



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 346 852**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02079139 .8**  
96 Fecha de presentación : **01.09.1993**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1298436**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2003**

54 Título: **Métodos para la identificación de los compuestos inhibidores de la liberación del péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ AP).**

30 Prioridad: **26.10.1992 US 965972**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.10.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.10.2010**

73 Titular/es: **ELAN PHARMACEUTICALS, Inc.**  
**800 Gateway Boulevard**  
**South San Francisco, California 94080, US**  
**THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, Inc. y**  
**ELI LILLY AND COMPANY**

72 Inventor/es: **Schenk, Dale B.;**  
**Seubert, Peter A.;**  
**Vigo-Pelfrey, Carmen;**  
**Selkoe, Dennis J. y**  
**Schlossmacher, Michael G.**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 346 852 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos para la identificación de los compuestos inhibidores de la liberación del péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ AP).

5 **Antecedentes de la invención**1. **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos de detección para la identificación de inhibidores de la producción de  $\beta$ AP, en los que se detecta  $\beta$ AP *in vitro* o *in vivo*.

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno degenerativo del cerebro caracterizado clínicamente por la pérdida progresiva de memoria, cognición, razonamiento, juicio y estabilidad emocional que conduce gradualmente a un deterioro mental profundo y finalmente a la muerte. La AD es una causa muy común de insuficiencia mental progresiva (demencia) en personas mayores y se cree que representa la cuarta causa de muerte médica más común en los Estados Unidos. La AD se ha observado en razas y grupos étnicos de todo el mundo y presenta un problema principal de salud pública actual y futuro. Se estima que la enfermedad afecta actualmente a aproximadamente de dos a tres millones de personas solamente en los Estados Unidos. La AD es incurable en la actualidad. No se conoce actualmente ningún tratamiento que evite de forma eficaz la AD o invierta sus síntomas y evolución.

Los cerebros de pacientes con AD muestran lesiones características llamadas placas seniles (o amiloides), angiopatía amiloide (depósitos amiloides en los vasos sanguíneos) y nudos neurofibrilares. Una gran cantidad de estas lesiones, particularmente las placas amiloides y los nudos neurofibrilares, se hallan generalmente en varias áreas del cerebro humano importantes para la función de la memoria y cognitiva en pacientes con AD. También se hallan una menor cantidad de estas lesiones en una distribución anatómica más restringida en los cerebros de seres humanos de más edad que tienen AD clínica. Las placas amiloides y la angiopatía amiloide también caracterizan los cerebros de pacientes con trisomía 21 (síndrome de Down) y la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés (HCHWA-D). En la actualidad, un diagnóstico definitivo de AD requiere habitualmente observar las lesiones mencionadas anteriormente en el tejido cerebral de pacientes que han muerto con la enfermedad o, en raras ocasiones, en pequeñas muestras de biopsia de tejido cerebral tomadas durante un procedimiento neuroquirúrgico invasivo.

El principal constituyente químico de las placas amiloides y de los depósitos amiloides vasculares (angiopatía amiloide) característico de AD y de otros trastornos mencionados anteriormente es una proteína de aproximadamente 4,2 kilodalton (kD) de aproximadamente 39 a 43 aminoácidos denominada péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ AP) o a veces  $A\beta$ ,  $A\beta P$  o  $\beta/A4$ .  $\beta$ AP se purificó por primera vez y se presentó una secuencia parcial de aminoácidos en Glenner y Wong (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120:885-890. El procedimiento de aislamiento y los datos de secuencia para los primeros 28 aminoácidos se describen en la patente US nº 4.666.829.

Los análisis de biología molecular y química proteica realizados durante los últimos seis años han demostrado que  $\beta$ AP es un fragmento pequeño de una proteína precursora mucho más grande, denominada proteína precursora  $\beta$ -amiloide (APP), que se produce normalmente en células de muchos tejidos de diversos animales, incluyendo los seres humanos. El conocimiento de la estructura del gen que codifica APP ha demostrado que  $\beta$ AP surge como un fragmento peptídico que se escinde de APP por enzimas hasta ahora desconocidas (proteasas). Se desconoce actualmente el mecanismo bioquímico preciso por el cual se escinde el fragmento  $\beta$ AP de APP y posteriormente se deposita en forma de placas amiloides en el tejido cerebral y en las paredes de los vasos sanguíneos cerebrales y meníngeos.

Varias líneas de evidencias indican que la deposición progresiva cerebral de  $\beta$ AP desempeña una tarea fundamental en la patogénesis de AD y puede preceder a los síntomas cognitivos durante años o décadas (para una revisión, véase Selkoe (1991) *Neuron* 6:487). La única línea más importante de evidencias es el descubrimiento en 1991 de que se pueden encontrar mutaciones con pérdida de sentido del ADN en el aminoácido 717 de la isoforma de 770 aminoácidos de APP en miembros afectados pero no en miembros no afectados de varias familias con una forma genéticamente determinada (familiar) de AD (Goate *et al.* (1991) *Nature* 349:704-706; Chartier Harlan *et al.*, (1991) *Nature* 353:844-846; y Murrell *et al.*, (1991) *Science* 254:97-99) y se denomina variante sueca. Se informó de una doble mutación que cambia la lisina<sup>595</sup>-metionina<sup>596</sup> a asparagina<sup>595</sup>-leucina<sup>596</sup> (en referencia a la isoforma 695) hallada en una familia sueca en 1992 (Mullan *et al.*, (1992) *Nature Genet.* 1:345-347). Los análisis de unión genética han demostrado que estas mutaciones, así como ciertas mutaciones diferentes en el gen de APP, son la causa molecular específica de AD en los miembros afectados de dichas familias. Además, se ha identificado una mutación en el aminoácido 693 de la isoforma de 770 aminoácidos de APP como la causa de la enfermedad de deposición de  $\beta$ AP, HCHWA-D y parece que un cambio de alanina a glicina en el aminoácido 692 causa un fenotipo que se parece a AD en algunos pacientes pero a HCHWA-D en otros. El descubrimiento de éstas y otras mutaciones en APP en casos genéticamente basados de AD demuestra que la alteración de APP y la posterior deposición de su fragmento  $\beta$ AP pueden causar AD.

A pesar de los progresos en la comprensión de los mecanismos subyacentes de AD y de otras enfermedades relacionadas con  $\beta$ AP, sigue existiendo la necesidad de desarrollar métodos y composiciones para el diagnóstico y el tratamiento de la(s) enfermedad(es). Los métodos de tratamiento podrían estar basados ventajosamente en fármacos que puedan inhibir la generación de  $\beta$ AP *in vivo*. Para identificar dichos fármacos, sería deseable proporcionar ensayos de detección para fármacos potenciales que puedan inhibir la generación de  $\beta$ AP en modelos *in vivo* e *in vitro*. Sería

adicionalmente deseable proporcionar métodos y composiciones para el diagnóstico de afecciones relacionadas con  $\beta$ AP, en los que el diagnóstico esté basado en la identificación de  $\beta$ AP en muestras fluidas del paciente. Los ensayos específicos para la detección de  $\beta$ AP deben poder detectar  $\beta$ AP en muestras fluidas a muy bajas concentraciones así como de distinguir entre  $\beta$ AP y otros fragmentos de APP que pueden estar presentes en la muestra.

5

## 2. Descripción de los antecedentes de la técnica

Glennner y Wong (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120:885-890 y la patente US n° 4.666.829, se han analizado anteriormente. La patente '829 sugiere el uso de un anticuerpo contra el fragmento  $\beta$ AP de 28 aminoácidos para detectar el "polipéptido amiloide del Alzheimer" en una muestra del paciente y para diagnosticar AD. No se presentan datos que demuestren la detección o el diagnóstico.

10

Numerosos estudios bioquímicos de microscopía electrónica e inmunquímica han informado de que  $\beta$ AP es muy insoluble en soluciones fisiológicas a pH normal. Véase, por ejemplo, Glennner y Wong (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122:1131-1135; Masters *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4245-4249; Selkoe *et al.* (1986) *J. Neurochem.* 46:1820-1834; Joachim *et al.* (1988) *Brain Research* 474:100-111; Hilbich *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 218:149-163; Barrow y Zagorski (1991) *Science* 253:179-182; y Burdick *et al.* (1992) *J. Biol. Chem.* 267:546-554. Además, esta insolubilidad está prevista por y es coherente con la secuencia de aminoácidos de  $\beta$ AP que incluye un segmento de aminoácidos hidrófobos que constituye parte de la región que ancla la proteína precursora (APP) en las membranas lipídicas de las células. Se predice que proteínas hidrófobas de anclaje a lípidos, tales como  $\beta$ AP, permanecen asociadas con membranas celulares o fragmentos de membrana y por tanto no están presentes en los fluidos extracelulares fisiológicos. Los estudios mencionados anteriormente y muchos otros han informado de la insolubilidad en solución fisiológica de  $\beta$ AP nativo purificado a partir de depósitos amiloides cerebrales con AD o de péptidos sintéticos que contienen la secuencia  $\beta$ AP. La extracción de  $\beta$ AP de depósitos amiloides cerebrales y su posterior solubilización ha requerido el uso de disolventes y desnaturalizantes potentes, no fisiológicos. Soluciones salinas fisiológicas tamponadas que imitan los fluidos extracelulares de tejidos humanos han fracasado igualmente para solubilizar  $\beta$ AP.

15

20

25

También se han emprendido intentos diferentes para detectar APP o fragmentos de la misma en plasma o CSF. Se ha descubierto un fragmento grande de APP secretado que no contiene la región  $\beta$ AP intacta en fluido cefalorraquídeo humano (Palmen *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6338-6342; Weidemann *et al.* (1989) *Cell* 57:115-126; Henriksson *et al.* (1991) *J. Neurochem.* 56:1037-1042; y Palmert *et al.* (1990) *Neurology* 40:1028-1034); y en plasma (Podlisny *et al.* (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167:1094-1101). También se ha informado de la detección de fragmentos de la parte carboxi-terminal de APP en plasma (Rumble *et al.* (1989) *N. Engl. J. Med.* 320:1446-1452) que no logra detectar dichos fragmentos (Schlossmacher *et al.* (1992) *Neurobiol. Aging* 13:421-434).

30

35

A pesar de la aparente insolubilidad de  $\beta$ AP nativo y sintético, se ha especulado que el  $\beta$ AP podría existir en fluidos corporales, tales como el fluido cefalorraquídeo (CSF) o el plasma (Wong *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8729-8732; Selkoe (1986) *Neurobiol. Aging* 7:425-432; Pardridge *et al.* (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145:241-248; Joachim *et al.* (1989) *Nature* 341:226-230; Selkoe *et al.* (1989) *Neurobiol. Aging* 10:387-395).

40

Se ha informado de varios intentos para medir  $\beta$ AP en CSF y plasma por métodos tanto de radioinmunoensayo (Pardridge *et al.* (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *supra*, y documento WO 90/12870 publicado el 1 de noviembre de 1990) como ELISA tipo sándwich (Wisniewski en *Alzheimer's Disease*, eds. Becker y Giacobini, Taylor y Francas, N.Y. pág. 206, 1990; Kim y Wisniewski en *Techniques in Diagnostic Pathology*, eds. Bullock *et al.*, Academic Press, Boston pág. 106; y el documento WO 90/12871 publicado el 1 de noviembre de 1990). Aunque estos informes detectaron niveles muy bajos de inmunoreactividad a  $\beta$ AP en fluidos corporales, no se prosiguieron los intentos para purificar y caracterizar directamente esta inmunoreactividad adicional y determinar si representaba  $\beta$ AP y se abandonaron los esfuerzos. No se consideró ni se demostró la posibilidad de la producción de  $\beta$ AP por células cultivadas. Retrospectivamente, la incapacidad para detectar fácilmente  $\beta$ AP en fluidos corporales se debió probablemente a la presencia de fragmentos precursores amiloides con regiones o fragmentos solapantes de  $\beta$ AP que oscurecían las mediciones y a la ausencia de anticuerpos completamente específicos para el  $\beta$ AP intacto. De hecho, los hallazgos previos tanto de Pardridge *et al.* como de Kim *et al.* informaron de niveles de  $\beta$ AP de cuatro a cinco veces inferiores a los mostrados en la presente invención. Esto es supuestamente debido a que los anticuerpos usados por ambos grupos reaccionarían de forma cruzada con otros fragmentos de APP que contenían parte de  $\beta$ AP que se sabe que está presente en CSF, impidiendo de este modo la medición, si existe, de  $\beta$ AP intacto. La presente invención supera estas dificultades con el uso de anticuerpos monoclonales específicos para un epítipo en la región de unión central de  $\beta$ AP intacto.

45

50

55

El documento EP 444.856 proporciona unos medios para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer usando un inmunoensayo tipo sándwich para "la proteína asociada a la enfermedad de Alzheimer" (ADAP). La ADAP se define como un material reactivo con el anticuerpo monoclonal llamado Alz50, descrito originalmente por Wolozin *et al.* (1986) *Science* 232:648-650. Se ha mostrado más recientemente que Alz50 reacciona específicamente con formas fosforiladas de tau (Ksiezak-Reder *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* 263:7943-7947; Ueda *et al.* (1990) *J. Neuroscience* 10:3295-3304; Lee *et al.* (1991) *Science* 251:675-578). Por tanto, las ADAP representan formas fosforiladas de tau y no están relacionadas con la proteína precursora amiloide de  $\beta$ AP descrita en la presente invención.

60

65

Seubert, P. *et al.* (1992) Nature 359:325-327, describieron un ensayo ELISA tipo sándwich para detectar el péptido  $\beta$ -amiloide soluble en muestras fluidas de seres humanos o animales no transgénicos. Hass *et al.* (1992) Nature 359: 322-325, informan de la detección de péptido  $\beta$ -amiloide soluble en medio de cultivo de células primarias o células transfectadas con  $\beta$ AP de tipo silvestre y especulan que la detección de  $\beta$ AP podría proporcionar la base para ensayos para identificar fármacos que bloqueen la liberación de  $\beta$ AP. El documento WO 93/21526 está comprendido en el estado de la técnica según el Art. 54(3) EPC y se refiere a ensayos de detección basados en la detección del fragmento amino-terminal de APP (ATF- $\beta$ APP).

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos útiles para la identificación de inhibidores de la producción del péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ AP), en los que los métodos y las composiciones dependen de la detección específica de  $\beta$ AP y/o fragmentos de  $\beta$ AP solubles en muestras fluidas. Para la identificación de inhibidores de la producción de  $\beta$ AP, se introduce un compuesto de ensayo en un modelo de generación de  $\beta$ AP *in vitro* o *in vivo*, y se observa el efecto del compuesto de ensayo sobre la cantidad de  $\beta$ AP o fragmento de  $\beta$ AP soluble generado por el modelo. Son particularmente útiles como modelo *in vitro* líneas celulares que expresan una variante particular que produce en exceso  $\beta$ AP. Las sustancias de ensayo que afectan a la producción de  $\beta$ AP y/o fragmentos de  $\beta$ AP, habitualmente reduciendo la cantidad producida, se consideran candidatos probables para ensayo adicional para su uso como fármacos terapéuticos en el tratamiento de afecciones relacionadas con  $\beta$ AP, particularmente la enfermedad de Alzheimer.

