



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 206 470**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **94931873 .7**

96 Fecha de presentación : **17.10.1994**

97 Número de publicación de la solicitud: **0736106**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.10.1996**

54

Título: **Procedimientos de detección de inhibidores de la producción de péptidos β -amiloides.**

30

Prioridad: **27.10.1993 US 143697**

45

Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.05.2004**

45

Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **12.08.2009**

45

Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **12.08.2009**

73

Titular/es: **ELAN PHARMACEUTICALS, Inc.**
800 Gateway Boulevard
South San Francisco, California 94080, US
ELI LILLY AND COMPANY

72

Inventor/es: **Seubert, Peter A.;**
Schenk, Dale B.;
McConlogue, Lisa C.;
Sinha, Sukanto y
Zhao, Jun

74

Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 206 470 T5

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de detección de inhibidores de la producción de péptidos β -amiloides.

5 Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente a procedimientos para el control del tratamiento de la proteína precursora del β -amiloide. Más particularmente, la presente invención se refiere a la utilización de dichos procedimientos para el diagnóstico, pronóstico y control de la respuesta a la terapia de la enfermedad de Alzheimer, y para la detección y evaluación de medicamentos potenciales para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la presencia de numerosas placas amiloides y redes neurofibrilares (agregados proteicos muy insolubles) que se encuentran en los cerebros de los pacientes de esta enfermedad, particularmente en aquellas regiones implicadas con la memoria y el conocimiento. Mientras que en el pasado existió un debate científico significativo respecto a si las placas y las redes eran la causa o meramente el resultado de la enfermedad de Alzheimer, recientes descubrimientos indican que la placa amiloide constituye un precursor o factor causante. En particular, se ha descubierto que la producción del péptido β -amiloide, un constituyente principal de la placa amiloide, puede proceder de mutaciones en el gen que codifica la proteína precursora amiloide, una proteína que cuando es procesada normalmente, no producirá el péptido β -amiloide. Se cree actualmente que un tratamiento normal (no patogénico) de la proteína precursora β -amiloide tiene lugar mediante la fragmentación mediante una " α -secretasa" putativa que realiza la fragmentación entre los aminoácidos 16 y 17 de la proteína. Se cree además que el tratamiento patogénico tiene lugar mediante una " β -secretasa" putativa en el extremo amino del péptido β -amiloide dentro de la proteína precursora.

La identificación de mutaciones en el gen de la proteína precursora amiloide que causan la enfermedad de Alzheimer familiar de comienzo temprano, constituye la evidencia más importante de que el metabolismo amiloide es el evento central en el proceso patogénico que subyace a la enfermedad. Se informa de cuatro mutaciones que provocan la enfermedad, que se incluyen respecto a la isoforma 770, valina⁷¹⁷ a isoleucina (Goate *et al.* (1991) Nature 349:704-706), valina⁷¹⁷ a glicina (Chartier Harlan *et al.* (1991) Nature 353:844-846, valina⁷¹⁷ a fenilalanina (Murrell *et al.* (1991) Science 254:97-99) y respecto a la isoforma 695, una mutación doble que cambia lisina⁵⁹⁵-metionina⁵⁹⁶ a asparagina⁵⁹⁵-leucina⁵⁹⁶ (Mullan *et al.* (1992) Nature Genet 1:345-347) a la que se hace referencia como la mutación sueca. Además, el péptido β -amiloide parece ser tóxico para las neuronas cerebrales, y la muerte de las células neuronales se asocia con la enfermedad.

De este modo, la capacidad para controlar el tratamiento celular de la proteína precursora del amiloide sería de un valor significativo en el diagnóstico, pronóstico y supervisión terapéutica de la enfermedad de Alzheimer. En particular, sería deseable identificar procedimientos mínimamente invasores para el control y evaluación de marcadores diagnósticos detectables, con el objeto de obtener fácilmente muestras de pacientes, tales como suero, líquido cefalorraquídeo (CSF) y similares.

Se han propuesto varios marcadores diagnósticos potenciales para la enfermedad de Alzheimer. De interés particular para la presente invención son ciertos fragmentos de la proteína precursora amiloide, incluyendo fragmentos carboxiterminales (tales como el mismo péptido β -amiloide y sus fragmentos), y fragmentos amino-terminales (tales como fragmentos de 25 kD, 105 kD y 125 kD). Hasta ahora, ninguno de los marcadores propuestos ha probado ser definitivo para el diagnóstico antes de la muerte o el control de la enfermedad de Alzheimer.

Así, sería deseable identificar marcadores diagnósticos alternativos para la enfermedad de Alzheimer. Dichos marcadores serían útiles por sí mismos y/o en combinación con otros marcadores diagnósticos y procedimientos. Preferentemente, los marcadores diagnósticos serían detectables en líquidos corporales, tales como CSF, sangre, plasma, suero, orina tejidos y similares, de forma que pueden ser utilizados procedimientos diagnósticos mínimamente invasores.

Son también de interés para la presente invención los procedimientos *in vivo* para detectar los medicamentos candidatos en cuanto a la capacidad de inhibir o evitar la producción de la placa β -amiloide. Sería deseable proporcionar procedimientos en cuanto a la capacidad para inhibir o evitar la conversión de la proteína precursora amiloide al péptido β -amiloide. En particular, sería deseable basar dichos procedimientos en las vías metabólicas que se ha encontrado que están implicadas en dicha conversión, donde el compuesto prueba sería capaz de interrumpir o interferir la vía metabólica que conduce a la conversión. Dichos procedimientos serían rápidos, económicos y apropiados para detectar grandes cantidades de compuestos prueba.

2. Descripción de la técnica anterior

El péptido β -amiloide (al que también se hace referencia como A4, β AP, A β , ó A β P; véase el documento de patente n° 4.666.829 y Glenner y Wong (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 120:1131-1135) se deriva de la proteína precursora β -amiloide (β APP), que se expresa en distintas formas empalmadas de 695, 751, y 770 aminoácidos. (Véase King *et al.* (1987) Nature 325:773-776; Ponte *et al.* (1988) Nature 331:525-527; y Kitaguchi *et al.* (1988) Nature 331:530-532. El tratamiento normal de la proteína precursora amiloide implica la fragmentación

proteolítica en un sitio entre los residuos Lys¹⁶ y Leu¹⁷ (tal como se denomina la región vAP donde Asp⁵⁹⁷ es el residuo 1 en Kang *et al* (1987) Nature 325:773-776), cerca del dominio transmembranal, que da lugar a la secreción constitutiva de un dominio extracelular que conserva la parte permanente de la secuencia del péptido β -amiloide (Esch *et al* (1990) Science 248:1122-1124). Esta vía parece estar ampliamente conservada entre las especies y se encuentra en muchos tipos celulares. Véase Weidemann *et al* (1989) Cell 57:115-126 y Oltersdorf *et al* (1990) J. Biol. Chem. 265:4492-4497. Esta vía normal se fragmenta en el interior de la región de la proteína precursora que corresponde al péptido β -amiloide, impidiendo aparentemente así su formación. Se ha tenido en cuenta otra forma de β APP secretada constitutivamente (Robakis *et al*, Soc. Neurosci., 26 Octubre, 1993, resumen n° 15.4, Anaheim, CA), que contiene más de la secuencia carboxi terminal de β AP que la forma descrita por Esch *et al* (1990), Science 248:1122-1124).

Golde *et al* (1992), Science 255:728-730, prepararon una serie de mutantes de delección de la proteína precursora amiloide y observaron un único sitio de fragmentación en el interior de la región del péptido β -amiloide. Basado en esta observación, se postuló que la formación del péptido β -amiloide no implica una vía secretora. Estus *et al* (1992) Science 255:726-728, da a conocer que los dos fragmentos proteolíticos carboxi terminales más grandes de la proteína precursora amiloide encontrados en las células cerebrales contienen la región peptídica β -amiloide entera.

La solicitud PCT WO 92/00521 describe procedimientos para la evaluación de la enfermedad de Alzheimer basada en la medición de las cantidades de ciertos derivados solubles de 25 kD, 105 kD, y 125 kD de la proteína precursora amiloide en el líquido cefalorraquídeo de un paciente. La Fig 3 de WO 92/00521 sugiere que la fragmentación de la proteína precursora amiloide puede tener lugar de forma adyacente al extremo amino del péptido β -amiloide para producir un fragmento amino-terminal soluble, pero en la memoria no se presenta evidencia o consideración de tal fragmentación. Kennedy *et al*. (1992) Neurodegeneration 1:59:64, presentan datos para una forma de β AP secretado, que se caracterizó por su reactividad con anticuerpos para los residuos 527-540 de β APP y la falta de reactividad con los anticuerpos para los primeros quince residuos de β AP. No se proporcionó una evidencia directa para sugerir el sitio de fragmentación o la identidad del extremo carboxi de la forma β APP. La solicitud PCT WO 91/16628 describe procedimientos para el diagnóstico de la enfermedad, basados en la detección de las proteínas precursoras del amiloide y de sus fragmentos, utilizando anticuerpos para la proteasa nexina-2 o la proteína precursora del amiloide.

Informes recientes muestran que el péptido soluble β -amiloide es producido por las células sanas en medio de cultivo (Haass *et al*. (1992) Nature 359:322-325) y en el CSF animal y humano (Seubert *et al*. (1992) Nature 359:325-327).

Palmert *et al*. (1989) Biochem. Biophys. Res. Comm. 165:182-188, describe tres posibles mecanismos de fragmentación para β APP y presenta evidencias de que la fragmentación de β APP no tiene lugar con la metionina⁵⁹⁶ en la producción de derivados solubles de β APP. La patente U.S. n° 5.200.339 considera la existencia de ciertos factores proteolíticos que son capaces putativamente capaces de fragmentar β APP en un sitio cercano del extremo amino de β APP.

Sahasrabudhe *et al* (1993) J. Biol. Chem. 268:16699-16705 se refiere a la generación enzimática del extremo amino del péptido β -amiloide y considera experimentos dirigidos a la identificación de enzimas que puedan fragmentar ciertos péptidos sintéticos.

Sumario de la invención

Se proporcionan los procedimientos definidos en las reivindicaciones 1, 2 y 8 para la detección y monitorización de un fragmento terminal amino de la proteína precursora del β -amiloide (β APP) que proviene de la fragmentación con la β -secretasa. El fragmento resultante, al que se hará referencia en adelante en la presente memoria como ATF- β APP, puede ser detectado en muestras biológicas y es útil para la monitorización del tratamiento de β APP en modelos animales. En particular, la presente invención proporciona la monitorización del tratamiento de β APP *in vivo*, donde la presencia de ATF- β APP se detecta en una muestra de un animal no humano transformado para expresar la mutación sueca del β APP humano y donde el ATF- β APP se ha fragmentado a partir de β APP entre LEU⁵⁹⁶ y ASP⁵⁹⁷, basándose en el número de Kang *et al* (1987) Nature 325:773-776, en la isoforma del aminoácido 695. La mutación sueca proviene de una sustitución de ASN⁵⁹⁵-LEU⁵⁹⁶ por LYS⁵⁹⁵-MET⁵⁹⁶ que se encuentran en la isoforma 695 del tipo salvaje de β APP.

Se ha encontrado que los modelos animales no humanos que expresan la mutación sueca humana del gen β APP son productores particularmente prolíficos de su fragmento amino-terminal. Es decir, los modelos animales no humanos son capaces de fragmentar la mutación sueca humana con una frecuencia superior que la fragmentación del β APP endógeno o de β APP humano de tipo salvaje. Se cree además que el tratamiento intracelular de la mutación sueca del β APP humano, da lugar a una producción mayor del ATF- β APP que el producido por otras mutaciones humanas del gen β APP. De este modo, los sistemas animales transgénicos no humanos, tales como los ratones transgénicos, que expresan la mutación sueca de β APP y son particularmente apropiados como modelos para monitorizar el tratamiento intracelular de β APP así como para detectar los compuestos de ensayo respecto a su capacidad para inhibir o modular la fragmentación de β APP como resultado de la actividad de la β -secretasa, la forma aparentemente patogénica del tratamiento de β APP.

