



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 340 892**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**C12N 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98945101 .8**

96 Fecha de presentación : **28.07.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **0996463**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.05.2000**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales catalíticos con actividad proteasa para la lisis selectiva del componente de proteína de placas y agregados relacionados con estados patológicos.**

30 Prioridad: **30.07.1997 IT MI97A1826**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.06.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.06.2010**

73 Titular/es: **ABIOGEN PHARMA S.p.A.**  
**Via San' Antonio, 61**  
**56125 Pisa, IT**

72 Inventor/es: **Trasciatti, Silvia y**  
**Rosini, Sergio**

74 Agente: **Lazcano Gainza, Jesús**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales catalíticos con actividad proteasa para la lisis selectiva del componente de proteína de placas y agregados relacionados con estados patológicos.

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales catalíticos según se definen en las reivindicaciones, para la preparación de un medicamento útil para el tratamiento o la prevención de patologías caracterizadas por la presencia de agregados de proteína que comprenden el péptido  $A\beta_{1-42}$  en conformación de lámina  $\beta$ .

#### Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad degenerativa que afecta al sistema nervioso central, principalmente al nivel de las zonas relacionadas con las funciones intelectuales, que produce necrosis de las células neuronales y, como consecuencia, la pérdida progresiva de capacidades cognitivas, mentales y mnemónicas de los pacientes en cuestión, inevitablemente con un desenlace mortal.

La EA, que sólo puede diagnosticarse de manera segura mediante la autopsia, se caracteriza por estructuras patológicas que pueden diferenciarse en:

- placas seniles o de amiloide, situadas en el espacio extracelular, que se depositan en el cerebro y en las paredes de los vasos sanguíneos cerebrales;
- marañas neurofibrilares situadas en el interior de las células.

La formación de dichas estructuras provoca una pérdida notable de neuronas en la neocorteza, el hipocampo y otras estructuras relacionadas, con una gran reducción de la concentración de neurotransmisores. Dichos efectos se deben a la toxicidad determinada tanto directa como indirectamente por las estructuras neuropatológicas citadas y la muerte neuronal da como resultado, a su vez, la pérdida progresiva de las capacidades cognitivas.

Las estructuras anatomopatológicas citadas anteriormente consisten en componentes específicos:

- 1 - Péptido  $\beta$ -amiloide (péptido  $A\beta$ ,  $A4$ ,  $A4\beta$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ ), que se deriva del procesamiento de la proteína precursora del amiloide ( $\beta$ APP), y es una mezcla de un pequeño grupo de péptidos, de 28 a 43 aminoácidos de longitud, dispuestos en estructuras de lámina plana.
- 2 - Apolipoproteína E (Apo E).
- 3 - Proteína tau.

El péptido  $A\beta$  es el principal componente de las placas de amiloide; existen al menos dos formas diferentes de placas, que es probable que representen dos etapas posteriores del proceso de polimerización de  $A\beta$ :

- a) placas difusas o preamiloideas, que consisten en depósitos amorfos, no congófilos de  $A\beta$  insoluble, con algunas deposiciones de amiloide, que contienen microglía o algunos astrocitos reactivos; éstos están situados habitualmente en la materia gris del cerebro y aparentemente no producen efectos notables sobre los tejidos adyacentes;
- b) placas seniles o neuríticas que consisten en un centro de depósitos fibrilares, congófilos de  $A\beta$ , que contienen microglía o astrocitos reactivos y están rodeados por neuritas distróficas, degenerativas.

La proteína tau asociada con microtúbulos, en forma hiperfosforilada, es el principal componente de las marañas neurofibrilares. Éstas están formadas habitualmente por filamentos helicoidales apareados (PHF, *paired helical filaments*) que, a su vez, se derivan de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP, *microtubule associated proteins*) y consisten en una acumulación anómala en las neuronas degenerativas de proteínas citoesqueléticas con propiedades bioquímicas y antigénicas específicas. En condiciones normales, las MAP probablemente regulan el movimiento y estabilizan la disposición de neuronas durante el crecimiento de los axones y de las dendritas.

ApoE está presente en combinación con las placas de amiloide, con las formas neurofibrilares y con los depósitos de amiloide de los vasos cerebrales. ApoE podría desempeñar un papel bioquímico en el desarrollo de la EA, relacionado con su capacidad de unirse a  $A\beta$ . Se supone que ApoE desempeña el papel de transportador molecular y podría ayudar en el secuestro de  $A\beta$  en las placas.

