora a 37°C. Los pocillos fueron exhaustivamente enjuagados (como en cada etapa del procedimiento) e incubados a continuación con anticuerpos anti-ratón de cabra etiquetados (HRP) peroxidasa de rábano específicos para IgG o IgM de ratón (diluidos en solución de bloqueo). Después del lavado, se visualizó la fijación de anticuerpos utilizando orto-fenildiamina como sustrato para HRP. Se midió la densidad óptica a 492 nm. Los anticuerpos monoclonales seleccionados fueron ampliados y purificados de acuerdo con procedimientos publicados: *IgG molecules on a protein A column* (Harlow *et al.* 1988). y *IgM on KaptiveM column*. Dos mAbs, a saber 2-40 y 3-11, fueron utilizados para estudios posteriores. El mAb 3F4 fue adquirido en Senetek, Ca. USA.

### *Búsqueda de la localización de epítomos de anticuerpos utilizando biblioteca de presentación de fagos*

Los anticuerpos 3-11 (IgM) y 2-40 (IgG) fueron biotinilados. Las siguientes bibliotecas (suministradas por G.P. Smith) fueron examinadas para buscar el epítomo de los anticuerpos estudiados, tal como se describió previamente en (Frenkel *et al.* 1998).

30

1. biblioteca fUSE5/15-mer en la que se muestran 15-mer extraños en las 5 copias de pIII.

2. biblioteca f88-4/6-mer en la que se muestran 6-mer extraños en hasta ~300 copias de pVIII (gen VIII recombinante que codifica el péptido es inducible con IPTG).

35

El ciclo de selección de los fagos por afinidad (biopanning) para encontrar el epítomo de anticuerpos fue realizado como se describió previamente en (Frenkel *et al.* 1998).

### *Inhibición competitiva de anticuerpos fijados a PrP por péptido NMKH*

La fijación competitiva por ELISA de los anticuerpos anteriores a péptido PrP covalentemente unido fue realizada tal como se describe arriba. Los anticuerpos fueron preincubados con péptido NMKH a fracción equimolar antes de añadirlos a los pocillos.

45

### *Agregación e inmunocomplejación de PrP 106-126*

La agregación *in vitro* del péptido 106-126 fue inducida por incubación de una solución acuosa de PrP 106-126 (10 mg/ml) para diversos intervalos de tiempo a 37°C. El péptido agregado fue incubado o bien con anticuerpos monoclonales 2-40, 3-11 o 3F4 en condiciones que se especifican más adelante.

### *Ensayo de citotoxicidad de PrP 106-126 utilizando células PC12*

55

Se cultivaron células PC 12 de feocromocitoma de rata en DMEM complementado con suero de caballo al 8%, suero de ternero fetal al 8%, 2 mM L-glutamina, y 100 unidades/ml penicilina/estreptomina e incubaron a 37°C bajo CO<sub>2</sub> al 5%. Para el ensayo de neurotoxicidad, las células PC 12 cultivadas fueron sembradas en una placa de 96 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^4$  células/100  $\mu$ l/pocillo en un medio exento de suero complementadas con 2  $\mu$ M de insulina. Las células fueron tratadas durante 3-5 días con 100  $\mu$ M PrP 106-126 preincubado 4-7 días a 37°C. La viabilidad celular fue evaluada por el ensayo MTT que mide la actividad de las enzimas mitocondriales responsables de la conversión de la sal de tetrazolio, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-bromuro de tetrazolio (MTT) en un producto de formazán en células viables (Hansen *et al.* 1989). El MTT fue añadido a los pocillos en una concentración final de 1 mg/ml e incubado con las células durante 3 horas más a 37°C. Se añadió tampón de lisis celular (SDS al 20% peso/vol en una solución de dimetilformamida al 50%, pH 4.7), y la placa fue incubada durante la noche a 37°C. La reducción MTT fue colorimétricamente determinada midiendo la densidad óptica (DO) a 550 nm.

65

## ES 2 344 189 T3

### *Prevención de la neurotoxicidad de PrP 106-126*

El efecto de mAbs sobre la inhibición de neurotoxicidad de PrP 106-126 fue determinado como sigue: PrP 106-126 (10 mg/ml) fue incubado durante 7 días a 37°C para inducir la agregación máxima del péptido. Se añadieron anticuerpos monoclonales 3-11, 2-40 y 3F4 durante 1 hora a muestras de 1 mM del péptido ya agregado. Las mezclas anticuerpo-péptido, así como el péptido agregado solo, fueron aplicadas a las células en una concentración final de péptidos de 100  $\mu$ M. Se evaluó la viabilidad celular después de una incubación de 3 días a 37°C con la mezcla de reacción antes mencionada, tal como se describe arriba. La viabilidad 100% fue definida como el valor del ensayo MTT para células no tratadas.

### *Modulación de conformación de PrP seguida de ensayo de fluorimetría con Tioflavina T (ThT)*

Cantidades crecientes del péptido PrP 106-126 (0-0.8 mg/ml) fueron incubadas durante 7 días a 37°C. Se midió la formación de fibrillas amiloides criónicas mediante el ensayo de unión con Tioflavina T (ThT). La fijación de la ThT a fibrillas amiloides de ciertos orígenes genera una señal fluorescente específica: un desplazamiento hacia el rojo de 114 nm en el pico de excitación desde 336 nm del espectro de excitación de la solución colorante libre en solución a un nuevo pico de excitación a 450 nm de la solución colorante fijada. Adicionalmente, la solución colorante fijada tiene una emisión mejorada a 482 nm (Naiki *et al.* 1989, LeVine 1993). Luego siguió la agregación del péptido priónico utilizando muestras de PrP 106-126 (0.3 mg/ml) en 0.1M Tris/HCl pH-7.1 incubadas durante 7 días a 37°C, con o sin mAbs 3-11, 2-40 y 3F4 en diversas diluciones. Se midió la desagregación de fibrillas amiloides priónicas ya formadas utilizando muestras de PrP 106-126 que fueron incubadas durante 7 días a 37°C y luego complementadas con el mAbs durante otras 24 horas. Se midió la fluorescencia (emisión a 482 nm después de excitación a 435 nm) después de la adición de las muestras a ThT (2  $\mu$ M en 50 mM glicina, pH-9).

## **Resultados experimentales**

Los ejemplos 1-6 siguientes se refieren a la producción de una versión de cadena simple del anticuerpo monoclonal anti-agregación. Los ejemplos 7-8 siguientes se refieren al suministro de un fago de presentación de péptido o de anticuerpo al cerebro. Los ejemplos 9-14 siguientes se refieren a la producción de títulos altos de anticuerpos policlonales anti-agregación por inmunización directa con antígenos de beta-amiloide presentados en un fago y a la caracterización de estos anticuerpos.

### Ejemplo 1

#### *Generación de un hibridoma IgM 508*

La inmunización de un ratón con un péptido de 16 aminoácidos de beta-amiloide (ácidos 1-16 de SEC N° ID:3) conjugado a KLH (SEC N° ID:9) se llevó a cabo como se describe arriba. La inmunización repetitiva produjo finalmente un título de anticuerpo bajo pero mensurable contra beta-amiloide. La esplenectomía subsiguiente del ratón inmunizado facilitó la preparación del hibridoma IgM 508 expresando scFvAb con especificidad en el beta-amiloide. Posteriormente se extrajo ARN de este hibridoma. El hibridoma IgM 508 mostró actividad específica en A $\beta$  para prevenir sus efectos tóxicos sobre células PC 12 (Anavi, S. 1998, M. Se. Tesis del departamento de Microbiología y Biotecnología Molecular de la Universidad de Tel-Aviv, I).

### Ejemplo 2

#### *Clonación de los dominios variables del hibridoma IgM 508 como un scFv*

MAb 508 mostró reconocimiento específico del  $\beta$ -amiloide y previno sus efectos tóxicos sobre células PC 12 (Anavi S., 1998, *ibid*). Para clonar el anticuerpo 508 como un scFv en un vector de presentación de fago, se extrajo ARN de 10<sup>8</sup> células del hibridoma 508 y fue utilizado como fuente para secuencias de codificación de región variable de anticuerpos. Se utilizó RT-PCR para amplificar los dominios variables que fueron clonados en el vector de presentación de fago pCC-Gal6(Fv), como se describe en Materiales y Métodos. Cuando se clonan anticuerpos derivados de hibridoma como scFvs, algunos de los clones pueden contener secuencias aberrantes que son no funcionales. Por lo tanto, para identificar clones de fagémido portadores de agentes ligantes funcionales de beta-amiloides de los clones generados, se eligieron al azar 10 clones individuales y se produjo de ese modo proteínas de fusión scFv-CBD. La Figura 2 muestra un mapa físico del plásmido pCC-508 que fue utilizado para expresar 508-scFv. El dominio CBD actúa como una detección inmunológica de proteína scFv soluble o como un nuevo enfoque del replegado de cuerpos de inclusión de la proteína scFv soluble de proteína sobreexpresada (Berdichevsky Y *et al.*, Protein Expr Purif., 17(2):249-59, 1999). El plásmido utilizado para la sobreexpresión de 508-scFv está representado en la Figura 3. Las scFv-CBD solubles de los clones seleccionados fueron incubadas en pocillos de una placa ELISA que había sido revestida con péptido  $\beta$ -amiloide. De los clones analizados, el 50% mostró fijación específica al  $\beta$ AP. Las Figuras la-e muestran e ilustran la preparación de 508 scFv a partir de anticuerpos IgM. La Figura 4 muestra la fijación al  $\beta$ AP por scFv-CBD producida por un clon positivo que fue elegido para análisis posterior. Se utilizó el análisis PCR para caracterizar su inserto de

## ES 2 344 189 T3

ADN. Se descubrió que el clon positivo (designado pCC-508(Fv)) contenía un inserto de ADN intacto (Figura 5). La secuenciación de ADN de pCC-508(Fv) confirmó que el clon expresa un fragmento scFv intacto (ver, Figuras 1 la-b y SEC N° ID: 5 y 6, para secuencias de ácido nucleico y aminoácidos, respectivamente, modificadas como se describe más adelante).

5

### Ejemplo 3

#### *Mutagénesis dirigida de anticuerpo 508-(Fv)*

10

El análisis de secuenciación de ADN de pCC508-(Fv) reveló la apariencia inusual de un residuo de cisteína en la posición 96 de V<sub>L</sub> CDR3 (Kabat, E. A. *et al.*, *Sequences of proteins of immunological interest*, 5th Ed., 1991). La secuencia de aminoácidos deducida de V<sub>L</sub> CDR3 es: H<sup>89</sup>QRSSYPCT<sup>97</sup> (SEC N° ID: 15). La presencia de un residuo de cisteína impar en un scFv puede reducir su capacidad de plegado y también disminuir su estabilidad en solución y su vida media de almacenamiento. Por lo tanto, el 508(Fv) fue subclonado en un vector de expresión y producido en *E. coli* como se describe en Materiales y Métodos. La Figura 6 resume el proceso de producción del 508(Fv)-CBD por el método de replegado asistido por celulosa (Berdichevsky Y *et al.*, *Protein Expr Purif.*, 17(2):249-59, 1999). Aunque el 508(Fv)-CBD podría ser purificado hasta casi la homogeneidad (Figura 6 vía 7) mediante este método, se replegó relativamente mal y fue inestable durante el almacenamiento a 4°C (Figura 7). Se asumió que la sustitución de la cisteína por un residuo diferente podría incrementar la capacidad de producción y la estabilidad del scFv soluble sin tener un efecto adverso sobre su afinidad (Kirprianov, M.S. *et al.*, *Protein Engineering*, 10:445-453, 1997).

15

20

Para la sustitución del codón 508 V<sub>L</sub> cisteína 96 se utilizó SOE PCR, lo cual permitió la sustitución de Cys 96 por codones de fenilalanina, leucina, serina, tirosina o triptófano. Además, el esquema PCR empleado permite la persistencia del residuo de cisteína en esa posición. Mutantes de 508(Fv) fueron clonados en el vector de fago pCC-Gal6(Fv), con el resultado de la generación de una micro biblioteca (con 6 variantes potenciales). Los residuos de sustitución elegidos son por lo general aceptables en esa posición CDR3, ya que se encuentran en diversos anticuerpos de la base de datos Kabat (Kabat, E. A. *et al.*, *Sequences of proteins of immunological interest*, 5th Ed., 1991). Sin embargo, los diferentes sustitutos pueden variar en su efecto sobre la fijación del βAP. Para probar qué sustituto mantiene la fijación βAP, se realizó un ciclo único de selección por afinidad en la micro biblioteca de fagos 508(Fv)-Mut utilizando βAP(1-16) biotinilado como antígeno de captación. El análisis de restricción y amplificación PCR fue utilizado para controlar el enriquecimiento de clones de biblioteca después del ciclo de selección por afinidad. Cuando el ADN 508Mut-(Fv)-CBD es digerido con *PvuI*, se obtiene un patrón de restricción típico por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Los fragmentos bp 750 y 500 bp inferiores representan el ADN 508Mut-(Fv)-CBD, mientras que un fragmento 1250 intacto representa scFv-CBD del ADN pCC-Gal6(Fv) que fue utilizado como un vector. Se descubrió que antes de la selección por afinidad la biblioteca estaba muy contaminada con el ADN vector pCC-Gal(Fv). Esto resulta evidente por el hecho de que el ADN de 18/19 clones de biblioteca tomados al azar no estaba desdoblado en el sitio de la enzima *PvuI* establecido adyacente a 508 V<sub>L</sub> posición 96. Solamente uno de los 19 clones analizados mostró el modelo de restricción esperado asociado a una mutación (Figura 8a). Sin embargo, después de selección por afinidad, 5/11 clones seleccionados al azar mostraron el modelo de restricción esperada (Figura 8b). Esto indica un factor de enriquecimiento de aproximadamente 10 veces, lo cual demuestra la capacidad de los mutantes de 508 scFv de fijarse al epítipo βAP(1-16). Las secuencias de ADN de los 5 mutantes fueron determinadas y se indican en la Tabla 1 siguiente. Se descubrió que los sustitutos adecuados del codón 508 L1 cisteína 96 eran la fenilalanina, serina o tirosina.

45

TABLA 1

50

Vía (Figura 8b)	Secuencia de aminoácidos	SEC N° ID
4	<sup>89</sup> HQRSSYP-C <sup>96</sup> -T	16
5	<sup>89</sup> HQRSSYP-F <sup>96</sup> -T	17
6	<sup>89</sup> HQRSSYP-Y <sup>96</sup> -T	18
8	<sup>89</sup> HQRSSYP-F <sup>96</sup> -T	19
11	<sup>89</sup> HQRSSYP-S <sup>96</sup> -T	20

55

60

### Ejemplo 4

#### *Reconocimiento de βAP(1-16) por mutantes scFv 508*

65

Para seguir examinando los derivados mutados de 508 scFv, los genes mutados fueron subclonados en un vector de expresión y sobreexpresados en *E. coli*, tal como se describe para la proteína de tipo salvaje anterior. Las interacciones de las diversas proteínas 508-(Fv) mutadas (Tabla 1) con βAP(1-16) fueron analizadas en un ensayo ELISA. Las Figuras 9a-b muestran que aunque 508-(Fv)-CBD de tipo salvaje se fija a la mitad de la unión máxima (HMB) de 10<sup>-5</sup>

## ES 2 344 189 T3

M, todos los mutantes mostraron una unión mejorada a  $\beta$ AP: la HMB de C96S y C96Y es  $5 \times 10^{-6}$  M y la HMB de C96F es  $10^{-7}$  M. Para seguir examinando se eligió el mutante 508-scFv que porta la mutación C96F (508F(Fv)), el cual muestra la afinidad y estabilidad de almacenamiento más elevadas (Figuras 9a-b). Se analizó la especificidad de la unión de  $\beta$ AP(1-16) por 508F(Fv) en un ELISA competitivo. Como se indica en la Figura 10, la unión de 508F(Fv)-CBD purificada al  $\beta$ AP fue inhibida por péptido  $\beta$ AP(1-16) soluble actuando como el competidor en la fase líquida de una manera dependiente de la dosis. Se obtuvo la inhibición de la unión al 50% a aproximadamente  $1 \mu\text{M}$  de competidor. La unión no se vio afectada por un péptido irrelevante (WVLD, N° ID. SEC.: 4).

### 10 Ejemplo 5

#### *Prevención del efecto neurotóxico del $\beta$ -amiloide por 508F (Fv)*

15 A fin de descubrir si 508F(Fv) muestra un efecto protector similar al anticuerpo IgM parental en prevenir la neurotoxicidad mediada por  $\beta$ A sobre células cultivadas, se aplicó un test *in vitro* utilizando PC 12 de feocromocitoma de rata como se describe en (Solomon B. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94: 4109-4112,1997). Se midió la viabilidad de las células expuestas a  $\beta$ A con o sin anticuerpo. Como se muestra en la Figura 12, 508F(Fv) impidió la neurotoxicidad de  $\beta$ A (viabilidad celular 90%) a una fracción molar  $\beta$ AP:scFv de 15:1, mientras que el scFv no relacionado no mostró ningún efecto. CBD purificado o el scFv sólo no tuvo efecto sobre las células.

20

### Ejemplo 6

#### *Desagregación de fibrilla $\beta$ -amiloide por 508F(Fv)*

25

Para examinar el efecto de 508F(Fv) sobre la alteración de la fibrilla  $\beta$ A (la forma tóxica del  $\beta$ AP) se utilizó el reactivo ThT que se une específicamente a estructuras fibrilares (Levine, H. III, Protein Sci., 2: 404-410,1993). Se midió la interferencia con la fibrilla  $\beta$ A ya formada a la misma fracción molar de  $\beta$ AP:scFv como en el ensayo neurotóxico de  $\beta$ A y fue cuantificada por fluorometría ThT. La Figura 13 muestra que 508F(Fv) incubado con fibrillas  $\beta$ A pre-formadas alteró la estructura de la fibrilla indicando deterioro importante de la morfología de la fibrilla, tal como se demuestra por la reducción sustancial (62%) de la fluorescencia ThT.

30

### Ejemplo 7

35

#### *Capacidad del fago filamentoso de entrar en el SNC a través del tracto olfatorio*

Ratones Balb/c hembras fueron tratadas con vector de fago f88-EFRH por administración intranasal. El propósito de este experimento era comprobar la capacidad del fago filamentoso de llegar a la región del hipocampo a través del tracto olfatorio. Dado que el fago no transporta ninguna molécula específica con destino a células neuronales, debería desaparecer sin causar daño varios días después de la administración. A fin de investigar la aparición de fago en el bulbo olfativo y la región del hipocampo, se utilizó doble etiquetado de anticuerpos como sigue: fago antifilamentoso de anticuerpo policlonal de conejo y anticuerpo monoclonal de ratón contra epítipo EFRH fusionado a glicoproteína VIII de la superficie del fago. Un día después de una única administración intranasal de  $10^{11}$  fagos, los animales mostraron dichos fagos en su bulbo olfativo e hipocampo (Figuras 14a-d). Siete días después de la administración se detectaron fagos en el bulbo olfativo de solo un ratón de los tres sometidos al test, mientras que no aparecieron fagos en el hipocampo. 28 días después de la administración no había restos de fago (Figuras 15a-d). Como se indica en las Figuras 16a-d, no había pruebas de cambios en la población de neuronas del cerebro de los ratones tratados.