La invención proporciona también un procedimiento para la identificación de los inhibidores de la producción del β -amiloide, el cual procedimiento comprende la administración de un compuesto de prueba a un animal no humano transformado para expresar la mutación sueca de la proteína precursora del β -amiloide humano (β APP); la detección de la cantidad de un fragmento amino terminal de β APP (ATF- β APP) fragmentado entre Leu⁵⁹⁶ y Asp⁵⁹⁷ en una muestra del animal no humano; y la comparación de la cantidad detectada de ATF- β APP con una cantidad control de ATF- β APP producido en la ausencia del compuesto de la prueba.

En un aspecto preferido de la presente invención, ATF- β APP producido por la fragmentación mediante la β -secretasa de la mutación sueca de β APP, se detecta mediante una sustancia de unión que se une específicamente a un epítipo que se encuentra en o cerca del extremo carboxilo de ATF- β APP, en el que el epítipo comprende el residuo terminal carboxilo (LEU⁵⁹⁶), y preferentemente los cinco residuos aminoácidos que se encuentran en el extremo carboxilo de ATF- β APP. Se ha encontrado que la unión entre sustancias de unión, tales como anticuerpos, contra dicho epítipo C-terminal, proporciona una detección de alta especificidad de la forma sueca de ATF- β APP. Los anticuerpos preferidos se producen contra un péptido que comprende el extremo carboxilo de los cinco residuos, que es expuesto mediante la fragmentación por la β -secretasa de la β APP sueca.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para detectar compuestos de prueba en cuanto a la capacidad para inhibir o modular la fragmentación de β APP, el cual procedimiento comprende la administración de un compuesto de prueba a un ratón transformado para expresar la mutación sueca del β APP humano, en el que dicho β APP humano se procesa a ATF- β APP en una cantidad suficiente para ser detectable en un homogenado cerebral de dicho ratón transformado, y la detección de un cambio en el tratamiento de β APP en dicho ratón transformado, cuando se compara con dicho tratamiento en ausencia del compuesto de prueba, en el que dicho cambio en el tratamiento de β APP es detectado midiendo un cambio en la cantidad de ATF- β APP.

25 Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A y 1B ilustran las distintas isoformas del β APP normal y las isoformas correspondientes del ATF- β APP, respectivamente.

Las figuras 2A, 2B y 2C, son patrones gélicos quimioluminiscentes de material derivado del medio condicionado de un cultivo de células cerebrales fetales humanas. Los carriles 1, 2 y 3 de cada gel representan el medio condicionado no tratado, el medio condicionado vacío por reacción con anticuerpos que reconocen un epítipo en el interior de los residuos 1-16 del péptido β -amiloide, y el material eliminado por este anticuerpo, respectivamente. Los cuadros A, B y C representan las siguientes sondas: anti-anticuerpo 5 (que reconoce localizaciones entre la región terminal amino de β APP y la región del péptido β -amiloide), el anticuerpo 92 (que se produjo contra un péptido sintético que terminaba en la metionina C-terminal expuesta por fragmentación de β APP), y el anticuerpo 10D5 (un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo de β APP en el interior de los residuos 1-16), respectivamente.

La Figura 3 es un patrón gélico quimioluminiscente obtenido mediante examen del CSF lumbar humano. El CSF se sondeó con 92 anticuerpos o solo (carril 1) o preincubado con varios péptidos que representan variaciones del extremo C de ATF- β APP. Se observó una competencia significativa (reducción en la unión) con los péptidos que finalizaban en la metionina C-terminal (carriles 3, 4, 6 y 7). Los péptidos fueron de la manera siguiente: carril 1, no se añadió péptido de competencia; carril 2, GSGLTNIKTEEISEVK carril 3, YSGLTNIKTEEISEVKM; carril 4, ISEVKM; carril 5 EISEVKMD; carril 6, CISEVKM; carril 7, YISEVKM. MW = marcadores de peso molecular (indicados en kilodaltons).

La Fig 4 es un autoradiograma que representa patrones de geles electroforéticos obtenidos mediante inmunoprecipitación del medio condicionado de varias progenies celulares. El material secretado por los cultivos cerebrales fetales humanos e inmunoprecipitado por el anticuerpo 92 (carril 11 en la flecha) es aparentemente más pequeño que el material precipitado por el anticuerpo 6C6 (carril 10 en la flecha). El anticuerpo 6C6 reconoce un epítipo en el interior de los residuos 1-16 de β APP.

La Fig 5 es un autoradiograma que representa patrones de geles electroforéticos obtenidos mediante inmunoprecipitación del medio condicionado de las progenies celulares 293 humanas transfectadas con cADN que codifica tanto el β APP normal como el sueco. La cantidad de material ATF- β APP secretada por las células suecas transfectadas (carriles 11 y 12) es cualitativamente más grande que el producido por los transfectantes normales β APP (carriles 9 y 10).

La Fig 6 es una inmunotransferencia que demuestra la especificidad de un anticuerpo monoclonal producido contra la mutación sueca de ATF- β APP (al que se hará referencia en lo sucesivo en esta memoria como el anticuerpo sueco 192).

La Fig 7A es un mapa del plásmido pNSEAPPsw Δ 3'.

La Fig 7B es un mapa del plásmido pNSEAPPsw.

La Fig 8 es una transferencia Western de fracciones solubles de homogenados cerebrales de ratones transgénicos y no transgénicos (control) sondeados respecto a la presencia de fragmentos β APP.

La Fig 9 son transferencias Western de fracciones solubles de homogenados cerebrales de ratones transgénicos y no transgénicos (control) demostrando que el anticuerpo sueco 192 no reacciona cruzadamente con fragmentos de β APP fragmentados en el sitio de la α -secretasa.

5 Descripción de las formas de realización específicas

La presente invención se deriva de la identificación de un fragmento secretado de la proteína precursora del β -amiloide (β APP) que proviene de la fragmentación de una región intacta de un péptido β -amiloide (β AP) de la proteína precursora. El fragmento secretado comprende la parte terminal amino de β APP que permanece después de dicha fragmentación y a la que se hará referencia después en la presente memoria como forma del fragmento terminal amino de β APP (ATF- β APP). Se cree que ATF- β APP es el producto de una vía de tratamiento secretoria alternativa para β APP, la cual vía se encuentra incluso en las células normales (no enfermas). Se cree además, sin embargo, que la vía secretoria alterna puede ser responsable de un evento esencial en la producción de β AP en las células enfermas en los pacientes, y que la producción anormal de ATF- β APP puede estar implicada en enfermedades relacionados con la placa β AP, particularmente con la enfermedad de Alzheimer y de Down. Así, la presente invención proporciona procedimientos para controlar el tratamiento celular de β APP que se basan en la detección y medición del ATF- β APP en las muestras biológicas.

El ATF- β AP es identificado y reconocido mediante la unión específica a anticuerpos producidos contra péptidos que comprenden ciertos residuos de β APP que se disponen inmediatamente adyacentes a la región β AP y para el β APP incluyen la metionina (que se numera como metionina⁵⁹⁶ en la isoforma 695, tal como se expone a continuación). Los péptidos incluirán habitualmente por lo menos cinco residuos contiguos hasta e incluyendo el residuo⁵⁹⁶, exponiéndose a continuación procedimientos específicos para producir dichos anticuerpos.

Haciendo referencia ahora a las Figs 1A y 1B, β APP se encuentra en tres isoformas que comprenden 695, 751 y 770 aminoácidos, respectivamente. La isoforma 695 es la mas habitual en las células neuronales, con las isoformas 751 y 770 resultando de las inserciones en el residuo 289 en la isoforma 695 (toda la numeración de la isoforma 695 estará de acuerdo con Kang *et al.* (1987) Nature 325:733-736). ATF- β APP resulta aparentemente de la fragmentación proteolítica de las varias isoformas β APP en o en el interior de los cinco residuos en el lado amino terminal del extremo amino de la región del péptido β -amiloide, que se localiza entre los residuos 596 y 597 de la isoforma 695. Tal fragmentación conduce a la exposición de un residuo C-terminal, el cual será habitualmente metionina⁵⁹⁶, lisina⁵⁹⁵ o leucina⁵⁹⁶, siendo más habitualmente metionina⁵⁹⁶ o leucina⁵⁹⁶, que se muestra como MET⁵⁹⁶ y LEU⁵⁹⁶ en la Fig 1B. La exposición de LEU⁵⁹⁶ tiene lugar con la fragmentación de la β -secretasa de la mutación sueca de la β APP humana tanto en los modelos humanos como animales, tal como se describe con más detalle a continuación en la presente memoria. Se apreciará, desde luego, que los residuos C-terminales tengan una numeración distinta cuando ATF- β APP se derive de una isoforma β APP diferente. En particular, la metionina C-terminal será MET⁶⁵² y MET⁶⁷¹ y la leucina C-terminal será LEU⁶⁵¹ y LEU⁶⁷⁰ en las isoformas β APP 751 y 770, respectivamente. Tal como se utiliza a continuación en la presente memoria y en las reivindicaciones, metionina⁵⁹⁶, lisina⁵⁹⁵ y leucina⁵⁹⁶, se referirán generalmente a los residuos correspondientes en todas las otras isoformas o variantes de β APP. En la actualidad, se cree que el residuo N-terminal de ATF- β APP es LEU¹⁸ en todas las isoformas (basándose en el tratamiento del final amino terminal de β APP en las formas secretadas que son fragmentadas en el interior de la región β AP).

Según la presente invención, ATF- β APP puede detectarse /o medirse en una muestra biológica, a partir de un modelo animal, típicamente CSF, sangre, suero, plasma, orina, tejidos y similares. La detección y la medición pueden llevarse a cabo mediante cualquier técnica capaz de distinguir ATF- β APP de otros fragmentos β -APP que pudieran encontrarse en la muestra. Convenientemente, pueden utilizarse técnicas de detección inmunológica que utilicen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, y otras sustancias de unión específicas que se unen a un epítipo característico de ATF- β APP y que están sustancialmente libres de reactividad cruzada con otros fragmentos β APP. De utilización particular son anticuerpos y otras sustancias de unión que se unen a un epítipo que comprende el residuo C-terminal de ATF- β APP que es expuesto después de la fragmentación con la β -secretasa de la región β AP, por ejemplo metionina⁵⁹⁶ leucina⁵⁹⁶ o lisina⁵⁹⁵. Se ha encontrado que dichos anticuerpos específicos C-terminales, son capaces de discriminar entre ATF- β APP y fragmentos β APP relacionados. Alternativamente, las técnicas de detección inmunológica pueden estar basadas en ATF- β APP aislado y purificado utilizando técnicas convencionales. La preparación de tanto anticuerpos específicos residuales C-terminales, como ATF- β APP aislados y purificados, se describe a continuación en la presente memoria. Particularmente, las técnicas de detección apropiada incluyen ELISA, transferencia Western, radioinmunoensayo, y similares.

Para la detección de ATF- β APP, pueden utilizarse otras técnicas que no necesitan utilizar sus (de ATF- β APP) anticuerpos específicos y/o antígenos competitivos. Por ejemplo, puede utilizarse la electroforesis en gel bidimensional para separar fragmentos solubles de β APP estrechamente relacionados. Los anticuerpos que reaccionan cruzadamente con muchos o todos los fragmentos, pueden entonces utilizarse para sondear los geles, basándose la identificación en la presencia de ATF- β APP en su posición precisa en el gel. Otras técnicas para la detección de ATF- β APP también forman parte de la experiencia en la materia. Por ejemplo, los tipos de β APP que contienen la región terminal amino de β AP pueden eliminarse inmunológicamente de una muestra para aislar ATF- β APP (véase la Fig 2A, carril 2 y Fig 5, carriles 11 y 12), que puede entonces detectarse mediante cualquier de los diversos procedimientos que se consideraron anteriormente.