El análisis genético de la EA temprana reveló mutaciones de algunos genes en diferentes cromosomas.

En correlación con la presencia característica de  $A\beta$ , se ha identificado una mutación del gen que codifica para  $\beta$ APP en el cromosoma 21, en los niveles de los codones 717 y 670/671. Una mutación puntiforme en dichos niveles puede cambiar el procesamiento de  $\beta$ APP, impidiendo la escisión fisiológica en péptidos que no se agregan y favoreciendo, por el contrario, la ruta amiloidogénica. Sin embargo, debe observarse que sólo un pequeño porcentaje de casos tempranos de EA familiar (4-5%) se han relacionado con mutaciones en el cromosoma 21.

Se ha identificado una segunda mutación relacionada estrictamente con la EA familiar, temprana en el brazo largo del cromosoma 14. En el gen implicado, denominado S182, se detectaron al menos 15 mutaciones diferentes, relacionadas con la EA familiar, apareciendo dichas mutaciones en el 80% de los casos de EA temprana. El producto del gen S182 es una proteína integral de la membrana, cuya función no se ha aclarado aún.

Un tercer gen, cuya mutación está relacionada con aproximadamente el 15% de los casos de EA familiar temprana, está situado en el cromosoma 1 y se denomina STM2. La función de la proteína codificada por dicho gen no se conoce aún, pero parece producir un aumento en la producción de  $\beta$ -amiloides.

En lo que se refiere a la EA senil, ésta podría ser el resultado de mutaciones oligogénicas. Se ha observado que esto está relacionado con mutaciones en el cromosoma 19, en particular contra el gen que codifica para ApoE.

$\beta$ APP es una glicoproteína transmembrana (695-770 aa) que en su mayor parte sobresale en el espacio extracelular. El procesamiento fisiológico de  $\beta$ APP consiste en la escisión por la enzima  $\alpha$ -secretasa dentro de la secuencia de  $A\beta$ , inmediatamente fuera de la región transmembrana (aa 16), con la formación y la liberación de formas solubles de amiloide (AAP) en el líquido extracelular. La acción de la  $\alpha$ -secretasa, por tanto, impide la formación de  $A\beta$ . La secuencia de aminoácidos de  $\beta$ APP que corresponde a  $A\beta$  está situada en parte en el espacio extracelular y en parte en la membrana (los 28 aa del extremo amino-terminal con respecto al único dominio transmembrana del precursor, más los primeros 11-15 residuos del dominio transmembrana). La expresión de  $\beta$ APP y la liberación de las APP están moduladas por factores neutróficos y por citocinas. La expresión de  $\beta$ APP aumenta cuando tiene lugar la diferenciación neuronal y las APP pueden afectar al crecimiento de neuritas y a la supervivencia neuronal en los cultivos celulares. La función de  $\beta$ APP no está clara: aparentemente puede desempeñar un papel como adhesivo/receptor y estar implicado en la plasticidad sináptica. Las APP controlan la  $[Ca^{2+}]_i$  y modifican la respuesta de  $Ca^{2+}$  al glutamato. Las APP se transportan a lo largo del axón y entonces se liberan en las sinapsis mediante los conos axónicos en crecimiento y mediante los terminales axónicos.

Brevemente, las funciones de  $\beta$ APP y de las APP son:

- regulación de la proliferación celular en células no neuronales,
- adhesión celular,
- fomento de la supervivencia neuronal,
- protección frente a la excitotoxicidad o frente a daños isquémicos,
- regulación del crecimiento neuronal,
- regulación de los niveles intracelulares de calcio.

Cuando no tiene lugar fisiológicamente la degradación de  $\beta$ APP, o bien debido a la presencia de la mutación puntiforme o bien al ataque de enzimas diferentes a la  $\alpha$ -secretasa o a una producción excesiva de  $\beta$ APP, se forman fragmentos amiloidogénicos, es decir fragmentos insolubles de  $A\beta$ , con una estructura de lámina  $\beta$  plana, se agregan en formaciones fibrosas cada vez más complejas hasta que se forman placas de amiloide extracelulares insolubles (Cummings, Neuroscience 48:763 (1992); Kuo, Neurobiol. Aging 14:547-560 (1993)).