50

### Ejemplo 8

#### *El fago filamentoso es un vehículo adecuado para transportar fragmentos de anticuerpo activos al SNC*

55 Para verificar si un fago filamentoso puede transportar un anticuerpo al SNC a través del tracto olfatorio y seguir manteniendo su actividad contra el  $\beta$ -amiloide se incubó un fago filamentoso presentando 508F con  $10^{-3}$  M  $\beta$ AP(1-16) biotinilado a fin de formar un inmunocomplejo antígeno anticuerpo. Ratones Balb/c fueron divididos en dos grupos y se les administró intranasalmente dos antígenos diferentes: inmunocomplejo 508F- $\beta$ AP(1-16) y para comparación,  $\beta$ AP(1-16) biotinilado solo. Después de una única dosis los ratones fueron sacrificados y secciones cerebrales de los mismos preparadas y reaccionadas con estreptavidina acoplada a un agente fluorescente. La fluorescencia fue detectada únicamente en secciones cerebrales de ratones a los que se administró 508F- $\beta$ AP(1-16), pero no, o en una medida mucho menor, en secciones cerebrales de ratones a los que se administró  $\beta$ AP(1-16) solo (Figuras 17a-d). Los ratones tratados no se caracterizaron por resultados histológicos (Figuras 18a-d).

60

65 Queda por lo tanto asumido que el fago actúa como un vehículo inerte de anticuerpos al cerebro, transportando la molécula  $\beta$ AP(1-16) al cerebro.

## ES 2 344 189 T3

### Ejemplo 9

#### *Producción de anticuerpos para $\beta$ AP anti-agregación a través de la inmunización de ratones con fago f3-EFRH*

5 El epítipo anti-agregación en  $\beta$ AP (EFRH, SEC N° ID:1) está en las posiciones 3-6 de la secuencia de aminoácidos del  $\beta$ AP. A fin de generar una respuesta inmune específica contra  $\beta$ AP, los ratones fueron inmunizados con fago fd producido mediante ingeniería genética portador del péptido YYEFRH (SEC N° ID:7) fusionado a su gpIII de capa menor de acuerdo con el programa de inmunización indicado en la Figura 19. Se utilizaron dosis de  $10^{10}$  partículas de fago por inyección para inmunizar a intervalos de 14 días mediante inyección intraperitoneal. Al cabo de 7 días de cada inyección, los ratones fueron sangrados y su suero analizado por ELISA para reactividad de anticuerpos IgG contra fago de tipo salvaje (no portador del péptido YYEFRH en su superficie) y contra  $\beta$ AP (Figuras 20a-b). Esta vía de administración produjo una respuesta muy elevada contra  $\beta$ AP (1:750) después de la tercera inyección. Además, se encontró que la inyección a través de fago portador de epítipo es duradera (Figura 21), no tóxica y puede darse sin coadyuvante. Se encontró que el vector de fago era una herramienta inmunogénica para suscitar una respuesta inmune de elevada afinidad a los 14 días de la primera inyección. La respuesta inmune contra el péptido YYEFRH (SEC N° ID:7) es baja, comparada con la respuesta inmune contra el fago entero y podría explicarse por el bajo número de copias de la gpIII de fusión sobre la envoltura del fago. Por lo tanto, para nuevos análisis se emplearon fagos presentando el epítipo a través de la glicoproteína VIII.

### Ejemplo 10

#### *Aislamiento de péptido f88-EFRH -fago presentado por un mAb anti-agregación*

25 Para identificar un epítipo de péptido EFRH desagregante se cribó una biblioteca fago-epítipo con anticuerpo biotinilado. Después de tres ciclos de selección y amplificación del fago, se cultivaron 90 colonias bacterianas individualmente aisladas en placas de microtitulación y se analizó la unión de anticuerpos de sus fagos. El análisis ELISA reveló que de los clones-fago que fueron seleccionados seguidos de tres ciclos de selección de fagos por afinidad (bio-panning), la mayoría (más del 80%) se unió específicamente a mAb anti-agregación, respectivamente. Se secuenció el ADN de 6 clones positivos (Tabla 2). La secuencia EFRH (SEC N° ID:1) apareció en 4 clones, otro clon tuvo la secuencia EPRH (SEC N° ID:1), con solo un sustituto del residuo de prolina con fenilalanina. En otro clon, el péptido insertado lleva la secuencia de los tres residuos FRH (ácidos 2-4 de SEC N° ID:1), faltando el residuo de glutamato.

TABLA 2

35

Secuencia de aminoácidos (nombre)	SEC N° ID.	N° de fagos
VHEPHEFRHVALNPV (C3-II)	8	2
DTEFRHSSNNFSAVR(C7-II)	21	1
STEFRHQTTPLHPNS (C11-I)	22	1
KEPRHHIQHHERVIR (F8-II)	23	1
SAADFRHGSPPI SAF (D3-I)	24	1

50 La unión del mAb anti-agregación al fago portador de EFRH era dependiente de la concentración; se obtuvo la unión media-máxima a una concentración de anticuerpos de 100 ng/ml, correspondiente al  $10^{-9}$  M (Figura 4) que se parece al nivel de unión de estos anticuerpos a todo el péptido. Un fago f88-EFRH específico (denominado C3-II, tabla 2) mostró un nivel más alto de avidéz si se compara con los otros (Figura 22). Puede ser debido al nivel más alto de exposición del epítipo EFRH en su superficie. Los ensayos de unión de f88-EFRH o f3-EFRH con la misma concentración de anticuerpos anti-agregación ( $1 \mu$ /ml) demostraron un número más elevado de copias del epítipo EFRH por fago que puede producir un título de suero más alto por respuesta inmune del fago (Figura 23).

### Ejemplo 11

#### *Producción de anticuerpos $\beta$ AP anti-agregación por inmunización de ratones con fago f88*

65 A fin de generar la misma respuesta inmune específica contra  $\beta$ AP, se inmunizó a ratones con fago fd producido por ingeniería genética portador del péptido VHEPHEFRHVALNPV (N° ID SEC:8) fusionado a su gpVIII de la capa mayor. Este fago fue seleccionado a partir de una biblioteca de péptidos-fago 15-mer por un anticuerpo  $\beta$ AP anti-agregación y presenta el epítipo mAb (subrayado) dentro de  $\beta$ AP. Este fago fue utilizado para inmunizar ratones como se describe. Al cabo de 7 días de cada inyección con  $10^{10}$  partículas de fago (sin coadyuvante) los ratones fueron sangrados y su suero se analizó mediante ELISA para ver su reactividad al anticuerpo IgG contra el fago de

tipo salvaje y contra  $\beta$ AP. Los resultados están resumidos en las Figuras 24a-b. Todos los animales mostraron una respuesta mensurable de anticuerpos IgG contra el fago de tipo salvaje y los títulos aumentaron con la segunda y tercera inyección. Esta ruta también dio las mayores respuestas mensurables contra  $\beta$ AP (1:50,000) después de la tercera inyección (Figura 24b).

5

## Ejemplo 12

*Inhibición de la unión del suero de anticuerpos al péptido  $\beta$ -amiloide*

10

La interacción del suero de ratón inmunizado por fago f88-EFRH con  $\beta$ AP fue analizada también por experimentos de inhibición competitivos. La Figura 25 muestra la inhibición de anticuerpos del suero de ratón con péptidos sintetizados derivados de  $\beta$ AP, cada uno de los cuales incluye la secuencia EFRH) como: DAEFRH (posiciones 1-6, SEC N° ID:3), DAEFRHD (posiciones 1-7, N° ID SEC:3), DAEFRHDSG (posiciones 1-9, N° ID SEC:3), y el propio  $\beta$ AP, DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV (posiciones 1-40, N° ID SEC:3).

15

La Figura 25 muestra que todos los péptidos sintéticos que llevan el motivo EFRH (N° ID SEC:1) inhibieron de manera similar la unión del anticuerpo de suero de ratón a  $\beta$ AP con valores  $IC_{50}$  de aproximadamente  $5 \times 10^{-6}$  M. Estos datos indican que el epítipo de anticuerpo de suero de ratón en la molécula  $\beta$ AP se compone de cuatro residuos de aminoácido correspondientes a las posiciones 3-6 en el  $\beta$ AP que se descubrió que actúa como un sitio regulador que controla tanto la solubilización como el proceso de desagregación de la molécula  $\beta$ A.

20

## Ejemplo 13

25

*Prevención del efecto neurotóxico del  $\beta$ -amiloide por anticuerpo de suero producido contra fago-EFRH*

A fin de descubrir si el suero de ratones inmunizados con f88-EFRH muestra un efecto protector similar al anticuerpo IgG parental en la prevención de la neurotoxicidad mediada por  $\beta$ A para con células cultivadas, se aplicó la prueba *in vitro* utilizando PC 12 de feocromocitoma de rata tal como se describe en (Solomon B. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94: 4109-4112, 1997). Se midió la viabilidad de las células expuestas a  $\beta$ A con o sin anticuerpos. Tal como se indica en la Figura 26, suero diluido a 1:5 impidió la neurotoxicidad de  $\beta$ A (80% viabilidad celular), mientras que el suero no relacionado no mostró efectos.

30

35

## Ejemplo 14

*Desagregación de fibrillas  $\beta$ -amiloides por suero de ratones inmunizados con EFRH*

Para examinar el efecto del suero de ratones inmunizados con f88-EFRH sobre la alteración de la fibrilla  $\beta$ A (la forma tóxica de  $\beta$ AP) se utilizó el reactivo ThT que se une específicamente a estructuras fibrilares (Levine, H. III, Protein Sci., 2: 404-410, 1993). Se incubaron muestras de  $\beta$ AP durante una semana a 37°C y luego se expusieron a anticuerpos de suero de ratón a diferentes diluciones. La formación de fibrillas fue cuantificada por el ensayo de unión por fluorimetría ThT. La Figura 27 muestra que el suero de ratón, a dilución de 1: 5 y 1:20, alteró la estructura fibrilar de  $\beta$ A con un amplio deterioro de la morfología fibrilar, tal como lo indica la sustancial disminución del 75% de la fluorescencia (dilución 1:5) y del 50% (dilución 1:20). El suero no relacionado utilizado como control (suero de ratón no inmunizado), no inhibió de manera importante la formación de fibrillas si se compara con el suero inmunizado. Este resultado resalta de manera importante la capacidad del epítipo EFRH presentada por un vector de fago filamentosos de provocar una respuesta inmune resultante en un anticuerpo anti-agregación.

45

50

## Ejemplo comparativo 15

La posible implicación de la proteína PrP en la patogénesis de la degeneración de las células nerviosas y la reacción de las células gliales condujo a la identificación de secuencias de un PrP que desempeña un papel en la formación de amiloides. Se demostró que un fragmento de PrP compuesto de aminoácidos 106-126 era tóxico para las neuronas hipocámpales de rata (Forloni *et al.* 1993), para las células cerebelares y corticales de ratón (Brown *et al.*, 1994; 1997), y que era particularmente altamente fibrilogénico (Selvaggini *et al.* 1993). Las fibrillas formadas eran parcialmente resistentes a la digestión de proteasas y mostraron propiedades de amiloides *in situ* (Selvaggini *et al.* 1993, Tagliavini *et al.* 1993). Péptidos sintéticos correspondientes a esta región de PrP exhibieron flexibilidad conformacional desde una conformación  $\beta$ -hélice a una conformación  $\beta$ -lámina (Selvaggini *et al.* 1993) que era similar a cambios conformacionales de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup>. La plasticidad conformacional de esta región queda más resaltada aún en los hallazgos de dos cepas de priones distintas que muestran diferentes sitios de desdoblamiento proteolítico en esta región (Bessen and Marsh, 1994; Telling *et al.*, 1996).

55

60

65

Como se describe más adelante, los autores de la presente invención han generado mAbs específicos para epítopos formados por los aminoácidos 106-126 de la proteína PrP. Dichos anticuerpos son útiles para estudiar la morfología y la formación de placas y como posibles agentes para tratar o impedir las enfermedades de placas generadas por priones.

## ES 2 344 189 T3

### *Preparación de anticuerpos monoclonales contra PrP 106-126*

Se utilizaron ratones inmunizados con un péptido sintético correspondiente a la secuencia de aminoácidos del PrP 106-126 humano acoplado al soporte más grande KLH para generar anticuerpos monoclonales reactivos contra epítomos en este péptido. El suero derivado de los ratones inmunizados fue sometido a ELISA y se detectaron y aislaron varios clones positivos compuestos principalmente de moléculas (IgM) de inmunoglobulina M y en menor medida de moléculas IgG.

Dos clones de inmunoglobulina que fueron aislados como se describe arriba y denominados mAbs 3-11 (IgM) y mAb 2-40 (IgG1) fueron utilizados en otros estudios.

### Ejemplo comparativo 16

#### 15 *Búsqueda de la localización del epítipo utilizando biblioteca de presentación de fagos*

Bibliotecas de presentación de fagos presentando varios fragmentos de péptido del polipéptido PrP 106-126 humano fueron generadas como se describe más arriba en la sección de métodos. No se detectaron clones reactivos a mAbs 3-11 o mAb 2-40 (para cada biblioteca) después de 6 ciclos de selección de fagos por afinidad en biblioteca (368 clones explorados) planteando la posibilidad de que los epítomos que son reconocidos por estos anticuerpos sean de una naturaleza conformacional.

### Ejemplo comparativo 17

#### 25 *Inhibición competitiva de anticuerpos unidos a PrP por péptido NMKH*

Los anticuerpos anteriormente descritos anti-PrP 106-126 fueron pre-incubados con un péptido de una secuencia de aminoácidos NMKH (SEC N° ID:26) a fracción equimolar antes de reaccionar con el polipéptido PrP 106-126 a fin de determinar la capacidad de NMKH de competir con PrP 106-126 humano en la unión de anticuerpos. Como se indica en la Figura 28, esta secuencia se conserva en gran medida entre secuencias de humanos y ratones (y otros) con la excepción de dos aminoácidos diferentes, MI09 en lugar de L y M 112 en lugar de Y. Estas dos diferencias aportan probablemente diferencias antigénicas entre la secuencia humana y del ratón, ya que los anticuerpos que se derivaron de ratones inmunizados con la secuencia humana correspondiente a PrP 106-126 no mostraron reactividad cruzada con la secuencia del ratón correspondiente al péptido PrP 106-126.

No se detectó competencia (según análisis ELISA) entre NMKH y todo el péptido, apoyando el indicio de que el epítipo puede depender de conformación tridimensional y no de la estructura primaria. Además, co-reaccionando mAb 3F4 (reconociendo la secuencia MKHM) y mAb 3-11 con PrP 106-126 no produjo una respuesta aditiva, haciendo pensar que sus epítomos pueden ser adyacentes o superpuestos (Solomon y Balas, 1991).

### Ejemplo comparativo 18

#### 45 *Agregación PrP y formación de inmunocomplejo*

La incubación de PrP 106-126 a 37°C a diferentes concentraciones condujo a una agregación fibrilar dosis dependiente medida por el ensayo de fluorescencia de unión con Tioflavina T (Figura 30). Se seleccionó una concentración PrP 106-126 de 0.3 mg/ml para otros estudios.

### Ejemplo comparativo 19

#### 55 *Ensayo de citotoxicidad de PrP 106-126 utilizando células PC12*

Dado que el principal órgano de destino de PrP<sup>Sc</sup> es el sistema nervioso, se utilizaron sistemas de modelo neuronal *in vitro* para analizar la toxicidad PrP. Se estableció una línea celular clonal que muestra propiedades neuronales a partir de tumores del sistema nervioso central de ratas (Schubert *et al.* 1974). Se ha demostrado que las células PC 12 de feocromocitoma de rata - una línea de células tumorales clonadas parecidas a neuronas (Greene y Tischler, 1976) - permiten la replicación *in vitro* de PrP<sup>Sc</sup> (Rubenstein *et al.* 1984). En cuanto tal, esta línea de células fue utilizada en el presente estudio como modelo para detectar moléculas con la capacidad de impedir la toxicidad inducida por fibrillas PrP.

Utilizando este sistema de modelo, se descubrió que PrP 106-126 es tóxico para células PC 12 de una manera dosis dependiente, toxicidad que está relacionada con el estado conformacional del péptido y con el tiempo de exposición de las células al péptido agregado. La viabilidad celular disminuyó considerablemente (tal como se detectó en ensayo MTT), cuando las células fueron incubadas con PrP 106-126 durante 5 días en comparación con una exposición de 3 días. Además, la preincubación de PrP 106-126 a 37°C antes de su adición a las células incrementó su toxicidad

probablemente al aumentar la cantidad de fibrillas amiloides. La preincubación del péptido durante 7 días tuvo como resultado una toxicidad notablemente más alta que era dependiente de la concentración (Figura 29). En las condiciones descritas, la viabilidad celular se redujo el 10% a una concentración de 100  $\mu$ M de PrP 106-126 tal como fue medido en ensayo MTT.

5

Ejemplo comparativo 20

*Prevención de la neurotoxicidad de PrP 106-126*

10

El efecto citoprotector de mAb 3-11 y 2-40 está indicado en la Figura 31. Mabs 3-11 y 2-40 inhibieron la muerte celular que fue inducida por 100  $\mu$ M de PrP 106-126. La viabilidad de células tratadas con una mezcla de anticuerpos y el péptido fue del 85-89%, en comparación con el índice de supervivencia del 40% de las células tratadas sólo con el péptido (Los anticuerpos sin el péptido no tuvieron efecto sobre la viabilidad celular). El efecto protector de los anticuerpos estaba aparentemente relacionado con el epítipo específico de la molécula PrP, dado que dicha protección no fue demostrada con mAb 3F4 (viabilidad 44%).

15

Ejemplo comparativo 21

20

*Propiedades anti-agregación de anticuerpos monoclonales medidos por ensayo ThT*

La formación de fibrillas amiloides de PrP 106-126 fue detectada por un ensayo de unión con tioflavina-T. Ambos mAbs 3-11 y 2-40 impidieron la agregación fibrilar y desagregaron la forma agregada de este péptido. Se observó una disminución significativa en la formación de fibrillas amiloides (80% aproximadamente de prevención) cuando el PrP 106-126 fue incubado a 37°C en presencia de los mAbs 3-11 y 2-40. Cuando se añadieron estos anticuerpos a agregados ya formados de PrP 106-126, más del 50% de las fibrillas se desagregaron. En cambio, mAb 3F4 tuvo menor eficacia tanto para inhibir la formación de fibrillas amiloides como para inducir su desagregación (Figura 32). Tanto la inhibición de la formación de fibrillas amiloides como la inducción de desagregación fueron dependientes de la concentración de anticuerpos y de la localización del epítipo (Figuras 32-33).

30

El efecto protector de mAbs 3-11 y 2-40 de la presente invención y de mAb 3F4 fue calculado tal como se indica en la Ecuación 1 siguiente:

35 Ecuación 1

$$\% \text{ efecto protector} = \frac{\text{Emisión 482 nm (Pr P106 - 126 incubado con Ab)}}{\text{Emisión 482 nm (Pr P106 - 126 incubado solo)}} \times 100$$

40

## Referencias

45 **Bessen, R.A. and Marsh, R.F. (1994).** Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J. Virol.* 68, 7859-7868.

50 **Blaney, J.M., Jorgensen, E.C., Connolly, M.L., Ferrin, T.E., Langridge, R., Oatley, S.J., Burrige, J.M. and Blake, C.C.F. (1982)** Computer graphics in drug design: molecular modeling of thyroid hormone-prealbumin interactions. *J. Med. Chem.* 25, 785-790.