Los anticuerpos específicos para un epítipo característico del ATF- β APP del tipo salvaje pueden prepararse contra un antígeno apropiado o hapteno, que comprende la secuencia C-terminal de ATF- β APP que incluye el residuo de metionina. Los anticuerpos específicos para un epítipo característico de la mutación sueca de ATF- β APP pueden prepararse contra un antígeno apropiado o hapteno que comprenda la secuencia C-terminal de ATF- β APP que incluye el residuo de leucina en la posición 596. Pueden prepararse convenientemente péptidos sintéticos mediante técnicas convencionales en fase sólida, acopladas a un inmunógeno apropiado, y utilizarse para preparar antisueros o anticuerpos monoclonales mediante técnicas convencionales. Un péptido sintético apropiado está formado por seis residuos de ATF- β APP (ISEVKM) que se localizan en el lado terminal amino inmediato de β AP y que puede acoplarse a un inmunógeno y utilizarse para preparar anticuerpos específicos, tal como se describe detalladamente en la sección experimental. Otros haptenos peptídicos apropiados comprenderán habitualmente por lo menos cinco residuos contiguos en el interior de β APP en el lado terminal amino inmediato de β AP, y puede incluir más de seis residuos (aunque se encontró que un péptido que incluía dieciséis residuos producía un antisuero que era menos específico). Los 25 residuos de extremo carboxilo del ATF- β APP normal, son de la siguiente manera: (utilizando denominaciones de aminoácidos con letras sencillas):

DRGLT
576

TRPGSGLTNI
586

KTEEISEVKM
596

Los 25 residuos de extremo carboxilo de la mutación sueca de β APP son de la siguiente forma:

DRGLT
576

TRPGSGLTNI
586

KTEEISEVNL
596

Los haptenos polipeptídicos sintéticos pueden producirse mediante la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida de Merrifield, en la que los aminoácidos se añaden secuencialmente a una cadena en crecimiento (Merrifield (1963), J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2156). Las secuencias aminoácidas pueden basarse en la secuencia de ATF- β APP que se ha expuesto anteriormente, o pueden utilizarse secuencias mutantes que se encuentren de forma natural o que se han manipulado genéticamente. Por ejemplo, los péptidos que imitan al mutante sueco tendrían asparagina⁵⁹⁵-leucina⁵⁹⁶ sustituidos por lisina⁵⁹⁵-metionina⁵⁹⁶ y otra sustitución podría incluir sólo la sustitución de leucina⁵⁹⁶ por metionina⁵⁹⁶. Un péptido preferido comprende los cinco aminoácidos carboxi terminales del ATF- β APP sueco: SEVNL.

Una vez se ha obtenido una cantidad suficiente de polipéptido hapteno, puede conjugarse con un transportador inmunogénico apropiado, tal como albúmina sérica, hemocianina de lapa, u otros transportadores proteicos apropiados, como los que se describen generalmente en Hudson y Hay, *Practical Immunology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, capítulo 1.3, 1980, cuya exposición se incorpora en la presente memoria como referencia.

Una vez que se ha obtenido una cantidad suficiente del inmunógeno, los anticuerpos específicos para el residuo C-terminal expuesto después de fragmentación de β AP a partir de ATF- β APP pueden producirse mediante técnicas *in vitro* o *in vivo*. Las técnicas *in vitro* implican la exposición de los linfocitos a los inmunógenos, mientras las técnicas *in vivo* necesitan la inyección de los inmunógenos en un huésped vertebrado apropiado. Los huéspedes vertebrados apropiados no son humanos, e incluyen ratones, ratas, conejos, ovejas, cabras y similares. Los inmunógenos se inyectan al animal según un esquema predeterminado, y los animales se sangran periódicamente con sangrados sucesivos que muestran títulos y especificidad mejorados. Las inyecciones pueden realizarse intramuscular, intraperitoneal o subcutáneamente, o de forma similar, y se utilizará un adjuvante, tal como al adjuvante incompleto de Freund.

Si se desea, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse preparando progenies celulares inmortalizadas capaces de producir anticuerpos con la especificidad deseada. Dichas progenies celulares inmortalizadas pueden producirse de diversas formas. De modo conveniente, un pequeño vertebrado tal como un ratón, es hiperinmunizado con el inmunógeno deseado mediante el procedimiento tal como se acaba de describir. El vertebrado se sacrifica entonces, habitualmente varios días después de la inmunización final, se recuperan las células del bazo, inmortalizándose. La forma de llevar a cabo esta inmortalización, no es crítica. Actualmente, la técnica más habitual es la fusión con una pareja de fusión de célula de mieloma, tal como se describió primero por Kohler y Milstein (1975), Nature 256:495-497. Otras técnicas que incluyen la transformación EBV, la transformación con ADN desnudo, por ejemplo, oncogenes, retrovirus, etc., o cualquier otro procedimiento que proporcione un mantenimiento estable de la progenie celular y la producción de anticuerpos monoclonales. Las técnicas específicas para la preparación de anticuerpos monoclonales se describen en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

Además de los anticuerpos monoclonales y policlonales (antisueros), las técnicas de detección de la presente invención podrán también utilizar fragmentos de anticuerpos, tales como F(ab), Fv, V_L, V_H, y otros fragmentos. También se podrán utilizar anticuerpos producidos de forma recombinante (inmunoglobulinas) y sus variaciones, tal como se describen actualmente en las patentes y en la literatura científica. Véase, por ejemplo, las patentes EPO 8430268.0; EPO 85102665.8; EPO 85305604.2; PCT/GB 85/00392; EPO 85115311.4; PCT/US86/002269; y la solicitud de patente japonesa 85239543.

También podrán prepararse otras proteínas recombinantes que imitarían la especificidad de unión de los anticuerpos preparados tal como se acaba de describir.

El ATF- β APP aislado y purificado es obtenido habitualmente en una forma sustancialmente pura. “Sustancialmente pura” significa una pureza del 50% peso/peso aproximadamente, por lo menos, o más, con la libertad sustancial de la interferencia de proteínas y contaminantes. Preferentemente, el ATF- β APP será aislado o sintetizado con una pureza superior al 50% pero/peso, preferentemente del 80% peso/peso o superior. ATF- β APP puede purificarse a partir de una fuente natural mediante técnicas convencionales de purificación de las proteínas, con composiciones homogéneas de por lo menos el 50% peso/peso aproximadamente de pureza, purificándose mediante la utilización de anticuerpos preparados tal como se ha descrito anteriormente, empleando técnicas convencionales de separación por inmunoafinidad. Los materiales apropiados naturales de iniciación incluyen medio condicionado procedente de progenies celulares productoras de ATF- β APP, tales como cultivos de células cerebrales fetales, y similares. Alternativamente, el ATF- β APP puede aislarse de muestras biológicas obtenidas de un huésped humano, tales como CSF, suero, y similares. En *Methods in Enzymology*, Vol 182, Deutcher, ed., Academic Press, Inc., San Diego, 1990, se describen técnicas apropiadas de purificación proteica.

Los anticuerpos y el ATF- β APP purificados preparados tal como se describe anteriormente, pueden utilizarse en varias técnicas inmunológicas convencionales para la detección de ATF- β APP en muestras biológicas, a partir de especímenes animales para el control de enfermedades relacionadas con el β -amiloide y la detección de medicamentos. Las técnicas inmunológicas apropiadas incluyen inmunoensayos, tales como ELISA, análisis de transferencia Western, y similares. En *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane, eds, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, se describen numerosas técnicas específicas de detección inmunológica.

De manera similar, el control *in vitro* de ATF- β APP en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer, como se da a conocer en la presente memoria, pueden también utilizarse para detectar compuestos de prueba para la efectividad terapéutica (habitualmente para ensayar los compuestos que se han identificado previamente mediante una detección *in vitro*). El compuesto o compuestos de prueba se administran al animal y se observa el nivel de ATF- β APP o la proporción de ATF- β APP a otros fragmentos de β APP. Los compuestos que reducen el nivel de ATF- β APP, o disminuyen la proporción de ATF- β APP a otros fragmentos de β APP, se considerará como candidato para una evaluación posterior.

Los modelos animales para la fragmentación, mediante la β -secretasa, de β APP son los animales transgénicos no humanos que expresan la mutación sueca del gen β APP, tal como se describió anteriormente. Se ha encontrado que dichos animales transgénicos, particularmente los ratones transgénicos, producen grandes cantidades de ATF- β APP, que pueden detectarse según los procedimientos de la presente invención. En particular, se ha encontrado que la mutación sueca de β APP produce cantidades de la ATF- β APP que serán habitualmente dos veces más altas, por lo menos, que la β APP humana de tipo salvaje que se expresa en los animales. Habitualmente, la producción será significativamente más alta, siendo típicamente por lo menos dos veces más alta. Con tales niveles elevados de la producción de ATF- β APP, el control de la actividad de la β -secretasa bajo distintas condiciones se facilita mucho. En particular, la detección de medicamentos y otras terapias para la inhibición de la actividad de la β -secretasa (y por tanto, la inhibición de la producción de β APP), se simplifican mucho en los modelos animales no humanos que expresan la mutación sueca de la β APP humana.

La utilización de modelos animales para la detección de medicamentos en cuanto a la actividad de la inhibición de la β -secretasa, se llevará a cabo a menudo después de que las técnicas de detección de cultivos celulares *in vitro*, se hayan llevado a cabo. Los medicamentos que parecen prometedores en la detección *in vitro*, pueden administrarse entonces a los animales no humanos de prueba, tales como los ratones de prueba, que son transgénicos y que expresan la mutación sueca de la β APP humana. Las técnicas particulares para la producción de ratones transgénicos que expresen la forma sueca de β APP se describen en la sección Experimental al final de la presente memoria. Se apreciará que la preparación de otros animales transgénicos no humanos que expresen la β APP humana sueca puede llevarse fácilmente a cabo, incluyendo ratas, hamsters, cobayas, conejos, y similares.

El efecto de los compuestos de prueba sobre la producción de ATF- β APP en los animales de ensayo puede medirse en varias muestras procedentes de dichos animales. En la sección Experimental, la detección de ATF- β APP en los homogenados cerebrales, se describe en detalle. La detección de ATF- β APP en los homogenados cerebrales es ejemplar, pero no necesariamente preferida. En algunos casos, será ventajoso medir la ATF- β APP en otras muestras, tales como el líquido cefaloraquídeo, sangre y similares, que pueden obtenerse del animal de prueba sin el sacrificio de éste.

En todos los casos, será necesario obtener un valor de control que sea característico del nivel de producción de ATF- β APP en el animal de ensayo en ausencia del compuesto o compuestos de prueba. En los casos en los que el animal se sacrifique, será necesario basar dichos valores de control en el promedio o en un valor típico de otros animales de ensayo no humanos que hayan sido modificados transgénicamente para expresar el mutante sueco de la β APP humana, pero a los que no se les haya administrado cualesquiera compuestos de prueba o de otras sustancias de las que se pueda esperar que afecten el nivel de producción de ATF- β APP. Una vez que se determina dicho nivel de control, los compuestos de prueba pueden administrarse a animales de ensayo adicionales, en los que la desviación del valor de control promedio indica que el compuesto de prueba tenía un efecto sobre la actividad β -secretasa en el animal. Las sustancias de prueba que se consideran positivas, es decir, que es probable sean beneficiosas en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o de otras situaciones relacionadas con el β -amiloide, serán aquellas que son capaces de

reducir el nivel de producción de ATF- β APP, preferentemente en un 20% por lo menos, más preferentemente en un 50% por lo menos, y muy preferentemente un 80% por lo menos.

Los compuestos de prueba pueden ser cualquier molécula, compuesto, u otra sustancia que pueda ser añadida al cultivo celular o administrada al animal de ensayo sin interferir sustancialmente con la viabilidad celular o del animal. Los compuestos de prueba apropiados pueden ser moléculas pequeñas, polímeros biológicos, tales como polipéptidos, polisacáridos, polinucleótidos, y similares. Los compuestos de prueba se administrarán típicamente al medio de cultivo a una concentración del orden de entre 1 nM a 1 mM aproximadamente, habitualmente de entre 10 μ M a 1 mM. Los compuestos de prueba se administrarán típicamente a una dosis de entre 1 ng/kg a 10 mg/kg, habitualmente entre 10 μ g/kg a 1 mg/kg.

Los compuestos de prueba que sean capaces de inhibir la secreción o la producción animal de ATF- β APP se consideran como candidatos para ulteriores determinaciones de la capacidad para bloquear la producción de β -amiloide en los animales y en el hombre. La inhibición de la secreción o producción indica que la fragmentación de β APP en el extremo amino de β AP se ha bloqueado parcialmente por lo menos de modo similar, reduciendo la cantidad de un intermediario de tratamiento disponible para la conversión al péptido β -amiloide.