En el centro de las placas neuríticas, se ha identificado una forma prevalente de  $A\beta$  de 42 aminoácidos de longitud, concretamente  $A\beta_{1-42}$  (Rohrer, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:10836-10840 (1993); Gravina, J. Biol. Chem. 270: 7013-7016 (1995); Motter, Ann. Neurol. 38: 643-648 (1995); Cummings, Neurobiol. Aging. 17: 653-659 (1996). Este fragmento, además de ser el principal componente de las placas de amiloide, es, entre los diversos fragmentos, el que tiene las mayores características amiloidogénicas, es decir, está altamente capacitado para asociarse en agregados cada vez más complejos y formar fibrillas. Se ha evidenciado, de hecho, un dominio más hidrófobo en la molécula de  $A\beta_{1-42}$  que parece ser crítico para el ensamblaje de las fibrillas de amiloide, porque aumenta la tasa de agregación de las mismas (Pike, J. Neuroscience 13:1676 (1993); por tanto,  $A\beta_{1-42}$  podría desempeñar un papel más importante que los fragmentos más cortos en la formación de placas. Tras la formación de los primeros agregados fibrilares que consisten en  $A\beta_{1-42}$ , también se agregan otros fragmentos más cortos en las placas; por tanto,  $A\beta_{1-42}$  serviría como centro de nucleación para la agregación.

$A\beta_{1-42}$  se deposita de manera temprana y selectiva en las placas seniles y esto es una característica constante de todas las formas de EA.  $A\beta_{1-42}$  se agrega en fibrillas y, ya en esta fase, es decir, antes de que se depositen las fibrillas en las placas de amiloide, las propias fibrillas pueden empezar el proceso neurodegenerativo y también inducir

hiperfosforilación de la proteína tau. Aparentemente, el aminoácido C-terminal es crítico para la agregación del péptido (Jarrett, *Biochemistry* 32:4693-4697 (1993)).

Existe una relación directa entre la agregación del péptido y la posibilidad de neurotoxicidad.  $A\beta$  tiene, de hecho, un efecto tóxico directo sobre neuronas humanas *in vitro* y tal toxicidad es directamente proporcional al estado de agregación.  $A\beta$  se acumula en o sobre la membrana plasmática (se incorpora en la bicapa lipídica) en la que forma canales de flujo selectivos para  $Ca^{2+}$ , produciendo así un cambio estructural en la membrana plasmática, con formación de canales específicos que alteran la permeabilidad al  $Ca^{2+}$ . Por tanto, la actividad como conducto de los canales iónicos estaría en el fondo del efecto neurotóxico de  $A\beta$ .

Los efectos de  $A\beta$  pueden resumirse así:

- alteración del crecimiento de neuritas,
- aumento de la vulnerabilidad de las neuronas frente a la excitotoxicidad,
- desestabilización de la homeostasis neuronal de calcio,
- toxicidad como consecuencia de la agregación,
- formación de poros para el transporte de  $Ca^{2+}$  en la membrana,
- fomento de la liberación de citocinas proinflamatorias.

En la actualidad, no existen terapias farmacológicas contra la EA. El único medicamento comercializado que lleva dicha indicación es la tacrina (DCI), un inhibidor de la acetilcolinesterasa, cuya actividad farmacológica se basa en el bloqueo del catabolismo del neurotransmisor acetilcolina.

Los enfoques terapéuticos actuales basados en el péptido  $\beta$  recurren a diferentes estrategias:

- inhibición de las enzimas implicadas en la ruta amiloidogénica ( $\beta$ -secretasa),
- productos que o bien bloquean la neurotoxicidad inducida por  $A\beta$  o bien estabilizan las células neuronales impidiendo su sensibilización al calcio intracelular,
- bloqueadores o modificadores de los canales iónicos de  $A\beta$
- compuestos que inhiben la agregación de  $A\beta$ , incluso que modifican el dominio hidrófobo que aparentemente provoca las propiedades amiloidogénicas.

### Aterosclerosis

La aterosclerosis es una patología extremadamente compleja y variable en la que algunos componentes de diferente naturaleza se depositan en placas que se adhieren a la capa íntima de los vasos sanguíneos. Dichas formaciones producen un daño local al vaso y un aumento de las resistencias circulatorias con un aumento de presión consiguiente, así como una disminución en el flujo de sangre a órganos y tejidos y por tanto una descompensación funcional.