**Blond, S. and Goldberg, M. (1987)** Partly native epitopes are already present on early intermediates in the folding of tryptophan synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1147-1151.

55 **Brown, D.R., HERNIS, J. and Kretzschmar, H.A. (1994)** Mouse cortical cells lacking cellular PrP survive in culture with aneurotoxic PrP fragment. *Neuroreport* 5, 2057-2060.

**Brown, D. R., Herms, J.W., Schmidt, B. and Kretzschmar, H.A. (1997)** Different requirements for the neurotoxicity of fragments of PrP and  $\alpha$ -amyloid. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1162-1169.

60

**Carlson, J.D. and Yarmush, M.L. (1992)** Antibody assisted protein refolding. *Biotechnology* 10, 86-89.

**Caughey, B.W., Dong, A., Bhat, K.S., Ernst, D., Hayes, S.F., Caughey, W.S. (1991)** Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry.* 30, 7672-7680.

65

**De Gioia, L., Selvaggini, C., Ghibaudi, E., Diomede, L., Bugiani, O., Forloni, G., Tagliavini, F. and Salmona, M. (1994)** Conformational polymorphism of the amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein. *J Biol Chem.* 269, 7859-7862.

- Donne, D.G., Viles, J.H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T.L., Cohén, F.E., Prusiner, S.B., Wright, P.E. and Dyson, H. (1997)** Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13452-13457.
- 5 **Forloni, G., Angeretti, N., Chiesa R., Monzani, E., Salmona, M., Bugiani, O., and Tagliavini, F. (1993)** Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362, 543-546.
- Frauenfelder, H., Petsko, G.A. and Tsernoglou, D. (1979)** Temperature-dependent X-ray diffraction as a probe of prote Nature 1989 Oct 5;341(6241):462-4 in structural dynamics. *Nature* 280, 558-563.
- 10 **Frenkel, D., Bailas, M. and Solomon, B. (1998)** N-terminal EFRH sequence of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptide represents the epitope of its anti-aggregating antibodies. *J. Neuroimmunology* 88, 85-90.
- Greene, L.A. and Tischler, A.S. (1976)** Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 2424-2428.
- 15 **Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K. (1989)** Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 119, 203-210.
- 20 **Harlow, E. and Lañe, D. (1988)** Antibodies, a laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory), *Chapter 8*.
- Horiuchi, M. and Caughey B. (1999)** Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state *EMBO J.* 18, 3193-3203.
- 25 **Kanyo, Z.F., Pan, K.M., Williamson, R.A., Burton, D.R., Prusiner, S.B., Fletterick, R.J. and Cohén, F.E. (1999)** Antibody binding defines a structure for an epitope that participates in the PrP<sup>C</sup>->PrP<sup>Sc</sup> conformational change. *J Mol Biol.* 293,855-863.
- Karplus, M. and Petsko, G.A. (1990)** Molecular dynamics simulations in biology. *Nature* 347, 631-639.
- 30 **Kohler, G. and Milstein, C. (1975)** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Le Vine, H. III (1993)** Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* 2, 404-410.
- 35 **Miroy, G.J., Lai, Z., Lashuel, H.A., Peterson, S.A., Strang, C. and Kelly, J.W. (1996)** Inhibiting transthyretin amyloid fibril formation via protein stabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 15051-15056.
- 40 **Muramoto, T., Scott, M., Cohén, F.E. and Prusiner, S.B. (1996)** Recombinant scrapie-like prion protein of 106 amino acids is soluble. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 15457-15462.
- Naiki, H., Higuchi, K., Hosakawa, M. and Takeda, T. (1989)** Fluorometric determination of amyloid fibrils *in vitro* using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal. Biochem.*, 177, 244-249.
- 45 **Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohén, F.E. and Prusiner, S.B. (1993)** Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90, 10962-10966.
- 50 **Peretz, D., Williamson, R.A., Matsunaga, Y., Serban, H., Pinilla, C., Bastidas, R.B., Rozenshteyn, R., James, T.L., Houghten, R.A., Cohén, F.E., Prusiner, S.B. and Burton, D.R. (1997)** A conformational transition at the N terminus of the prion protein features in formation of the scrapie isoform. *J. Mol. Biol.* 273, 614-622.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R., Wüthrich, K (1997)** NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett.* 413,282-288.
- 55 **Rubenstein, R, Carp, R.I. and Callahan, S.M. (1984)** *in vitro* replication of scrapie agent in a neuronal model: infection of PC 12 cells. *J Gen Virol* 65, 2191-2198.
- 60 **Schubert, D., Heinemann, S., Carlisle, W., Tarikas, H., Kimes, B., Patrick, J., Steinbach, J.H., Culp, W. and Brandt, B.L. (1974)** Clonal cell lines from the rat central nervous system. *Nature* 249, 224-227.
- Selvaggini, C., De Gioia, L., Cantu, L., Ghibaudi, E., Diomedede, L., Passerini, F., Forloni, G., Bugiani, O., Tagliavini, F. and Salmona, M. (1993)** Molecular characteristics of a protease-resistant, amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 1380-1386.
- 65 **Silen, J.L. and Agard, D.A. (1989)** The alpha-lytic protease pro-region does not require a physical linkage to activate the protease domain *in vivo*. *Nature* 341, 462-464.

- Solomon, B. and Balas N. (1991)** Thermostabilization of carboxypeptidase A by interaction with its monoclonal antibodies. *Biotechnol Appl Biochem.* 14, 202-211.
- Solomon, B., Fleminger, G., Schwartz, F., Doolman, R. and Sela, B.A. (1992)** Microalbuminuria immunoassay based on antibodies covalently conjugated to Eupergit C-coated beads. *Diabetes Care* 15, 1451-1454.
- Solomon, B., Schmitt, S., Schwartz, F., Levi, A. and Fleminger, G. (1993)** Eupergit C-coated membranes as solid support for a sensitive immunoassay of human albumin. *J. Immunol. Methods* 157, 209-215.
- Solomon, B., and Schwartz, F. (1995)** Chaperone-like effect of monoclonal antibodies on refolding of heat-denatured carboxypeptidase A. *J. Mol. Recognit.* 8, 72-76.
- Solomon, B., Koppel, R., Hanan, E. and Katzav, T. (1996)** Monoclonal antibodies inhibit *in vitro* fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 452-455.
- Solomon, B., Koppel, R., Frankel, D., Hanan-Aharon, E. (1997)** Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by sitedirected mAb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4109-4112.
- Tagliavini, F., Prelli, F., Verga, L., Giaccone, G., Sarma, R., Gorevic, P., Ghetti, B., Passerini, F., Ghibaudi, E., Forloni, G., Salmona, M., Bugiani, O. and Frangione, B. (1993)** Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106-147 form amyloid-like fibrils *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9678-9682.
- Telling, G.C., Parchi, P., DeArmond, S.J., Cortelli, P., Montagna, P., Gabizon, R., Mastrianni, J., Lugaresi, E., Gambetti, P. and Prusiner, S.B. (1996)** Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science*, 274, 2079-2082.
- Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., López García, F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G. and Wuthrich, K. (2000)** NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97, 145-150.

#### Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es para información del lector únicamente. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en la compilación de referencias, no se puede excluir la existencia de errores u omisiones y la EPO declina toda responsabilidad al respecto.

#### Documentos de patentes citados en la descripción

- US 5688561 A [0009]
- EP 526511 A, McMichael [0010]
- US 9825386 W, Schenk [0011]
- WO 0115655 A [0018]
- US 4666828 A [0122]
- US 4683202 A [0122]
- US 4801531 A [0122]
- US 5192659 A [0122]
- US 5272057 A [0122]
- US 3791932 A [0122]
- US 3839153 A [0122]
- US 3850752 A [0122]
- US 3850578 A [0122]
- US 3853987 A [0122]
- US 3867517 A [0122]

## ES 2 344 189 T3

- US 3879262 A [0122]
- US 3901654 A [0122]
- 5 • US 3935074 A [0122]
- US 3984533 A [0122]
- US 3996345 A [0122]
- 10 • US 4034074 A [0122]
- US 4098876 A [0122]
- 15 • US 4879219 A [0122]
- US 5011771 A [0122]
- US 5281521 A [0122]
- 20

### **Bibliografía no correspondiente a patentes citada en la descripción**

- **Wilesmith; Wells.** *Curr Top Microbiol Immunol*, 1991, vol. 172, 21-38 [0002]
- 25 • **Gajdusek.** *Science*, 1977, vol. 197, 943-960 [0002]
- **Medori, Tritschler et al.** *N Engl J Med*, 1992, vol. 326, 444-449 [0002]
- **Goate et al.** *Nature*, 1991, vol. 349, 704 [0005]
- 30 • **Murrell et al.** *Science*, 1991, vol. 254, 97 [0005]
- **Mullan et al.** *Nature Genet*, 1992, vol. 1, 345 [0005]
- 35 • **Hardy.** *TINS*, 1997, vol. 20, 154 [0006]
- **Young AA. et al.** *FEBS Lett*, 1994, vol. 343 (3), 237-41 [0007]
- **Banks; Kastin.** *Prog Brain Res.*, 1992, vol. 91, 139-4 [0007]
- 40 • **Seubert et al.** *Nature*, 1992, vol. 359, 325-327 [0010]
- **Schenk et al.** *Nature*, 1999, vol. 400, 173-177 [0011] [0017]
- 45 • **Hanan; Solomon.** *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.*, 1996, vol. 3, 130-133 [0013]
- **Solomon et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1996, vol. 93, 452-455 [0013]
- **Solomon et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, vol. 94, 4109-4112 [0013]
- 50 • **Frenkel D., J.** *Neuroimmunol.*, 1998, vol. 88, 85-90 [0014]
- **Solomon, B. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1997, vol. 94, 4109-4112 [0014]
- 55 • **Solomon, B. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1996, vol. 93, 452-455 [0014] [0127]
- **Frenkel; Solomon.** *J. of Neuroimmunol.*, 1998, vol. 88, 85-90 [0015]
- **Anavi, S. M.** Se. thesis from the Department of Molecular Microbiology and Biotechnology of the Tel-Aviv  
60 University, 1998 [0058]
- **Schenk et al.** *Nature*, 1999, vol. 100, 173-177 [0059]
- **Mathison et al.** *J. Drug Target*, 1998, vol. 5 (6), 415-441 [0062]
- 65 • **Chou et al.** *Biopharm Drug Dispos.*, 1997, vol. 18 (4), 335-46 [0062]
- *Gene Therapy*, 1995, vol. 2, 418-423 [0062]

## ES 2 344 189 T3

- **Draghia et al.** *Gene Therapy*, 1995, vol. 2, 418-423 [0063]
- **Delmastro et al.** *Vaccine*, 1997, vol. 15, 1276-1285 [0068]
- 5 • **Willis et al.** *Gene*, 1993, vol. 128, 79-83 [0068]
- **Poul et al.** *J. Mol. Biol.*, 1999, vol. 288, 203-211 [0068]
- **Larocca et al.** *Hum. Gene Ther.*, 1998, vol. 9, 2393-2399 [0068]
- 10 • Epitope Mapping Protocols in *Methods in Molecular Biology*. 1996, vol. 66 [0081]
- **Burke et al.** *J. Inf. Dis.*, 1994, vol. 170, 1110-19 [0081]
- 15 • **Tigges et al.** *J. Immunol.*, vol. 156, 3901-3910 [0081]
- **Johnstone; Thorpe.** *Immunochemistry in Practice*. Blackwell Scientific Publications, 1982 [0088]
- **Harlow; Lañe.** *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Publications, 1988 [0088]
- 20 • **Borrebaeck.** *Antibody Engineering - A Practical Guide*. W.H. *Freeman and Co*, 1992 [0088]
- Remington's *Pharmaceutical Sciences*. *Mack Publishing Co*, [0098]
- 25 • **Fingí et al.** *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 1975, 1 [0116]
- **Sambrook et al.** *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 1989 [0122]
- *Current Protocols in Molecular Biology*. 1994, vol. I-III [0122]
- 30 • **Ausubel et al.** *Current Protocols in Molecular Biology*. *John Wiley and Sons*, 1989 [0122]
- **Perbal.** *A Practical Guide to Molecular Cloning*. *John Wiley & Sons*, 1988 [0122]
- 35 • **Watson et al.** *Recombinant DNA*. *Scientific American Books* [0122]
- *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series*. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1998, vol. 1-4 [0122]
- 40 • *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. 1994, vol. I-III [0122]
- *Current Protocols in Immunology*. 1994, vol. I-III [0122]
- *Basic and Clinical Immunology*. *Appleton & Lange*, 1994 [0122]
- 45 • *Selected Methods in Cellular Immunology*. W. H. *Freeman and Co*, 1980 [0122]
- *Oligonucleotide Synthesis*. 1984 [0122]
- *Nucleic Acid Hybridization*. 1985 [0122]
- 50 • *Transcription and Translation*. 1984 [0122]
- *Animal Cell Culture*. 1986 [0122]
- 55 • *Immobilized Cells and Enzymes*. *IRL Press*, 1986 [0122]
- **Perbal, B.** *A Practical Guide to Molecular Cloning*. 1984 [0122]
- *Methods in Enzymology*. *Academic Press*, vol. 1-317 [0122]
- 60 • *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*. *Academic Press*, 1990 [0122]
- **Marshak et al.** *Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual*. *CSHL Press*, 1996 [0122]
- 65 • **Berdichevsky Y et al.** *J Immunol Methods.*, 1999, vol. 228 (1-2), 151-62 [0126]
- **Morag E et al.** *Appl Environ Microbiol.*, 1995, vol. 61 (5), 1980-6 [0126]

- **Berdichevsky Y et al.** *Protein Expr Purif.*, 1999, vol. 17 (2), 249-59 [0128] [0161] [0162]
- **Studier, F.W. et al.** *Methods Enzymol.*, 1990, vol. 85, 60-89 [0128]
- 5 • **Laemmli, U.K.** *Nature*, 1970, vol. 227, 263-270 [0128]
- **Solomon B. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1997, vol. 94, 4109-4112 [0129]
- **Lefenbrve, B. et al.** *Biotechniques*, 1995, vol. 19, 186-188 [0130]
- 10 • **Berdichevsky Y.** *J Immunol Methods.*, 1999, vol. 228 (1-2), 151-62 [0130]
- **Sladowski, D. et al.** *J. Immunol. Methods.*, 1993, vol. 157, 203-207 [0133] [0150]
- 15 • **Kabat, E. et al.** *Sequences of proteins of immunological interest.* 1991 [0162]
- **Kirpriyanov, M.S. et al.** *Protein Engineering*, 1997, vol. 10, 445-453 [0162]
- **Kabat, E. A. et al.** *Sequences of proteins of immunological interest.* 1991 [0163]
- 20 • **Solomon B. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1997, vol. 94, 4109-4112 [0176]
- **Bessen, R.A.; Marsh, R.F.** Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J. Virol.*, 1994, vol. 68, 7859-7868 [0191]
- 25 • **Blaney, J.M.; Jorgensen, E.C.; Connolly, M.L.; Ferrin, T.E.; Langridge, R.; Oatley, S.J.; Burridge, J.M.; Blake, C.C.F.** Computer graphics in drug design: molecular modeling of thyroid hormone-prealbumin interactions. *J. Med. Chem.*, 1982, vol. 25, 785-790 [0191]
- 30 • **Blond, S.; Goldberg, M.** Partly native epitopes are already present on early intermediates in the folding of tryptophan synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 1147-1151 [0191]
- **Brown, D.R.; Hernis, J.; Kretzschmar, H.A.** Mouse cortical cells lacking cellular PrP survive in culture with aneurotoxic PrP fragment. *Neuroreport*, 1994, vol. 5, 2057-2060 [0191]
- 35 • **Brown, D. R.; Herms, J.W.; Schmidt, B.; Kretzschmar, H.A.** Different requirements for the neurotoxicity of fragments of PrP and a-amyloid. *Eur. J. Neurosci.*, 1997, vol. 9, 1162-1169 [0191]
- **Carlson, J.D.; Yarmush, M.L.** Antibody assisted protein refolding. *Biotechnology*, 1992, vol. 10, 86-89 [0191]
- 40 • **Caughey, B.W.; Dong, A.; Bliat, K.S.; Ernst, D.; Hayes, S.F.; Caughey, W.S.** Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 1991, vol. 30, 7672-7680 [0191]
- 45 • **De Gioia, L.; Selvaggini, C.; Ghibaudi, E.; Diomede, L.; Bugiani, O.; Forloni, G.; Tagliavini, F.; Salmona, M.** Conformational polymorphism of the amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein. *J Biol Chem.*, 1994, vol. 269, 7859-7862 [0191]
- **Donne, D.G.; Viles, J.H.; Groth, D.; Mehlhorn, I.; James, T.L.; Cohén, F.E.; Prusiner, S.B.; Wright, P.E.; Dyson, H.** Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 13452-13457 [0191]
- 50 • **Forloni, G.; Angeretti, N.; Chiesa R.; Monzani, E.; Salmona, M.; Bugiani, O.; Tagliavini, F.** Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature*, 1993, vol. 362, 543-546 [0191]
- 55 • **Frauenfelder, H.; Petsko, G.A.; Tsernoglou, D.** Temperature-dependent X-ray diffraction as a probe of prote. *Nature*, 05 October 1989, vol. 341 (6241), 462-4 [0191]
- *Nature*, vol. 280, 558-563 [0191]
- 60 • **Frenkel, D.; Bailas, M.; Solomon, B.** N-terminal EFRH sequence of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptide represents the epitope of its anti-aggregating antibodies. *J. Neuroimmunology*, 1998, vol. 88, 85-90 [0191]
- **Greene, L.A.; Tischler, A.S.** Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, vol. 73, 2424-2428 [0191]
- 65 • **Hansen, M.B.; Nielsen, S.E.; Berg, K.** Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*, 1989, vol. 119,203-210 [0191]