Por tanto, la presente solicitud describe un método para detectar un péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ AP) en una muestra fluida en presencia de la proteína precursora  $\beta$ -amiloide (APP) o fragmentos de la misma, comprendiendo dicho método capturar  $\beta$ AP soluble de la muestra usando una primera sustancia de unión en condiciones en las que la primera sustancia de unión específica se une a un epítipo en una región de unión sobre el  $\beta$ AP y que está sustancialmente libre de reactividad cruzada con APP y fragmentos de la misma diferentes a  $\beta$ AP, donde la región de unión está centrado en el sitio entre los restos aminoacídicos de  $\beta$ AP 16 y 17 y es una diana para la escisión proteolítica normal; y detectar la captura del  $\beta$ AP soluble usando una segunda sustancia de unión marcada que se une a un epítipo sobre una segunda región del  $\beta$ AP soluble diferente al epítipo de  $\beta$ AP sobre el que se une la primera sustancia de unión.

Preferentemente, el  $\beta$ AP es  $\beta$ AP intacto. El  $\beta$ AP soluble puede capturarse sobre una fase sólida, y la captura se detecta exponiendo la fase sólida a la segunda sustancia de unión marcada y después de ello detectando la presencia del marcador sobre la fase sólida.

La solicitud también describe un método para detectar un péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ AP) en una muestra fluida, comprendiendo dicho método exponer la muestra a una primera sustancia de unión específica para un epítipo en una región de unión sobre el  $\beta$ AP dispuesta entre los restos aminoacídicos 13 a 28; y detectar la unión entre la primera sustancia de unión y el  $\beta$ AP soluble en condiciones en las que la primera sustancia de unión se une al  $\beta$ AP sin reactividad cruzada sustancial con la proteína precursora  $\beta$ -amiloide (APP) y fragmentos de la misma diferentes de  $\beta$ AP.

Preferentemente, la primera sustancia de unión es un anticuerpo, opcionalmente un anticuerpo monoclonal, creado contra un péptido constituido por los restos aminoacídicos 13 a 28 de  $\beta$ AP.

La unión de la primera sustancia de unión y el  $\beta$ AP soluble puede detectarse separando los complejos unidos de la sustancia de unión y  $\beta$ AP, exponiendo los complejos unidos separados a una segunda sustancia de unión marcada específica para la región N-terminal de  $\beta$ AP, y detectando la presencia del marcado sobre los complejos unidos.

La segunda sustancia de unión puede ser un anticuerpo, opcionalmente un anticuerpo monoclonal, creado contra un péptido constituido por los restos aminoacídicos 1-16 de  $\beta$ AP.

La solicitud también incluye un método para detectar un péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ AP) en una muestra fluida que puede contener  $\beta$ AP y fragmentos  $\beta$ AP de la proteína precursora  $\beta$ -amiloide diferentes de  $\beta$ AP, comprendiendo dicho método exponer la muestra fluida a una primera sustancia de unión en condiciones en las que la primera sustancia de unión se unirá a un epítipo sobre el  $\beta$ AP soluble y los fragmentos  $\beta$ AP pero no se unirá a epítopos sobre fragmentos de APP que pueden estar presentes en la muestra; y detectar la unión entre la primera sustancia de unión y el  $\beta$ AP soluble y fragmentos  $\beta$ AP.

Preferentemente, la primera sustancia de unión se une específicamente a  $\beta$ AP intacto o a un fragmento de  $\beta$ AP de aproximadamente 3 kD. La primera sustancia de unión puede inmovilizarse sobre una fase sólida, y la unión se detecta exponiendo la fase sólida a una segunda sustancia de unión marcada y después de ello detectando la presencia del marcado sobre dicha fase sólida.

En otras formas de realización preferidas adicionales, la muestra fluida para su uso en los métodos de la presente invención se selecciona de entre el grupo constituido por medio de cultivo, sangre, CSF, orina, y fluido peritoneal.

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para identificar inhibidores de la producción de péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ AP), comprendiendo dicho método cultivar células de mamífero en un medio de cultivo en condiciones que provocan la producción de un péptido  $\beta$ AP soluble que puede detectarse en el medio de cultivo, en el que las células de mamífero cultivadas son de una línea celular que comprende el ADN que codifica una variante sueca de

## ES 2 346 852 T3

la proteína precursora amiloide (APP) que es una doble mutación  $\text{Lys}^{595} \rightarrow \text{Asn}^{595}$  y  $\text{Met}^{596} \rightarrow \text{Leu}^{596}$  con referencia a APP<sub>695</sub> y que proporciona producción en exceso de  $\beta$ AP en las células de mamífero cultivadas; exponer las células cultivadas a un compuesto de ensayos; y determinar si el compuesto de ensayo afecta a la cantidad de péptido  $\beta$ AP soluble presente en el medio de cultivo.

5

En las formas de realización preferidas, la determinación del péptido  $\beta$ AP puede ser específica para el  $\beta$ AP soluble presente en el medio de cultivo.

En otra forma de realización de la invención, el efecto del compuesto de ensayo se determina comparando la acumulación de  $\beta$ AP en el medio de cultivo durante un periodo de tiempo en ausencia del compuesto de ensayo con acumulación de  $\beta$ AP en el medio de cultivo en presencia del compuesto de ensayo durante el mismo periodo de tiempo.

La invención proporciona asimismo un método para ensayar un compuesto de ensayo para la capacidad de inhibir la producción de péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ AP) por células como se ha definido anteriormente, comprendiendo dicho método cultivar una primera población de células de mamífero en un medio de cultivo en condiciones que provocan la generación de un péptido  $\beta$ AP soluble que puede detectarse en el medio de cultivo; cultivar una segunda población de las mismas células de mamífero en un segundo medio de cultivo en condiciones idénticas a las de la primera población, excepto en que el compuesto de ensayo está presente en el segundo medio de cultivo; medir las cantidades de  $\beta$ AP soluble presentes en los medios de cultivo de la primera población y de la segunda población de células; y comparar las cantidades medidas de  $\beta$ AP para determinar si el compuesto de ensayo ha tenido efecto sobre la generación de péptido  $\beta$ AP soluble por las células cultivadas.

En las formas de realización preferidas, la medición es específica para el  $\beta$ AP presente en los medios de cultivo de la primera y la segunda poblaciones de células.

25

Los compuestos de ensayo de la invención pueden estar presentes a una concentración en el intervalo de 1 nM a 1 mM.

La invención también incluye un método para identificar inhibidores de la producción  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ AP), comprendiendo dicho método administrar un compuesto de ensayo a un hospedador transgénico mamífero no humano que comprende ADN que codifica una variante sueca de la proteína precursora amiloide (APP) que es una doble mutación  $\text{Lys}^{595} \rightarrow \text{Asn}^{595}$  y  $\text{Met}^{596} \rightarrow \text{Leu}^{596}$  con referencia a APP<sub>695</sub>; y determinar si el compuesto de ensayo afecta a la cantidad de péptido  $\beta$ AP soluble presente en un fluido corporal.

El efecto del compuesto de ensayo puede determinarse midiendo una cantidad basal de péptido  $\beta$ AP soluble en un fluido corporal antes de administrar el compuesto de ensayo y volviendo a medir la cantidad de  $\beta$ AP soluble en el fluido corporal después de dicha administración.

En las formas de realización preferidas, el hospedador transgénico mamífero se selecciona de entre el grupo compuesto por monos, perros, conejos, cobayas, ratas y ratones. Opcionalmente, el hospedador transgénico mamífero es un hospedador transgénico que tiene susceptibilidad aumentada a la deposición de placas de  $\beta$ AP en comparación con un mamífero de la misma especie que no comprende dicho ADN.

En otras formas de realización preferidas, el fluido corporal se selecciona de entre el grupo constituido por sangre, CSF, orina y fluido peritoneal. Opcionalmente, el compuesto de ensayo se administra por vía oral, tópica, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraventricular o intraperitoneal.

El péptido  $\beta$ AP soluble puede ser  $\beta$ AP intacto o un fragmento de  $\beta$ AP de aproximadamente 3 kD. El fragmento de  $\beta$ AP puede estar constituido por los restos aminoacídicos 11-40 ó 17-40 de  $\beta$ AP.

50

Esencialmente, dicho ADN codifica APP que comprende la mutación sueca (una doble mutación  $\text{Lys}^{595} \rightarrow \text{Asn}^{595}$  y  $\text{Met}^{596} \rightarrow \text{Leu}^{596}$ ).

### 55 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico que ilustra la detección de tres péptidos  $\beta$ AP sintéticos usando el formato de ensayo ELISA con el anticuerpo monoclonal 266 como anticuerpo de captura y el anticuerpo monoclonal 10D5 como anticuerpo informador. El anticuerpo 266 se preparó contra un péptido sintético que incluía los restos aminoacídicos 13-28 de  $\beta$ AP. El anticuerpo 10D5 se creó contra un péptido sintético que incluía los restos aminoacídicos 1-28 de  $\beta$ AP.

Las figuras 2A y 2B son diagramas que comparan las concentraciones plasmáticas y en CSF de  $\beta$ AP en controles normales y pacientes con AD.

La figura 3 es un diagrama que compara la concentración en CSF de  $\beta$ AP en controles normales (C), pacientes con enfermedad de Alzheimer (AD), pacientes con accidente cerebrovascular (CVA) (apoplejía) y pacientes con enfermedad de Parkinson (PD).

La figura 4 es una transferencia Western del medio condicionado purificado por afinidad de una línea celular que expresa en exceso APP. El material purificado por afinidad del medio condicionado de los cultivos celulares de cerebro mezclado humano que se había purificado adicionalmente mediante cromatografía en fase inversa.

5 La figura 5 es un autorradiograma que demuestra la presencia de  $\beta$ AP soluble en el fluido de cultivo de células 293 de riñón humano. El  $\beta$ AP se inmunoprecipitó del fluido de cultivo con un anticuerpo específico para  $\beta$ AP contra los restos 1-40 de  $\beta$ AP.

10 La figura 6 es un autorradiograma que demuestra que  $\beta$ AP es totalmente soluble en el medio de células 293 del riñón humano y que permanece en el sobrenadante posterior a  $10^5 \times g$  y no se encuentra en el sedimento posterior a  $10^5 \times g$  después de la ultracentrifugación.

15 La figura 7 muestra la cuantificación de  $\beta$ AP (panel izquierdo) y proteína precursora  $\beta$ -amiloide secretada (APPs) (panel derecho) en el medio condicionado en células 293 transfectadas de forma transitoria usando dos ELISA tipo sándwich distintos. Cada columna representa la media de cuatro experimentos de transfección con construcciones de APP normales o variantes con la excepción de la columna simulada, que se basa en tres experimentos de transfección.

20 La figura 8 es un autorradiograma que demuestra los niveles de  $\beta$ AP soluble en el fluido de cultivo de células 293 de riñón humano transfectadas con construcciones normales variantes de APP<sub>695</sub>.

### Descripción de las formas de realización específicas

25 La presente invención es el resultado del descubrimiento de que se generan cantidades detectables de péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ AP) soluble y fragmentos de  $\beta$ AP continuamente a bajas concentraciones en una amplia diversidad de células de mamífero. En particular, se ha descubierto que dichos péptidos  $\beta$ AP se generan *in vitro* por células de mamífero cultivadas y se pueden medir en el medio de cultivo condicionado de numerosas líneas celulares de mamífero. Se ha descubierto adicionalmente que los péptidos  $\beta$ AP están presentes en los fluidos corporales de diversos hospedadores mamíferos y que elevados niveles de péptidos  $\beta$ AP están asociados con afecciones relacionadas con  $\beta$ AP, tales como la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down.

30 Sobre la base de este descubrimiento, la presente invención proporciona métodos para detectar fármacos para identificar inhibidores de la generación potencial de  $\beta$ AP. Los métodos dependen de la medición de concentraciones muy bajas de  $\beta$ AP en una muestra fluida, típicamente en el intervalo de 0,1 ng/ml a 10 ng/ml, proporcionando adicionalmente la presente invención métodos muy sensibles y específicos para realizar dichas mediciones. En particular, los métodos de detección de la presente invención incluyen la medición de  $\beta$ AP a concentraciones umbral de 0,1 ng/ml e inferiores, y son suficientemente específicos para distinguir  $\beta$ AP de otros fragmentos de la proteína precursora  $\beta$ -amiloide (APP) que contiene los aminoácidos precursores además de los aminoácidos 39-43 que comprenden la región de  $\beta$ AP.

40 Actualmente no se comprende el mecanismo de generación de  $\beta$ AP y el fragmento de  $\beta$ AP. Es posible que se produzca  $\beta$ AP intacto o de longitud completa de forma intracelular y después de ello se libere o se secrete al fluido extracelular, es decir, fluidos corporales *in vivo* y medio de cultivo celular condicionado *in vitro*. Alternativamente, es posible que se secrete o se libere una proteína o fragmento precursor, que puede ser la APP completa o una parte de la misma que contiene la región  $\beta$ AP, de las células de mamífero y se procese fuera de la fuente celular. Independientemente del mecanismo particular, la presente invención depende de la detección y la medición de las concentraciones o cantidades de  $\beta$ AP y fragmentos de  $\beta$ AP en los fluidos extracelulares, incluyendo el medio de cultivo condicionado y los fluidos corporales, como se analiza con mayor detalle a continuación.

50 La expresión "péptido  $\beta$ -amiloide" ( $\beta$ AP) como se usa en la presente memoria, se refiere a una proteína de aproximadamente 4,2 kD que, en los cerebros de sujetos con AD, síndrome de Down, HCHWA-D y en algunos ancianos normales, forma la subunidad de los filamentos amiloides que compone las placas seniles (amiloides) y por depósitos amiloides en pequeños vasos sanguíneos del cerebro y las meninges (angiopatía amiloide). La  $\beta$ AP puede existir en una forma polimérica filamentosa (en esta forma, muestra las características de unión a los colorantes rojo Congo y tioflavina S del amiloide descritas en relación con éste). El  $\beta$ AP también puede existir en una forma no filamentosa (depósitos "preamiloides" o "amorfos" o "difusos") en el tejido, no existiendo en esta forma tinción birrefringente detectable con rojo Congo. Se describe una parte de esta proteína en forma insoluble obtenida de vasos sanguíneos meníngeos en la patente US n° 4.666.829. Cuando se usa  $\beta$ AP en relación con la esta invención, se refiere específicamente a un péptido de aproximadamente 39-43 aminoácidos que es sustancialmente homólogo a la forma de la proteína producida por el método descrito en la patente de Glenner *et al.*, pero que, de acuerdo con la presente invención, puede encontrarse en y purificarse a partir del fluido extracelular (medio) de células cultivadas que han crecido *in vitro* o a partir de fluidos corporales de seres humanos u otros animales, incluyendo individuos tanto normales como individuos que padecen afecciones relacionadas con  $\beta$ AP. Por tanto,  $\beta$ AP también se refiere a secuencias de  $\beta$ AP relacionadas producidas por mutaciones en la región  $\beta$ AP del gen normal. De cualquier forma,  $\beta$ AP es un fragmento de aproximadamente 39-43 aminoácidos de una glucoproteína grande trans-membrana, denominada proteína precursora  $\beta$ -amiloide (APP), codificada por un gen en el brazo largo del cromosoma 21 humano. El  $\beta$ AP se caracteriza adicionalmente por su movilidad relativa en electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida o en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Su secuencia de 43 aminoácidos es:

1  
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr

11  
Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe

21  
Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala

31  
Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val

41  
Ile Ala Thr

o una secuencia que sea sustancialmente homóloga a la misma.