La caracterización histológica de las placas ateroscleróticas no se ha definido aún por completo: los parámetros responsables de la evolución de la placa, los mecanismos de formación y las fases de la evolución todavía no están claros en parte y varían dependiendo de factores determinantes tales como la edad, el sexo, la dieta y el entorno. El estudio de la morfología y la composición de placas ateromatosas complejas, extraídas de pacientes sometidos a cirugía periférica, mostró una heterogeneidad notable en la composición química/biológica de los agregados: algunas formaciones consisten principalmente en lipoproteínas y lípidos, otras en células inflamatorias, otras en cápsulas fibrosas, otras, las más complejas, en vasos neoformados.

Por otro lado, las fases de formación tempranas de las placas ateromatosas tienen aparentemente algunas características comunes: en particular, la presencia de lipoproteínas del grupo de las LDL (Hoff HF *et al.* *J. Lipid Res* 34: 789-798 (1993); Srinivasan SR *et al.* *Atherosclerosis* 38: 137-147 (1981); Piotrowski JJ *Life Sci.* 58: 735-740 (1996)) parece representar una característica estructural común de las placas ateromatosas en la fase temprana de deposición.

Westermarck y colaboradores (*Am. J. Pathol.* 147: 1186-1192 (1995)) evidenciaron que los depósitos de amiloide en la capa íntima de la aorta son muy comunes en combinación con patologías ateroscleróticas y envejecimiento. Estos investigadores purificaron una proteína fibrilar presente en los depósitos extracelulares de pacientes con aterosclerosis: dicha proteína es el fragmento N-terminal de 69 aminoácidos de longitud de la apolipoproteína A1.

En la actualidad, no existen terapias farmacológicas eficaces para el tratamiento de las fases tempranas de la formación de placas ateromatosas. Aunque la cirugía es la estrategia de elección cuando están presentes placas evolucionadas, complejas, los pacientes que se sabe que son propensos a la aterosclerosis no pueden recibir terapias preventivas adecuadas.

### Amiloidosis

Las gammapatías monoclonales o discrasias de células plasmáticas son un grupo de enfermedades clínicas y bioquímicamente diferentes caracterizadas por la proliferación anómala de un clon celular normalmente implicado en la síntesis de inmunoglobulinas.

La característica inmunoquímica de estas enfermedades es la presencia de inmunoglobulinas estructural y electroforéticamente homogéneas (monoclonales) o de subunidades polipeptídicas de las mismas en el suero o la orina del paciente.

Algunos de estos estados son asintomáticos y aparentemente estables, otros, tales como el mieloma múltiple y la amiloidosis, son progresivos y mortales.

La etiología de las gammapatías monoclonales es desconocida.

La amiloidosis consiste en un grupo de estados bioquímicos y clínicamente heterogéneos, que habitualmente se caracterizan por la deposición de proteínas en forma fibrilar en los tejidos. Tal acumulación produce un daño funcional en los órganos implicados con un desenlace a menudo mortal.

Más particularmente, la amiloidosis AL se debe a la deposición de fibrillas formadas por fragmentos de cadenas ligeras de inmunoglobulina. Esta amiloidosis se diferencia en amiloidosis primaria, si el clon de células plasmáticas no es muy grande y amiloidosis asociada a mieloma múltiple.

La amiloidosis AL es una de las discrasias de células plasmáticas más graves para la que no existen tratamientos eficaces. La evolución de la enfermedad es rápida y mortal, con una supervivencia media de sólo 12 meses.

### Enfermedades priónicas

Se introdujo el término prión para definir una clase de partículas responsables de la transmisión de algunas enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Creutzfeld-Jakob, kuru, síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), insomnio familiar mortal (FFI, *familial fatal insomnia*), encefalopatía espongiforme bovina (EEB).