## ES 2 344 189 T3

- **Harlow, E.; Lañe, D.** Antibodies, a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 1988 [0191]
- **Horiuchi, M.; Caughey B.** Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. *EMBO J.*, 1999, vol. 18, 3193-3203 [0191]
- 5 • **Kanyo, Z.F.; Pan, K.M.; Williamson, R.A.; Burton, D.R.; Prusiner, S.B.; Fletterick, R.J.; Cohén, F.E.** Antibody binding defines a structure for an epitope that participates in the PrPC $\rightarrow$ PrP<sup>Sc</sup> conformational change. *J Mol Biol.*, 1999, vol. 293, 855-863 [0191]
- 10 • **Karplus, M.; Petsko, G.A.** Molecular dynamics simulations in biology. *Nature*, 1990, vol. 347, 631-639 [0191]
- **Kohler, G.; Milstein, C.** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, vol. 256, 495-497 [0191]
- 15 • **LeVine, H. III.** Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.*, 1993, vol. 2, 404-410 [0191]
- **Miroy, G.J.; Lai, Z.; Lashuel, H.A.; Peterson, S.A.; Strang, C.; Kelly, J.W.** Inhibiting transthyretin amyloid fibril formation via protein stabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 15051-15056 [0191]
- 20 • **Muramoto, T.; Scott, M.; Cohén, F.E.; Prusiner, S.B.** Recombinant scrapie-like prion protein of 106 amino acids is soluble. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 15457-15462 [0191]
- **Naiki, H.; Higuchi, K.; Hosakawa, M.; Takeda, T.** Fluorometric determination of amyloid fibrils *in vitro* using the fluorescent dye, thioflavin TI. *Anal. Biochem.*, 1989, vol. 177, 244-249 [0191]
- 25 • **Pan, K.M.; Baldwin, M.; Nguyen, J.; Gasset, M.; Serban, A.; Groth, D.; Mehlhorn, I.; Huang, Z.; Fletterick, R.J.; Cohén, F.E.** Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1993, vol. 90, 10962-10966 [0191]
- 30 • **Peretz, D.; Williamson, R.A.; Matsunaga, Y.; Serban, H.; Pinilla, C.; Bastidas, R.B.; Rozenshteyn, R.; James, T.L.; Houghten, R.A.; Cohen, F.E.** A conformational transition at the N terminus of the prion protein features in formation of the scrapie isoform. *J. Mol. Biol.*, 1997, vol. 273, 614-622 [0191]
- 35 • **Riek, R.; Hornemann, S.; Wider, G.; Glockshuber, R.; Wüthrich, K.** NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett.*, 1997, vol. 413, 282-288 [0191]
- **Rubenstein, R.; Carp, R.I.; Callaban, S.M.** *in vitro* replication of scrapie agent in a neuronal model: infection of PC 12 cells. *J Gen Virol*, 1984, vol. 65, 2191-2198 [0191]
- 40 • **Schubert, D.; Heinemann, S.; Carlisle, W.; Tarikas, H.; Kimes, B.; Patrick, J.; Steinbach, J.H.; Culp, W.; Brandt, B.L.** Clonal cell lines from the rat central nervous system. *Nature*, 1974, vol. 249,224-227 [0191]
- **Selvaggini, C.; De Gioia, L.; Cantu, L.; Ghibaudi, E.; Diomede, L.; Passerini, F.; Forloni, G.; Bugiani, O.; Tagliavini, F.; Salmona, M.** Molecular characteristics of a protease-resistant, amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, vol. 194,1380-1386 [0191]
- 45 • **Silen, J.L.; Agard, D.A.** The alpha-lytic protease pro-region does not require a physical linkage to activate the protease domain *in vivo*. *Nature*, 1989, vol. 341, 462-464 [0191]
- 50 • **Solomon, B.; Balas N.** Thermostabilization of carboxypeptidase A by interaction with its monoclonal antibodies. *Biotechnol Appl Biochem.*, 1991, vol. 14,202-211 [0191]
- 55 • **Solomon, B.; Fleminger, G.; Schwartz, F.; Doolman, R.; Sela, B.A.** Microalbuminuria immunoassay based on antibodies covalently conjugated to Eupergit C-coated beads. *Diabetes Care*, 1992, vol. 15, 1451-1454 [0191]
- **Solomon, B.; Schmitt, S.; Schwartz, F.; Levi, A.; Fleminger, G.** Eupergit C-coated membranes as solid support for a sensitive immunoassay of human albumin. *J. Immunol. Methods*, 1993, vol. 157, 209-215 [0191]
- 60 • **Solomon, B.; Schwartz, F.** Chaperone-like effect of monoclonal antibodies on refolding of heat-denatured carboxypeptidase A. *J. Mol. Recognit.*, 1995, vol. 8, 72-76 [0191]
- **Solomon, B.; Koppel, R.; Hanan, E.; Katzav, T.** Monoclonal antibodies inhibit *in vitro* fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 452-455 [0191]
- 65 • **Solomon, B.; Koppel, R.; Frankel, D.; Hanan-Aharon, E.** Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site-directed mAb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94,4109-4112 [0191]

## ES 2 344 189 T3

• **Tagliavini, F.; Prelli, F.; Verga, L.; Giaccone, G.; Sarma, R.; Gorevic, P.; Ghetti, B.; Passerini, F.; Ghibaudi, E.; Forloni, G.** Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106-147 form amyloid-like fibrils *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 9678-9682 [0191]

5 • **Telling, G.C.; Parchi, P.; DeArmond, S.J.; Cortelli, P.; Montagna, P.; Gabizon, R.; Mastrianni, J.; Lugaresi, E.; Gambetti, P.; Prusiner, S.B.** Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science*, 1996, vol. 274, 2079-2082 [0191]

10 • **Zahn, R.; Liu, A.; Luhrs, T.; Riek, R.; Schroetter, C.; López Garcia, F.; Billeter, M.; Calzolari, L.; Wider, G.; Wuthrich, K.** NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2000, vol. 97, 145-150 [0191]

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica, que comprende un soporte farmacéuticamente aceptable y, como ingrediente activo, un vehículo viral de presentación que es una partícula viral no apta para la propagación *in vivo*, vehículo de presentación que presenta un polipéptido, donde dicho polipéptido comprende al menos un epítipo del beta-amiloide ( $A\beta$ ), y donde dicho epítipo genera anticuerpos de unión con  $A\beta$  contra dicho epítipo durante la administración a un sujeto y donde dichos anticuerpos inhiben la agregación de dicho beta-amiloide.
- 10 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, donde dicha partícula viral no apta para la propagación *in vivo* se elige en el grupo que consiste en una partícula viral de ADN bicatenario no apta para la propagación *in vivo*, una partícula viral de ADN monocatenario no apta para la propagación *in vivo*, una partícula viral de ARN de cadena positiva no apta para la propagación *in vivo* y una partícula viral de ARN de cadena negativa no apta para la propagación *in vivo*.
- 15 3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde dicha partícula viral no apta para la propagación *in vivo* es una partícula de bacteriófago no apta para la propagación *in vivo*.
- 20 4. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha partícula viral no apta para la propagación *in vivo* se elige de forma que, menos de 30 días después de una introducción de una triple dosis de  $10^{10}$  unidades de ésta en el receptor, un título de dichos anticuerpos sea superior a 1:50 000, de la manera determinada por el análisis ELISA.
- 25 5. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho epítipo es EFRH (SEC N° ID: 1), DAEFRH (residuos 1-6 de SEC N° ID: 3), DAEFRHD (residuos 1-7 de la SEC N° ID: 3), o DAEFRHDSG (residuos 1-9 de la SEC N° ID: 3).
- 30 6. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho epítipo comprende EFRH (SEC N° ID: 1).
- 35 7. Utilización de una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la producción de un medicamento destinado al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 40 8. Utilización según la reivindicación 7, donde dicha partícula viral no apta para la propagación *in vivo* se elige en el grupo que consiste en una partícula viral de ADN bicatenario no apta para la propagación *in vivo*, una partícula viral de ADN monocatenario no apta para la propagación *in vivo*, una partícula viral de ARN de cadena positiva no apta para la propagación *in vivo* y una partícula viral de ARN de cadena negativa no apta para la propagación *in vivo*.
- 45 9. Utilización según la reivindicación 7, donde dicha partícula viral no apta para la propagación *in vivo* es una partícula de bacteriófago no apta para la propagación *in vivo*.
- 50 10. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde la enfermedad de Alzheimer es la enfermedad de Alzheimer de aparición precoz.
- 55 11. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde la enfermedad de Alzheimer es la enfermedad de Alzheimer de aparición tardía.
- 60 12. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde la enfermedad de Alzheimer es la enfermedad de Alzheimer presintomática.
- 65 13. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, donde dicho medicamento está destinado a la introducción en el organismo del receptor de manera que se inhiba la agregación del beta-amiloide por aplicación de dicha partícula viral no apta para la propagación *in vivo* en el sistema olfativo del receptor.
14. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, donde dicho epítipo es EFRH (SEC N° ID: 1), DAEFRH (residuos 1-6 de la SEC N° ID: 3), DAEFRHD (residuos 1-7 de la SEC N° ID: 3), o DAEFRHDSG (residuos 1-9 de la SEC N° ID: 3).
15. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, donde dicho epítipo comprende EFRH (SEC N° ID: 1).
16. Agente que comprende un vehículo viral de presentación que es una partícula viral no apta para la propagación *in vivo*, vehículo de presentación que presenta un polipéptido, donde dicho polipéptido comprende al menos un epítipo de beta-amiloide ( $A\beta$ ), y donde dicho epítipo genera anticuerpos de unión con  $A\beta$  contra dicho epítipo durante la administración a un sujeto y donde dichos anticuerpos inhiben la agregación de dicho beta-amiloide.

## ES 2 344 189 T3

17. Agente según la reivindicación 16, donde dicha partícula viral no apta para la propagación *in vivo* se elige en el grupo que consiste en una partícula viral de ADN bicatenario no apta para la propagación *in vivo*, una partícula viral de ADN monocatenario no apta para la propagación *in vivo*, una partícula viral de ARN de cadena positiva no apta para la propagación *in vivo* y una partícula viral de ARN de cadena negativa no apta para la propagación *in vivo*.

5

18. Agente según la reivindicación 16 o la reivindicación 17, donde dicha partícula viral no apta para la propagación *in vivo* es una partícula de bacteriófago no apta para la propagación *in vivo*.

19. Agente según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, donde dicha partícula viral no apta para la propagación *in vivo* se elige de manera que, menos de 30 días después de una introducción de una triple dosis de 1010 unidades de ésta en el receptor, un título de dichos anticuerpos sea superior a 1:50 000, de la manera determinada por el análisis ELISA.

10

20. Agente según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, donde dicho epítipo es EFRH (SEC N° ID: 1), DAEFRH (residuos 1-6 de la SEC N° ID: 3), DAEFRHD (residuos 1-7 de la SEC N° ID: 3), o DAEFRHDSG (residuos 1-9 de la SEC N° ID: 3).

15

21. Agente según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, donde dicho epítipo comprende EFRH (SEC N° ID: 1).

20

22. Utilización de un agente según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, en la producción de un medicamento destinado al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

23. Utilización según la reivindicación 22, donde dicha partícula viral no apta para la propagación *in vivo* se elige en el grupo que consiste en una partícula viral de ADN bicatenario no apta para la propagación *in vivo*, una partícula viral de ADN monocatenario no apta para la propagación *in vivo*, una partícula viral de ARN de cadena positiva no apta para la propagación *in vivo* y una partícula viral de ARN de cadena negativa no apta para la propagación *in vivo*.

25

24. Utilización según la reivindicación 22, donde dicha partícula viral no apta para la propagación *in vivo* es una partícula de bacteriófago no apta para la propagación *in vivo*.

30

25. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, donde la enfermedad de Alzheimer es la enfermedad de Alzheimer de aparición precoz.

26. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, donde la enfermedad de Alzheimer es la enfermedad de Alzheimer de aparición tardía.

35

27. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, donde la enfermedad de Alzheimer es la enfermedad de Alzheimer presintomática.

40

28. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 27, donde dicho medicamento está destinado a la introducción en el organismo del receptor de manera que se inhiba la agregación de beta-amiloide aplicando dicha partícula no apta para la propagación *in vivo* en el sistema olfativo del receptor.

29. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 28, donde dicho epítipo es EFRH (SEC N° ID: 1), DAEFRH (residuos 1-6 de la SEC N° ID: 3), DAEFRHD (residuos 1-7 de la SEC N° ID: 3), o DAEFRHDSG (residuos 1-9 de la SEC N° ID: 3).

45

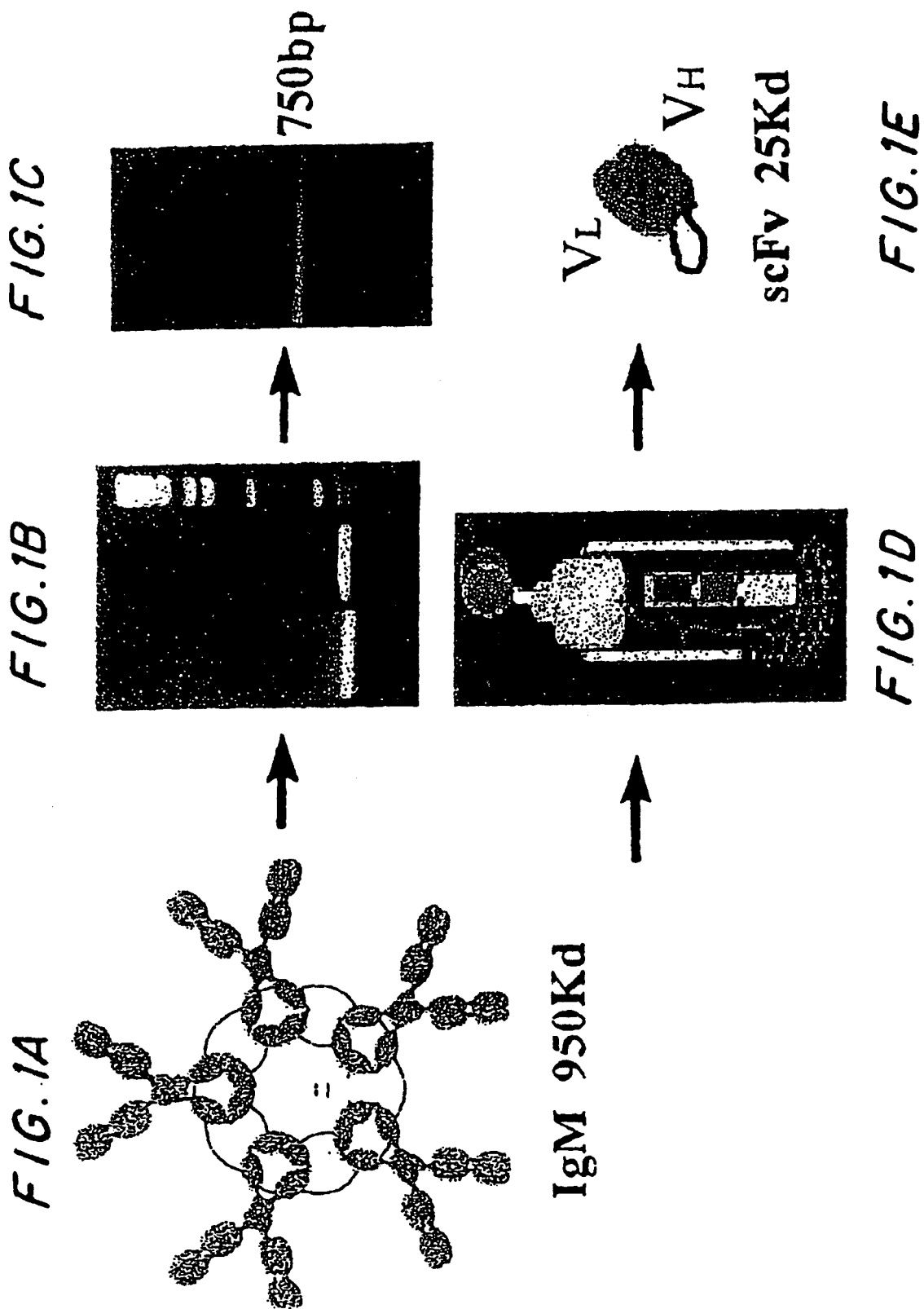
30. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 29, donde dicho epítipo comprende EFRH (SEC N° ID: 1).