La expresión “péptidos  $\beta$ AP” como se usa en este documento, se refiere a  $\beta$ AP intacto o de longitud completa así como a fragmentos y productos de degradación de  $\beta$ AP que se generan a bajas concentraciones por células de mamíferos. Los fragmentos de  $\beta$ AP particulares tienen un peso molecular de aproximadamente 3 kD y actualmente se cree que están constituidos por los restos aminoacídicos 11-40 y 17-40 de  $\beta$ AP.

La expresión “región de unión de  $\beta$ AP” como se usa en la presente memoria, se refiere a una región de  $\beta$ AP que está centrada en el sitio entre los restos aminoacídicos 16 y 17 (Lys<sup>16</sup> y Leu<sup>17</sup>) que es una diana para el procesamiento proteolítico normal de APP. Dicho procesamiento normal produce una diversidad de fragmentos de APP que son potencial e inmunológicamente reactivos de forma cruzada con la molécula  $\beta$ AP intacta y los fragmentos de  $\beta$ AP que se tienen que identificar en los métodos de la presente invención. La región de unión comprende los restos aminoacídicos 10 a 35, comprendiendo preferentemente los restos aminoacídicos 15 a 30, habiéndose hallado que anticuerpos creados contra un péptido sintético compuesto por los restos aminoacídicos 13 a 28 presentan la especificidad requerida.

La expresión “proteína precursora  $\beta$ -amiloide” (APP) como se usa en la presente memoria, se define como un polipéptido que está codificado por un gen del mismo nombre localizado en el ser humano en el brazo largo del cromosoma 21 y que incluye  $\beta$ AP dentro de su tercio carboxilo. APP es una proteína glucosilada, trans-membrana única expresada en una amplia diversidad de células en muchos tejidos de mamíferos. Los ejemplos de isotipos específicos de APP que actualmente se sabe que existen en los seres humanos son el polipéptido de 695 aminoácidos descrito por Kang *et al.* (1987) Nature 325:733-736 que se denomina APP “normal”; el polipéptido de 751 aminoácidos descrito por Ponte *et al.* (1988) Nature 331:525-527 (1988) y Tanzi *et al.* (1988) Nature 331:528-530; y el polipéptido de 770 aminoácidos descrito por Kitaguchi *et al.* (1988) Nature 331:530-532. Los ejemplos de variantes específicas de APP incluyen mutaciones puntuales que pueden diferir tanto en la posición como en el fenotipo (para una revisión de las mutaciones de variantes conocidas véase Hardy (1992) Nature Genet. 1:233-234).

La expresión “fragmentos de APP” como se usa en la presente memoria, se refiere a fragmentos de APP diferentes de los que constan únicamente de  $\beta$ AP o de fragmentos de  $\beta$ AP. Es decir, los fragmentos de APP incluirán secuencias de aminoácidos de APP adicionales a las que forman  $\beta$ AP intacto o un fragmento de  $\beta$ AP.

La expresión “afección relacionada con  $\beta$ AP” como se usa en la presente memoria, se define incluyendo la enfermedad de Alzheimer (que incluye la enfermedad de Alzheimer familiar), el síndrome de Down, HCHWA-D y el envejecimiento del cerebro.

Las expresiones “medio de cultivo condicionado” y “medio de cultivo” como se usan en la presente memoria, se refieren al fluido extracelular acuoso que rodea las células que han crecido en cultivo tisular (*in vitro*) y que contiene, entre otros constituyentes, proteínas y péptidos secretados por las células.

La expresión “fluido corporal” como se usa en la presente memoria, se refiere a aquellos fluidos de un hospedador mamífero que es de esperar que contengan cantidades medibles de  $\beta$ AP y de fragmentos de  $\beta$ AP, incluyendo específicamente sangre, fluido cefalorraquídeo (CSF), orina y fluido peritoneal. El término “sangre” se refiere a sangre completa, así como a plasma y a suero.

De acuerdo con la presente invención, pueden detectarse  $\beta$ AP y fragmentos de  $\beta$ AP y/o medirse en una diversidad de muestras biológicas y fisiológicas, incluyendo muestras *in vitro*, tales como medio condicionado de células cultivadas, incluyendo líneas celulares transfectadas y líneas celulares endógenas, y muestras de pacientes *in vivo*, típicamente fluidos corporales. La detección y la medición de péptidos  $\beta$ AP se puede conseguir por cualquier técnica capaz de distinguir  $\beta$ AP y fragmentos de  $\beta$ AP de otros fragmentos de APP que se podrían encontrar en la muestra. Convenientemente, pueden emplearse técnicas de detección inmunológica usando sustancias de unión específicas para  $\beta$ AP, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos recombinantes y similares, que se unen con especificidad y sensibilidad a  $\beta$ AP. En particular, se ha descubierto que los anticuerpos que son monoespecíficos para la región de unión de  $\beta$ AP pueden distinguir  $\beta$ AP de otros fragmentos de APP. La región de unión de  $\beta$ AP está centrada en los restos aminoacídicos 16 y 17, comprendiendo típicamente los restos aminoacídicos 13-28, y dichos anticuerpos

específicos para la unión pueden prepararse usando péptidos sintéticos que tienen esa secuencia como inmunógeno. Las técnicas de detección particularmente adecuadas incluyen ELISA, transferencia Western, radioinmunoensayo y similares.

5 Una técnica de inmunoensayo preferida es un ensayo de dos sitios o tipo “sándwich” que utiliza un anticuerpo específico para la unión como anticuerpo de captura (unido a una fase sólida) y un segundo anticuerpo marcado que se une a un epítipo diferente del unido al anticuerpo de captura. El segundo anticuerpo marcado reconoce preferentemente el extremo amino de  $\beta$ AP y puede crearse convenientemente contra un péptido sintético que consta esencialmente de los restos aminoacídicos 1-16 de  $\beta$ AP. Los métodos particulares para preparar dichos anticuerpos y utilizar dichos anticuerpos en un ELISA ejemplar están expuestos en la sección experimental a continuación en la presente memoria.

10 También pueden emplearse otras técnicas no inmunológicas para detectar  $\beta$ AP y fragmentos de  $\beta$ AP que no requieren el uso de anticuerpos específicos para  $\beta$ AP. Por ejemplo, puede utilizarse electroforesis en gel bidimensional para separar proteínas solubles muy relacionadas presentes en una muestra fluida. Los anticuerpos reaccionan de forma cruzada con muchos fragmentos de APP, incluyendo  $\beta$ AP, pueden usarse después para sondear los geles, identificándose la presencia de  $\beta$ AP sobre la base de su posición precisa en el gel. En el caso de células cultivadas, las proteínas celulares pueden marcarse metabólicamente y separarse por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, utilizando opcionalmente inmunoprecipitación como etapa de separación inicial. Un ejemplo específico del último enfoque se describe en la sección experimental a continuación en la presente memoria.

20 Los anticuerpos específicos para  $\beta$ AP pueden prepararse contra un antígeno o hapteno adecuado que comprenda el epítipo diana deseado, tal como la región de unión que consta de los restos aminoacídicos 13-28 y el extremo amino que consta de los restos aminoacídicos 1-16. Convenientemente, pueden prepararse péptidos sintéticos por técnicas convencionales en fase sólida, acoplada a un inmunógeno adecuado, y usarse para preparar antisueros o anticuerpos monoclonales por técnicas convencionales. Los haptenos peptídicos adecuados comprenderán habitualmente por lo menos cinco restos contiguos dentro del  $\beta$ AP y pueden incluir más de seis restos.

25 Los haptenos polipeptídicos sintéticos pueden producirse por la técnica de síntesis en fase sólida de Merrifield bien conocida, en la que se añaden secuencialmente aminoácidos a una cadena creciente (Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2156). Las secuencias de aminoácidos pueden estar basadas en la secuencia de  $\beta$ AP expuesta anteriormente.

30 Una vez se ha obtenido una cantidad suficiente de hapteno polipeptídico, puede conjugarse con un vehículo inmunogénico adecuado, tal como albúmina sérica, hemocianina de lapa californiana u otros vehículos proteicos adecuados, como se describe en líneas generales en Hudson y Hay, Practical Immunology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, capítulo 1.3, 1980, cuya descripción se incorpora a la presente memoria como referencia. Un vehículo inmunogénico ejemplificativo utilizado en los ejemplos proporcionados a continuación es el anticuerpo  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  (Boehringer-Mannheim, clon n° 145-2C11).

40 Una vez se ha obtenido una cantidad suficiente de inmunógeno, pueden producirse anticuerpos específicos para el epítipo deseado por técnicas *in vitro* o *in vivo*. Las técnicas *in vitro* implican la exposición de linfocitos a los inmunógenos, mientras que las técnicas *in vivo* requieren la inyección de inmunógenos en un hospedador vertebrado adecuado. Los hospedadores vertebrados adecuados son animales no humanos, incluyendo ratones, ratas, conejos, ovejas, cabras y similares. Los inmunógenos se inyectan en el animal de acuerdo con un programa predeterminado, y se extrae sangre periódicamente de los animales, teniendo las extracciones de sangre sucesivas un título y especificidad mejorados. Las inyecciones pueden practicarse por vía intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, o similares, y puede utilizarse un adyuvante, tal como el adyuvante incompleto de Freund.

45 Si se desea, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales preparando líneas celulares inmortalizadas capaces de producir anticuerpos que tengan la especificidad deseada. Dichas líneas celulares inmortalizadas pueden producirse de diversos modos. Convenientemente, un vertebrado pequeño, tal como un ratón, se hiperinmuniza con el inmunógeno deseado por el método descrito. El vertebrado después se sacrifica, habitualmente varios días después de la inmunización final, se extraen las células esplénicas y se inmortalizan las células esplénicas. La forma de inmortalización no es crítica. Actualmente, la técnica más común es la fusión con un compañero de fusión celular de mieloma, como se describió por primera vez por Kohler y Milstein (1975) Nature 256:495-497. Otras técnicas que incluyen transformación con EBV, transformación con ADN desnudo, por ejemplo, oncogenes, retrovirus, etc., o cualquier otro método que proporcione un mantenimiento estable de la línea celular y producción de anticuerpos monoclonales. Se describen técnicas específicas para preparar anticuerpos monoclonales en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, cuya descripción completa se incorpora a la presente memoria como referencia.

50 Además de anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales (antisueros), las técnicas de detección de la presente invención también serán capaces de usar fragmentos de anticuerpo, tales como F(ab), Fv, V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub> y otros fragmentos. En el uso de anticuerpos policlonales, sin embargo, puede ser necesario adsorber los antisueros contra los epítopos diana para producir una población de anticuerpos monoespecíficos. También será posible emplear anticuerpos (inmunoglobulinas) producidos de forma recombinante y variaciones de los mismos como bien se describe actualmente en la patente y en la bibliografía científica. Ver, por ejemplo, los documentos EP0171496, EP173494, WO 86/01533, EP0184187, WO 87/02671 y JP62100291. También sería posible preparar otras proteínas recombinantes que imitarían la especificidad de unión de anticuerpos preparados como se ha descrito.

La detección *in vivo* de  $\beta$ AP en muestras de pacientes puede usarse para diagnosticar y controlar la enfermedad de Alzheimer y otras afecciones relacionadas con  $\beta$ AP, tales como el síndrome de Down y HCHWA-D. Las muestras adecuadas de pacientes incluyen fluidos corporales, tales como sangre, CSF, orina y fluido peritoneal. La presencia de la afección relacionada con  $\beta$ AP generalmente estará asociada con elevados niveles de  $\beta$ AP en el fluido en comparación con esos valores en individuos normales, es decir, individuos que no padecen la enfermedad de Alzheimer o cualquier otra afección relacionada con  $\beta$ AP. Las concentraciones de diagnóstico de  $\beta$ AP en la sangre están en el intervalo de 0,1 ng/ml a 10 ng/ml o mayores, más generalmente de 0,1 ng/ml a 3 ng/ml. La concentraciones de diagnóstico de  $\beta$ AP en CSF están en el intervalo de 0,1 ng/ml a 25 ng/ml o superiores, más generalmente de 0,1 ng/ml a 5 ng/ml.

Además del diagnóstico inicial de la afección relacionada con  $\beta$ AP, las concentraciones medidas de  $\beta$ AP pueden controlarse para seguir el progreso de la enfermedad y potencialmente para seguir la eficacia del tratamiento (cuando dichos tratamientos resultan disponibles). Sería de esperar que los niveles de  $\beta$ AP disminuyeran con un régimen de tratamiento eficaz.

Puede usarse el control *in vitro* de los niveles de  $\beta$ AP en un medio de cultivo condicionado procedente de un cultivo celular adecuado para la detección de fármacos. Cultivando células en condiciones que produzcan la acumulación de  $\beta$ AP en el medio de cultivo condicionado y exponiendo las células cultivadas a compuestos de ensayo, puede observarse el efecto de estos compuestos de ensayo sobre la producción de  $\beta$ AP. Sería de esperar que compuestos de ensayo que son capaces de disminuir la cantidad de acumulación de  $\beta$ AP fueran candidatos para ensayo como inhibidores de la generación de  $\beta$ AP. Las líneas celulares adecuadas incluyen líneas celulares de seres humanos y animales, tales como la línea celular de riñón humano 293, las líneas celulares de neuroglioma humano, células HeLa humanas, células endoteliales humanas primarias (por ejemplo, células HUVEC), fibroblastos o linfoblastos humanos primarios, células cerebrales mezcladas humanas primarias (incluyendo neuronas, astrocitos y neuroglía), células de ovario de hámster chino (CHO) y similares.

Para su uso en los métodos de detección de fármacos de acuerdo con la presente invención, resultan preferidas las líneas celulares capaces de expresar una variante de APP particular que produzca en exceso  $\beta$ AP. Por “producir en exceso” se entiende que la cantidad de  $\beta$ AP producida a partir de la APP variante es mayor que la cantidad producida por cualquiera o todas las isoformas de APP normales, por ejemplo, las isoformas de 695, 751 y 770 aminoácidos que se han descrito previamente. Por ejemplo, como se muestra en la sección experimental de la presente memoria, las células K293 que expresan un ADN de APP que alberga una doble mutación ( $\text{Lys}^{595} \rightarrow \text{Asn}^{595}$  y  $\text{Met}^{596} \rightarrow \text{Leu}^{596}$ ) hallada en una familia sueca con FAD, producen aproximadamente de seis a ocho veces más  $\beta$ AP que células que expresan APP normal. La mutación en el resto 596 parece ser la responsable principal del aumento.

Asimismo, el control *in vivo* de  $\beta$ AP en modelos animales, tales como el modelo animal de ratón descrito en el documento WO 91/19810 y modelos animales que expresan la variante partícula de APP, también puede usarse para explorar compuestos para su eficacia terapéutica (habitualmente para ensayar compuestos que se han identificado previamente por una detección *in vitro*, tal como la detección *in vitro* descrita anteriormente). El(los) compuesto(s) de ensayo se administra(n) al animal y se observa el nivel de  $\beta$ AP o fragmento de  $\beta$ AP en un fluido corporal. Los compuestos de ensayo que reducen el nivel de  $\beta$ AP en ciertos fluidos corporales se consideran candidatos para evaluación adicional.