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

Experimentación

Materiales y métodos

1. Preparación del anticuerpo y de la matriz de afinidad

Se produjo el anticuerpo monoclonal 6C6 y se detectó de la misma forma que el anticuerpo 10D5 (Hyman *et al* (1992) J. Neuropath. Exp. Neurol. 51:76), utilizando un péptido sintético que contenía residuos 1-28 de β AP conjugados a la albúmina sérica de conejo como el inmunógeno. Tanto 10D5 como 6C6 reconocen un epítipo en el interior de los primeros 16 aminoácidos de la secuencia β AP. 6C6 fue más eficiente que 10D5 en la inmunoprecipitación y se utilizó como un anticuerpo de captura. para preparar la resina de 6C6, 4 mls de Affigel® 10 (Laboratorios Bio-Rad, Hercules, CA), se lavaron con agua fría y se combinaron con 3 mls de 6C6 (12,5 mg/ml en PBS (2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8,1 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl, pH 7,5) 0,5 M NaCl. El acoplamiento tuvo lugar durante la noche a 4°C con agitación suave. Se añadieron entonces 400 μ l de 1M Tris, pH 8,0, continuándose la agitación durante 40 minutos. La resina se lavó entonces con TTBS (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM Tris, 0,5% Tween® 20, pH 7,5) exhaustivamente antes de usarla. El anticuerpo 7H5 se describe también en Hyman *et al* (1992), J. Neuropath. Exp. Neurol. 51:76. Los anticuerpos anti-5 se produjeron contra β APP 444-592 (Oldersdorf *et al* (1989) Nature 341:144-147 y (1990) J. Biol. Chem. 265:4492-4497).

Los anticuerpos (denominados anticuerpo 92) se produjeron contra un péptido sintético que incluía los residuos 591-596 de β APP (tal como se numera en Kang *et al* (1987) Nature 325:773-776). El péptido (N-acetil-CISEVKM) se conjugó a la albúmina sérica de conejo que se había activado con el éster de sulfomaleimido benzoil-N-hidroxisuccinimida para formar un inmunógeno. Los antisueros se produjeron contra el inmunógeno en conejos mediante metodologías estándar. Durante cada inoculación, los conejos recibieron 5 μ g de inmunógeno en inyecciones de 0,1 ml subcutáneamente en 10 sitios aproximadamente (50 μ g/revacunación). El mismo péptido se acopló al gel Sulfolink™ (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) para la purificación por afinidad de los anticuerpos de la fracción IgG.

Una descripción más detallada de la preparación del anticuerpo 92 es la que sigue a continuación. Albúmina sérica de conejo (12,3 mg) se incubó con 13 mg de éster sulfo-maleimido benzoil-N-hidroxisuccinimida en 1,25 mls de 0,05 M KH_2PO_4 , pH 7,0 durante 20 minutos a 0°C. La mezcla se sometió entonces inmediatamente a filtración en gel sobre una columna de 1 x 75 cm de Sephadex G-10 equilibrada con el tampón fosfato. El eluyente proteico en el volumen excluido se agrupó y se combinó inmediatamente con 30 mg del péptido N-acetil-CISEVKM que se sintetizó mediante metodologías estándar automatizadas en fase sólida. Se dejó que se llevara a cabo la reacción de acoplamiento (volumen de 20 ml) por la noche y se envió entonces a instalaciones comerciales para la generación de anticuerpos. El protocolo de inyecciones consistió en emulsificar el antígeno en un volumen igual del adyuvante completo de Freund e inyectar subcutáneamente un total de 50 μ g del antígeno en alícuotas de 0,1 ml en 10 sitios aproximadamente. Después, cada tres semanas se administró una inyección de recuerdo mediante un protocolo idéntico excepto en que como emulsificante, se utilizó el adyuvante incompleto de Freund. Los conejos se sangraron una semana después de cada inyección y se examinó el suero respecto a la titulación mediante la reacción para los péptidos en ELISA. Se purificó la IgG a partir de los sueros reaccionantes positivos mediante precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50%, (2 x's) y se dializó contra PBS. El péptido N-actil-CISEVKM se conjugó al gel Sulfo-link™ (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) utilizando las recomendaciones del fabricante para generar una resina de afinidad con objeto de purificar los anticuerpos específicos para el péptido. La fracción IgG se aplicó a la columna y, después de lavar mediante un material no específicamente unido con PBS, los anticuerpos se eluyeron con 0,1 M de glicina pH 2,5, 0,5 M NaCl, dializándose entonces respecto a PBS antes de congelar.

El anticuerpo sueco 192 se produjo contra un péptido sintético compuesto de los residuos 590-596 de la secuencia sueca β APP. Además de la secuencia β APP, dos glicinas y una cisteína se añadieron como un espaciador y un engarce,

dando lugar a la secuencia siguiente: CGGEISEVNL. El péptido se conjugó a una Albúmina Sérica Bovina cationizada activada por la maleimida, disponible comercialmente (modulador Inmune Super transportador Pierce Imject, al que se hará referencia en adelante en la presente memoria como cBSA.) El antisuero se produjo siguiendo el esquema de inyección descrito anteriormente para el anticuerpo 92.

En general, el cBSA se volvió a suspender en agua desionizada hasta una concentración de 10 mg/ml. Una cantidad igual en miligramos del péptido se añadió al transportador y se mezcló durante cuatro horas a temperatura ambiente. El conjugado se dializó entonces extensamente contra solución salina tamponada de fosfato de Dulbecco sin calcio y magnesio.

El conjugado se comparó con el cBSA inicial sobre un gel Novex de Tris-glicina al 6% pre-vertido. La conjugación exitosa fue indicada por un cambio visible a un peso molecular más alto.

2. Cultivo de células cerebrales fetales humanas

Se obtuvieron muestras de tejido neural fetal a partir de cadáveres fetales de 12-14 semanas. Muestras de córtex cerebral se enjuagaron dos veces con Solución Salina Equilibrada de Hank (HBSS). El tejido cortical (2-3 gramos) se emplazó en 10 mls de HBSS fría a la que se añadió 1 mg de DNasa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO D3427). La suspensión triturada se filtró a través de pantallas de nylon Nitex de 210 μm y entonces de 130 μm , tal como se describe por Pullian *et al.* (1984) J. Virol. Met. 9:301.

Las células se recuperaron mediante centrifugación y se volvieron a suspender en medio neuronal (MEM reforzado con suero bovino fetal al 10%, glucosa al 1%, 1 mM Piruvato de sodio, 1 mM glutamina, 20 mM KCl). Placas (o discos) de 100 mm revestidos con polietilenimina se sembraron con $1,5 \times 10^7$ células en 8 mls de medio neuronal. El medio se cambió dos veces a la semana. Todos los cultivos en este estudio se desarrollaron *in vitro* por lo menos 30 días. Para las condiciones de crecimiento sin suero, los cultivos se cambiaron a un medio definido (DMEM suplementado con 5 $\mu\text{g/ml}$ de insulina bovina; 0,1 mg/ml de transferrina humana; 0,1 mg/ml de la fracción V de BSA; 0,062 $\mu\text{g/ml}$ de progesterona, 1,6 $\mu\text{g/ml}$ de putrescina; 0,039 $\mu\text{g/ml}$ de selenito sódico, 0,042 $\mu\text{g/ml}$ de tiroxina; y 0,033 $\mu\text{g/ml}$ de triyodo-L-trionina), recuperándose, después de 3 días, el sobrenadante.

El medio condicionado de las células (10 ml) se recuperó. EDTA (5 mM), leupeptina (10 $\mu\text{g/ml}$) y Tris-HCl (20 mM, pH 8,0) se añadieron a cada uno de las muestras de 10 ml a la concentración final indicada, haciendo rotar la muestra a 30.000 xg durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se dividió en dos alícuotas iguales, añadiéndose 6C6 a una de las alícuotas (200 μl de la resina con aproximadamente 5 mg/ml de 6C6 unido). Ambas alícuotas se mezclaron suavemente durante 6 horas a 4°C, sedimentándose la resina, y aladiéndose una segunda alícuota de 200 μl de la resina. Las muestras se mezclaron posteriormente durante la noche a 4°C. Las resinas combinadas se lavaron dos veces con TTBS, y se extrajeron brevemente dos veces con una alícuota de un ml de 0,1 M glicina, 0,1 M NaCl, pH 2,8.

El material extraído de la resina, el medio vaciado por la resina y el medio de iniciación se precipitaron individualmente con TCA al 10% (ácido tricloro-acético) a 0°C durante una hora, se lavaron los sedimentos con acetona y se volvieron entonces a suspender en 150 μl de tampón SDS-PAGE de la muestra, bajo condiciones reductoras, hirviéndose. Cada muestra (25 μl) se sometió a SDS-PAGE utilizando geles de tricina del 10-20% (Novex). Las proteínas se transfirieron a membranas Problot DVDF durante la noche a HOV. La visualización de las proteínas inmunoreactivas utilizó el sistema de quimioluminiscencia TROPIX según las instrucciones del fabricante para el sustrato AMPPD. Las concentraciones de anticuerpos primarios fueron de: anti-5, 0,1 $\mu\text{g/ml}$; 92, 2 $\mu\text{g/ml}$; 10D5, 2 $\mu\text{g/ml}$.

3. Cultivo de las células 293 humanas

Células humanas 293 (ATCC n° CRL-1573) se modificaron para sobreexpresar APP (Selkoe *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85: 7341). Las células se hicieron crecer en placas de 10 cm para obtener subclonfluencias antes de utilizarlas. El marcado metabólico y la inmunoprecipitación se llevaron a cabo esencialmente tal como previamente se describió en Oltersdorf *et al.* (1989), Nature 341:144 y (1990) J. Biol. Chem. 265:4492. Brevemente, el marcado se realizó en placas de 10 cm. Las células se lavaron en medio sin metionina, se incubaron durante 20 minutos en 2 ml de medio sin metionina suplementado con 0,5 mCi de ^{35}S -metionina, se lavaron en medio completo, y se retuvieron durante 2 horas en 3 ml de medio completo. El medio condicionado se recuperó y depuró a 3000 xg durante 10 minutos, seguido por preabsorción con proteína A Sepharose® (Pharmacia, Piscataway, NJ). La inmunoprecipitación se llevó a cabo con 1,5 mg de proteína A Sepharose® por muestra. Se utilizó un anticuerpo anti-5 con 2 μg por muestra; 6C6, 7H5 y 92 se utilizaron con 10 μg por muestra. 5 mg de la IgG anti ratón de conejo se utilizaron con 6C6 y 7H5, así como en las muestras de control. Los precipitados se lavaron cuatro veces en TBS (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM Tris, pH 7,5), NP40 al 0,1%, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina. SDS-PAGE se llevó a cabo en geles Laemmli al 5%.

4. Cultivo de células 293 humanas transfectadas con la mutación sueca

Pocillos duplicados en una bandeja de 6 pocillos de células 293 renales humanas se transfectaron transitoriamente con vectores plasmídicos que expresaban la β APP humana normal o la β APP variante de la mutación sueca utilizando la transfección mediada por DOTAP, tal como se describe por el fabricante (Boehringer Mannheim). 40 horas después, las células se dispusieron en DME sin metionina que contenía suero de ternera fetal al 10% y 20 minutos después se marcabán durante 35 minutos con 200 μ Ci/ml de S^{35} -metionina. Las células se volvieron entonces a situar en medio DME normal que contenía suero de ternera fetal al 10% y se incubaron otras 2,5 horas. El medio se recuperó a partir de las células, y se hicieron rotar a 1000 xg durante 15 minutos para eliminar todas las células. Los sobrenadantes se dividieron por la mitad y una de las mitades se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-5 mediante los procedimientos estándar. La otra mitad se incubó por la noche con el anticuerpo 6C6 acoplado a agarosa, y el material unido al 6C6 agarosa se separó mediante centrifugación. El material que quedaba fue el que precipitó inmunológicamente con el anticuerpo anti-5. Los inmunoprecipitados totales anti-5 ($\alpha 5+$), los precipitados unidos a 6C6 (6c6+) y los inmunoprecipitados reactivos anti-5 y no reactivos 6C6 (6C6-, $\alpha 5+$) se procesaron en un gel Laemmli al 5% y las proteínas inmunoreactivas se visualizaron mediante autoradiografía.