Este tipo de patologías se caracteriza por la acumulación en el cerebro de una proteína resistente a proteasas (PrPres), que se deriva de una proteína sensible a proteasas (PrPsen) de 33-35 kDa. La secuencia de aminoácidos de las dos proteínas es la misma y difieren en la conformación. Los signos clínicos de las enfermedades coinciden con la modificación estructural de PrPsen a PrPres, acumulándose esta última en estructuras fibrilares. La característica histopatológica del tejido nervioso de los pacientes con enfermedades priónicas es, de hecho, la presencia de agregados cristalinos con una estructura esférica situada en las evaginaciones postsinápticas. En extractos cerebrales en bruto de roedores infectados, se han identificado estructuras fibrilares con una morfología bien definida: existen dos tipos de fibrillas, formadas por dos o cuatro subfilamentos helicoidales; el avance de rotación de los subfilamentos así como el espacio entre ellos son regulares. Esta estructura microscópica característica permite distinguir entre los agregados presentes en las enfermedades priónicas y aquellos que caracterizan otras enfermedades con acumulaciones de placas, tales como la enfermedad de Alzheimer. Los priones son altamente resistentes a la acción de las proteasas y habitualmente se inactivan por medios químicos y físicos.

Algunos anticuerpos monoclonales pueden catalizar reacciones químicas que implican componentes que pueden reconocer el propio anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales catalíticos se denominan aczimas y habitualmente se preparan usando como antígeno el análogo estable del estado de transición de la reacción que va a catalizar la propia aczima.

Para la preparación de aczimas con actividad proteasa, se emplea habitualmente el análogo del estado de transición del enlace peptídico entre dos aminoácidos seleccionados, es decir, un análogo dipeptídico; por otro lado, se obtiene de esta manera una aczima con actividad proteasa inespecífica, y cualquier proteína que contenga dicho dipéptido en su propia secuencia puede ser la diana de la aczima. Para aumentar la especificidad del anticuerpo, en la actualidad se han hecho intentos para usar inmunógenos en los que están presentes no más de 8 aminoácidos unidos al análogo dipeptídico. También en este caso, sin embargo, la especificidad y selectividad resultantes no podrían garantizar la ausencia de reacciones cruzadas entre la aczima y otras moléculas de proteína diferentes a la diana.

Además, las aczimas se han producido hasta ahora con el fin de aumentar las velocidades de reacción. Por el contrario, no se conocen aczimas producidas con el fin de ejercer actividades ausentes o deficientes en el organismo afectado con una de las patologías descritas anteriormente.

Solomon B *et al.*: PNAS, vol. 94, abril de 1997 (04-1997) da a conocer el uso de anticuerpos monoclonales (Acm) que se unen al péptido  $A\beta$  y para disgregar y deteriorar fibrillas de amiloide formadas por  $A\beta_{1-42}$  agregado para tratar enfermedades caracterizadas por un aumento de péptidos amiloidogénicos, tales como la enfermedad de Alzheimer y las enfermedades priónicas. Sin embargo, los anticuerpos dados a conocer por Solomon no son catalíticos, sino que simplemente son anticuerpos monoclonales dirigidos al sitio, es decir, no ejercen una actividad peptidasa, sino que solamente se unen a un epítipo expuesto en forma agregada, posiblemente induciendo un cambio conformacional dentro del mismo péptido que permite su solubilización.

## Sumario de la invención

Sorprendentemente, se ha descubierto que pueden prepararse anticuerpos monoclonales catalíticos (a continuación, aczimas) con actividad proteasa sin usar el análogo estable del estado de transición. De la manera más inesperada, usando como inmunógeno el agente de proteína responsable o implicado en patologías caracterizadas por placas o agregados con un componente de proteína, pueden obtenerse aczimas con actividad proteasa extremadamente selectiva frente al componente de proteína de la placa o del agregado característico de la patología en cuestión.

Por tanto, es un objeto de la presente invención una aczima o un fragmento de la misma o un fragmento modificado por ingeniería genética de la misma que participa en la reacción de escisión de moléculas de proteína cuya presencia, o bien en forma libre o bien agregada, está relacionada con patologías de diversos aparatos y órganos.

Un objeto adicional de la presente invención es un procedimiento para la preparación de dicha aczima.

Todavía un objeto adicional de la presente invención son composiciones farmacéuticas que contienen dicha aczima o mezcla de aczimas y medicamentos útiles para el tratamiento o la prevención de patologías relacionadas con proteínas en forma libre o agregada contra diversos aparatos y órganos.

Estos y otros objetos de la invención, en las diversas realizaciones de la misma, se describirán a continuación con mayor detalle también por medio de ejemplos.

## Descripción detallada de la invención

Según la presente invención, la aczima según se define en las reivindicaciones tiene actividad proteasa frente a moléculas de proteína cuya presencia, o bien en forma libre o bien agregada, está relacionada con patologías de diversos aparatos y órganos.