Los compuestos de ensayo pueden ser cualquier molécula, compuesto u otra sustancia que pueda añadirse al cultivo celular sin impedir sustancialmente la viabilidad celular. Los compuestos de ensayo adecuados pueden ser pequeñas moléculas, polímeros biológicos, tales como polipéptidos, polisacáridos, polinucleótidos y similares. Los compuestos de ensayo típicamente se administran al medio de cultivo a una concentración en el intervalo de aproximadamente 1 nM a 1 mM, habitualmente de aproximadamente 100  $\mu$ M a 1 mM. Los compuestos de ensayo que pueden inhibir la generación, acumulación o secreción de  $\beta$ AP se consideran candidatos para determinaciones adicionales de la capacidad para disminuir la producción de  $\beta$ AP en células y/o animales.

Los ejemplos siguientes se proporcionan a título ilustrativo y no limitativo.

## Parte experimental

### Materiales y métodos

#### 1. Preparación del anticuerpo

##### a. Anticuerpos monoclonales contra la región de unión de $\beta$ AP

Se prepararon anticuerpos monoclonales para la región de unión de  $\beta$ AP usando un péptido sintético que comprende los restos aminoacídicos 13-28 ( $\beta$ AP<sub>13-28</sub>). Se conjugó  $\beta$ AP<sub>13-28</sub> con un inmunógeno (anticuerpo  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$ ; clon n° 145-2C11, Boehringer-Mannheim) usando éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pierce).

Se inmunizaron ratones A/J inicialmente por vía intraperitoneal (IP) con el conjugado  $\beta$ AP mezclado con adyuvante completo de Freund. Catorce días después, se administró una dosis de refuerzo IP a los ratones con el conjugado  $\beta$ AP mezclado con solución salina tamponada con fosfato (PBS) en intervalos de 14 días. Después de seis dosis de

refuerzo en total, finalmente se administró a los ratones dosis de refuerzo por vía intravenosa con conjugado  $\beta$ AP mezclado con PBS y la fusión se hizo 3 días después. La fusión de células esplénicas con células de mieloma P3.653 se realizó de acuerdo con lo descrito en Oi y Herzenberg, *Selective Methods in Cellular Immunology*, Mishell and Shigii, eds., W.H. Freeman and Company, San Francisco, capítulo 17 (1980). Los títulos séricos y las exploraciones  
 5 iniciales se realizaron por el método RÍA descrito a continuación. Se expandieron varios clones en una placa de 24 pocillos y se sometieron a análisis adicional como se describe a continuación. Los clones de interés se produjeron en fluido ascítico de ratón.

El método RIA usado para explorar extracciones séricas y sobrenadantes de hibridoma de fusión estaba basado  
 10 en un método desarrollado por Wang *et al.* (1977) *J. Immunol. Methods* 18:157-164. En resumen, el sobrenadante (o suero) se incubó durante una noche a temperatura ambiente sobre una hélice con  $\beta$ AP<sub>1-28</sub> marcado con <sup>125</sup>I y perlas de Sepharose® 4B a los que se había acoplado IgG de oveja con antirratón mediante bromuro de cianógeno. Se recogieron las perlas de cada pocillo sobre discos de filtro de fibra de vidrio con un recolector celular y se lavaron varias veces con PBS. Los discos de filtro después se transfirieron a tubos gamma y se hizo un recuento de la radiactividad unida  
 15 con un contador gamma.

Se ensayaron todos los hibridomas para su unión a  $\beta$ AP<sub>1-28</sub> usando el método descrito anteriormente en la ex-  
 20 ploración inicial y después se volvieron a ensayar 3 días después. Los clones  $\beta$ AP<sub>1-28</sub> positivos se caracterizaron adicionalmente para su reactividad con  $\beta$ AP<sub>1-28</sub> marcado con <sup>125</sup>I usando el método RIA descrito anteriormente. No se hallaron clones que se unieran  $\beta$ AP<sub>1-16</sub>. En un ELISA de captura de péptidos, se observó que todos los clones reaccionaban con  $\beta$ AP<sub>13-28</sub> mientras que ningún clon reaccionó con  $\beta$ AP<sub>17-28</sub>. Por lo tanto, se determinó que todos los clones presentaban un epítipo dentro de la región de unión que comprende los aminoácidos 16 y 17.

Sobre la base de los resultados de los ensayos anteriores, se expandieron varios clones en placas de 24 pocillos.  
 25 Estos clones se caracterizaron adicionalmente por ensayo de saturación. Se añadieron sobrenadantes en el punto de titulación del 50% (determinado por el método RIA descrito anteriormente) a pocillos que contenían perlas de Sepharose®-IgG de oveja antirratón, una cantidad constante de  $\beta$ AP<sub>1-28</sub> marcado con <sup>125</sup>I y cantidades variables de  $\beta$ AP<sub>13-28</sub> o  $\beta$ AP<sub>17-28</sub> sin marcar. Se determinó la concentración de péptido frío para el 50% de inhibición para cada anticuerpo. No se observó inhibición para el  $\beta$ AP<sub>17-28</sub> a 100 ng/pocillo para ningún clon. El punto de inhibición del  
 30 50% para  $\beta$ AP<sub>13-28</sub> varió de 10 a 80 ng/pocillo. Los clones también se caracterizaron sobre la base de la reactividad en transferencias de Western. Sobre la base del punto de titulación, la sensibilidad (determinada por el punto de inhibición del 50%) y en la reactividad en transferencia de Western se produjeron varios clones en fluido ascítico.

Se seleccionaron anticuerpos de los hibridomas denominados 067, 266, 297 y 361 para su uso como anticuerpo de  
 35 captura en los ensayos descritos a continuación.

#### b. Anticuerpos monoclonales para la región N-terminal de $\beta$ AP

Se prepararon anticuerpos monoclonales para la región N-terminal de  $\beta$ AP utilizando un péptido sintético que  
 40 comprendía los restos aminoacídicos 1-28 ( $\beta$ AP<sub>1-28</sub>). Se acopló químicamente  $\beta$ AP<sub>1-28</sub> usando suberato de disuccimidilo (DSS) a albúmina sérica de conejo (RSA) usando un relación molar 20:1 de péptido a proteína en fosfato sódico 50 mM, pH 7,0, NaCl 150 mM, durante una noche a 21°C usando DSS 1 mM (Hyman *et al.* (1992) *J. Neuropath. Exp. Neuro.* 51:76).

Se obtuvieron los anticuerpos 10D5 y 6C6 a partir de una fusión en la que los ratones habían recibido 5 inyecciones  
 45 de  $\beta$ AP<sub>1-28</sub> acoplado a RSA mediante DSS a 100  $\mu$ g/ml. La inyección inicial fue en adyuvante completo de Freund (CFA) seguida por una segunda y posteriores inyecciones en adyuvante incompleto de Freund (IFA) cada 10-14 días. Tres días antes de la fusión, el ratón 4 que tenía un título de 1/70.000 medido por ELISA frente a  $\beta$ AP<sub>1-28</sub>, recibió  
 50 100  $\mu$ g de  $\beta$ AP<sub>1-28</sub> RSA en PBS por vía intraperitoneal como refuerzo final. Se realizó una detección por ELISA y en secciones de cerebro con AD fijadas con parafina. La concentración del recubrimiento de  $\beta$ AP<sub>1-28</sub> fue de 1  $\mu$ g/pocillo. 10D5 y 6C6 fueron positivos en el ELISA y la sección de tejido cerebral con AD.

Se seleccionaron los anticuerpos de hibridomas denominados 10D5 y 6C6 para su uso como anticuerpo informado  
 55 en los ensayos descritos a continuación.

#### c. Anticuerpos policlonales

Se crearon anticuerpos policlonales contra los péptidos sintéticos  $\beta$ AP<sub>1-38</sub>,  $\beta$ AP<sub>1-40</sub> y  $\beta$ AP<sub>1-42</sub>, y se denominaron  
 60 anti- $\beta$ AP<sub>1-38</sub> (antisuero Y), anti- $\beta$ AP<sub>1-40</sub> (antisuero 1280) y anti- $\beta$ AP<sub>1-42</sub> (antisuero HM). Se inmunizaron conejos con 0,5-3,0 mg de uno de estos péptidos (no conjugados) en adyuvante completo de Freund por vía intradérmica. Los conejos recibieron dosis de refuerzo de 0,1-0,5 mg de péptido 3 semanas después de la inmunización principal y a intervalos de aproximadamente 2 a 4 semanas después de ello hasta que se pudieron detectar elevados títulos de reactividad anti-péptido en las muestras de suero de conejo. Estos antisueros después se usaron en ensayos inmunológicos  
 65 a diluciones que variaban de 1:300 a 1:1.500.

## ES 2 346 852 T3

### 2. Ensayo ELISA

#### a. Unión del anticuerpo de captura a pocillos de microtitulación

5 Se diluyó el anticuerpo monoclonal 266 hasta una concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$ , y el anticuerpo monoclonal 067 a 10  $\mu\text{g/ml}$  en un tampón que contenía  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 26,2 g/l;  $\text{NaN}_3$ , 1 g/l; pH 8,3. Después se distribuyeron cien  $\mu\text{l/pocillo}$  de esta solución en una placa COSTAR de poliestireno transparente de 96 pocillos y se incubaron durante una noche a temperatura ambiente. Después del recubrimiento, la solución restante se aspiró y se bloquearon los sitios de unión no específica al anticuerpo con albúmina sérica humana (HSA) al 0,25% disuelta en un tampón  
10 que contenía  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1 g/l;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10,8 g/l;  $\text{NaN}_3$ , 0,5 g/l y sacarosa, 25 g/l; pH 7,4. Estas placas recubiertas/bloqueadas se usaron inmediatamente o se secaron en un desecador y se almacenaron en un recipiente seco a 4°C durante un máximo de 5 días.

#### 15 b. Protocolo de ensayo

Después se añadieron patrones que contenían cantidades conocidas de  $\beta\text{AP}$  y muestras de diversos fluidos corporales o extracorporales a la placa a 100  $\mu\text{l/pocillo}$ . Las muestras se añadieron sin diluir o diluidas en un tampón que contenía  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g/l;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,16 g/l;  $\text{NaN}_3$ , 0,5 g/l; BSA (sin globulina) 6 g/l; Triton X-405,  
20 0,5 ml/l; NaCl, 8,5 g/l; pH 7,4. Las muestras y los patrones se incubaron en los pocillos durante 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente se aspiraron y se lavaron los pocillos con 300  $\mu\text{l/pocillo}$  de una solución que contenía NaCl, 80 g/l; KCl, 3,8 g/l; base Tris, 5,85 g/l; Tris HCl, 31,75 g/l y Tween<sup>®</sup> 20 al 0,05%; pH 7,5 (TBS).

Se disolvió NHS-biotina (15 mg) en 0,25 ml de dimetilsulfóxido y se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de esta solución a 1 mg de anticuerpo 10D5 ó 6C6 suspendido en 1 ml de solución de carbonato sódico, 50 mM, pH 8,5. La mezcla se incubó en la oscuridad durante 1 $\frac{1}{2}$  horas a temperatura ambiente y después se dializó frente a solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4 durante 48 horas a 4°C, para producir anticuerpo informador biotinilado. Después se añadieron cien  $\mu\text{l/pocillo}$  del anticuerpo informador biotinilado (10D5 ó 6C6) diluido a 3  $\mu\text{g/ml}$  a cada pocillo y se incubaron durante otra hora a temperatura ambiente. El diluyente del anticuerpo estaba compuesto por base Trizma, 1,21 g/l; NaCl, 29,22  
30 g/l;  $\text{NaN}_3$ , 1,5 g/l; Triton X-405, 0,5 ml/l; PEG (Pm 3350), 40 g/l;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,095 g/l;  $\text{ZnCl}_2$ , 0,014 g/l; suero bovino fetal, 100 ml/l y BSA, 2,5 g/l, pH 7,4.

Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente con el anticuerpo informador (10D5 ó 6C6) se aspiró el sobrenadante y se lavaron los pocillos tres veces con 300  $\mu\text{l/pocillo}$  de TBS. Se añadió fosfatasa alcalina con estreptavidina (100  $\mu\text{l/pocillo}$ , diluida 1:2000 en el tampón diluyente del conjugado) y se incubó durante otra hora a temperatura ambiente. Después se aspiró el sobrenadante y se lavó 3 veces con 300  $\mu\text{l/pocillo}$  de TBS. Se añadió sustrato fluorescente (fosfato de 4-metil-umbeliferilo en tampón 2-amino-2-metil propanolol; pH 9,5; (100  $\mu\text{l/pocillo}$ )) y se leyó la fluorescencia y se expresó como unidades de fluorescencia relativa (FSU) después de 15 minutos usando un Cytofluor 2300 de Millipore, con un filtro de excitación de 360/40 y un filtro de emisión de 460/40.  
40

### 3. Células cultivadas

Se cultivaron células humanas (y células de otros mamíferos) en condiciones de cultivo celular convencionales en placas de plástico o en placas de microtitulación de múltiples pocillos. En particular, se cultivaron células de carcinoma de riñón embrionario humano 293 (en adelante denominadas células K293) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenían suero de ternera fetal al 10% y antibióticos. Se usaron células K293 que se habían transfectado previamente con una construcción de ADN recombinante que contenía la región codificante completa de la proteína precursora  $\beta$ -amiloide (APP) además de células K293 sin transfectar (Selkoe *et al.* (1988) Proc. Acad. Sci. USA 85:7341-7345 y Oltersdorf *et al.* (1990) J. Biol. Chem. 265:4492-4497). Las células transfectadas expresan elevados niveles de la proteína APP, en comparación con las niveles de fondo habituales de APP endógena característicos de células K293.  
50

También se cultivaron varios tipos de células diferentes, incluyendo células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC); una línea celular leucémica megacariocitoide humana denominada DAMI; células de ovario de hámster chino (CHO), fibroblastos humanos primarios y cultivos celulares cerebrales mezclados primarios (incluyendo neuronas, astrocitos y microglía) establecidos a partir de cerebro humano o de roedor.  
55

Estas diversas líneas celulares se cultivaron a 37°C en un incubador de cultivo tisular que contenía una atmósfera de oxígeno al 95% y de dióxido de carbono al 5%. Las células se subcultivaron de forma rutinaria proporcionando medio de cultivo fresco a intervalos regulares. El fluido extracelular que rodeaba las células (medio condicionado) se recogió de las células cultivadas en condiciones de reposo convencionales o después de diversos tratamientos bioquímicos de las células. Todas las células cultivadas y sus muestras de los medios derivados se manipularon en condiciones asépticas.  
60

Se prepararon cultivos de células de cerebro humano mezcladas para su uso en estudios cromatográficos de inmunofluorescencia, del siguiente modo. Se obtuvieron muestras de tejido neural fetal de cadáveres fetales de 12 a 14 semanas de edad. Las muestras de corteza cerebral se aclararon dos veces con solución salina equilibrada de Hank (HBSS). El  
65

## ES 2 346 852 T3

tejido cortical (2-3 gramos) se colocó en 10 ml de HBSS fría a la que se añadió 1 mg de DNasa (Sigma Chemical Co., Sant Louis, MO D3427). La suspensión triturada se filtró a través de tamices de nylon Nitex de 210  $\mu\text{m}$ , después de 130  $\mu\text{m}$ , como se describió por Pulliam *et al.* (1984) J. Virol. Met. 9:301.

5 Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en medio neuronal (MEM reforzado con suero bovino fetal al 10%, glucosa al 1%, piruvato Na 1 mM, glutamina 1 mM, KCl 20 mM). Las placas de 100 mm recubiertas con polietilimina se sembraron con  $1,5 \times 10^7$  células en 8 ml de medio neuronal. Se recogió el medio y se añadió medio fresco dos veces a la semana. El medio condicionado procedente de las células (HFBC-CM) se congeló hasta su uso.