5. Especificidad del anticuerpo 192 sueco

Se recuperó el medio condicionado de las células renales 293, que se habían transfectado establemente para sobreexpresar la proteína β APP sueca. Alícuotas de un mililitro se añadieron a 100 μ l de la resina de afinidad-6C6 inmovilizada (véase antes) o a 100 μ l de agarosa-heparina (Sigma). La reacción con la resina 6C6 se realizó durante 5 horas a 4°C; la agarosa-heparina se hizo reaccionar durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las resinas se lavaron con TTBS y entonces se añadieron a cada muestra 100 μ l del tampón de muestra 2 X SDS-PAGE, hirviéndose las muestras (5 minutos) y centrifugándose brevemente. Veinte μ l de las muestras se cargaron en geles de SDS-poliacrilamida al 6% y se sometieron a electroforesis. Las proteínas se transfirieron a membranas ProBlot® tal como se ha descrito anteriormente. Las muestras se sondearon con los anticuerpos siguientes: 6C6 (descrito anteriormente), sueco 192 (véase antes), o 8E5 (un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo de β APP en la región de los aminoácidos 444-592, utilizando la numeración de la forma 695). Se utilizaron todos los anticuerpos a 2 μ g/ml durante el sondeo de la inmunotransferencia. La visualización del material inmunorreactivo se alcanzó utilizando el sistema Amersham ECL® según las recomendaciones de los fabricantes. El bloqueo y las diluciones de los anticuerpos se realizaron utilizando leche seca sin grasa al 5% (Carnation) en TTBS.

6. Ratones transgénicos

Se generaron ratones transgénicos utilizando los plásmidos que se muestran en la Fig 7 (NSEAPPsw y NSEAPPsw $\Delta 3'$). Estos plásmidos contienen la forma 751 de β APP que contiene la mutación sueca (KM a NL en posición 595 y 596 de la forma 695). El promotor neural enolasa específico gobierna la expresión y proporciona una secuencia de corte y empalme. El promotor NSE de la rata y las secuencias de corte y empalme se derivaron de pNSE6 (Okayama y Berg (1982) Mol. Cell. Biol. 2:161-170. Este vector contiene el fragmento Bg1II de 4,2 kb de la región del promotor NSE de la rata (que empieza a partir del sitio Bg1II por encima y continua hasta el sitio Bg1II en el intrón segundo), clonado en el sitio BamHI del vector pSP65 (Promega). El sitio XbaI derivado del vector en el extremo 5' del promotor definió el extremo 5' del promotor utilizado y el ATG iniciador de la traducción de NSE, contenido en el interior del intrón segundo, se fusionó con el ATG iniciador de β APP.

NSEAPPsw contiene también una secuencia de corte y empalme de SV40 en la región 3' del gen. Esta secuencia de corte y empalme se derivó del vector pL1 de Okayama/Berg, y es una fusión de las últimas secuencias de corte y empalme mensajeras 19s y 16s (Forss-Petter *et al.* (1990) Neuron 5:187-197). La poliadenilación es suministrada por las secuencias de SV40.

Los ratones transgénicos que incorporan estas secuencias plasmídicas se generaron utilizando técnicas estándar. El fragmento NotI que contiene la cassette de expresión anteriormente descrita se purificó e inyectó en los cigotos obtenidos de un ratón híbrido C57B1/DBA. Los cigotos se implantaron en ratones pseudopreñados y la descendencia se detectó en cuanto a la presencia de secuencias plasmídicas en el ADN de la cola mediante PCR, transferencia en ranura y análisis Southern. Los ratones fundadores así generados se detectaron respecto a la expresión de la expresión del β APP humano mediante análisis de su descendencia F1 transgénica. Los cerebros de los animales F1 se homogenizaron con un homogenizador manual (polytron PT122B, Kinematica AG), bien en tampón SDS (SDS al 2%, 20 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA) o en tampón NP-40 (NP40 al 1%, 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM EDTA, y un cóctel de inhibidores de la proteasa que contenía 5-10 μ g/ml de leupeptina, 2-4 μ g/ml de Pepstatina A, 5-10 μ g/ml Aprotinina, y 1-2 mM PMSF). Los lisados de SDS se cargaron directamente sobre los geles para análisis Western. Los homogenizados NP40 se hicieron rotar a 55.000 rpm durante 10 minutos en una ultracentrífuga Beckman (rotor T1100.3) y los sobrenadantes se cargaron en los geles para el análisis Western. Éste se llevó a cabo mediante procedimientos estándar que utilizaban los anticuerpos anti-5 (0,4 μ g/ml) o 8E5 (5 μ g/ml) para detectar la β APP específica humana. Aquellas progenies que expresaban niveles relativamente altos de β APP se seleccionaron para un análisis posterior. Este incluía las progenies Hillary 14, Chelsea 32 y Chelsea 58. Los experimentos que se describen en la presente memoria se llevaron a cabo en animales heterocigotos de estas progenies derivados mediante cría transgénica, que contenía animales de tipo salvaje y detectando a la descendencia respecto a la presencia del transgén. De modo similar, pueden utilizarse animales homocigóticos procedentes de un número seleccionado de progenies.

Descripción de las figuras experimentales

Fig 2

5 Demostración de β APP truncado en un medio condicionado de cultivos celulares humanos cerebrales mezclados

La muestra 1 es el medio condicionado del cultivo; la muestra 2 es el medio vaciado del β APP 6C6 reactivo; y la muestra 3 es el material extraído de la resina 6C6. El grupo A se sondeó con 5 anticuerpos que se obtuvieron contra la secuencia 444-592 de β APP (Oltersdorf *et al.* (1989), Nature 341:144-147 y (1990) J. Biol. Chem. 265:4492-4497. El grupo B se sondeó con el anticuerpo 92, descrito en la sección de Materiales y Métodos. El conjunto C se sondeó con 10D5, un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo en el interior de los residuos 1-16 de β APP, tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos. las bandas de peso molecular más bajo observadas en C2 y C3 no se apreciaron en C1 y se derivan de la resina 6C6 y son reconocidas por el conjugado de fosfatasa alcalina IgG anti ratón de cabra, independiente de un anticuerpo primario (datos que no se muestran).

Fig 3

Especificidad de los anticuerpos 92

Un mililitro de una muestra de CSF lumbar humano obtenida de un macho de 75 años de edad, se precipitó con TCA al 10% para obtener una concentración diez veces superior y se procesó tal como se describe en la Fig 2, excepto en que el pocillo del gel tiene una ranura de 4 cm. El anticuerpo 92 se diluyó hasta 6,7 μ g/ml en 0,5 mls de TTBS en presencia de varios péptidos potencialmente competitivos, cada uno a una concentración aproximada de 60 μ M, durante 10 horas a 4°C con agitación suave. El anticuerpo se diluyó entonces ocho veces en gelatina al 1%/TTBS antes de incubarlo con tiras de la transferencia por adsorción del material derivado de CSF y procesado tal como se describe en la Fig 2. Los péptidos competitivos son de la siguiente forma: carril 1, sin añadir péptidos competitivos, carril 2, GSGLTIKTEEISEVK; carril 3, YSGLTIKTEEISEVKM; carril 4, ISEVKM; carril 5, EISEVKMD; carril 6, CISEVKM; carril 7, YISEVKM. MW= marcadores de peso molecular (indicados en kilodaltons).

Fig 4

35 Heterogeneidad del peso molecular de las formas secretadas de APP en la inmunoprecipitación detectada por los anticuerpos contra distintos extremos C en las progenies celulares y en los cultivos cerebrales fetales humanos primarios

Anticuerpos: anti-5: Carriles 3,6,9; 6C6 (dirigido contra los residuos 1-16 del péptido β AP): Carriles 4, 7, 10; anticuerpo 92 (contra aminoácidos 591 a 596 de APP): Carriles 5, 8, 11; 7H5 (contra APP-KPI): Carril 12. Células: grupo izquierdo (carriles 1 y 3-5): células 293 transfectadas establemente con APP 695; grupo medio (carriles 2 y 6-8): células 293 transfectadas establemente con APP 751; grupo derecho (carriles 9-13): cultivos cerebrales fetales humanos. Controles: carriles 1, 2 y 13: anticuerpo de conejo anti IgG de ratón. Flechas: un ejemplo de diferencia de peso molecular entre formas secretadas de APP reconocidas por los anticuerpos 6C6 y 92. SDS-PAGE se llevó a cabo en un gel Laemmli al 5%. MW= marcadores de peso molecular (indicados en kilodaltons).

Fig 5

50 Demostración de β APP truncado en medio condicionado de células 239 humanas transfectadas con la mutación sueca

La Fig 5 muestra resultados de transfecciones duplicadas tanto para la forma normal como para la sueca. Los carriles 1-4 son α 5+; los carriles 5-8 son 6C6+; y los carriles 9-12 son muestras 6C6-, α 5+. Los carriles 1, 2, 5, 6, 9 y 10 son del β APP normal, y los carriles 3, 4, 7, 8, 11 y 12 son del β APP sueco. La mutación sueca da lugar a la producción de un aumento de AFT- α APP, pues los carriles 11 y 12 contienen más material ATF- β APP que los carriles 9 y 10.

Fig 6

60 Inmunotransferencia que demuestra la especificidad del anticuerpo sueco 192

La figura 6 muestra una inmunotransferencia que demuestra la especificidad del anticuerpo sueco 192. Los carriles 1, 3, 5 contienen material eluído de heparina agarosa. Los carriles 2, 4, 6 contienen material eluído de la resina 6C6. Los carriles 1 y 2 se sondearon con el anticuerpo 8E5; los carriles 3 y 4 se sondearon con el anticuerpo sueco 192; los carriles 5 y 6 se sondearon con el anticuerpo 6C6.

Figs 7A y 7B

Mapas plasmídicos

Las Figuras 7A y 7B son mapas plasmídicos de pNSEAPPswΔ3' y pNSEAPPsw, respectivamente, que se utilizan para producir ratones transgénicos tal como se describió anteriormente.

Fig 8

Transferencia Western

La Fig 8 es una transferencia Western de fracciones solubles de cerebros de animales transgénicos y de control sondeados respecto a la presencia de fragmentos β APP secretados que reaccionan con el anticuerpo sueco 192. Carril 1: marcadores de peso molecular; carril 2: progenie no transgénica; carril 3: progenie transgénica.

Fig 9

Transferencia Western

La Fig 9 son transferencias Western de homogenados cerebrales de animales transgénicos (+) y no transgénicos (-) vaciados de formas β APP anticuerpo 6C6-reactivas sondeados con el anticuerpo 8 E5 (grupo A) y el anticuerpo sueco 192 (grupo B).

Resultados

El anticuerpo monoclonal 6C6 que reconoce un epítipo de β AP en el interior de los residuos 1-16, se utilizó para vaciar inmunológicamente ciertos fragmentos β APP de varias muestras. El anticuerpo monoclonal 6C6 se acopló a la resina (tal como se describió anteriormente) y se incubó con el medio condicionado de los cultivos celulares cerebrales fetales humanos, tal como se describió anteriormente. Como puede apreciarse (Fig 2, carril C2) esta resina elimina efectivamente el β APP que contiene β AP 1-6 del medio condicional del cultivo celular. La inmunoreactividad sustancial del β APP, sin embargo, no es capturada por la resina tal como se detecta mediante el anticuerpo anti-5 dirigido contra un epítipo N-terminal a la región β AP (Fig 2, carril A2).

Con objeto de caracterizar esta forma de β APP, se produjeron anticuerpos contra un péptido sintético que incluía residuos 591-596 de β APP (tal como se describe antes). Se encontró que este anticuerpo (denominado 92) reconocía los tipos de β APP no capturados por la resina, (Fig 2, carril B2), pero sorprendentemente no reaccionó con la forma secretada de β APP que contenía la secuencia 1-16 de β AP (carril B3).