50

55

60

65





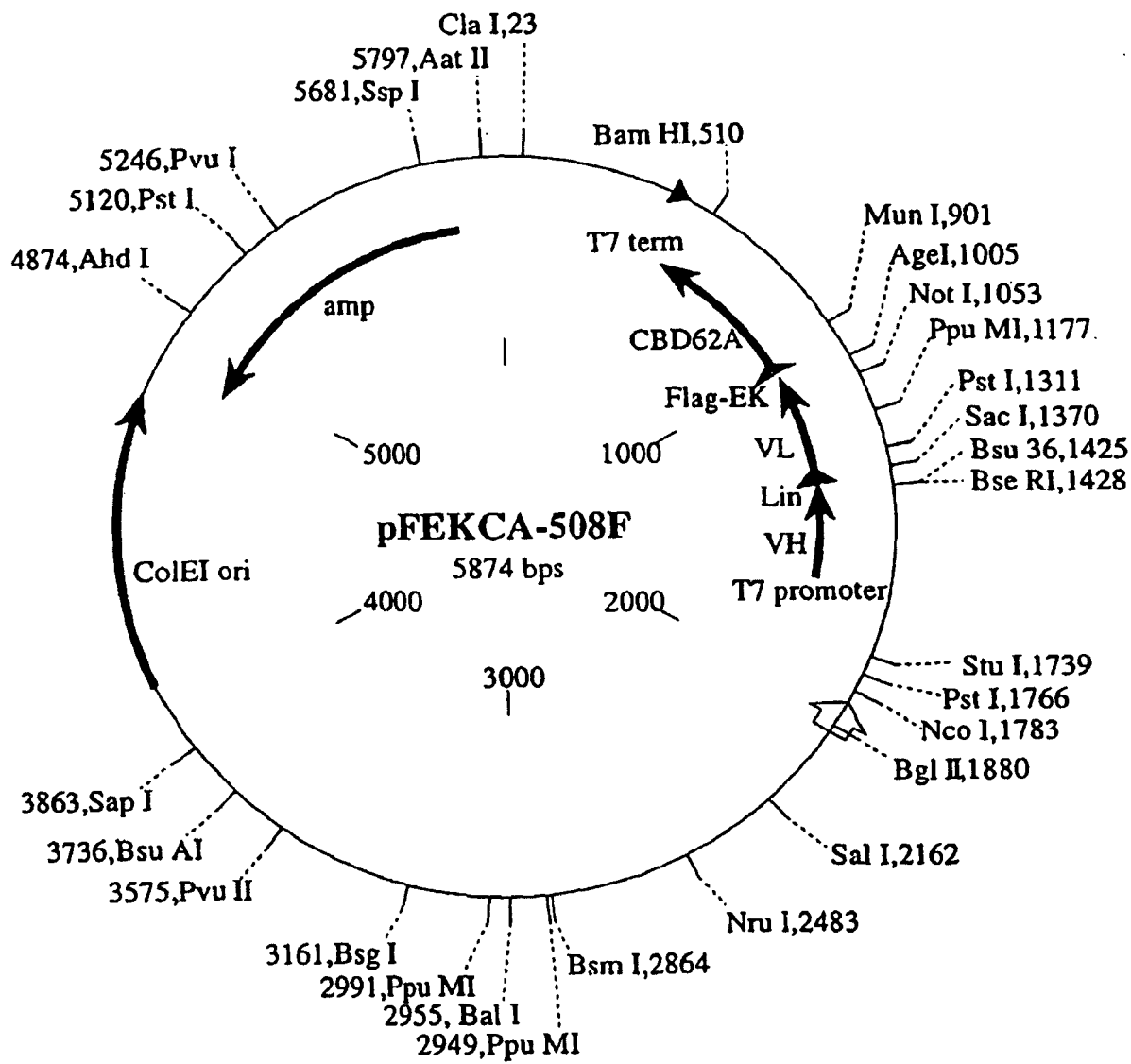


FIG. 3

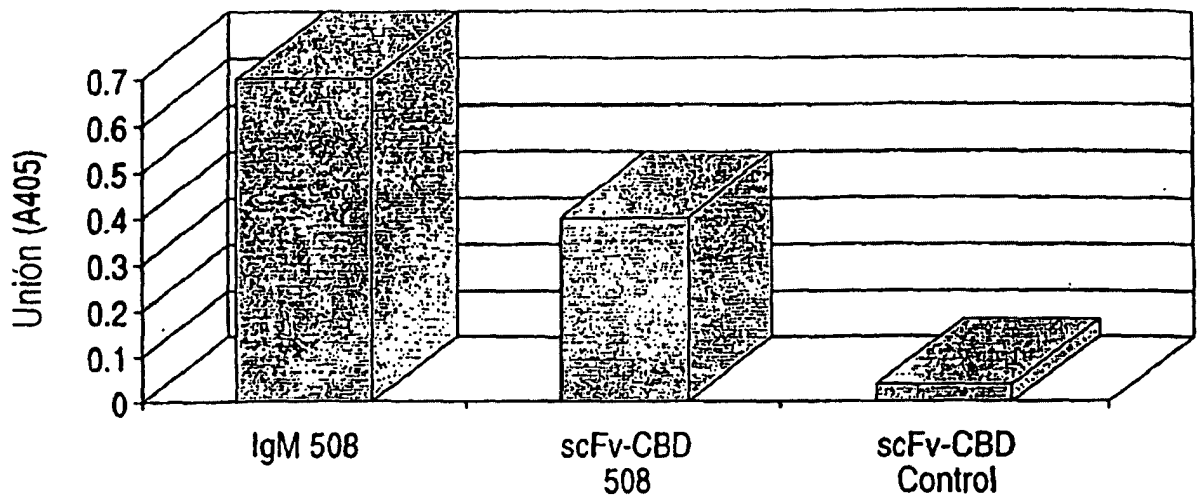


FIG.4

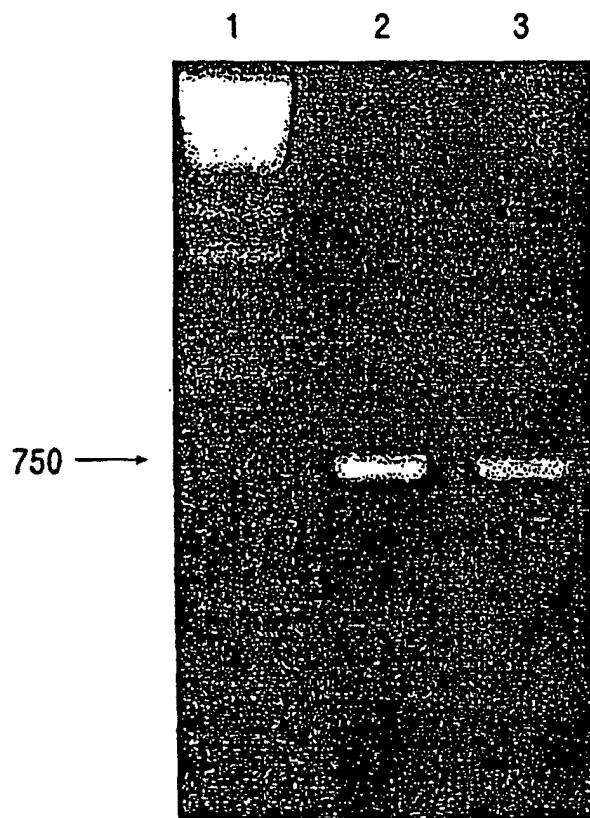


FIG.5

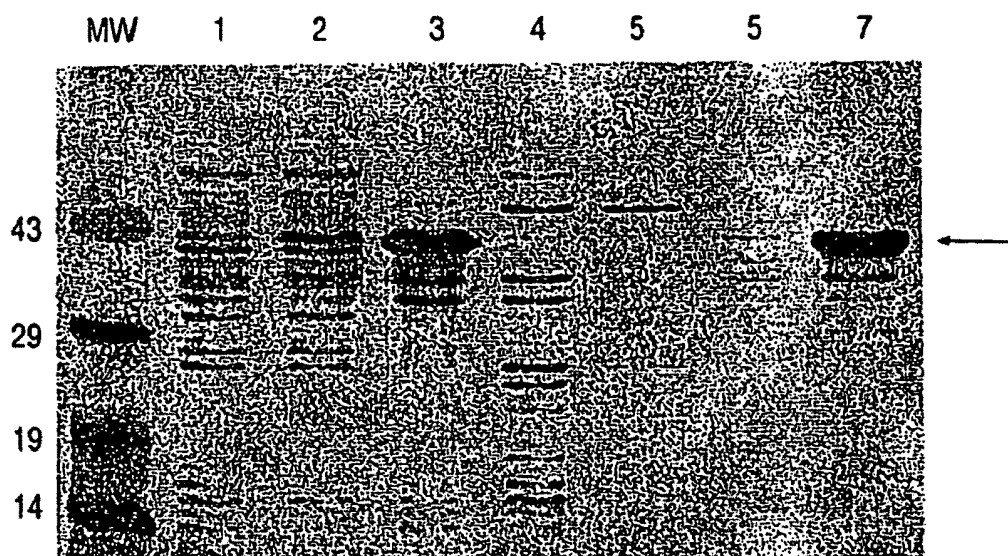


FIG.6

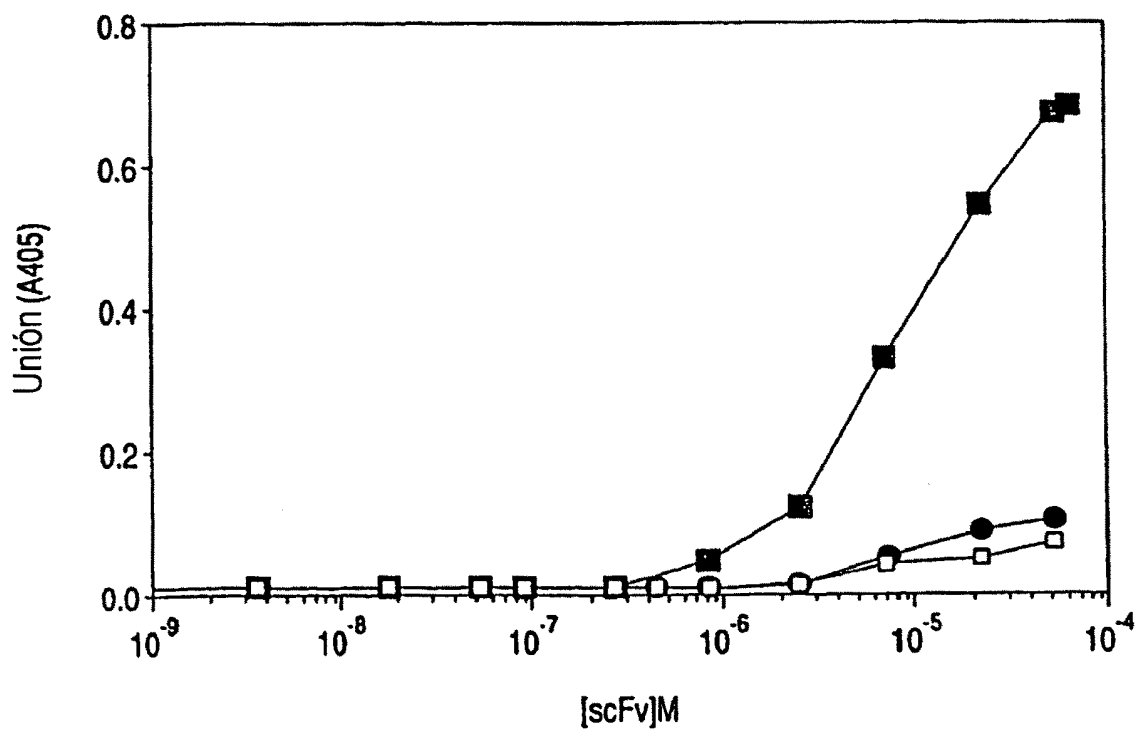
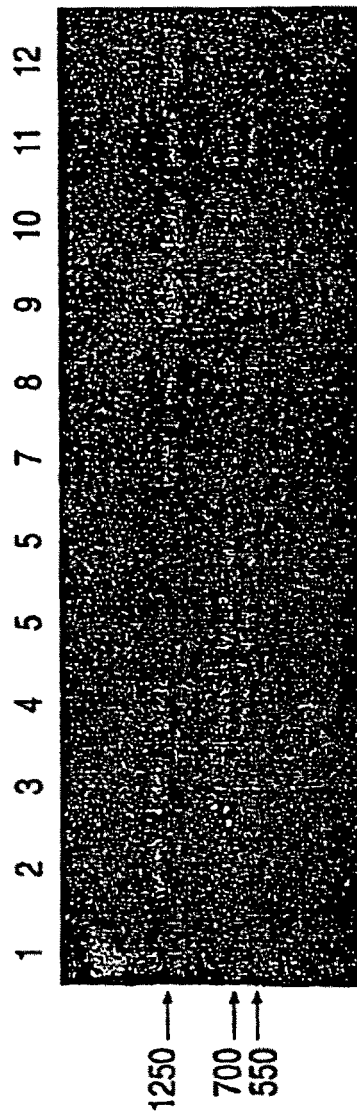


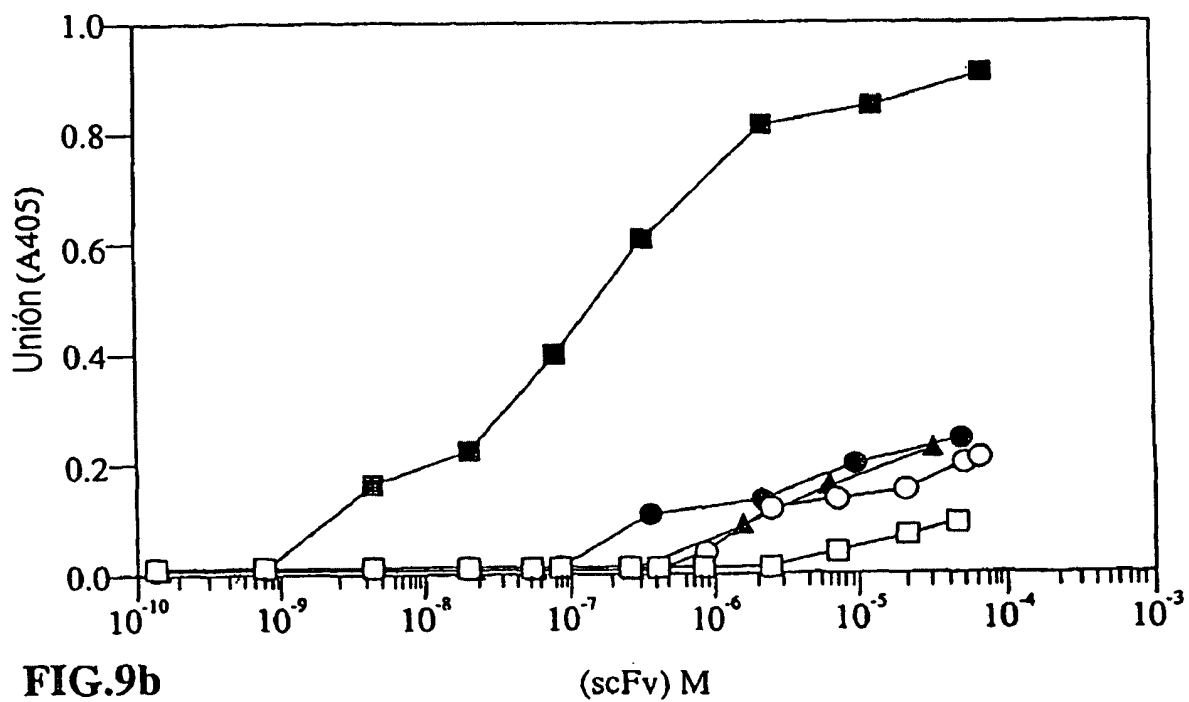
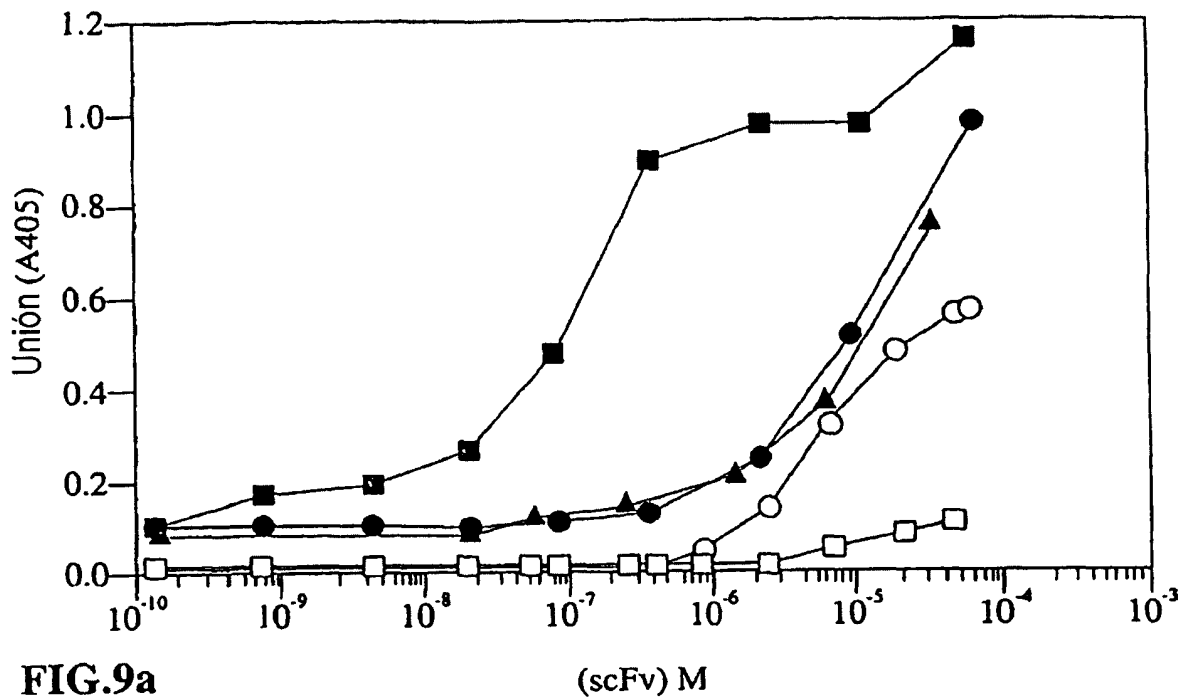
FIG.7

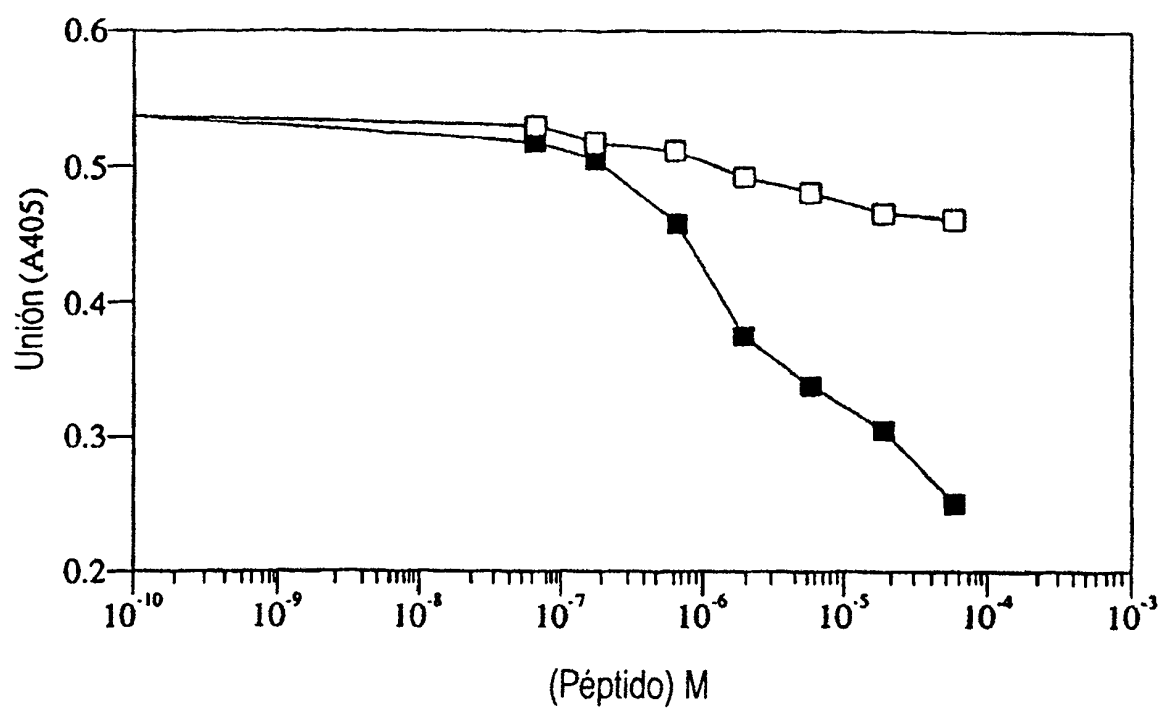


**FIG.8a**



**FIG.8b**





**FIG.10**

CAG GTC AAA CTG CAG GAG TCA GGG GCT GAG CTG GTG AGG CCT GGG GTC TCA GTG AAG ATT  
 gln val lys leu gln glu ser gly ala glu leu val arg pro gly val ser val lys ile  
 TCC TGC AAG GGT TCT GGC TAC ACA TTC ACT GAT TAT GCT ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGT  
 ser cys lys gly ser gly tyr thr phe thr asp tyr ala met his trp val lys gln ser  
 CAT GCA AAG AGT CTA GAG TGG ATT GGA GTT ATT AGT ACT TAC TAT GGT GAT GCT AGC TAC  
 his ala lys ser leu glu trp ile gly val ile ser thr tyr gly asp ala ser tyr  
 AAC CAG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA ATG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAT  
 asn gln lys phe lys gly lys ala thr met thr val asp lys ser ser thr ala tyr  
 ATG GAA CTT GCC AGA CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCC ATC TAT TAC TGT GCA AGA GGG GCT  
 met glu leu ala arg leu thr ser glu asp ser ala ile tyr tyr cys ala arg gly ala  
 ACT ATG TCC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GTG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA ggt gga  
 thr met ser tyr phe asp tyr trp gly gln val thr thr val ser ser gly gly  
 CDR 1  
 CDR 2  
 CDR 3

FIG.11a

ggc ggt tca ggc gga gtt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg GAC ATC GAG CTC ACT CAG TCT  
 gly gly ser gly gly val gly ser gly gly gly ser asp ile glu leu thr gln ser  
 Linker  
 CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA  
 pro ala ile met ser ala ser pro gly glu lys val thr met thr cys ser ala ser ser  
 AGT ATA AGT TAC ATG CAC TGG TAT CAG CAG AAG CCA GGC ACC TCC CCC AAA AGA TGG ATT  
 ser ile ser tyr met his trp tyr gln gln lys pro gly thr ser pro lys arg trp ile  
 cdr 1  
 TAT GAC ACA TCC AAA CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG  
 tyr asp thr ser lys leu ala ser gly val pro ala arg phe ser gly ser gly ser gly  
 cdr 2  
 ACC TCT TAT TCT CTC ACA ATC AGC AGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC  
 thr ser tyr ser leu thr ile ser ser met glu ala glu asp ala thr tyr tyr cys  
 CAT CAG CGG AGT AGT TAC CCA TTC ACG TTC GGA GGG GGC AAG CTG GAA ATA AAA  
 his gln arg ser ser tyr pro phe thr phe gly gly ala lys leu glu ile lys  
 cdr 3