10

#### 4. Ensayo de inmunoprecipitación/autorradiografía para $\beta\text{AP}$

##### a. Marcaje metabólico e inmunoprecipitación

15 Células K293 cultivadas en condiciones de cultivo convencionales experimentaron marcaje metabólico de proteínas recién sintetizadas por la adición de metionina radiomarcada con  $^{35}\text{S}$  al medio de cultivo. Durante esta etapa, el medio contenía metionina no marcada ("fría") pero por lo demás era idéntico al medio convencional usado para cultivar células K293. Se usaron cantidades de metionina radiactiva que variaban de 50-300  $\mu\text{Ci/ml}$  de medio en los experimentos de marcaje. Las células se incubaron durante aproximadamente 10-20 horas. Después de ello, se recogió el medio que contenía cualquier proteína radiomarcada liberada por las células.

20

25 Se añadió un anticuerpo policlonal producido contra un péptido  $\beta\text{AP}$  sintético que comprendía los aminoácidos Asp-1 a Val-40 ( $\beta\text{AP}_{1-40}$ ) al medio recogido y se incubó durante periodos que variaban de 2-10 horas. Esto permitió que se formaran complejos antígeno-anticuerpo entre el anticuerpo anti- $\beta\text{AP}$  y cualquier péptido  $\beta\text{AP}$  presente en los medios de cultivo. Después de ello, se añadió un reactivo proteína A-Sepharose<sup>®</sup> capaz de unirse a las inmunoglobulinas (anticuerpos), y esta mezcla se incubó adicionalmente durante periodos variables de 2-10 horas. Esta incubación posibilitó que las perlas de proteína A-Sepharose<sup>®</sup> se unieran a los anticuerpos anti- $\beta\text{AP}$  que a su vez estaban unidos al péptido  $\beta\text{AP}$ . Después se centrifugó el medio condicionado a 12.000 x g durante 12 minutos para sedimentar los complejos antígeno-anticuerpo-perlas proteína A-Sepharose<sup>®</sup>.

30

##### b. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE) del inmunoprecipitado

35 Los inmunoprecipitados del medio de las células marcadas metabólicamente se sometieron a electroforesis en geles de Tris-tricina al 10-20%, que tiene la ventaja de revelar bien las proteínas de bajo peso molecular (tales como  $\beta\text{AP}$ ). Después se secaron los geles y se expusieron a una película de rayos-X para producir un autorradiograma o fluorograma. Los tiempos de exposición variaron pero habitualmente estaban en el intervalo de 2-7 días. Después del revelado de la película de rayos-X, se visualizó cualquiera de las proteínas radiomarcadas que habían precipitado del medio celular por el anticuerpo anti- $\beta\text{AP}$  en forma de bandas oscuras en el peso molecular apropiado (es decir, 4 kD).

40

#### 5. Preparación de resina 266

45 El anticuerpo 266 (15 ml a 0,85 mg/ml) se dializó frente a acetato Na 10 mM, NaCl 15 mM, pH 5,5 y después se acopló a hidrazida Hz Affi-Gel<sup>®</sup> (Bio-Rad, Richmond, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante, usando aproximadamente 5 ml de resina. Se colocó un ml de resina en una columna de 1 x 10 cm para la purificación de  $\beta\text{AP}$  a partir de 4 litros de medio condicionado.

#### 6. Transferencia Western

50 Las muestras se sometieron a SDS-PAGE en geles de Tricina (Novex) al 10-20% y se transfirieron a membranas de PVDF (Pro-blot, Applied Biosystems) a 40 voltios, durante una noche, en el sistema de tampón descrito por Towbin, *et al.* (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4354. La visualización de las proteínas inmunorreactivas utilizó el sistema de quimioluminiscencia TROPIX de acuerdo con las directrices del fabricante para el sustrato AMPPD. El anticuerpo primario usado fue 10D5 a una concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$ .

55

#### 7. Construcción y análisis de la mutación FAD "sueca"

60 La mutación sueca implica dos conversiones de pares de bases adyacentes: nucleótido 1785 G a T y nucleótido 1786 A a C que conduce a dos intercambios de aminoácidos: Lys  $\rightarrow$  Asn<sup>595</sup> y Met  $\rightarrow$  Leu<sup>596</sup> (toda la numeración está basada en APP<sub>695</sub>).

65 Para analizar el efecto bioquímico de esta mutación sobre el metabolismo de APP *in vitro*, se introdujo por mutagénesis *in vitro* en un vector de expresión para la expresión eucariótica de moléculas de APP (descrito en Selkoe *et al.*, 1988 *supra*). En este caso, se usaron las dos formas del vector portadoras de las formas de 695 y 751 aminoácidos de APP. La mutagénesis se realizó por el uso de dos cebadores oligonucleotídicos derivados de la secuencia de APP y de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El cebador 1 (con sentido) es un oligómero de 30 unidades y tiene la secuencia GAG GAG ATC TCT GAA GTG AAT CTG GAT GCA. Este cebador contiene un sitio para la endonucleasa de restricción BglII (AGA TCT) que corresponde al sitio BglII en la posición 1770 de APP y contiene

## ES 2 346 852 T3

los dos intercambios de nucleótidos descritos en las posiciones 24 y 25 del cebador. El cebador 2 (antisentido) es un oligómero de 29 unidades con la secuencia AAT CTA TTC ATG CAC TAG TTT GAT ACA GC. El cebador contiene un sitio para la endonucleasa de restricción SpeI (ACT AGT) que corresponde a la posición 2360 de APP. Usando un ADNc de APP normal para el molde, los dos cebadores permiten la creación de un fragmento de ADN de aproximadamente 600 pares de bases de longitud por PCR convencional (reactivos y protocolos de Perkin Elmer). El fragmento obtenido así como el vector de expresión que contiene el ADNc de APP normal se escindieron con las endonucleasas de restricción BglII y SpeI.

Se seleccionaron BglII y SpeI ya que ambos son sitios de corte únicos en este vector y por lo tanto permiten la eliminación simple del fragmento de restricción no mutado correspondiente al fragmento creado por PCR. Por consiguiente, el fragmento del vector de aproximadamente 600 pares de bases se reemplazó por el fragmento generado por PCR de igual longitud portador de la mutación por técnicas convencionales. Se obtuvo el ADN de clones bacterianos recombinantes por métodos convencionales, que se exploró para la ausencia de un sitio para la endonucleasa de restricción Mbo II. Después se confirmó la secuencia del ADN por secuenciación de la región completa que había experimentado la reacción de PCR.

Además de la construcción de la doble mutación, se examinaron por separado los efectos de cada una de las dos mutaciones. Usando cebadores apropiados u oligonucleótidos específicos para la sustitución 595 Lys → Asn o la sustitución 596 Met → Leu, se prepararon construcciones de ADN y se usaron para transfectar células K293 como se ha descrito.

El análisis de los efectos de la mutación se realizó por expresión transitoria del clon mutado obtenido en células 293. Se usó el método de transfección con reactivo DOTAP de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN). Se recogió el medio condicionado 48 horas después de la transfección. La eficacia de la transfección se evaluó por un ELISA tipo sándwich para APP en el medio condicionado con anticuerpos policlonales B5 purificados por afinidad (biotinilados) contra una proteína de fusión bacteriana de APP<sub>444-592</sub> y el anticuerpo de captura B3, contra una proteína de fusión bacteriana de APP<sub>20-304</sub>. Se midieron los niveles de  $\beta$ AP por el ELISA descrito anteriormente en el Ejemplo 2. Como se describe a continuación, la medición de  $\beta$ AP en el medio condicionado de células K293 transfectadas de forma transitoria que expresan la forma variante sueca de APP muestra un aumento de 6-7 veces en la producción de  $\beta$ AP.

### Resultados

El ensayo ELISA de  $\beta$ AP se usó para detectar cantidades conocidas de los péptidos  $\beta$ AP sintéticos  $\beta$ AP<sub>1-38</sub> y  $\beta$ AP<sub>1-40</sub>. El ensayo que utilizaba el anticuerpo de captura 266 y el anticuerpo informador 10D5 fue capaz de detectar los péptidos en 0,1 ng/ml. Ver la figura 1. Además, se descubrió que el ensayo con 266/10D5 no reaccionaba de forma cruzada significativamente con APP de longitud completa, APP 695 ó 751 secretada, las construcciones 15 ó 6 de fragmentos de APP recombinantes, los fragmentos de  $\beta$ AP 15-20, 11-18, 13-18 ó 13-20, o fibrinógeno (Tabla I).

TABLA I

*Reactividad cruzada de  $\beta$ AP en ELISA 266/10D5*

Molécula	ng/ml	% de reactividad cruzada
APP de longitud completa	1-100	0
APP 695 secretada	1-100	0
APP 751 secretada	1-100	0
Construcción 15*	1-100	0
Construcción 6**	1-100	<0,1
Fragmento 15-20 de $\beta$ AP	1-1.000	0
Fragmento 11-18 de $\beta$ AP	1-1.000	0
Fragmento 13-18 de $\beta$ AP	1-1.000	0
Fragmento 13-20 de $\beta$ AP	1-1.000	0,2
Fibrinógeno tipo I	1-1.000	0
Fibrinógeno tipo II	1-1.000	0
Fibrinógeno tipo III	1-1.000	0

\* Descrito en Sinha et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:2104-21013.

\*\* Restos 590-695, enumerados en la isoforma 695

## ES 2 346 852 T3

Se usó el ensayo ELISA para explorar muestras de sangre y de CSF en seres humanos, perros, cobayas y ratas. Se hallaron cantidades detectables de  $\beta$ AP, con concentraciones en los intervalos expuestos en la Tabla II.

TABLA II

*Nivel de  $\beta$ AP en plasma y CSF de diversas especies*

<u>Especie</u>	<u><math>\beta</math>AP de CSF</u> ( $\mu$ g/ml)	<u><math>\beta</math>AP plasmático</u> (ng/ml)
Ser Humano	0,1-20,0	0,1-30,0
Perro	2,0 - 10,0	2,0
Cobaya	2,5 - 8,0	4,0 - 5,0
Rata	1,5	ND
Conejo	1,5 - 9,0	0,5 - 3,0

Se realizó un estudio comparativo en grupos de individuos normales y pacientes con AD, tanto en plasma como en CSF. Las muestras se exploraron usando el ensayo ELISA, con los resultados para plasma expuestos en la figura 2A y los resultados para CSF expuestos en la figura 2B. Los niveles de  $\beta$ AP en CSF para individuos normales (C), pacientes con AD, accidente cerebrovascular (CVA) y enfermedad de Parkinson (PD) están expuestos en la figura 3. Una combinación de CSF de aproximadamente 1.000 individuos tenía un valor medio de 2,5 ng/ml en CSF, marcado con un círculo en la figura 3, fila C. El resto de los individuos de control tenía una diversidad de enfermedades degenerativas neuronales no AD. Los valores medios de AD están muy por encima del valor de la combinación de control.

Se ensayaron varias células cultivadas transfectadas y no transfectadas para la liberación de  $\beta$ AP usando el ensayo ELISA. Se descubrió que todas las células ensayadas liberaban  $\beta$ AP en el medio de cultivo, liberando las células transfectadas con APP concentraciones más elevadas que células cultivadas no transfectadas, como se expone en la Tabla III.

TABLA III

*Liberación de  $\beta$ AP por células en cultivo*

<u>Tipo de células</u>	<u>Transfección</u>	<u><math>\beta</math>AP</u> (ng/ml)
K293	---	0,1 - 0,4
K293	695	1,6 - 2,5
K293	751	1,2 - 2,5
Células de cerebro mezcladas	---	4,0
CHO	751	2,0 - 9,0

Usando el ensayo de inmunoprecipitación/autorradiografía descrito anteriormente en el Ejemplo 4, se demostró que el anticuerpo policlonal 1280 inmunoprecipitaba una proteína de 4 kD a partir del medio de células K293 que comigraba exactamente con una muestra patrón del péptido  $\beta$ AP<sub>1-40</sub> sintético radioyodado. Además, se precipitó simultáneamente una proteína de 3 kD. Ésta parece ser un fragmento de  $\beta$ AP que carece de los primeros 10 ó 16 aminoácidos. Cuando el anticuerpo 1280 se preabsorbía con el péptido sintético  $\beta$ AP<sub>1-40</sub> para bloquear su actividad, no precipitaban bandas de 3 kD o 4 kD a partir del medio de células K293. Cuando el medio condicionado de células K293 que expresan en exceso APP se centrifugaba a 100.000 x g durante 2 horas (para sedimentar cualquier material proteico insoluble), la inmunoprecipitación/autorradiografía con el anticuerpo 1280 demostró que sustancialmente todas las proteínas de 3 kD y 4 kD permanecían en el sobrenadante (ver la figura 6). Este experimento demuestra que la  $\beta$ AP hallada en el medio de cultivo es una molécula soluble, en contraste con los informes previos sobre  $\beta$ AP en tejido cerebral humano *post mórtem* (véase por ejemplo, Glenner y Wong (1984), *supra*).

La precipitación del fragmento de  $\beta$ AP comigrante de 4 kD del medio de las células K293 transfectadas con ADNc de  $\beta$ APP se confirmó usando anticuerpos contra  $\beta$ AP adicionales. El anticuerpo Y contra el péptido  $\beta$ AP<sub>1-38</sub> sintético precipitaba la proteína de 4 kD de forma idéntica al anticuerpo 1280. Además, el anticuerpo HM contra  $\beta$ AP<sub>1-42</sub> sintético precipitaba la proteína de 4 kD. Como control, cada uno de estos anticuerpos se preabsorbía con su antígeno peptídico sintético, neutralizando de este modo su actividad. Después de ello, los anticuerpos ya no inmunoprecipitaban el péptido  $\beta$ AP de 4 kD del medio condicionado. Como control adicional, los sueros preinmunes (es decir, una muestra de suero normal tomada de cada conejo usado para crear los anticuerpos policlonales antes de la inmunización real) no inmunoprecipitaron el péptido de 4 kD del medio.

Para verificar la especificidad inmunoquímica del péptido de  $\beta$ AP comigrante de 4 kD precipitado en el medio, se usaron otros anticuerpos contra regiones de APP que flanqueaban la región de  $\beta$ AP en el ensayo de inmunoprecipitación/autorradiografía anterior. Por ejemplo, un anticuerpo contra la región de 20 aminoácidos inmediatamente amino terminal al inicio de la región  $\beta$ AP de APP, no logró precipitar el péptido de 4 kD en el medio. Asimismo, un anticuerpo contra los últimos 20 aminoácidos en el extremo carboxilo de APP (60 aminoácidos más allá de la región  $\beta$ AP) no lograba tampoco precipitar el péptido de 4 kD. En contraste, un anticuerpo contra los primeros 15 restos de  $\beta$ AP precipitaba satisfactoriamente la banda de 4 kD. Asimismo, anticuerpos contra la parte media de  $\beta$ AP también precipitaban el péptido de 4 kD, pero no el péptido de 3 kD analizado anteriormente. Estas diversas precipitaciones con anticuerpo demuestran que el péptido de 4 kD presente en el medio de células cultivadas (por ejemplo: células K293) demuestran las reactividades inmunoquímicas específicas características de  $\beta$ AP. El péptido de 3 kD en el medio muestra la reactividad inmunoquímica específica de  $\beta$ AP que carece de los primeros 10 ó 16 restos. Las evidencias de que los anticuerpos eran activos en cada reacción se proporcionó por la coprecipitación en el mismo medio del fragmento secretado normal de APP (denominado "APP soluble" o "APP<sub>s</sub>") siempre que las reacciones de precipitación se realizaran con anticuerpos contra esa región de APP. Es conocido que este fragmento de APP soluble grande está presente normalmente en los medios de células cultivadas que expresan APP. Su coprecipitación por anticuerpos anti- $\beta$ AP representa por tanto una reacción de control positivo que demuestra la actividad intacta de los anticuerpos usado en este ensayo.