Como norma, según la presente invención, la aczima se obtiene usando directamente su diana proteica como agente inmunógeno, sin necesidad de un derivado sintético del análogo del estado de transición.

El procedimiento comprende:

- a) inmunizar un animal no humano con el péptido  $A\beta_{1-42}$  agregado en lámina  $\beta$
- b) obtener el hibridoma
- c) seleccionar los hibridomas por su actividad proteasa.

El procedimiento para la preparación de la aczima se efectúa con técnicas convencionales para la preparación de anticuerpos monoclonales, tales como inmunización *in vivo*, inmunización *in vitro* y presentación en fago.

El anticuerpo resultante puede ser entero, o puede aislarse y usarse sólo la parte de la molécula que mantiene la actividad catalítica. La presente invención también comprende cualquier modificación que se derive de procedimientos de ingeniería genética, tales como fragmento variable de cadena sencilla (ScFv), o de procedimientos de modificación, tales como fragmento de unión a antígeno (Fab) y análogos equivalentes.

La aczima se dirige contra  $A\beta_{1-42}$  agregado en conformación de lámina  $\beta$ .

Dicha aczima reconoce selectivamente el  $A\beta_{1-42}$  ensamblado en placas seniles y puede ejercer una actividad catalítica peptidasa específicamente frente al mismo, escindiéndolo en fragmentos más pequeños, que pueden metabolizarse fácilmente y que no muestran actividades de agregación. Un enfoque de este tipo permitiría el tratamiento de pacientes tanto en fases tempranas como tardías de la enfermedad, aunque en este último estado el proceso neurodegenerativo ya está avanzado y es irreversible.

Es esencial para la aczima frente a  $A\beta_{1-42}$  que el inmunógeno, es decir, el propio fragmento del fragmento 1-42 del amiloide  $\beta$  esté en una conformación de lámina  $\beta$ .

El uso pretendido del fragmento  $A\beta_{1-42}$  como agente inmunógeno se debe al hecho de que el centro de los depósitos extracelulares insolubles de amiloide consiste principalmente en  $A\beta_{1-42}$ . Además,  $A\beta_{1-42}$  es, entre los diversos

fragmentos, el que tiene mayores propiedades amiloidogénicas, es decir está altamente capacitado para asociarse en agregados cada vez más complejos y ensamblarse en fibras.  $A\beta_{1-42}$ , de hecho, es más hidrófobo que otros fragmentos y su tasa de agregación es mayor.

Se ha encontrado que la estructura secundaria del péptido es de extrema importancia para su actividad neurotóxica (Simmons, Mol. Pharmacol. 45:373-379 (1994), y el fragmento 1-42 ejerce su acción sólo tras alcanzar la conformación de lámina  $\beta$  plana. Considerando que  $A\beta_{1-42}$  tiene una conformación de lámina  $\beta$  plana también en las placas de amiloide, es necesario usar el péptido en su estructura secundaria como inmunógeno. El  $A\beta_{1-42}$  comercial (recién preparado) tiene una estructura helicoidal aleatoria; la conformación de lámina  $\beta$  puede obtenerse mediante incubación del  $A\beta_{1-42}$  recién preparado en disolución acuosa durante algunos días (envejecimiento): este tratamiento determina una transición conformacional desde la hélice aleatoria hasta la lámina  $\beta$  (Simmons, 1994), obteniéndose  $A\beta_{1-42}$  envejecido.

El inmunógeno puede unirse opcionalmente a una proteína transportadora, cuando el propio inmunógeno no tiene un tamaño suficiente para provocar una respuesta inmunitaria adecuada o si esto se considera útil en la práctica de la presente invención.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al método para la selección de hibridomas. De manera convencional, los hibridomas se seleccionan con técnicas de afinidad. Sin embargo, dichas técnicas no seleccionan las aczimas basándose en la actividad catalítica, de modo que las aczimas seleccionadas a veces no son las que tienen la mejor actividad. Según la presente invención, la selección se lleva a cabo poniendo en contacto los hibridomas con un reactivo de tinción que revela que ha tenido lugar la reacción catalítica en cuestión. La detección de las especies que han reaccionado puede llevarse a cabo mediante procedimientos convencionales, por ejemplo técnicas colorimétricas o espectrofotométricas.