FIG.11b

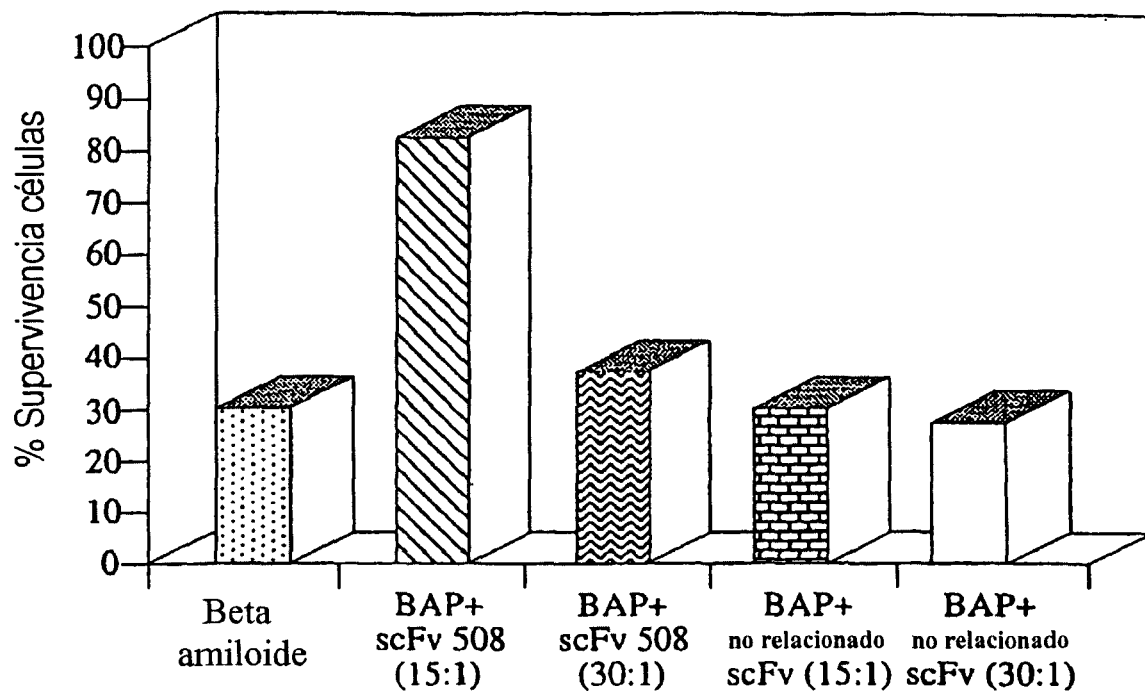


FIG.12

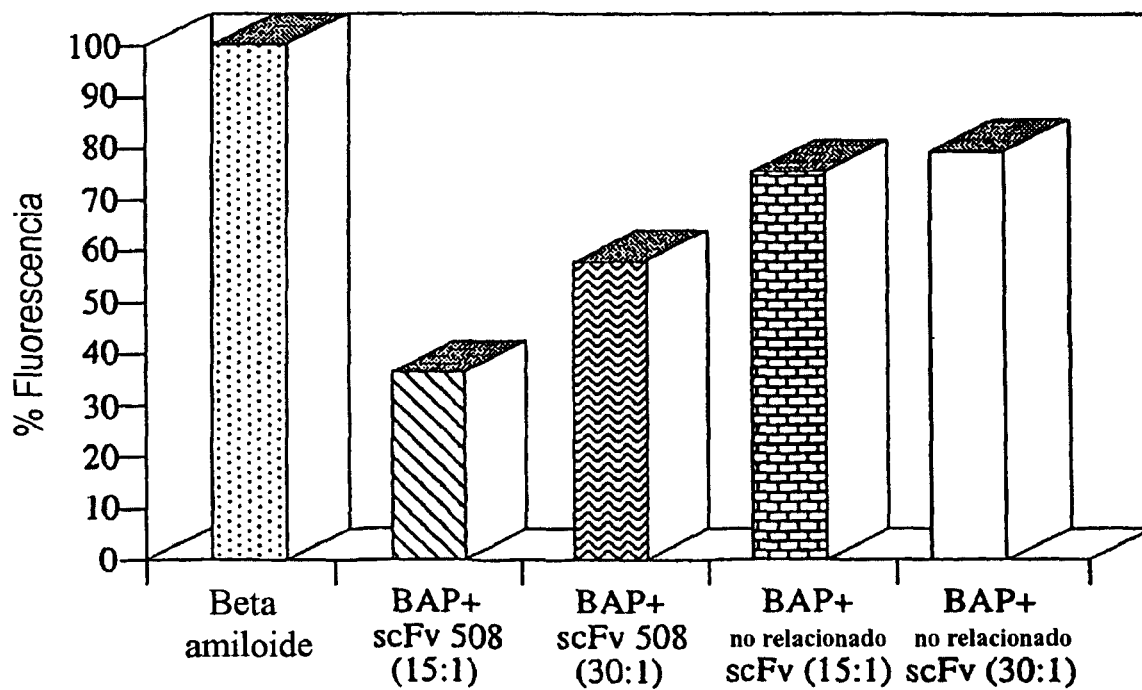
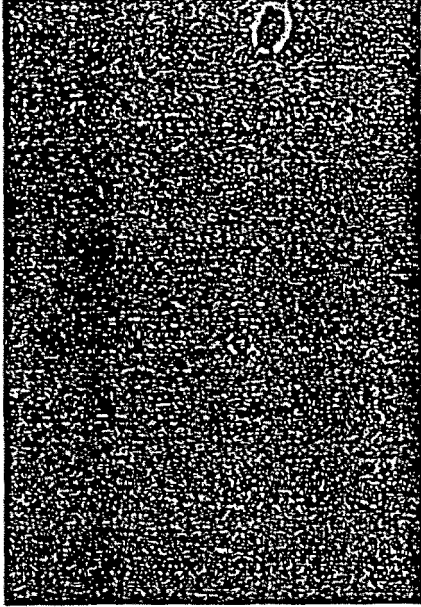
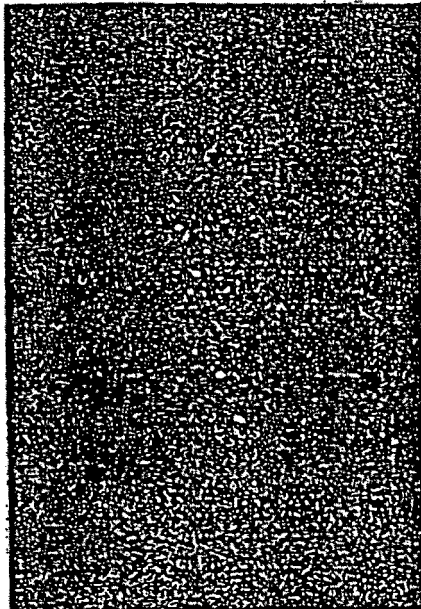
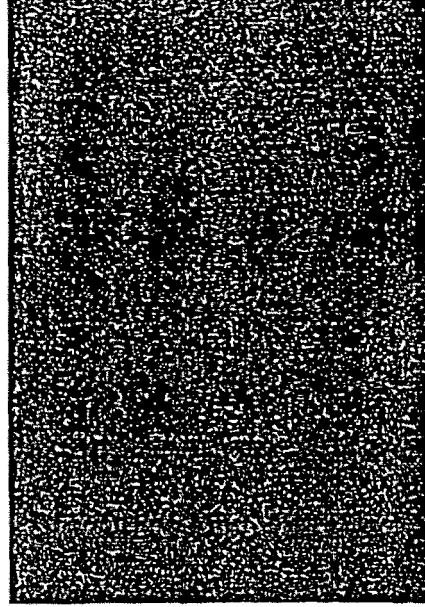


FIG.13

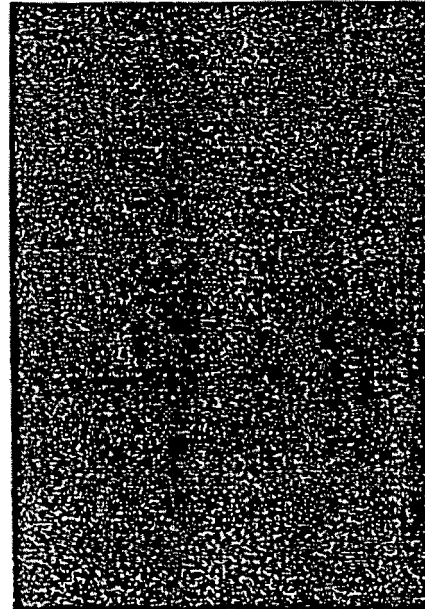
**FIG.14c**



**FIG.14d**

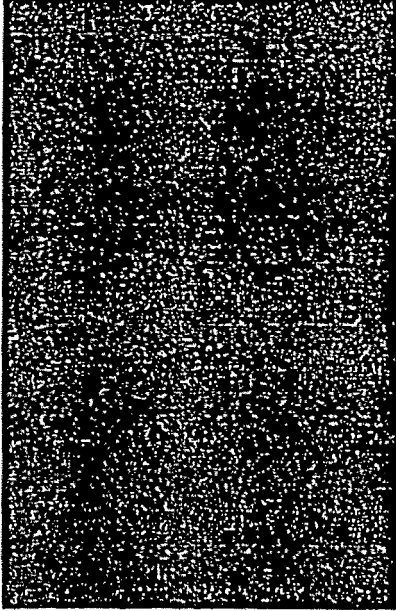


**FIG.14a**

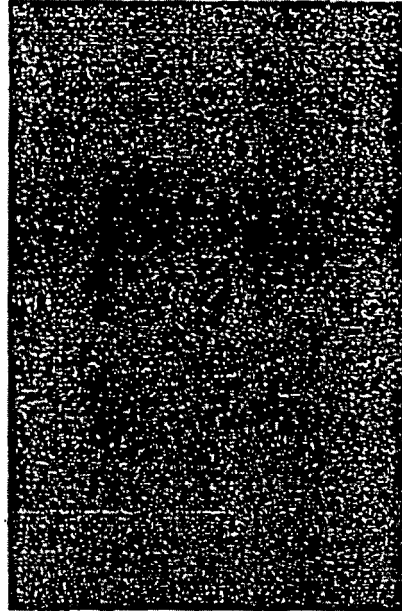


**FIG.14b**

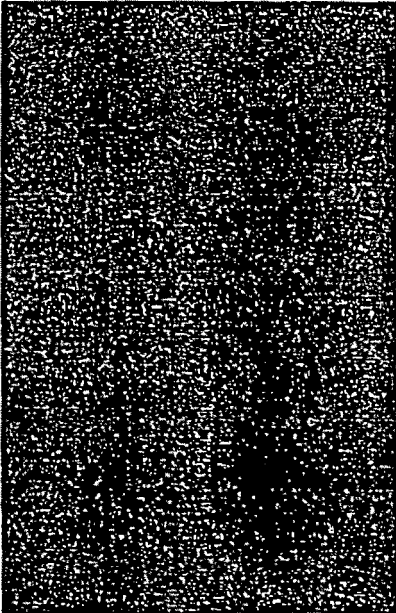
**FIG.15c**



**FIG.15d**



**FIG.15a**



**FIG.15b**

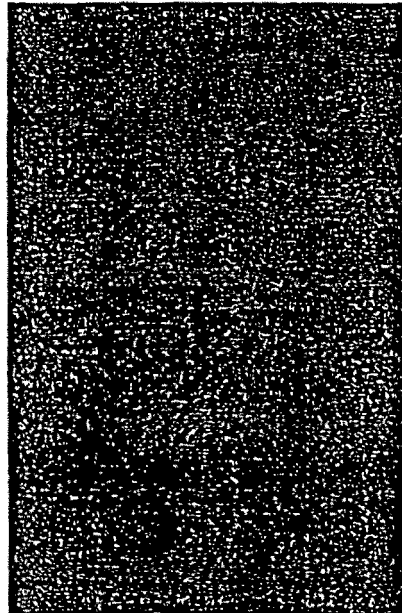


FIG. 16c

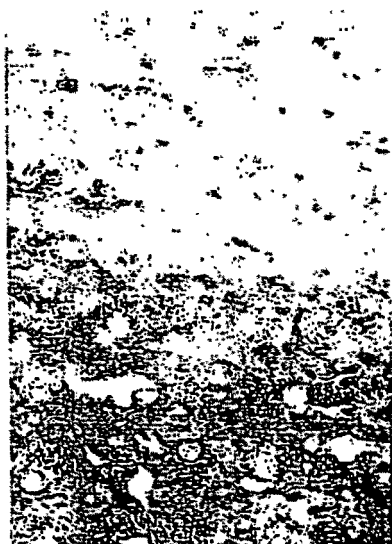


FIG. 16d



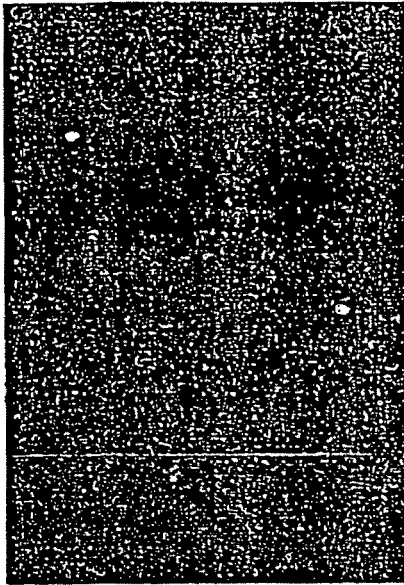
FIG. 16a



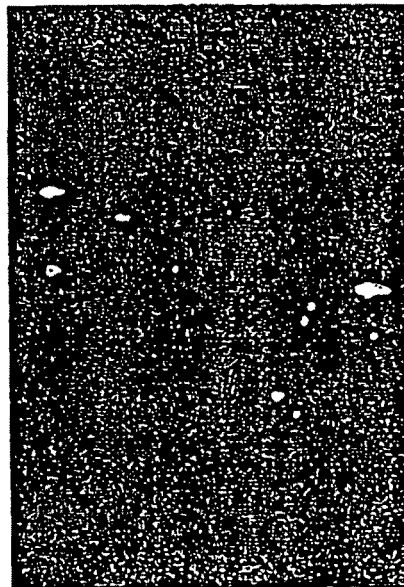
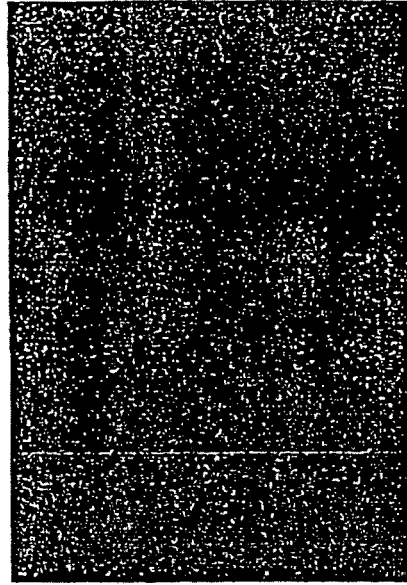
FIG. 16b