Como reacción de control adicional para demostrar que la proteína de 4 kD inmunoprecipitada que comigra con el  $\beta$ AP sintético representaba realmente el  $\beta$ AP auténtico, se compararon los medios de células transfectadas con ADNc de APP (y que por tanto expresan en exceso APP) con los medios de células no transfectadas. La inmunoprecipitación/autorradiografía mostró un aumento en la cantidad de proteína de 4 kD que puede precipitar en el medio de células transfectadas frente a no transfectadas, como era de esperar a partir de su producción aumentada de la molécula precursora APP. Ver la figura 5. Asimismo, los medios de las células transfectadas mostraron más fragmento soluble APP<sub>s</sub> de APP que los medios de las células no transfectadas; esta reacción de control positivo se observó simultáneamente en los inmunoprecipitados que contenían la proteína de 4 kD.

Se obtuvo el mismo resultado cuando se usó un tipo celular diferente, células de ovario de hámster chino (CHO). La comparación de células CHO sin transfectar o transfectadas con ADNc de APP mostró niveles aumentados del péptido que puede precipitar 1280 de 4 kD en el medio de las últimas células. Estos resultados proporcionaron evidencias adicionales de que la proteína de 4 kD en el medio celular era  $\beta$ AP auténtico.

Se extrajo  $\beta$ AP nativo, auténtico, de corteza cerebral humana sometida a autopsia de pacientes que habían muerto con AD. Esta muestra de  $\beta$  del tejido cerebral con AD comigraba con el péptido que puede precipitar 1280 de 4 kD del medio cultivo celular cuando se analizó por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Esta comigración proporcionó apoyo adicional para la identidad del péptido de 4 kD como  $\beta$ AP.

Se descongelaron cuatro litros de medio de cultivo condicionado de cerebro fetal humano (HFBC-CM) y se filtraron a través de un matraz de filtración de 0,45  $\mu$ m. Se añadieron leupeptina (1  $\mu$ g/ml) y PMSF (35  $\mu$ g/ml) tomados de una solución madre de 35 mg/ml en isopropanol al HFBC-CM inmediatamente antes de la cromatografía de afinidad. El material se procesó a través de la columna de afinidad 266 a un caudal de aproximadamente 2 ml/min a 4°C. La columna después se lavó con 500 ml de PBS. La elución del material unido específicamente a la resina se consiguió con glicina 0,2 M, pH 2,0. Se usó un total de 9 ml.

El material eluido se sometió a dos etapas de cromatografía líquida en fase inversa usando una columna en fase inversa Vydac C4 [0,21 x 15 cm] y un sistema de disolvente que contenía TFA al 0,1% en tampón "A" y TFA al 0,1%/acetronitrilo al 80% en tampón "B". El material purificado por afinidad se cargó en la columna de fase inversa a 200  $\mu$ l/min y después se lavó con tampón (A) al 80% y tampón (B) al 20% a 200  $\mu$ l/min durante 60 min. y 50  $\mu$ l/min durante 42 min. para equilibrar la columna y estabilizar la medida basal. Se ejecutó un gradiente de "B" del 20% al 70% durante 50 min. a 50  $\mu$ l/min y se controló el eluyente a OD<sub>220</sub>. Se recogieron fracciones de 100  $\mu$ l y se ensayaron tanto por transferencia de Western como por ELISA. Sobre la base de estos resultados, se combinaron las fracciones 11 y 12 y se volvieron a cromatografiar en condiciones casi idénticas excepto en que se empleó un gradiente de 150 min. de "B" del 10 al 40% seguido de un gradiente de 20 min. de "B" del 40 al 100%.

Se descubrió que la fracción 77 de la segunda etapa de cromatografía en fase inversa era reactiva frente al anticuerpo 10D5 tanto por transferencia de Western (Figura 4) como por ELISA.

Se microsecuenció una alícuota del material de la fracción 77 y se demostró que tenía la secuencia N-terminal de  $\beta$ AP, que comienza por Asp. La microsecuenciación se realizó en un secuenciador de proteínas de Applied Biosystems modelo 477 usando un cartucho de reacción a microescala y ciclos del programa MICFST de Applied Biosystems.

Una segunda alícuota se sometió a espectrometría de masas con ionización por electronebulización, realizada en M-SCAN, Inc., que reveló un pico de masa a 4329,81 (+/- 1,27 SD) que correspondería a la masa esperada de  $\beta$ AP 1-40 (PM teórico de 4330,4). La secuenciación N-terminal de varios picos a A<sub>220</sub> fue positiva para  $\beta$ AP. El ELISA reveló que la secuencia  $\beta$ AP estaba presente en las fracciones 65, 70 y 75 además del pico principal de la fracción 77. Las fracciones 65 y 70 contenían una secuencia adicional de un fragmento de  $\beta$ AP no descrito previamente que comienza en el resto 11 (Glu) de  $\beta$ AP. En la fracción 65, había suficiente material presente para secuenciar hasta el resto 33 de  $\beta$ AP.

## ES 2 346 852 T3

Transferencia de Western (Figura 4) de las fracciones RPLC del material purificado por afinidad-266 de HFBC-CM. Se diluyeron 3  $\mu$ l de las fracciones indicadas con 15  $\mu$ l de tampón de muestra SDS-PAGE y se neutralizaron con 1  $\mu$ l de NaOH 1 M antes del hervido y procesado descrito anteriormente. El material cargado en los respectivos carriles fue el siguiente:

5

	<b>Carril</b>	<b>Fracción RPLC</b>
	1	65
10	2	70
	3	71
	4	74
	5	75
15	6	77
	7	78
	8	79
	9	83
20	10	84
	11	85

25 El carril 12 era tampón solamente; el carril 13 contenía 20 ng de  $\beta$ AP 1-38; el carril 14 contenía 100 ng de  $\beta$ AP 1-38; el carril 15 contenía patrones de bajo peso molecular Rainbow<sup>®</sup> (Amersham). Puede apreciarse que la banda de aproximadamente 4 kD en el carril vía 6 que comigra con el patrón  $\beta$ AP del carril 14.

30 Se realizaron experimentos paralelos a los descritos para HFBC-CM usando 4 litros de CSF humano para caracterizar estructuralmente la inmunoreactividad  $\beta$ AP a partir de esta fuente. Los datos de secuenciación confirmaron la presencia de secuencias N-terminales que empiezan con el resto 1 de  $\beta$ AP (Asp) y el resto 11 de  $\beta$ AP (Glu).

35 El aumento en los niveles de  $\beta$ AP en el medio de los transfectantes suecos se cuantificó utilizando el ELISA específico para  $\beta$ AP con los anticuerpos monoclonales 266 y 6C6. El ELISA tipo sándwich para APP<sub>S</sub> usó los anticuerpos policlonales B5 y B3. Para cada ELISA se usaron cantidades crecientes de  $\beta$ AP<sub>1-40</sub> sintético purificado o APP<sub>S</sub> purificada de medios condicionados de células K293 transfectadas con ADNc para la isoforma 695 de APP para construir una curva patrón. La cuantificación de  $\beta$ AP (panel izquierdo) y APP<sub>S</sub> (panel derecho) en medios condicionados en las células K293 transfectadas de forma transitoria se muestra en la figura 7. Cada columna representa la media de cuatro transfecciones con la excepción de la columna simulada, que está basada en tres cultivos. Las barras de error indican la desviación típica. Para columnas sin barras de error, la desviación típica fue inferior a 0,01 unidades.

40

45 Como se muestra en la figura 7, las células que expresaban la construcción 695 de la variante APP sueca produjeron de 6-7 veces más  $\beta$ AP de media que células transfectadas de forma idéntica que expresaban APP normal (isoforma 695). Además, se observó un aumento similar de 7-8 veces en cultivos que expresaban la mutación sueca en la isoforma 751 de APP (figura 7). Se documentaron aumentos similares en los niveles de  $\beta$ AP usando un segundo método de cuantificación: análisis de imágenes fosforescentes de la banda de  $\beta$ AP de 4 kD en geles de inmunoprecipitados 1280. Este método demostró adicionalmente que el fragmento de 3 kD disminuía varias veces en los medios de los transfectantes suecos. Las células CHO y K293 transfectadas de forma estable con ADNc de la mutación sueca en la isoforma 751 de APP también mostraron aumentos notables en los niveles de  $\beta$ AP en su medio de cultivo.

50 Para estudiar el mecanismo responsable de la producción aumentada de  $\beta$ AP, se examinaron por separado los efectos de cada mutación individual (Lys  $\rightarrow$  Asn<sup>595</sup> y Met  $\rightarrow$  Leu<sup>596</sup>) en la isoforma 695 de APP. La figura 8 muestra los medios condicionados de células K293 radiomarcadas transfectadas de forma transitoria sin ADN (carril 1); con APP normal (carril 2), mutante sueca APP KM-NL 695 (carril 3), variante APP 695 K-N (carril 4), variante APP 695 M-L (carril 5), APP $\Delta$ C (delección del dominio citoplásmico de APP, carril 6) y APP $\Delta$ C KM-NL (mutaciones suecas y delecciones del dominio citoplásmico, carril 7) y se inmunoprecipitaron con 1280. El  $\beta$ AP y las bandas de 3 kD están indicados con flechas. El  $\beta$ AP (1-40) sintético marcado con <sup>125</sup>I se procesó como marcador de tamaño en el mismo gel (carril 8). Las células que expresaban la sustitución Met  $\rightarrow$  Leu tenían niveles aumentados de  $\beta$ AP en su medio, mientras que las células que expresaban la sustitución Lys  $\rightarrow$  Asn tenían niveles similares a los transfectantes normales (Figura 8, carriles 2-5). Este descubrimiento sugiere que la mutación 596 provoca más escisión proteolítica de APP en el enlace peptídico Leu-Asp que en el enlace Met-Asp normal. Es posible que el cambio Lys  $\rightarrow$  Asn en 595 pueda potenciar adicionalmente la escisión cuando se acopla con la sustitución Met  $\rightarrow$  Leu en 596.

65 Las células que contenían la mutación sueca junto con la delección del dominio citoplásmico de APP, eliminando de este modo la secuencia consenso de direccionamiento lisosomal Asn-Pro-X-Tyr, aún producían sustancialmente más  $\beta$ AP en su medio que los transfectantes normales, pero mostraban niveles aumentados del péptido de 3 kD (Figura 8, carriles 6 y 7). Este resultado indica que el efecto de las mutaciones suecas no requiere un dominio citoplásmico intacto y que la generación de APP es improbable que requiera el procesamiento de APP en los endosomas/lisomas tardíos.

## ES 2 346 852 T3

Estos descubrimientos proporcionan evidencias experimentales de que mutaciones puntuales en el gen de APP descubierto en equivalentes de FAD pueden provocar directamente una generación aumentada de  $\beta$ AP. El análisis de las mutaciones suecas demuestra la utilidad de medir la producción de  $\beta$ AP *in vitro* a partir de APP que aloja una mutación particular (por ejemplo, mutaciones en el resto 717 inmediatamente después de la región  $\beta$ AP y aquellas dentro de la región  $\beta$ AP) no solamente como una vía para dilucidar el mecanismo de la  $\beta$ -amiloidosis acelerada en las formas familiares de AD, sino también la utilidad de variantes de APP en los métodos de la presente invención.

Se realizaron ensayos de detección para compuestos de ensayo capaces de inhibir la producción de  $\beta$ AP en líneas celulares que presenten la mutación sueca del siguiente modo. Se transfectaron de forma estable dos líneas celulares (línea celular de riñón humano K293 y línea celular de ovario de hámster chino (CHO) con el gen de APP751 que contiene la doble mutación Lys-651-Met-652 a Asn-651-Leu-652 (numeración APP-751) llamada habitualmente mutación sueca usando el método descrito en Citron *et al.* (1992) Nature 360:672-674. Las líneas celulares transfretadas se denominaron 293 751 SWE y CHO 751 SWE y se sembraron en placas Corning de 96 pocillos a  $2,5 \times 10^4$  células por pocillo respectivamente en medio esencial mínimo de Dulbecco más suero bovino fetal al 10%. Después de incubar durante una noche a  $37^\circ\text{C}$  en un incubador equilibrado con dióxido de carbono al 10% ( $\text{CO}_2$ ), se eliminó el medio y se reemplazó con  $200 \mu\text{l}$  por pocillo de medio que contenía un inhibidor de proteasa de ensayo. Después de un periodo de pretratamiento de dos horas, se eliminó de nuevo el medio y se reemplazó con medio fresco que contenía el mismo inhibidor de proteasa, y se incubaron las células durante un periodo adicional de dos horas.

Se prepararon soluciones madre de inhibidor de proteasa en DMSO de modo que a la concentración final usada en el tratamiento, la concentración de DMSO no excediera del 0,5%. Después del tratamiento, se centrifugaron las placas en un Beckman GPR a 1200 rpm durante cinco minutos a temperatura ambiente para sedimentar los desechos celulares de los medios condicionados. De cada pocillo, se transfirieron  $100 \mu\text{l}$  de medio condicionado a una placa ELISA recubierta previamente con anticuerpo 266 contra  $\beta$ AP-13-28 como se ha descrito anteriormente y se almacenó durante una noche a  $4^\circ\text{C}$ . Al día siguiente se procesó un ensayo ELISA utilizando anticuerpo 6C6 marcado (contra  $\beta$ AP-1-16) para medir la cantidad de  $\beta$ AP producida.

Se midieron los efectos citotóxicos de los compuestos por una modificación del método de Hansen *et al.* (1989) J. Immun. Meth. 119:203-210. A las células que permanecieron en la placa de cultivo tisular se les añadieron  $25 \mu\text{l}$  de una solución madre de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolio (MTT) (5 mg/l) hasta una concentración final de 1 mg/ml. Las células se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante una hora, y se detuvo la actividad celular por la adición de un volumen igual de tampón de lisis MTT (dodecilsulfato sódico al 20% p/v en DMF al 50%, pH 4,7). Se consiguió una extracción completa por agitación durante una noche a temperatura ambiente. Se midió la diferencia entre la  $\text{OD}_{562 \text{ nm}}$  y la  $\text{OD}_{650 \text{ nm}}$  en un lector de microplacas Molecular Devices  $\text{UV}_{\text{max}}$  como indicador de la viabilidad celular.

Los resultados del ELISA de  $\beta$ AP se ajustaron en una curva patrón y se expresaron como ng/ml de péptido  $\beta$ AP. Para una normalización para la citotoxicidad, estos resultados de  $\beta$ AP se dividieron por los resultados de MTT y se expresaron como un porcentaje de los resultados de un control sin fármaco.

Los compuestos de ensayo se ensayaron para la actividad de inhibición de la producción de  $\beta$ AP en células usando este ensayo. Los resultados presentados en las siguientes Tablas IV y V, son la media y la desviación típica de por lo menos seis ensayos por duplicado.