La explicación para esta falta de reactividad cruzada parece ser que el anticuerpo 92 reconoce un epítipo en β APP incluyendo la metionina carboxi terminal, que corresponde al residuo 596. De acuerdo con esto, se examinó la capacidad de varios péptidos sintéticos para bloquear la inmunoreactividad generada con el 92. Como puede apreciarse en la Fig 3, los péptidos basados en la secuencia β APP que finalizan con el equivalente de la metionina 596, bloquean sustancialmente la reacción del 92, mientras que los péptidos que son un aminoácido más largos o más cortos en su extremo carboxilo, son comparativamente inefectivos en la competencia. Se observó el mismo patrón de competencia peptídica en los sobrenadantes del cultivo celular (datos que no se muestran) y en el CSF. Una serie de experimentos de atrapamiento de pulsos revelaron que cantidades detectables del material inmunoprecipitable por el anticuerpo 92 son producidas por células 293 que sobreexpresan bien la isoforma 695 ó la 751 de β APP (Fig 4, carriles 5 y 8). Experimentos similares sobre cultivos celulares cerebrales fetales humanos muestran que el material inmunoprecipitable por 92 puede resolverse a partir del β APP C6C reactivo en un SDS-PAGE de bajo porcentaje (5%) (Fig 4, carriles 9-11). En los cultivos de células cerebrales fetales, el tratamiento alternativo de las formas β APP que contienen el dominio KPI (inhibitorio de la proteasa Kunitz) es menos aparente, aunque se observan bandas pálidas que co-emigran con las inmunoprecipitaciones del anticuerpo 92 y del anticuerpo 7H5 anti-KPI (carriles 11, 12).

La capacidad para resolver los materiales precipitables por los anticuerpos 92 y 6C6 en los cultivos mezclados cerebrales se debe, por lo menos en parte, a las cantidades casi iguales de las formas respectivas producidas cuando se comparan a la situación en las células 293. Estus *et al* (1992), Science 255:726-728, observó que comparado con otros tejidos, el cerebro humano contenía una cantidad relativamente alta del fragmento carboxi terminal amiloidogénico que, debido a su tamaño, parece empezar en o cerca del extremo amino de β AP.

La coincidencia temporal de la aparición de los materiales β APP precipitables por los anticuerpos 92 y 6C6 es un argumento contra la posibilidad de un segundo evento proteolítico que tenga lugar después de la secreción, particularmente desde que tiempos de captura más largos no dan lugar a una alteración notable en la proporción de los tipos reactivos 92 y 6C6 (datos que no se muestran). La resolución de las formas secretadas mediante SDS-PAGE, acoplada con la falta completa de reactividad cruzada inmunológica de estos tipos, demuestra posteriormente la existencia de una vía secretora alternativa. El sitio alternativo de fragmentación se denominó como sitio de la β -secretasa, para ha-

cer hincapié en que la fragmentación es amino-terminal al β AP, distinta de la descrita por Esch *et al* (1990), Science 248:1122-1124, que tiene lugar en el interior de β AP.

Como puede apreciarse en la Figura 6, carril 4, el anticuerpo sueco 192 no reconoce apreciablemente la forma de β APP que reacciona con 6C6 a pesar del hecho de que en el carril 4, comparado con el carril 3, se encuentra más β APP total (compárense los carriles 1 y 2). La falta de reactividad con las formas de β APP que contienen la secuencia β AP parcial (que reacciona con 6C6) sugiere que el anticuerpo sueco 192 reconoce el β APP fragmentado en o cerca del extremo amino de β AP, pero no cuando β APP se extiende más allá de esta región.

Con objeto de comprobar la utilidad de este planteamiento como un modelo animal, fracciones solubles de los cerebros de animales transgénicos se sondearon en cuanto a la presencia de la forma "92" del β APP secretado (Fig 8). Esta forma se produce como un producto de desecho de la producción de β AP, y la inhibición de la producción de esta forma en células cultivadas, acompaña a la inhibición de la fragmentación del extremo N-terminal de β AP, el sitio fragmentado por la β -secretasa.

Los cerebros de ratones transgénicos (sueco Hillary 14) o no transgénicos se homogenizaron en 50 mM Tris 10 mM EDTA junto con el cóctel inhibidor proteásico anteriormente descrito, centrifugándose a 55k rpm 10 minutos tal como se describió antes. El sobrenadante se analizó mediante transferencia Western, utilizando el anticuerpo sueco "192" que reacciona sólo con la forma secretada de β APP producida por la β -secretasa. Para el análisis Western, las proteínas se separaron sobre un gel SDS-PAGE al 6% (de Novex) y se transfirieron entonces a immobilonP mediante técnicas estándar. El filtro se incubó con 2 μ g/ml del anticuerpo sueco "192" utilizando técnicas estándar, y el anticuerpo unido se visualizó utilizando el equipo ECL de Amersham. Tal como se muestra en la Fig 8, carril 3, existía material que reaccionaba con "192" intensamente detectable en el sobrenadante del animal transgénico. El homogenado cerebral del animal no transgénico contenía una pequeña cantidad de material inmunoreactivo que se mostraba ligeramente más rápido sobre el gel que el material específico al animal transgénico (carril 1). Este material no está probablemente relacionado con β APP, ya que no se hibridiza con otros anticuerpos β APP (por ejemplo, anti-5).

En los sistemas de cultivo de tejidos, el anticuerpo sueco 192 no reacciona cruzadamente con el β APP secretado que se fragmenta en el sitio de la α -secretasa en posición 17 en el punto medio de la secuencia β AP. Para comprobar que esto es también verdad en los modelos murinos, se vaciaron (o eliminaron) homogenados cerebrales de formas del β APP fragmentado por la α -secretasa utilizando resina unida al anticuerpo 6C6, el cual es específico para los primeros 16 aminoácidos de β AP, y reacciona por tanto con el fragmento terminal amino del fragmento β APP secretado, fragmentado por la α -secretasa, pero no con el fragmento β APP secretado más corto, fragmentado por la β -secretasa. La resina se produjo utilizando Actigel-ALS acoplado en suspensión, tal como se describe por el fabricante (Sterogene). Se incubó un exceso de resina-anticuerpo con los homogenados cerebrales de los animales que contenían o no el transgén durante una incubación inicial de 3 horas a 4°C con agitación, separándose el material unido y no unido mediante centrifugación a 14.000 rpm durante 1 min. El sobrenadante se incubó otra vez con un exceso de resina unida al 6C6 durante 16 horas a 4°C, centrifugándose otra vez para separar el material no unido. El material unido durante la primera incubación y el material que no se unió a la resina acoplada a 6C6, se analizaron mediante transferencia Western utilizando 8E5 y los anticuerpos sueco 192 (Fig 9).

Los homogenados de los ratones transgénicos (+) o no transgénicos (-) se sondearon con 8E5 (grupo A) o sueco 192 (grupo B). Los carriles 1 se refieren al homogenado total, los carriles 2 se refieren a la fracción que no se unió a la resina 6C6 (*es decir*, que no contiene el fragmento de β APP fragmentado por la α -secretasa), y los carriles 3 se refieren a la fracción que se unió a la resina acoplada con 6C6 (*es decir*, que conserva el fragmento de β APP fragmentado por la α -secretasa). Ninguno de los β APP, identificados por su reactividad con el anticuerpo anti-5, reaccionó cruzadamente con el anticuerpo sueco 192. El material no unido, identificado por la reactividad con el anti-5, reaccionó con el anticuerpo sueco 192.

De este modo, la presente invención proporciona un modelo animal viable para la elucidación del tratamiento de β APP a β AP y fragmentos relacionados, y proporciona además un sistema conveniente para la detección de los inhibidores de la actividad de la β -secretasa y/o de medicamentos que modulen la actividad de ella.

Aunque la invención anteriormente mencionada se ha descrito detalladamente con objeto de clarificar su comprensión, es obvio que pueden llevarse a cabo ciertas modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para controlar el tratamiento *in vivo* de la proteína precursora del β -amiloide (β APP), comprendiendo dicho procedimiento la detección de la presencia de un fragmento terminal amino de β APP (ATF- β APP) en una muestra procedente de un animal no humano transformado para expresar la mutación sueca de la β APP humana, en el que el fragmento terminal amino se ha fragmentado entre Leu⁵⁹⁶ y Asp⁵⁹⁷.
- 10 2. Procedimiento para identificar los inhibidores de la producción de β -amiloide, comprendiendo dicho procedimiento:
 - la detección de la cantidad de un fragmento terminal amino de β APP (ATF- β APP) fragmentado entre Leu⁵⁹⁶ y Asp⁵⁹⁷ en una muestra de un animal no humano transformado para expresar la mutación sueca de la proteína precursora del β -amiloide humano (β APP) y al cual se ha administrado un compuesto prueba; y
 - 15 la comparación de la cantidad detectada de ATF- β APP con una cantidad control de ATF- β APP producida en ausencia de dicho compuesto de prueba.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que la cantidad de control de ATF- β APP se mide en el mismo animal no humano que recibe el compuesto de prueba o en el que la cantidad de control de ATF- β APP es un valor promedio determinado a partir de diversos animales no humanos de prueba que expresan la mutación sueca del β APP humano.
- 25 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la presencia de ATF- β APP se detecta mediante reacción de la muestra con una sustancia específica de unión para un epítipo en el extremo carboxilo de ATF- β APP, que comprende la secuencia aminoácida Ser-Glu-Val-Asn-Leu, opcionalmente en el que la sustancia de unión es un anticuerpo monoclonal producido contra un péptido que comprende los aminoácidos.
- 30 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra es líquido cefalorraquídeo u homogenado cerebral.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la presencia del ATF- β APP se detecta mediante la reacción de la muestra con una sustancia de unión capaz de discriminar entre ATF- β APP y los fragmentos de β APP relacionados.
- 35 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho animal no humano es un ratón.
8. Procedimiento para detectar compuestos de prueba en cuanto a la capacidad para inhibir o modular la fragmentación de β APP, comprendiendo dicho procedimiento:
 - 40 la administración de un compuesto de prueba a un ratón transformado para expresar la mutación sueca del β APP humano, en el que dicho β APP humano se procesa a ATF- β APP en una cantidad suficiente para ser detectable en un homogenado cerebral de dicho ratón transformado, y
 - 45 la detección de un cambio en el tratamiento de β APP en dicho ratón transformado, cuando se compara con dicho tratamiento en ausencia del compuesto de prueba, en el que dicho cambio en el tratamiento de β APP es detectado midiendo un cambio en la cantidad de ATF- β APP.