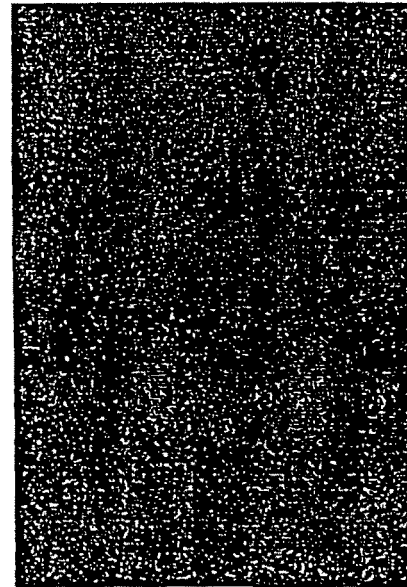
**FIG.17c**



**FIG.17d**



**FIG.17a**



**FIG.17b**

Fig 18c

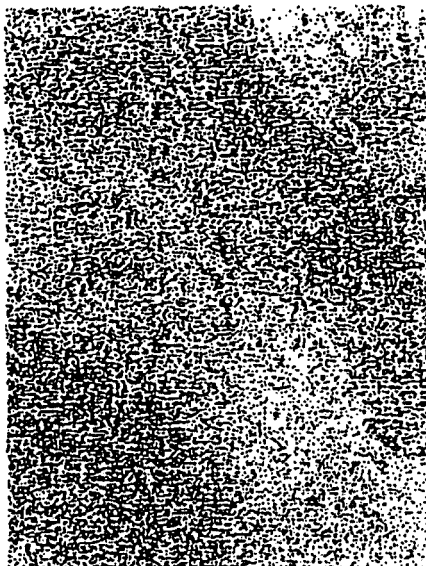


Fig 18d

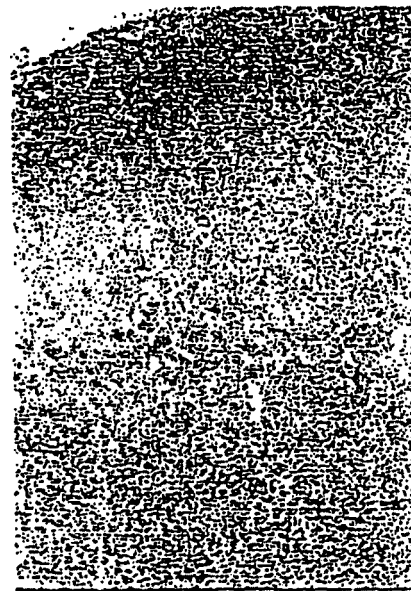
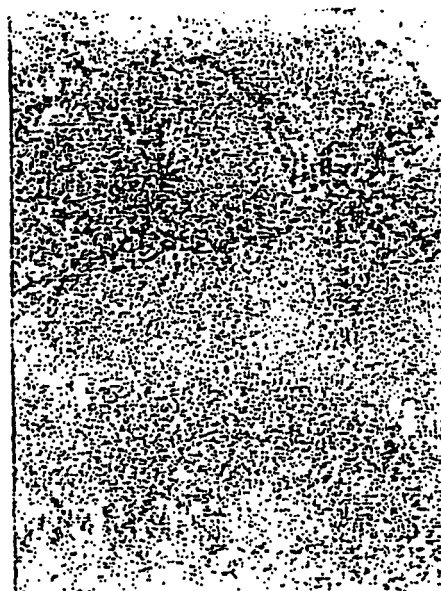
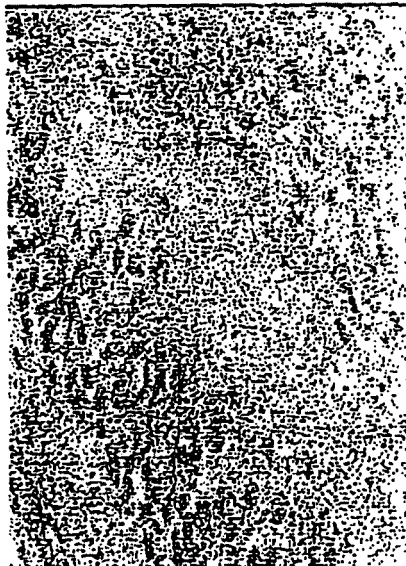
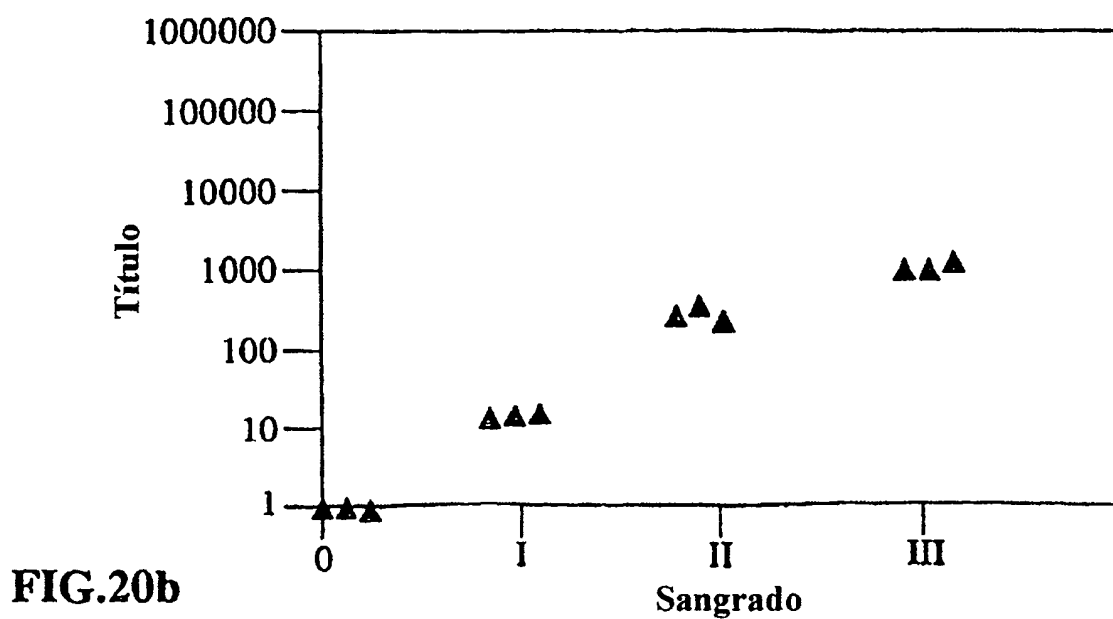
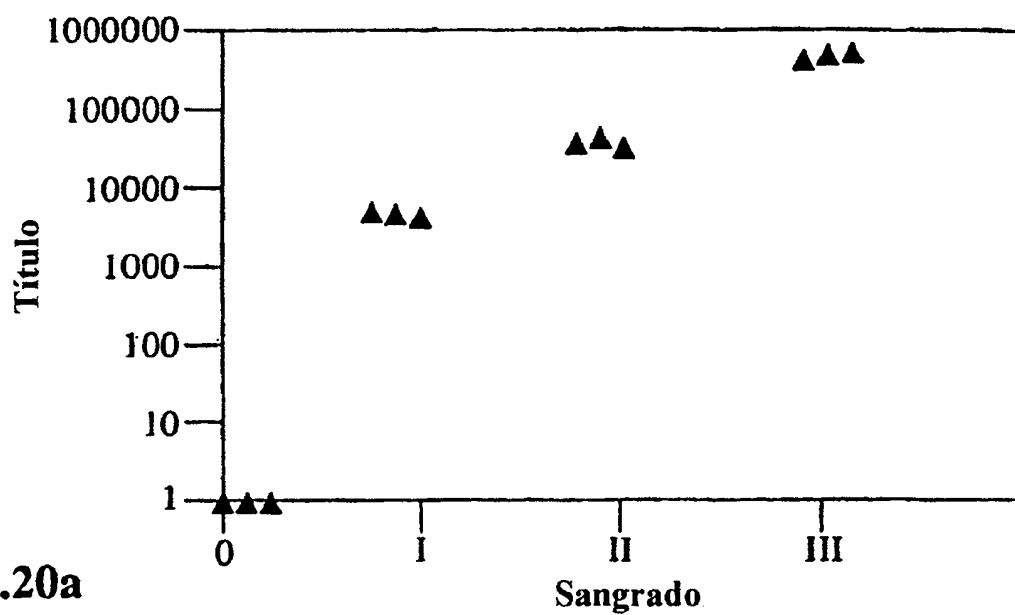
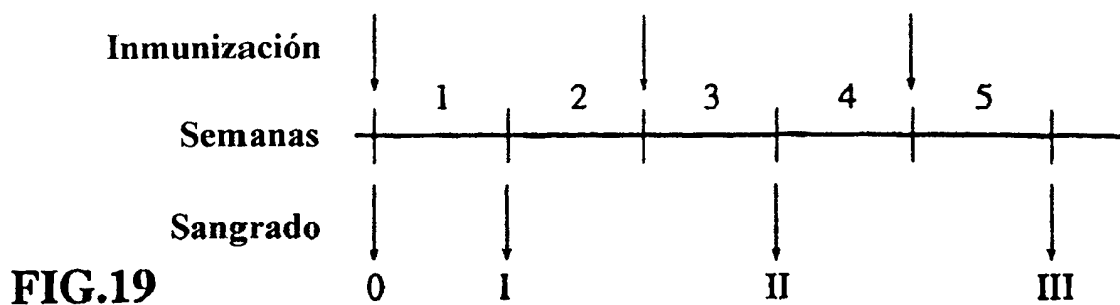


Fig 18a

Fig 18b



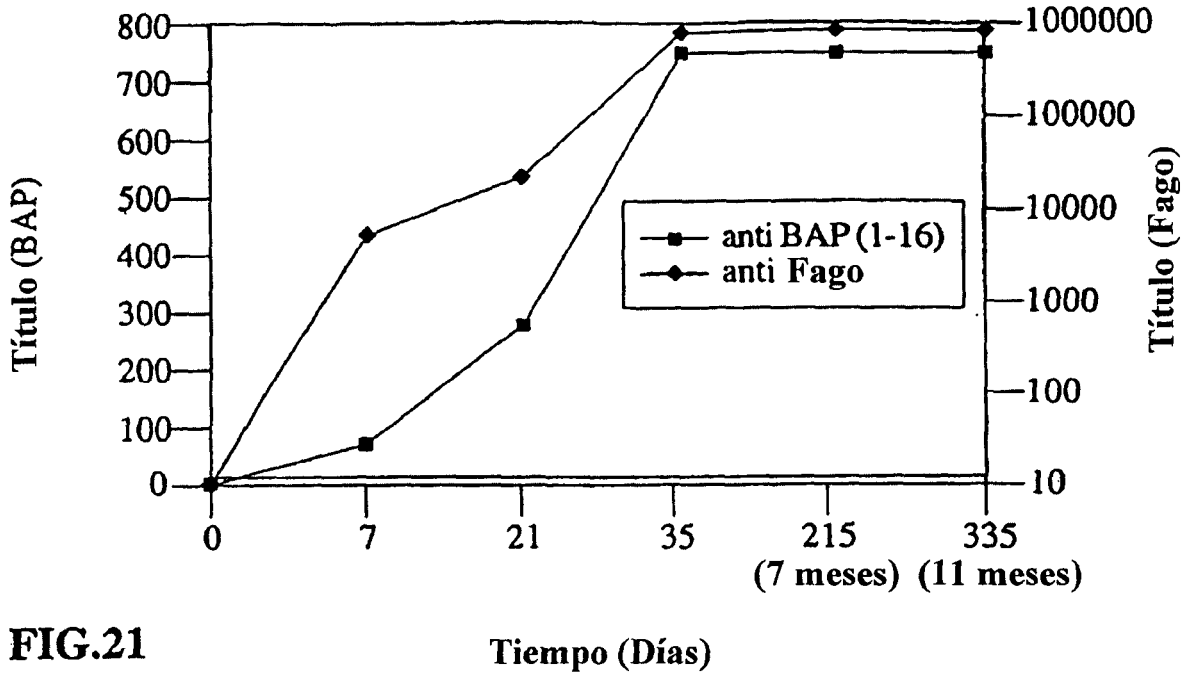


FIG.21

Tiempo (Días)

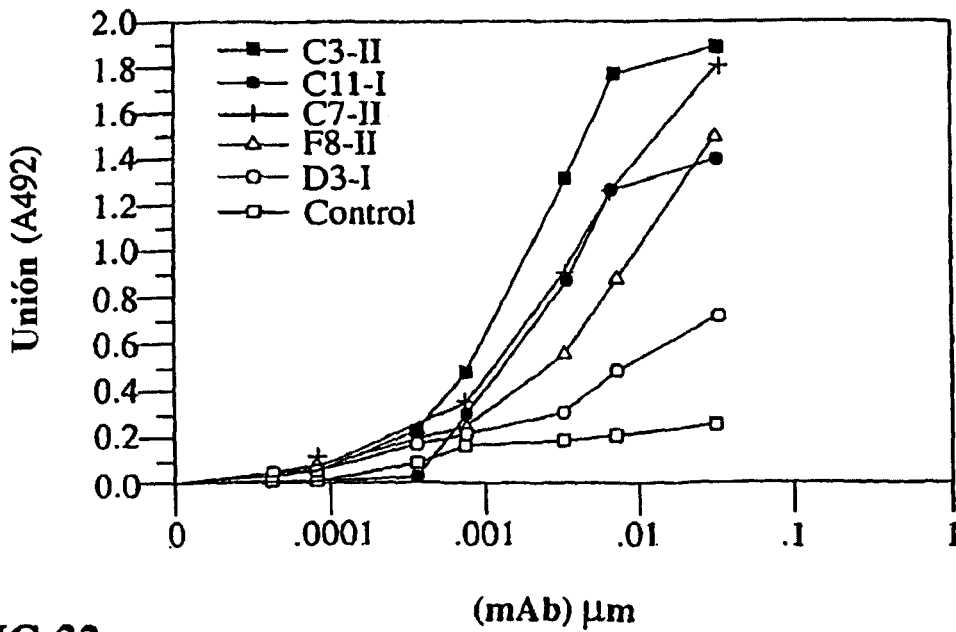
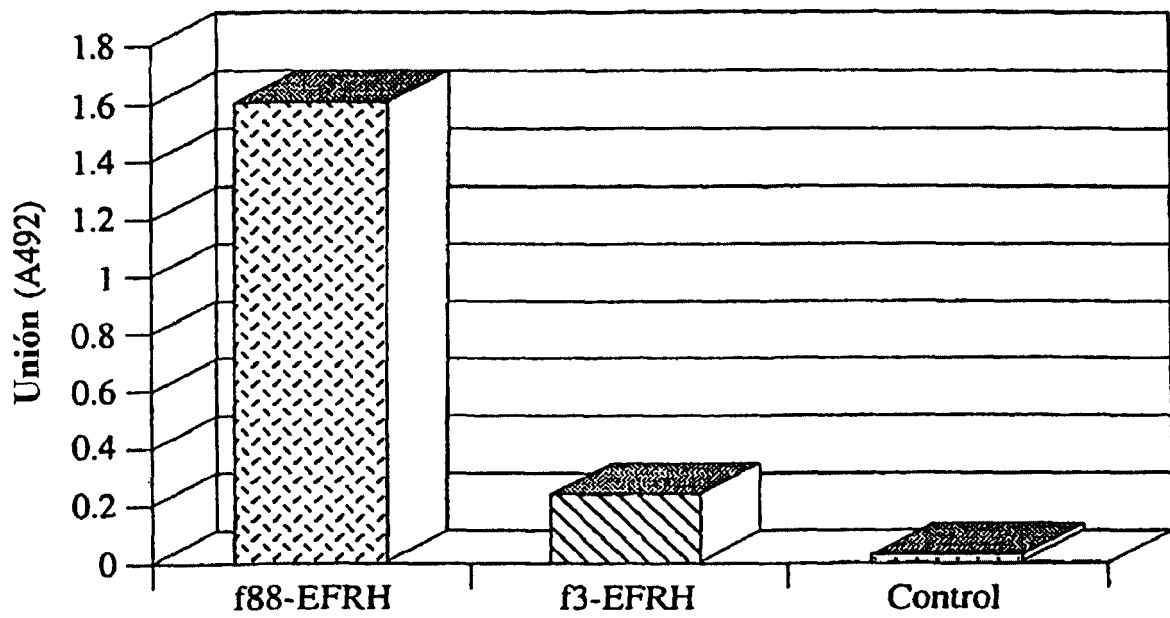