TABLA IV

*Actividad de inhibición de la producción de  $\beta$ AP en células*

<u>Ejemplo</u>	<u>Inhibición de la producción de <math>\beta</math>AP</u>
41	$-6,2 \pm 6,2\%$
42	$13,1 \pm 7,5\%$
43	$16,2 \pm 8,5\%$
45	$3,3 \pm 1,1\%$
48	$1,6 \pm 19,8\%$

## ES 2 346 852 T3

TABLA V

	<u>Compuesto de ensayo</u>	<u>Inhibición de la producción de <math>\beta</math>AP *</u>
5	1	37,5 $\pm$ 2,2%
	2	53,4 $\pm$ 1,4%
	3	53,5 $\pm$ 1,5%
	4	57,4 $\pm$ 3,1%
10	5	58,1 $\pm$ 2,8%
	6	65,4 $\pm$ 3,9%
	7	69,1 $\pm$ 6,8%
	8	77,5 $\pm$ 6,0%
15	9	89,3 $\pm$ 7,7%
	10	89,8 $\pm$ 4,9%
	11	110,3 $\pm$ 3,3%
20	12	111,7 $\pm$ 9,1%

\* Los resultados de ensayo negativos no están representados en esta Tabla.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

5 1. Método *in vitro* para identificar inhibidores de la producción del péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ AP), comprendiendo dicho método cultivar células de mamífero en un medio de cultivo en condiciones que provocan la producción de un péptido  $\beta$ AP soluble que puede detectarse en el medio de cultivo, en el que las células de mamífero cultivadas son de una línea celular que comprende ADN que codifica una variante sueca de la proteína precursora amiloide (APP) que es una doble mutación Lys<sup>595</sup>  $\rightarrow$  Asn<sup>595</sup> y Met<sup>596</sup>  $\rightarrow$  Leu<sup>596</sup> con referencia a APP<sub>695</sub> y que proporciona producción en exceso de  $\beta$ AP en las células de mamífero cultivadas; exponer las células cultivadas a un compuesto de ensayo; y  
10 determinar si el compuesto de ensayo afecta a la cantidad de  $\beta$ AP soluble presente en el medio de cultivo.

15 2. Método según la reivindicación 1, en el que el efecto del compuesto de ensayo se determina comparando la acumulación de  $\beta$ AP en el medio de cultivo durante un periodo de tiempo en ausencia del compuesto de ensayo con la acumulación de  $\beta$ AP en el medio de cultivo en presencia del compuesto de ensayo durante el mismo periodo de tiempo.

20 3. Método según la reivindicación 1, que comprende cultivar una primera población de las células de mamífero en un medio de cultivo en condiciones que provocan la generación de un péptido  $\beta$ AP soluble que puede detectarse en el medio de cultivo; cultivar una segunda población de las mismas células de mamífero en un segundo medio de cultivo en condiciones idénticas a las de la primera población, a excepción de que está presente el compuesto de ensayo en el segundo medio de cultivo; medir las cantidades de  $\beta$ AP soluble presentes en los medios de cultivo de la primera población y la segunda población de células; y comparar las cantidades medidas de  $\beta$ AP para determinar si el compuesto de ensayo ha tenido un efecto sobre la generación de péptido  $\beta$ AP intacto soluble por las células cultivadas.

25 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las células cultivadas son de una línea celular humana.

30 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto de ensayo está presente en una concentración en el intervalo de 1 nM a 1 mM.

35 6. Método para identificar inhibidores de producción de  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ AP), comprendiendo dicho método administrar un compuesto de ensayo a un hospedador transgénico mamífero no humano que comprende ADN que codifica una variante sueca de la proteína precursora amiloide (APP) que es una doble mutación Lys<sup>595</sup>  $\rightarrow$  Asn<sup>595</sup> y Met<sup>596</sup>  $\rightarrow$  Leu<sup>596</sup> con referencia a APP<sub>695</sub>; y determinar si el compuesto de ensayo afecta a la cantidad de un péptido  $\beta$ AP soluble presente en un fluido corporal.

40 7. Método según la reivindicación 6, en el que el efecto del compuesto de ensayo se determina midiendo una cantidad basal de péptido  $\beta$ AP soluble en un fluido corporal antes de administrar el compuesto de ensayo y volviendo a medir la cantidad de  $\beta$ AP soluble en el fluido corporal después de dicha administración.

45 8. Método según la reivindicación 6 ó 7, en el que el hospedador transgénico mamífero se selecciona de entre el grupo constituido por monos, perros, conejos, cobayas, ratas y ratones.

9. Método según la reivindicación 8, en el que el hospedador transgénico es una rata o ratón.

50 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que el hospedador transgénico mamífero es un hospedador transgénico que presenta susceptibilidad potenciada a la deposición de placas de  $\beta$ AP en comparación con un mamífero de la misma especie que no comprende dicho ADN.

55 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que el fluido corporal se selecciona de entre el grupo constituido por sangre, CSF, orina y fluido peritoneal.

60 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en el que el compuesto de ensayo se administra por vía oral, tópica, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraventricular, o intraperitoneal.

65

60

65

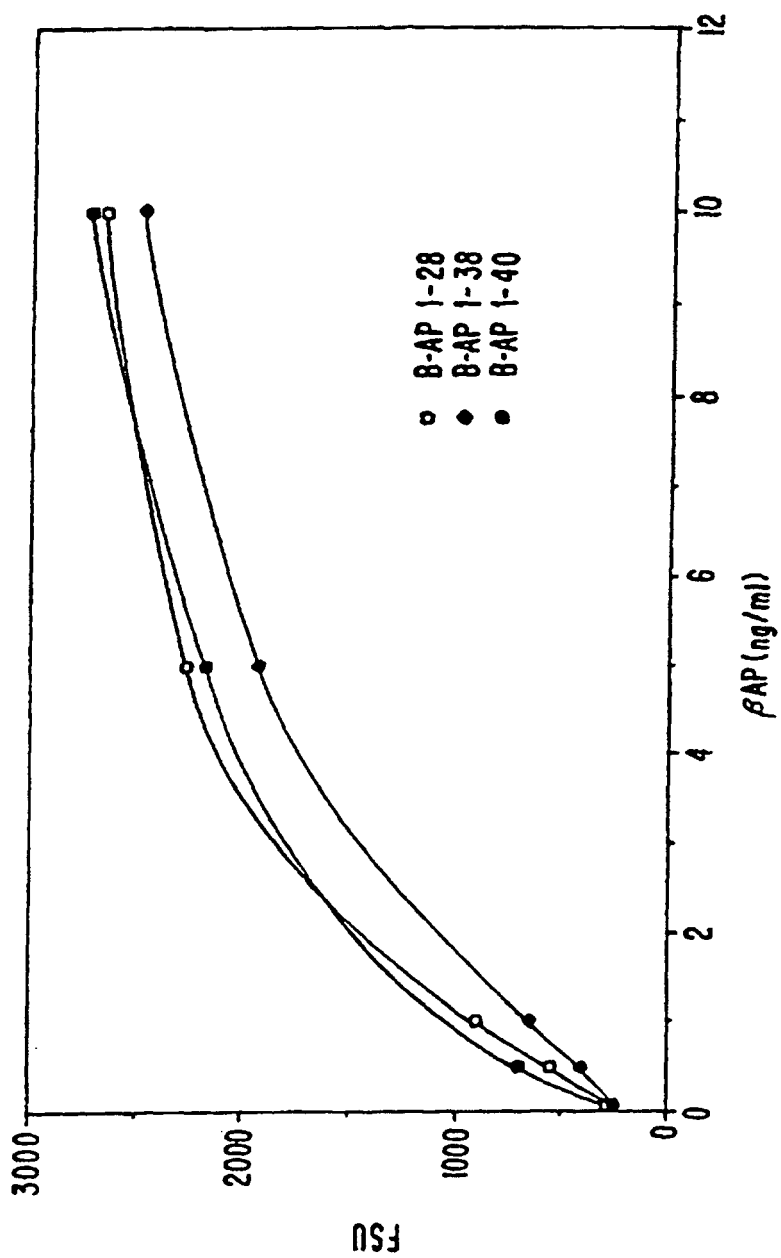


FIG. 1.

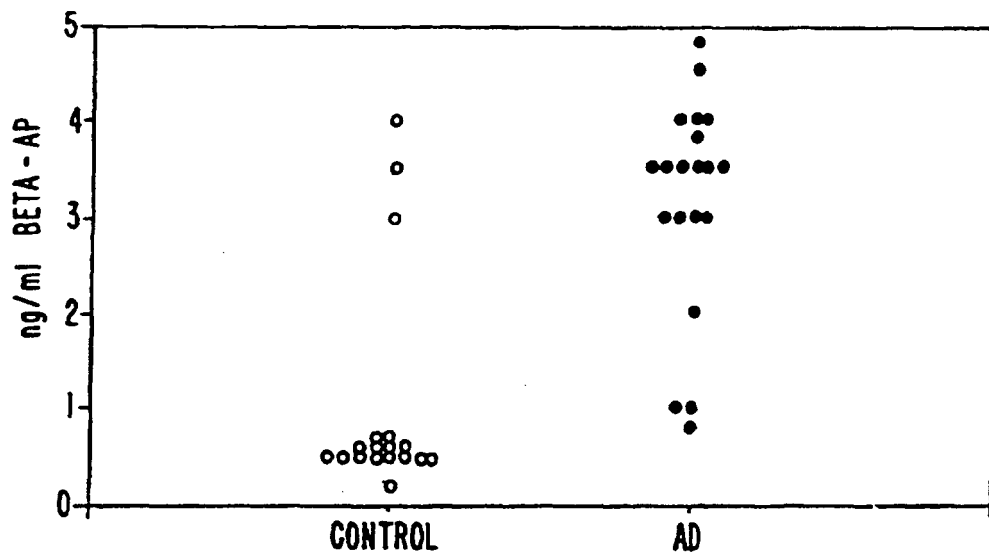


FIG. 2A.

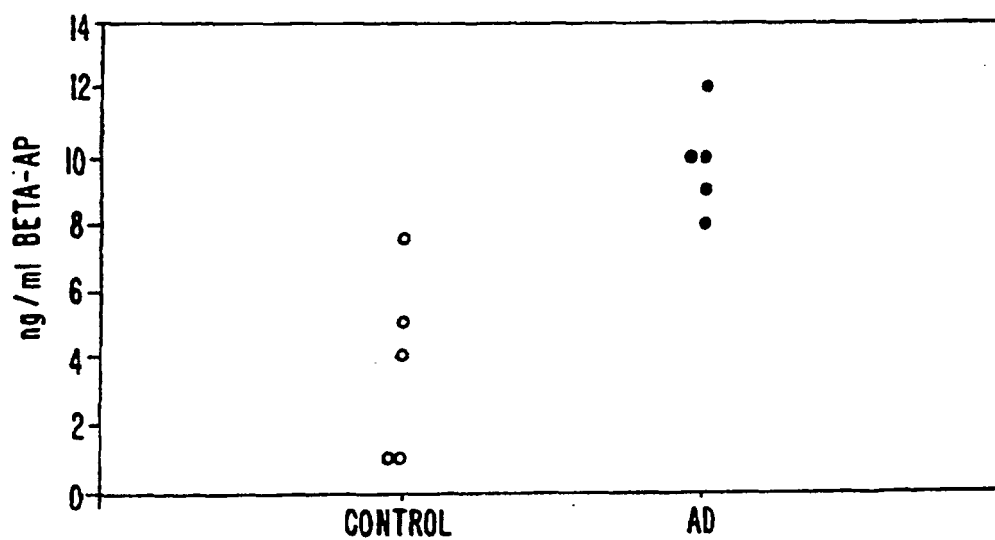


FIG. 2B.