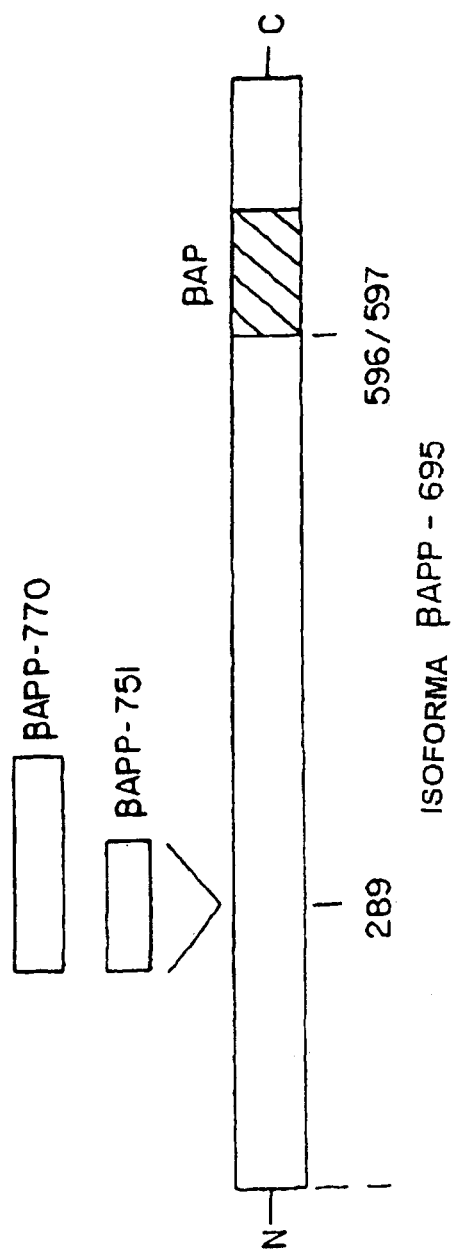
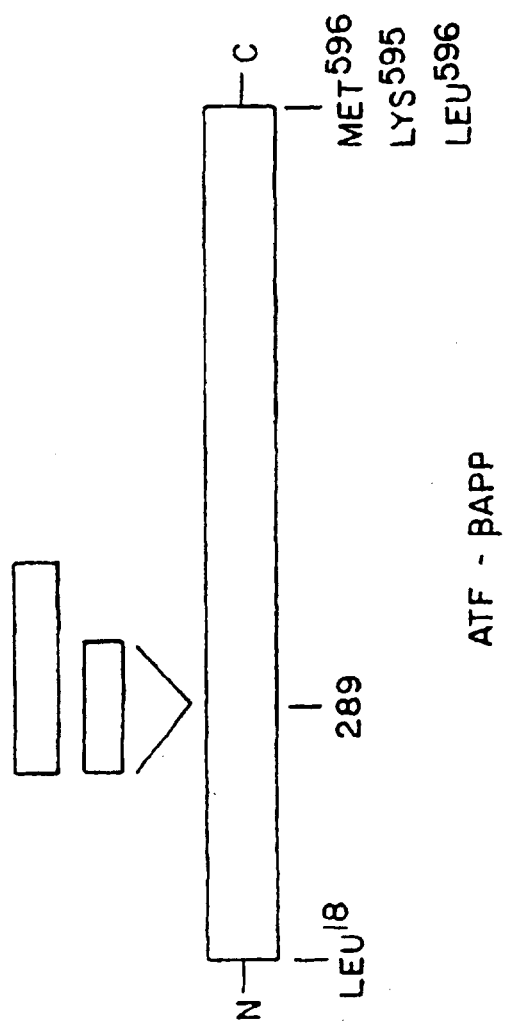


FIG. 1A.



ATF - BAPP

FIG. 1B.

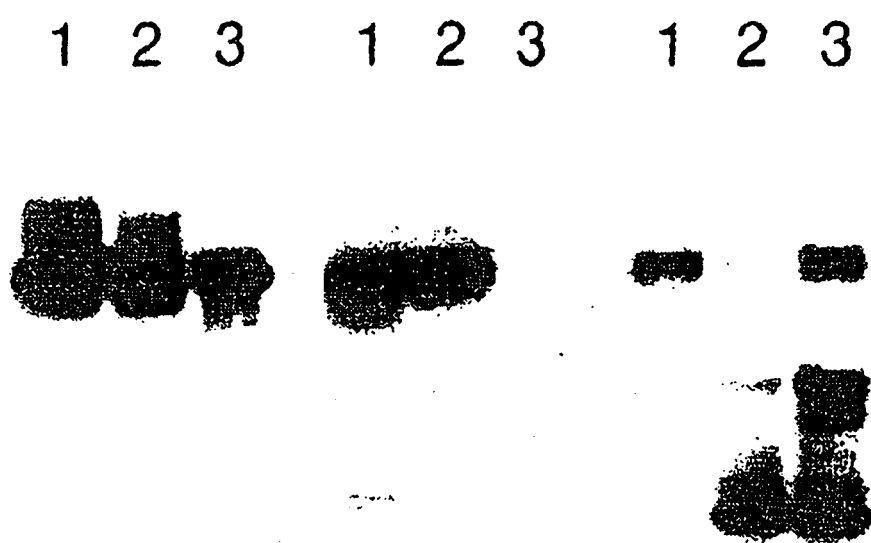


FIG. 2A.

FIG. 2B.

FIG. 2C.

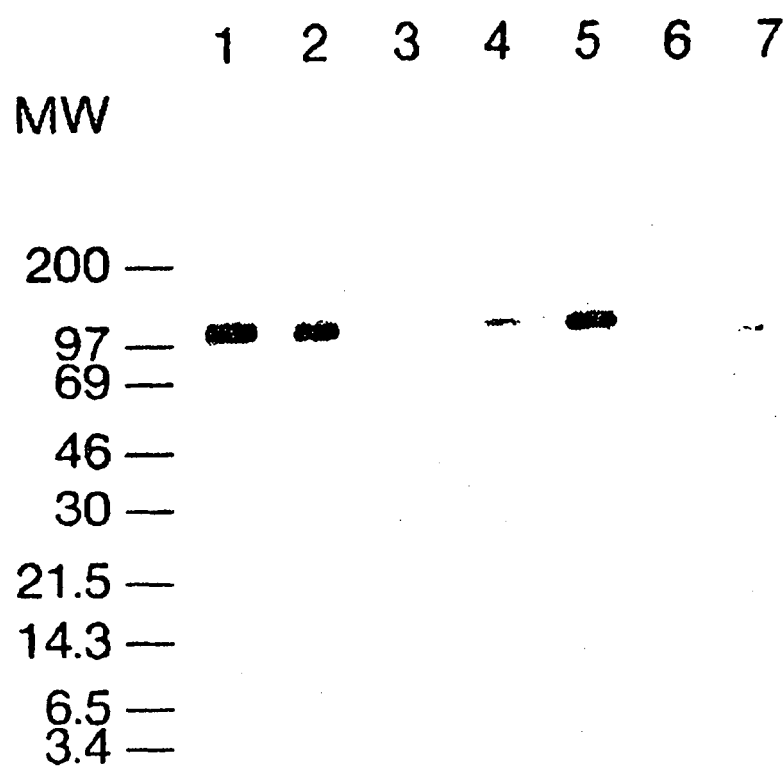


FIG. 3.

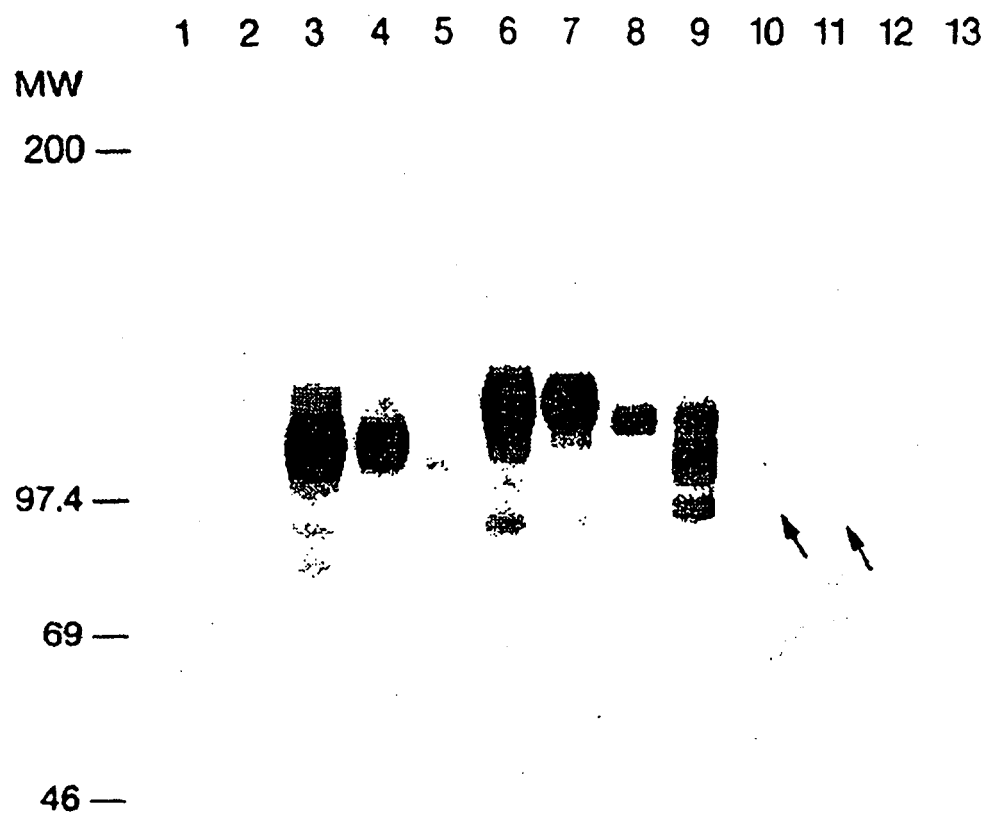


FIG. 4.

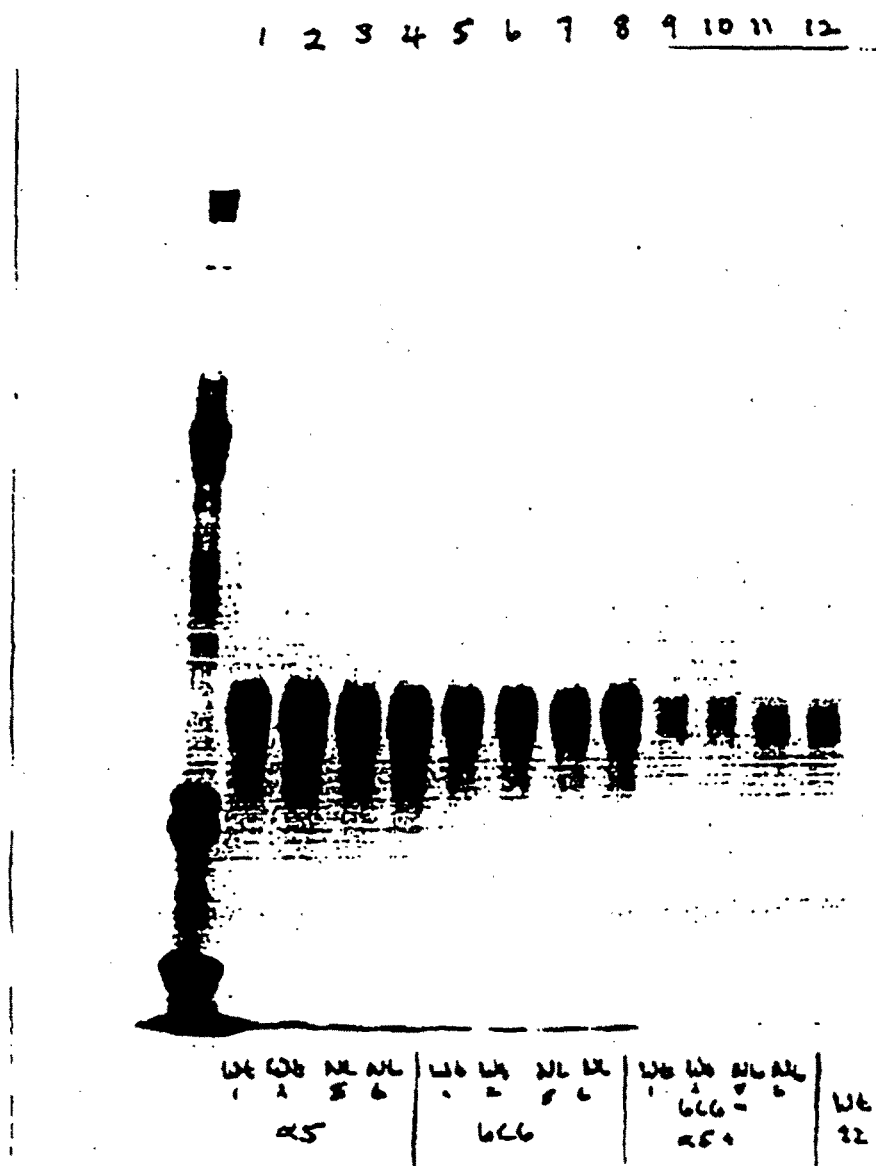


FIG. 5

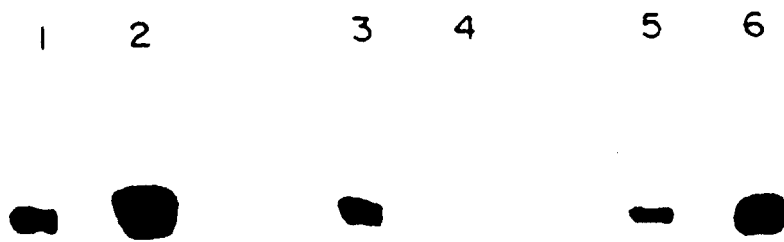


FIG. 6.