FIG.22



**FIG.23**

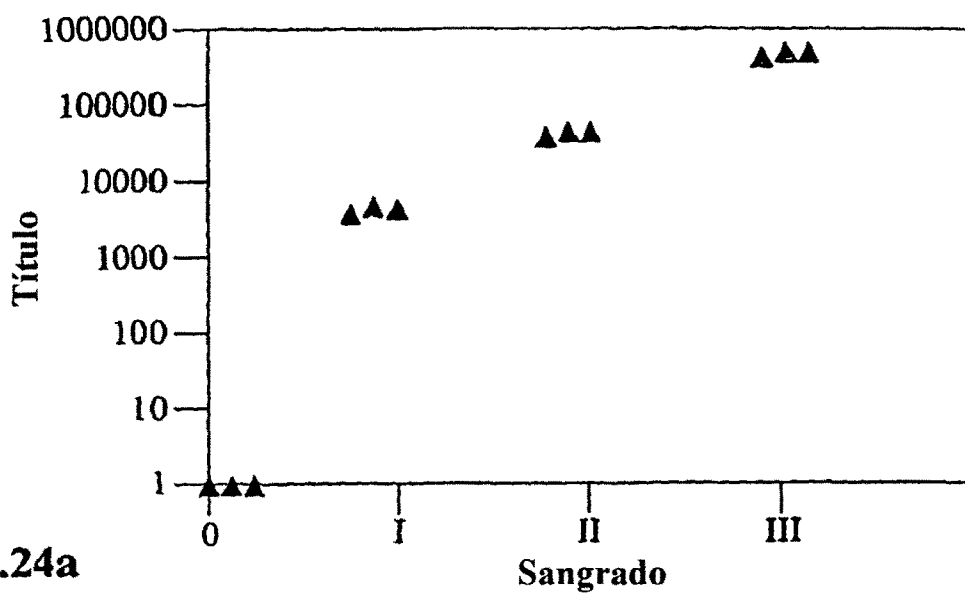


FIG.24a

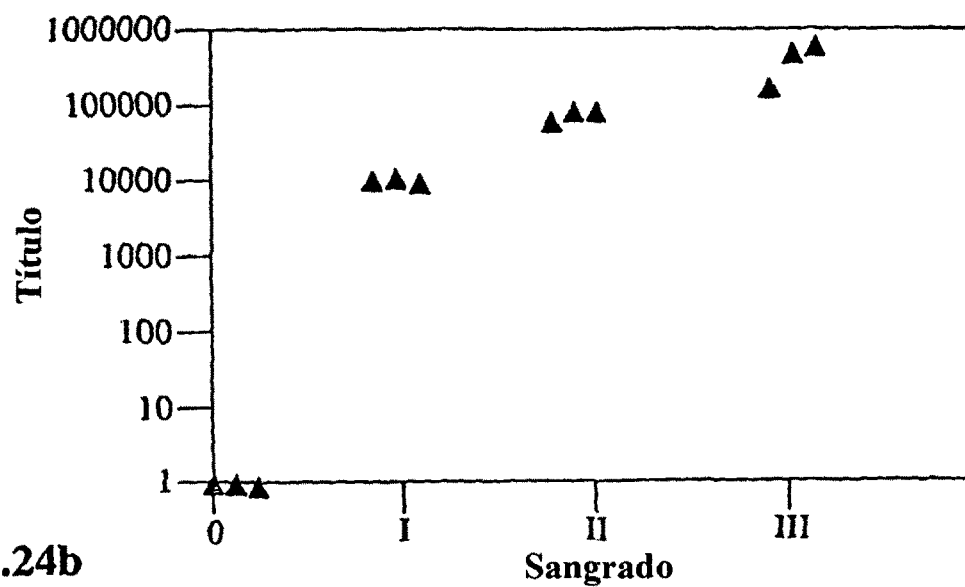


FIG.24b

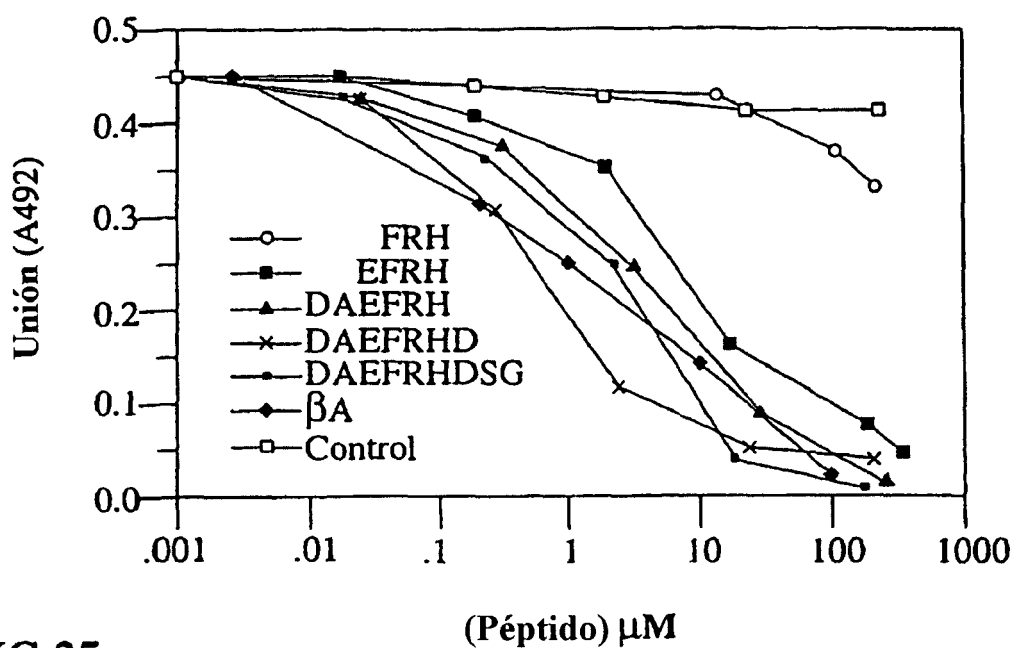


FIG.25

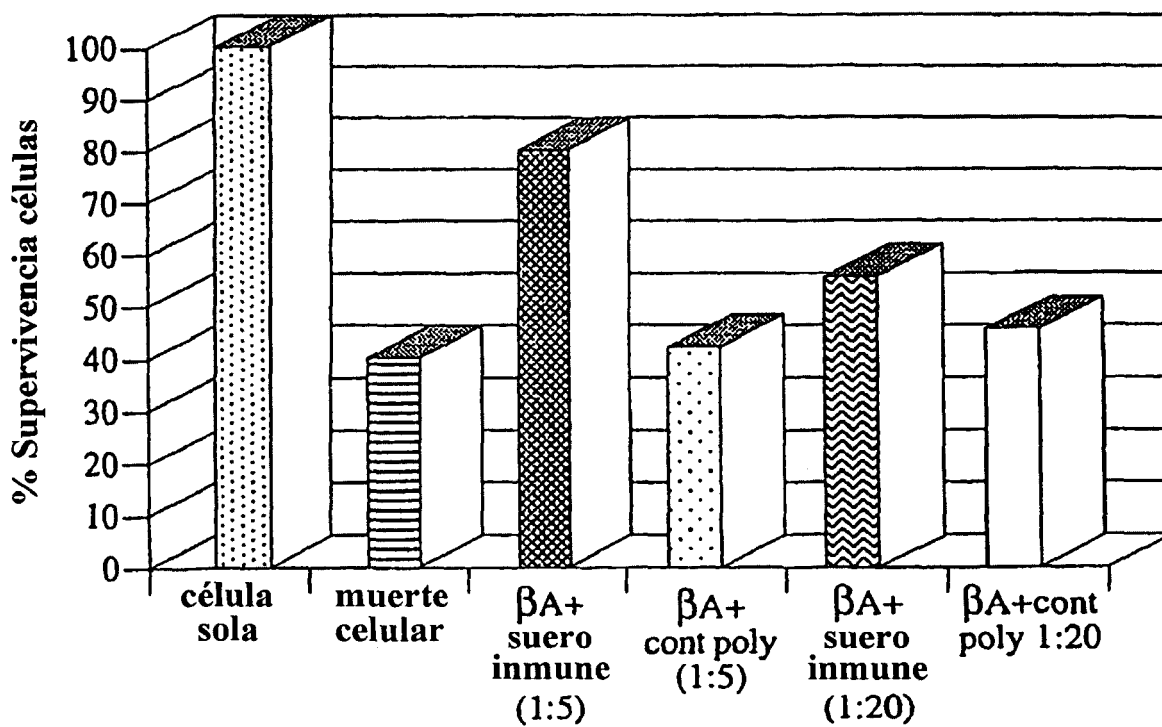


FIG.26

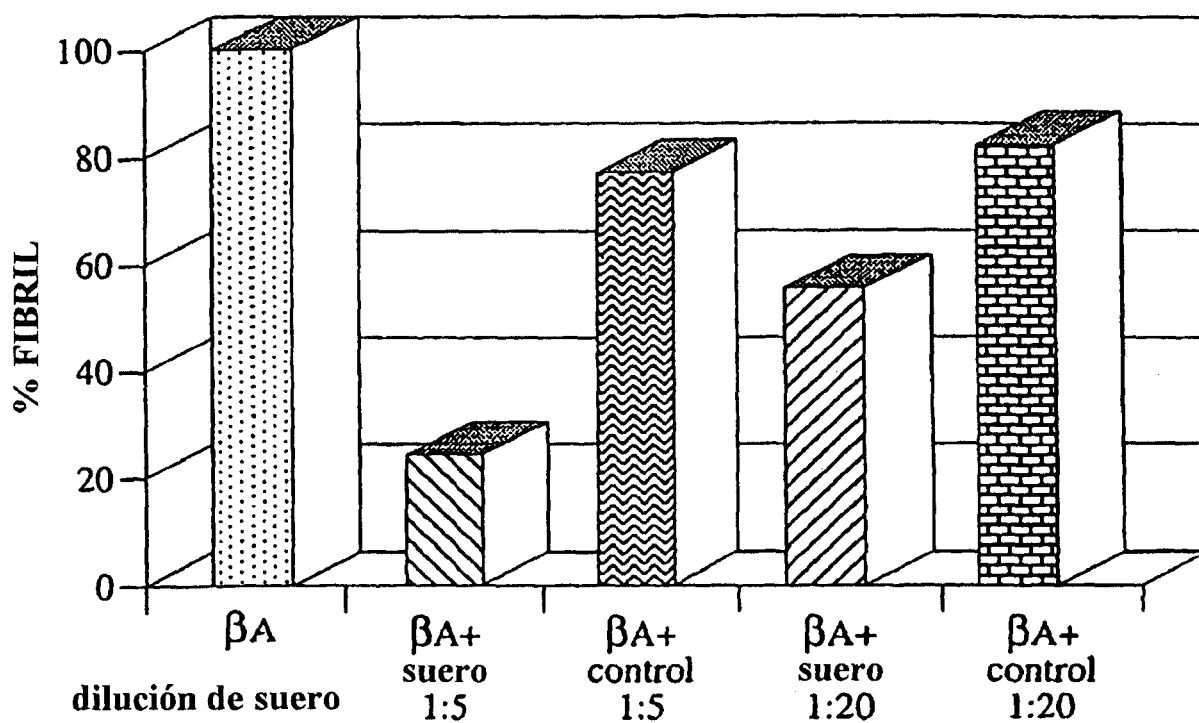


FIG.27

Humano PrP 106-126: KTNMKHMAGAAAAGAVVGGLG  
Ratón PrP 105-125: KTNLKHVAGAAAAGAVVGGLG

FIG.28

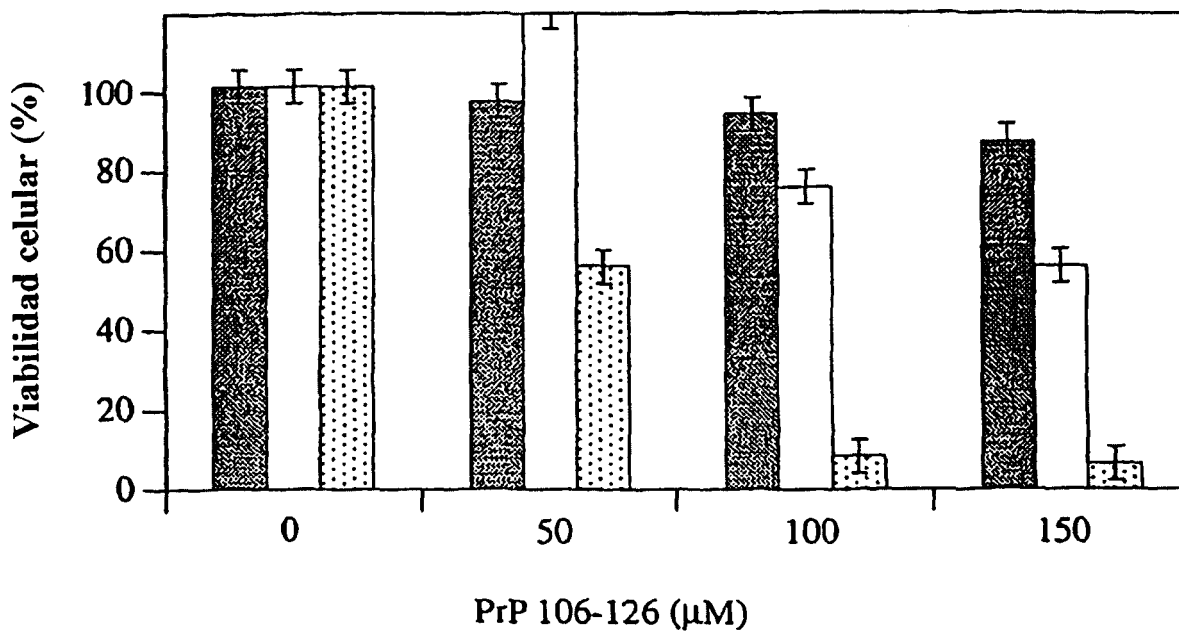
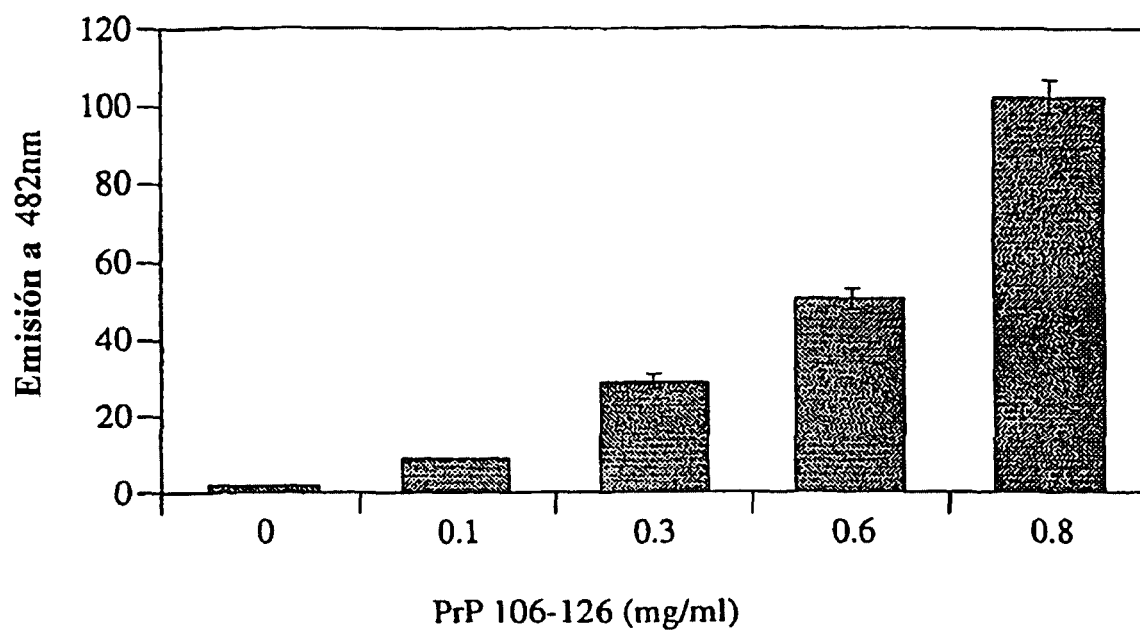
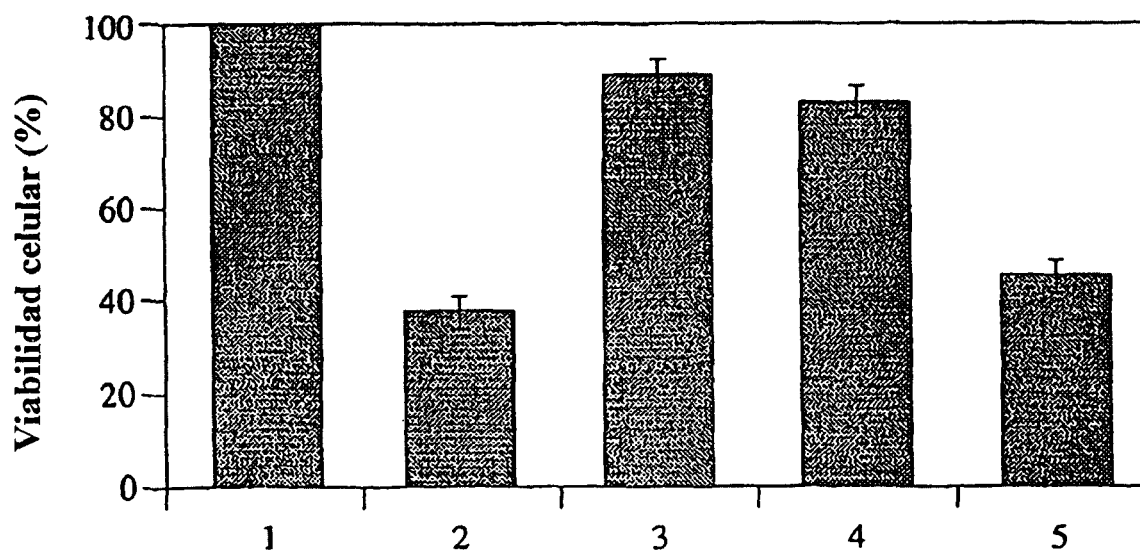


FIG.29



**FIG.30**



**FIG.31**

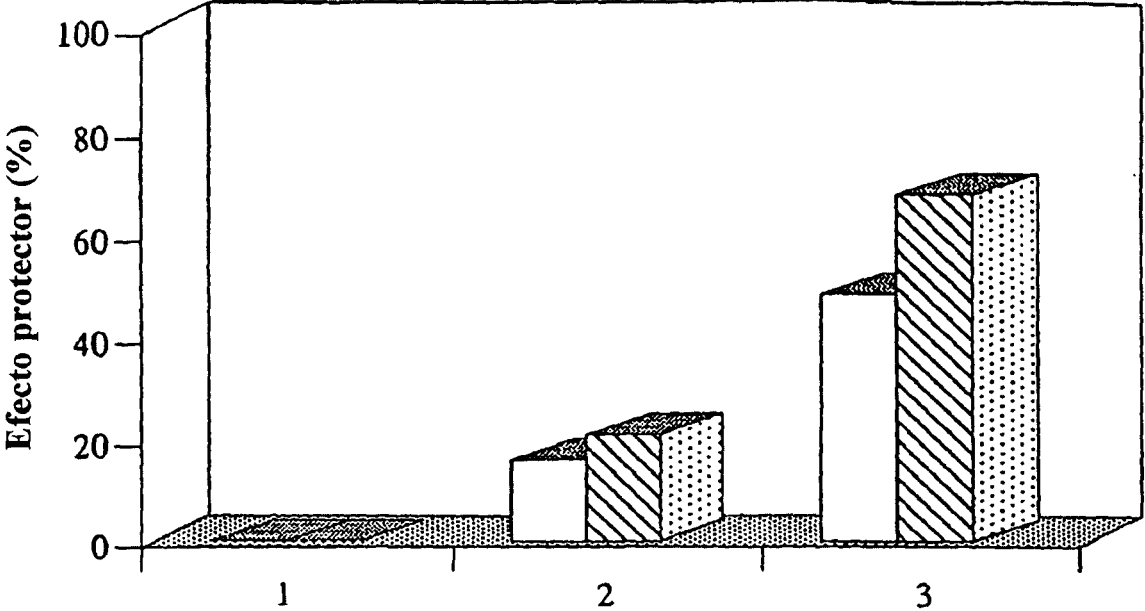


FIG.32

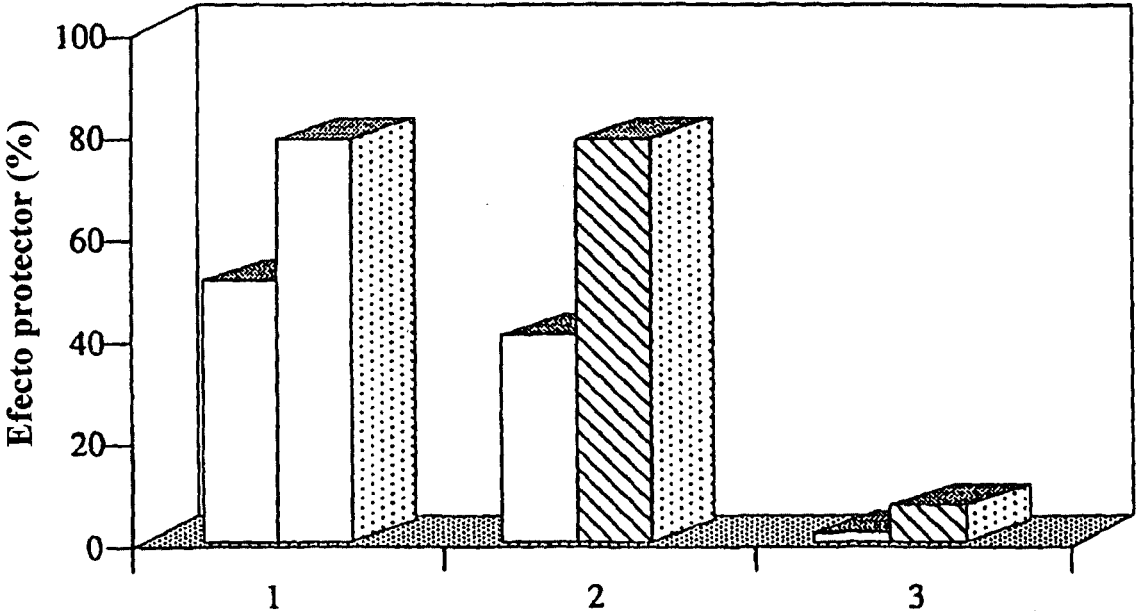


FIG.33

# ES 2 344 189 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Beka Solomon *et al.*

5 <120> Agentes y composiciones y métodos que los utilizan útiles en el tratamiento o prevención de enfermedades que forman placas.

<130> 20100

10

<150> 60/152,417

<151> 3 de septiembre, 1999

15 <160> 26

<170> PatentIn Ver. 2.1

20 <210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

30 <400> 1

Glu Phe Arg His

35 <210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 2

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
5 10 15

50

<210> 3

<211> 43

55

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

65



ES 2 344 189 T3

<400> 6

5 Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Val  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 10 Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys  
 Ala Arg Gly Ala Thr Met Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Val Thr  
 15 Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Val Gly Ser  
 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met  
 Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser  
 20 Ser Ile Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro  
 Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser  
 25 Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser  
 Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Ala Lys Leu Glu Ile Lys  
 30 225 230 235

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 7

Tyr Tyr Glu Phe Arg His  
 5

45

<210> 8

<211> 15

<212> aminoácido

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223>

55

<400> 8

Val His Glu Pro His Glu Phe Arg His Val Ala Leu Asn Pro Val  
 5 10 15

60

<210> 10

<211> 45

<212> ADN

65

<213> Secuencia artificial

## ES 2 344 189 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
5	<400> 10	
	CCCCCCTCCG AACGTSNATG GGTAACCTCGA TCGCTGATGG CAGTA	45
10	<210> 11	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
20	<400> 11	
	ATCTATGCGG CCCAGCCGGC CATG	24
25	<210> 12	
	<211> ADN	
	<212> 38	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
35	<400> 12	
	GTGGTGCTGA GTGGATCCTA TACTACACTG CCACCGGG	38
40	<210> 13	
	<211> 58	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
50	<400> 13	
	AGCTCCGATG CTGAATTCGG TGATAGCGGC TACGAAGTGC ATCATCAGAA ACCTGCAG	58
55	<210> 14	
	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
65	<400> 14	
	GGTTTCTGAT GATGCACTTC GTAGCCGCTA TCATGACGAA ATTCAGCATC GG	52

## ES 2 344 189 T3

<210> 15  
<211> 9  
<212> PRT  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
10  
<400> 15

**His Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Cys Thr**  
15 **5**

<210> 16  
<211> 9  
20 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
25 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
  
<400> 16

30 **His Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Cys Thr**  
**5**

<210> 17  
35 <211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
  
<400> 17

45 **His Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr**  
**5**

50 <210> 18  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

60 <400> 18

**His Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr**  
65 **5**

<210> 19  
<211> 9

ES 2 344 189 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<223>

<400> 19

10

**His Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr**  
5

15 <210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213>

20

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 20

**His Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Ser Thr**  
5

30

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 21

**Asp Thr Glu Phe Arg His Ser Ser Asn Asn Phe Ser Ala Val Arg**  
5 10 15

45

<210> 22

<211> 15

50

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 22

60

**Ser Thr Glu Phe Arg His Gln Thr Thr Pro Leu His Pro Asn Ser**  
5 10 15

<210> 23

65

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

## ES 2 344 189 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 23

**Lys Glu Pro Arg His His Ile Gln His His Glu Arg Val Ile Arg**  
5 10 15

10 <210> 24

<211> 15

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

20

<400> 24

**Ser Ala Ala Asp Phe Arg His Gly Ser Pro Pro Ile Ser Ala Phe**  
5 10 15

25

<210> 25

<211> 21

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 25

40

**Lys Thr Asn Met Lys His Met Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val**  
5 10 15  
**Gly Gly Leu Gly**  
20

45 <210> 26

<211> 4

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

55 <400> 26

Asn Met Lys His

60 **ACCTCTTATT CTCTCACAAT CAGCAGCATG GAGGCTGAAG ATGCTGCCAC TTATTACTGC 660**  
**CATCAGCGGA GTAGTTACCC ATTCACGTTT GGAGGGGGGG CCAAGCTGGA AATAAAA 717**

<210> 6

65 <211> 244

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 344 189 T3

<400> 6

5 Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Val  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Ala Tyr  
 Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys  
 Ala Arg Gly Ala Thr Met Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Val Thr  
 Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Val Gly Ser  
 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met  
 Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser  
 Ser Ile Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro  
 Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser  
 Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser  
 Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Ala Lys Leu Glu Ile Lys  
 225 230 235

35 <210> 7

<211> 6

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

45

<400> 7

Tyr Tyr Glu Phe Arg His  
 5

50

<210> 8

<211> 15

<212> aminoácido

55

<213> Secuencia artificial

<220>

60

<223>

<400> 8

65

Val His Glu Pro His Glu Phe Arg His Val Ala Leu Asn Pro Val  
 5 10 15