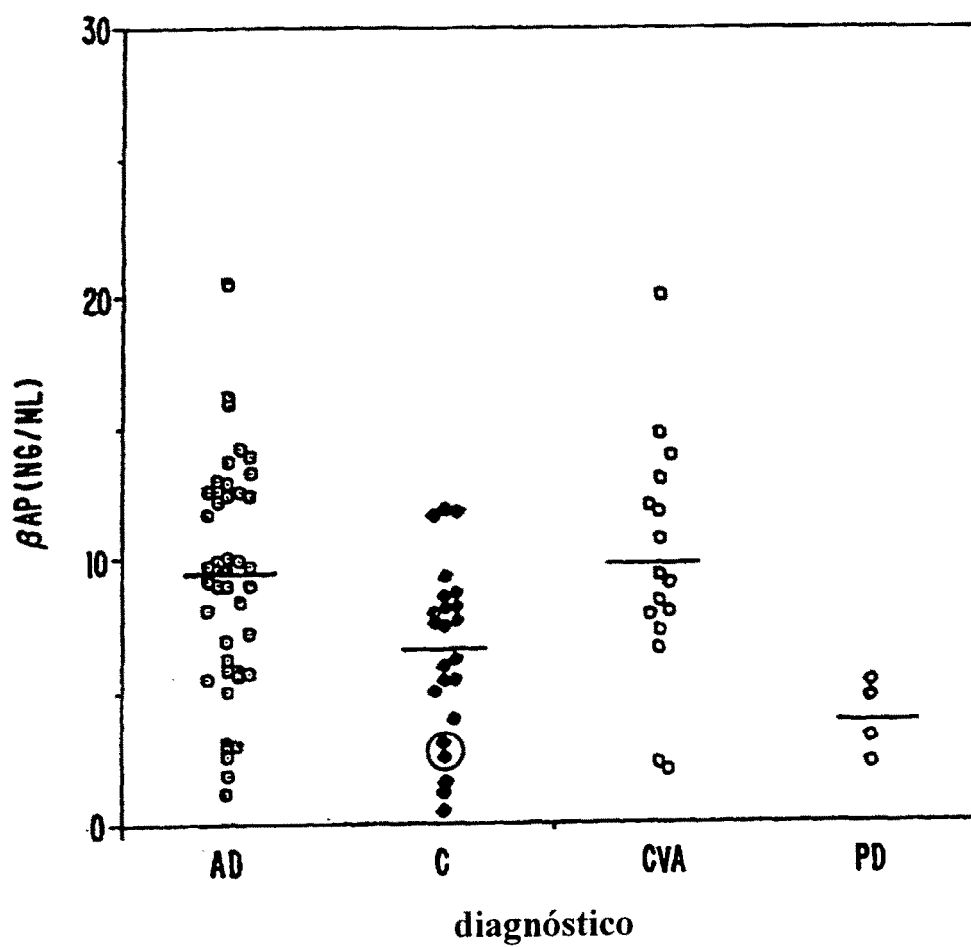
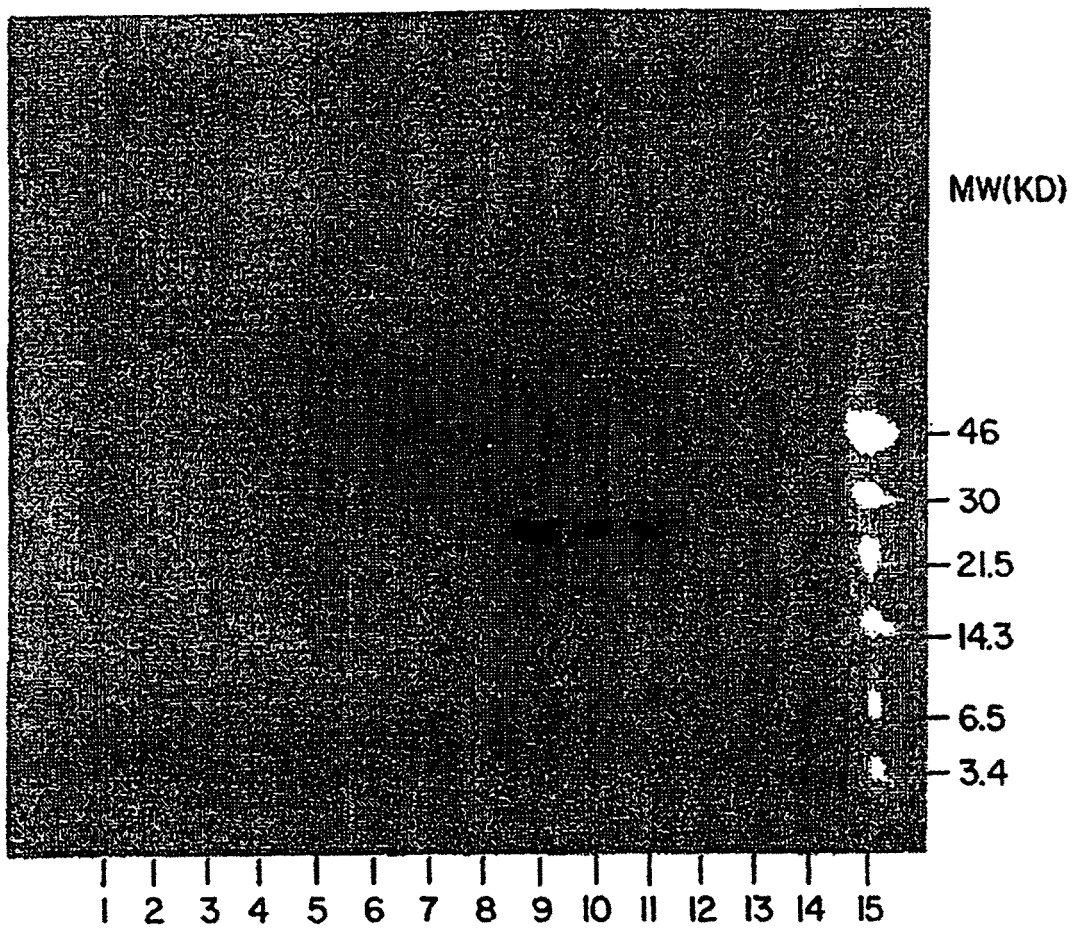
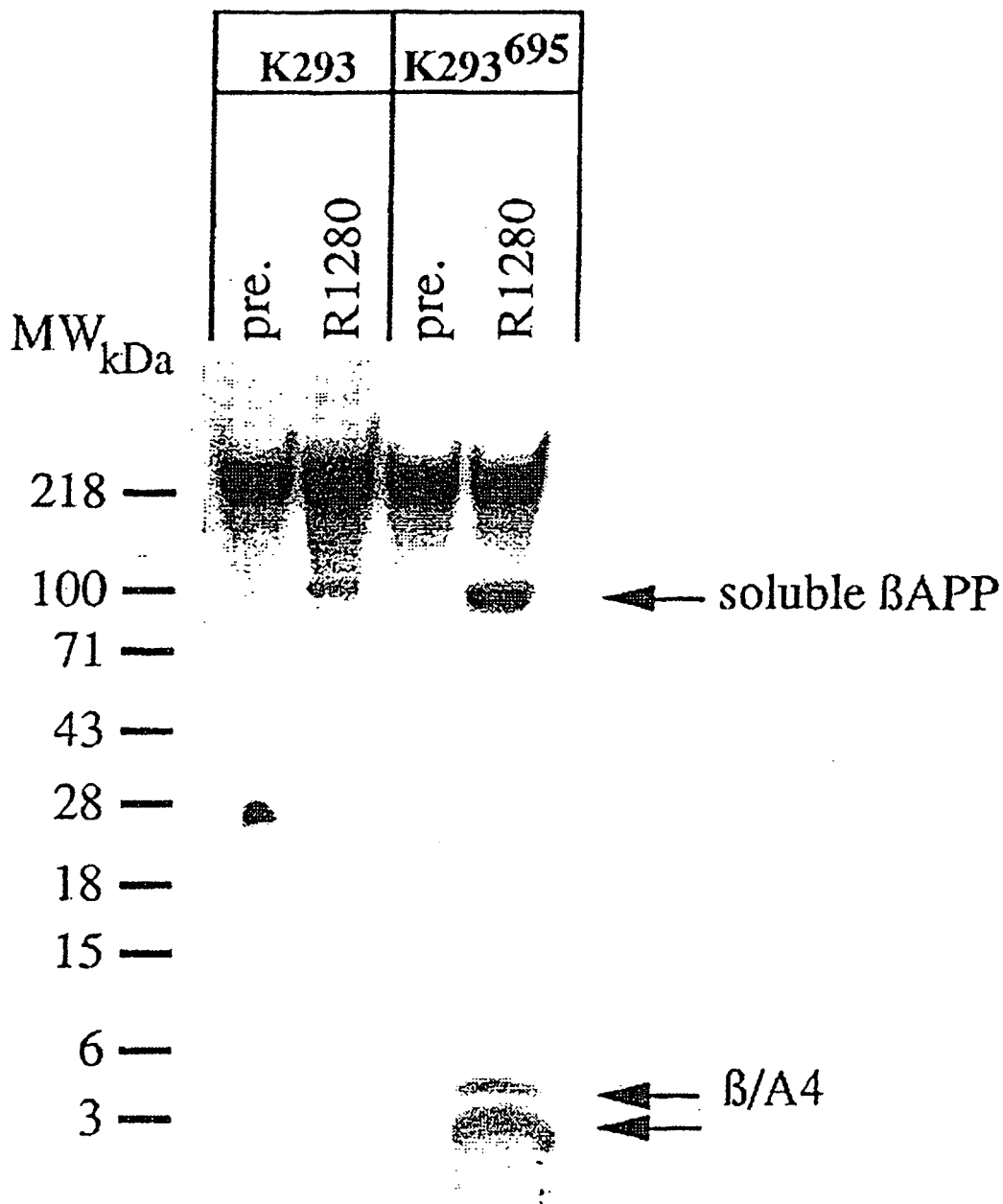


FIG. 3.



**FIG. 4.**



**FIG. 5.**

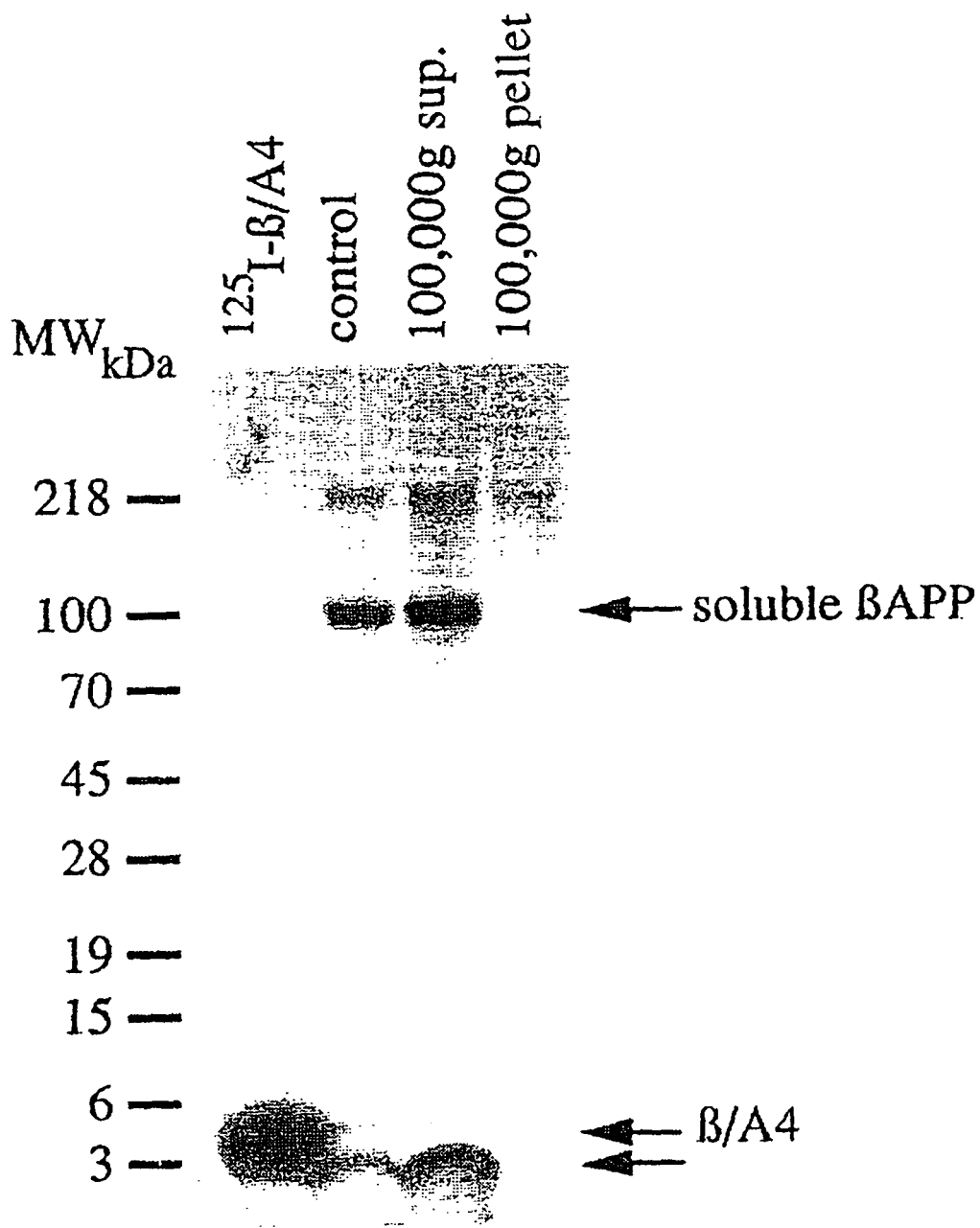


FIG. 6.

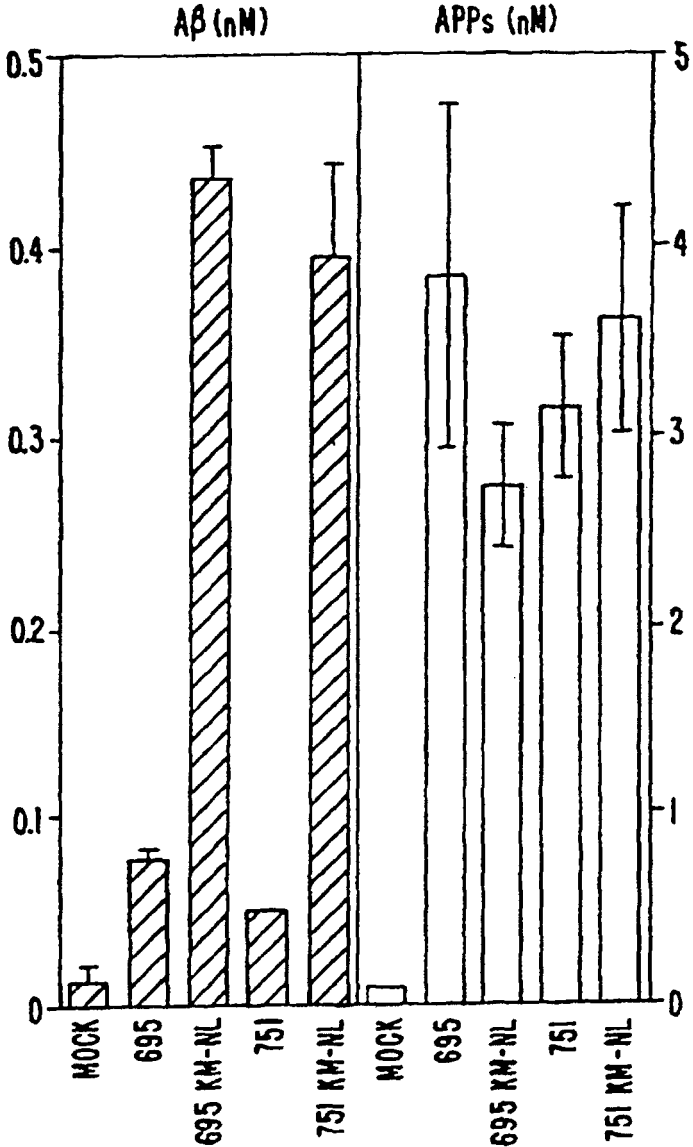
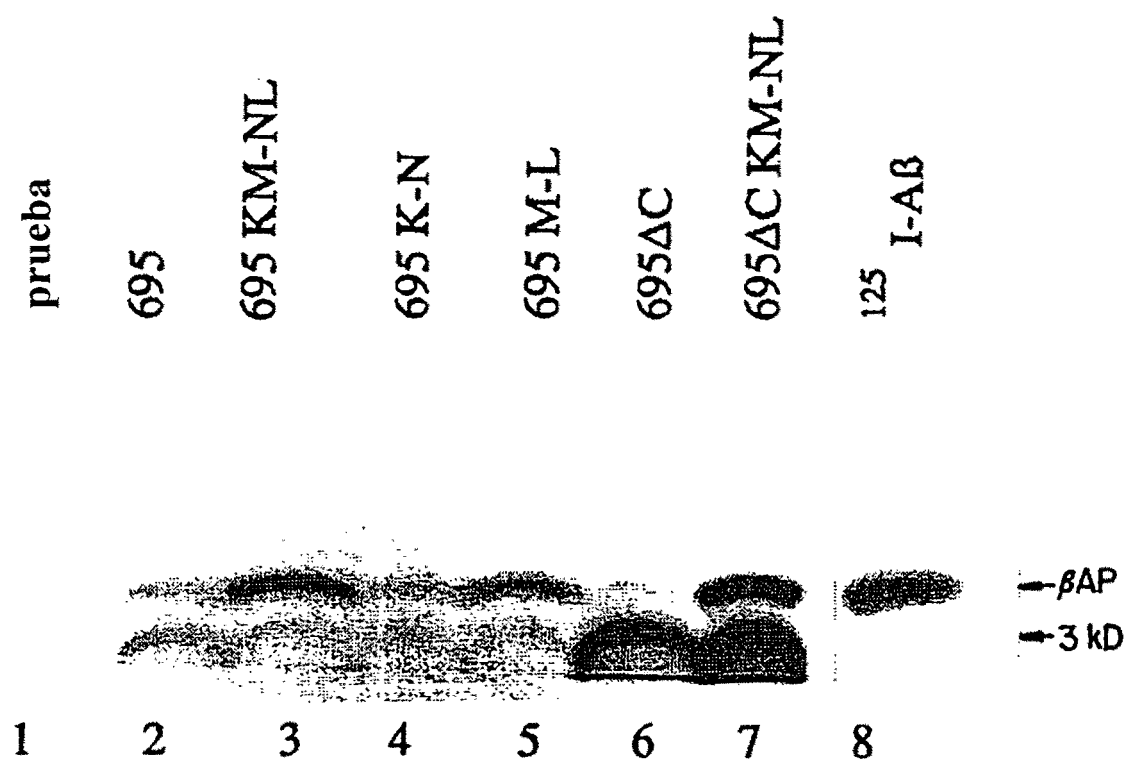


FIG. 7.



**FIG. 8.**