El siguiente ejemplo ilustra adicionalmente la invención.

### Ejemplo

#### *Aczima contra $A\beta_{1-42}$*

Se ha usado el fragmento sintético  $A\beta_{1-42}$  en disolución acuosa, preparado según un procedimiento ilustrado a continuación, como antígeno que se inyecta a ratones Balb/c de 8 semanas de edad. También pueden usarse placas procedentes de pacientes con EA.

Tras llevar a cabo la inmunización, según esquemas convencionales, se fusionan los esplenocitos del animal inmunizado con células de mieloma de ratón, para producir hibridomas.

La selección de los hibridomas que resultan de la fusión se efectúa según un procedimiento espectrofotométrico descrito a continuación.

El colorante rojo Congo (RC) se une selectivamente al  $\beta$ -amiloide cuando está en su configuración de lámina  $\beta$  plana; una conformación estructural de este tipo está relacionada con el estado de agregación del propio péptido en las placas de amiloide.

Cuando se añade RC a una disolución que contiene agregado de  $A\beta$  (envejecido), los agregados retienen el colorante y, una vez que se centrifuga la muestra, permanece atrapado en el sedimento, con una consiguiente disminución de su concentración en el sobrenadante. La diferencia de Absorción a una longitud de onda de 485 nm (pico de Absorbancia de RC) indica la presencia del péptido soluble en el sobrenadante y, por tanto, es un índice de la actividad proteasa y de la presencia de la aczima deseada.

Se prepara una disolución 100  $\mu$ M de RC.

Se prepara el  $A\beta$  25  $\mu$ M envejecido en PBS.

Se dispensan 100  $\mu$ l de  $A\beta$  envejecido en tubos de ensayo.

Se toman 100  $\mu$ l de cada muestra de cada pocillo que contiene los hibridomas y se dispensan en el tubo de ensayo correspondiente, que se agita y se incuba a 37°C durante 1 hora. Se extingue la reacción en hielo.

Se mantienen en hielo los tubos de ensayo y se les añaden 100  $\mu$ l de RC frío, luego se agitan, se incuban en hielo durante 1 hora, luego se centrifugan a 14.000 g durante 5 minutos.

#### *Pruebas in vitro*

Se incubó el  $A\beta$  envejecido 25  $\mu$ M en PBS con el sobrenadante en el clon de hibridomas seleccionados. Tras la centrifugación a 14.000 g, se resuspendió el precipitado.

## ES 2 340 892 T3

Se añadió gota a gota al tubo de ensayo que contenía el precipitado resuspendido una disolución al 1% de rojo Congo en agua destilada.

Tras una incubación de una hora en hielo, se llevó a cabo una siembra en placa sobre un portaobjetos que se observó al microscopio óptico.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Aczima o fragmento de la misma que tiene actividad proteasa contra el péptido  $A\beta_{1-42}$  agregado en conformación de lámina  $\beta$ , obteniéndose dicha aczima mediante inmunización con el péptido  $A\beta_{1-42}$  agregado en conformación de lámina  $\beta$ .

2. Fragmento según la reivindicación 1, que se selecciona de ScFv y Fab.

3. Procedimiento para la preparación de una aczima según la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:

a) inmunizar un animal no humano con el péptido  $A\beta_{1-42}$  agregado en conformación de lámina  $\beta$ ;

b) obtener hibridomas;

c) seleccionar los hibridomas por su actividad proteasa;

**caracterizado** porque la selección de la etapa c) se lleva a cabo poniendo en contacto los hibridomas con un reactivo de tinción que revela que ha tenido lugar la reacción catalítica en cuestión.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la etapa de inmunización se realiza con  $A\beta_{1-42}$  sintético agregado en conformación de lámina  $\beta$ .

5. Composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad eficaz de la aczima o fragmento de la misma según la reivindicación 1 ó 2.

6. Uso de la aczima o fragmento de la misma según la reivindicación 1 ó 2 para la preparación de un medicamento útil para el tratamiento o la prevención de patologías **caracterizadas** por la presencia de agregados de proteína que comprenden el péptido  $A\beta_{1-42}$  en conformación de lámina  $\beta$ .

7. Uso según la reivindicación 6, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer.

8. Uso según la reivindicación 6 ó 7, en el que el fragmento se selecciona de ScFv y Fab.