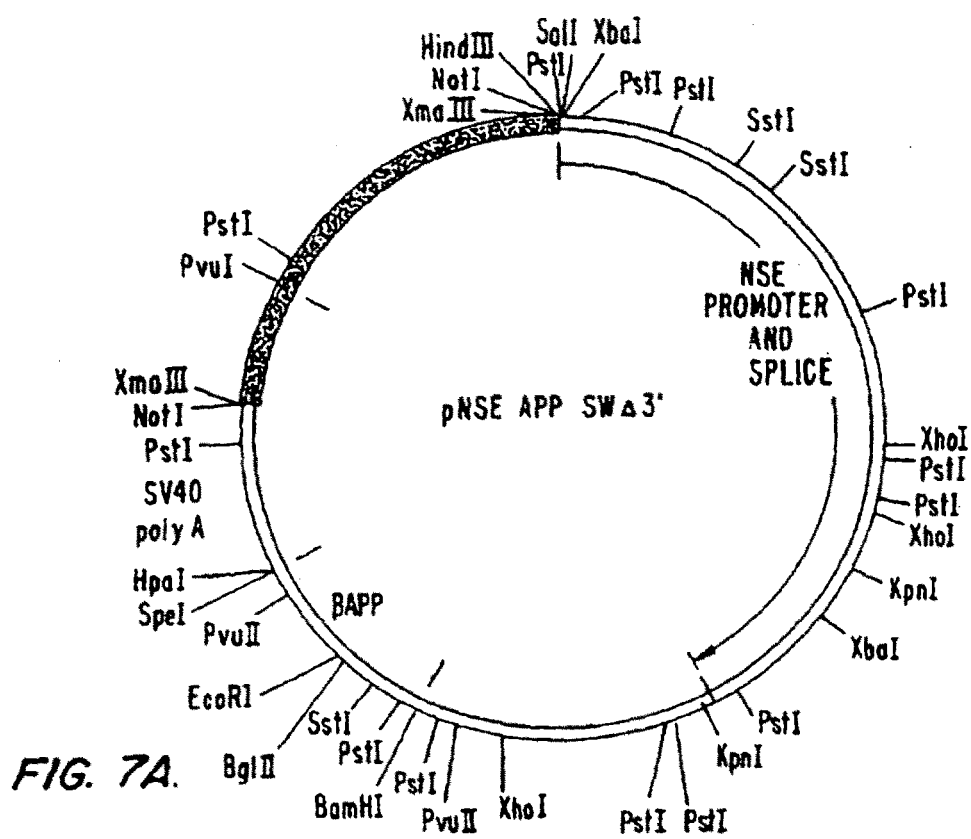


FIG. 7A.

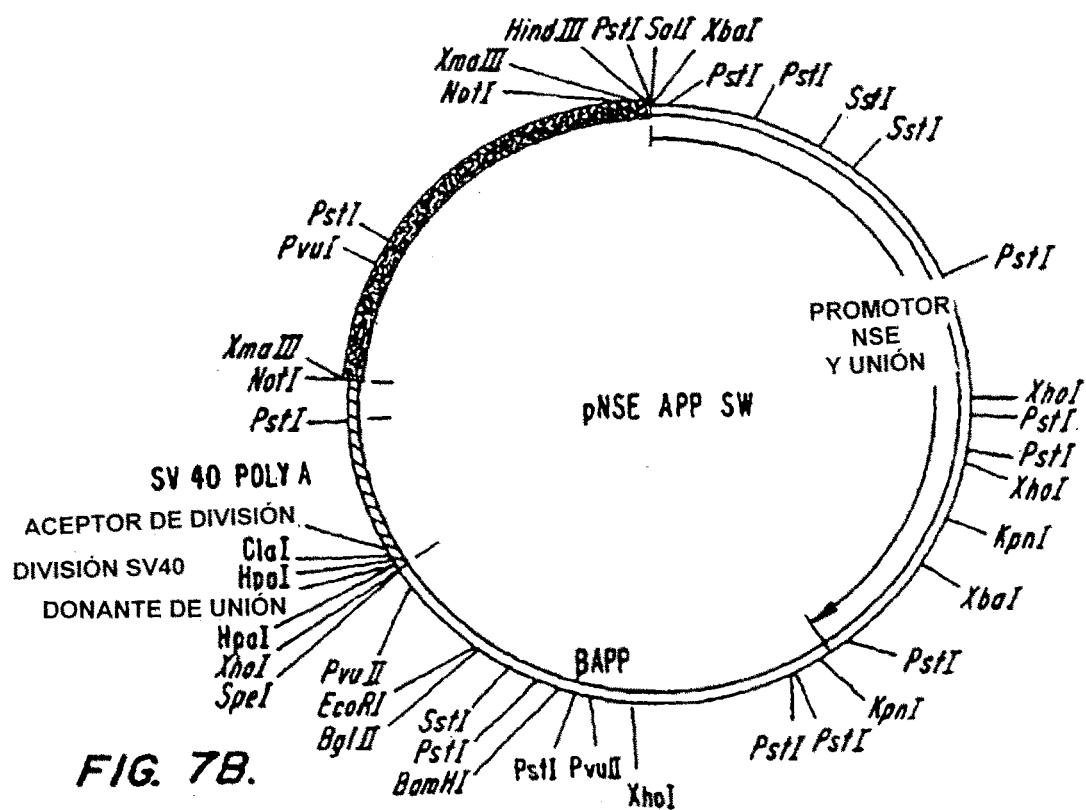


FIG. 7B.

FIG. 8

1 2 3

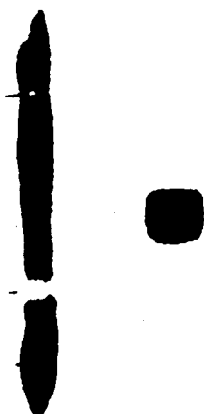
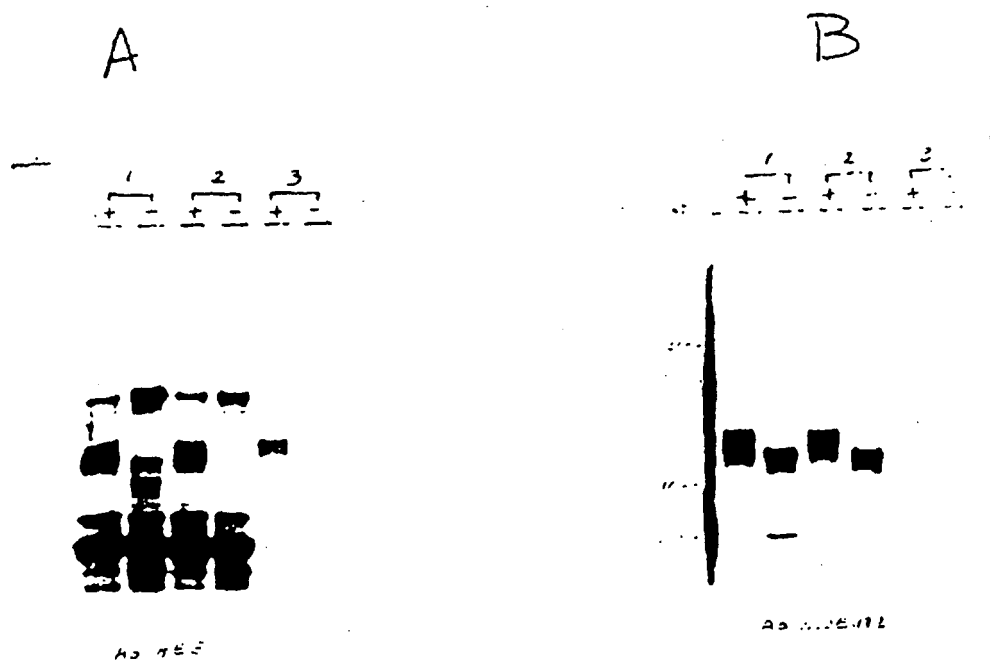


FIG. 9



ES 2 206 470 T5

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE: ATHENA NEUROSCIENCES, INC.

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Procedimientos de detección de inhibidores de la producción de péptidos beta-amiloides

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 12

(iv) DIRECCIÓN CORRESPONDENCIA:

(A) DIRECCIÓN: Townsend and Townsend Khourie and Crew

(B) CALLE: One Market Plaza, Steuart Tower, Ste. 2000

(C) CIUDAD: San Francisco

(D) ESTADO: California

(E) PAÍS: USA

(F) ZIP: 94105

(v) MEDIO LEGIBLE POR ORDENADOR

(A) TIPO DE MEDIO: Disquete

(B) ORDENADOR: PC compatible IBM

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión # 1.25

(vi) FECHA DE SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/143.697

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 27-OCT-1993

(C) CLASIFICACIÓN:

(vii) FECHA DE SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 07/965.971

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 26-OCT-1992

(viii) FECHA DE SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 07/868.949

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 15-ABR-1992

(ix) DATOS DE ABOGADO/AGENTE DE INFORMACIÓN:

(A) NOMBRE: Heslin, James M.

(B) NÚMERO DE REGISTRO: 29.541

(C) REFERENCIA/NÚMERO DE DOCUMENTO: 15270-4-2PC

(ix) INFORMACIÓN DE CONTACTO:

(A) TELÉFONO: 415-326-2400

(B) FAX: 415-326-2422

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID n°: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 16 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO FILAMENTO: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: péptido

ES 2 206 470 T5

(xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIA: SEC ID nº 1

		Gly	Ser	Gly	Leu	Thr	Asn	Ile	Lys	Thr	Glu	Glu	Ile	Ser	Glu	Val
5	Lys	1				5					10				15	

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 2:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

15 (C) TIPO FILAMENTO: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: péptido

20 (xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIA: SEC ID nº 2

		Tyr	Ser	Gly	Leu	Thr	Asn	Ile	Lys	Thr	Glu	Glu	Ile	Ser	Glu	Val
25	Lys	1				5					10				15	

Met

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 3:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

35 (C) TIPO FILAMENTO: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: péptido

40 (xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIA: SEC ID nº 3:

		Ile	Ser	Glu	Val	Lys	Met
		1				5	

45 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 8 aminoácidos

50 (B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO FILAMENTO: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

55 (ii) TIPO MOLECULAR: AND (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIA: SEC ID nº 4:

		Glu	Ile	Ser	Glu	Val	Lys	Met	Asp
60		1				5			

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 5:

65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 7 aminoácidos

ES 2 206 470 T5

- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO FILAMENTO: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 5
- (ii) TIPO MOLECULAR: ADN (genómico)
 - (xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIA: SEC ID nº 5:

10

	Cys	Ile	Ser	Glu	Val	Lys	Met
	1				5		

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 6:

- 15
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 7 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
- 20
- (C) TIPO FILAMENTO: simple
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO MOLECULAR: ADN (genómico)
- (xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIA: SEC ID nº 6:

25

	Tyr	Ile	Ser	Glu	Val	Lys	Met
	1				5		

30 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 7:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 5 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
- 35
- (C) TIPO FILAMENTO: simple
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 40
- (ii) TIPO MOLECULAR: péptido
 - (xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIA: SEC ID nº 7:

45

	Asp	Arg	Gly	Leu	Thr
	1				5

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 8:

- 50
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 10 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
- 55
- (C) TIPO FILAMENTO: simple
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO MOLECULAR: péptido
- (xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIA: SEC ID nº 8:

60

	Thr	Arg	Pro	Gly	Ser	Gly	Leu	Thr	Asn	Ile
	1				5					10

65 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 9:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 206 470 T5

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO FILAMENTO: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIA: SEC ID nº 9:

Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO FILAMENTO: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIA: SEC ID nº 10:

Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Asn Leu
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO FILAMENTO: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIA: SEC ID nº 11:

Ser Glu Val Asn Leu
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO FILAMENTO: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIA: SEC ID nº 12:

Cys Gly Gly Glu Ile Ser Val Asn Leu
1 5