



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 273 496**

51 Int. Cl.:

C12N 15/02 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99926899 .8**

86 Fecha de presentación : **02.07.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1092767**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.04.2001**

54

Título: **Anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a una serina proteasa y utilización de los mismos.**

30

Prioridad: **02.07.1998 JP 10-187506**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2007

73

Titular/es:
FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, Ltd.
7-10, Doshomachi 1-chome
Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-0045, JP

72

Inventor/es: **Kominami, Katsuya;**
Okui, Akira;
Mitsui, Shinichi y
Yamaguchi, Nozomi

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 273 496 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a una serina proteasa y utilización de los mismos.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención hace referencia a anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a una cierta serina proteasa, esto es, la neurosina. Asimismo se refiere a un procedimiento de producción de los mismos y a un método para diagnosticar diversas enfermedades utilizando los anticuerpos monoclonales.

Descripción de la técnica anterior

15 En general, las proteasas son biosintetizadas como precursores inactivos. Estos experimentan una hidrólisis limitada en moléculas para convertirse en proteasas de tipo activado. En tanto que las enzimas son proteasas, tienen una actividad de hidrólisis de un enlace peptídico. No obstante, sus modos de acción son variados según las clases de proteasas. Según las clases concretas de sitios catalíticos, las proteasas se dividen en serina proteasas, cisteína proteasas, aspartato proteasas, metaloproteasas y similares. Las proteasas de cada clase tienen una variedad de propiedades por ejemplo, desde las que tienen propiedades digestivas generales a las que tienen diversos dominios reguladores y una especificidad de sustrato estricta, hidrolizando de ese modo específicamente sólo proteínas características.

25 El intervalo de pH óptimo de las serina proteasas es de neutro a débilmente alcalino y, en general, muchas de ellas tienen un peso molecular de aproximadamente 30.000 o menos. Todas las proteasas de la coagulación de la sangre, la fibrinólisis y los sistemas de complemento que tienen un peso molecular grande pertenecen a las serina proteasas de tipo tripsina. Tienen muchos dominios reguladores y forman una cascada de proteasa que es de suma importancia para las reacciones del organismo.

30 Según su estructura primaria, las serina proteasas pueden ser divididas en la familia de la subtilisina y la familia de la quimotripsina. Las de la familia de la subtilisina son producidas solamente por *Bacillus subtilis*, mientras las de la familia de la quimotripsina están repartidas en los microorganismos, los animales y las plantas. His-57, Asp-102 y Ser-195 (Núms. de quimotripsina) están relacionadas en su actividad catalítica y, en general, son inactivadas por fluorofosfato de diisopropilo (DFP). Para mostrar su actividad, se requiere una tríada catalítica, en la cual la His influenciada por Asp priva a la Ser-195 de su protón para activar la Ser. Adicionalmente, se une a un sustrato para causar la polarización del grupo carbonilo, y el átomo de oxígeno forma un anión oxi. La tripsina tiene una Asn-189 en este sitio e interacciona con la carga positiva de un aminoácido alcalino tal como Lys, Arg o similar. Por otra parte, el correspondiente sitio de la quimotripsina es Ser-189, y es un aminoácido aromático tal como Tyr, Phe, Trp o similar, o también se pueden unir a este Leu o Met. En analogía con la quimotripsina, la esterasa tiene la Ser-189 e interacciona con un aminoácido no aromático tal como Ala o similar. En cuanto a otras enzimas pertenecientes a la familia de la quimotripsina, están la proteasa de *Achromobacter*, la plasmina, la medulasina, la acrosina, la proteasa V8, la catepsina G, la quimasa, la endopeptidasa específica de prolina, la proteasa A de la glándula submaxilar, XIIa, XIa, la calicreína del plasma, IXa, Xa, la α -trombina, VIIa, la proteína C, el activador del plasminógeno tisular, la uroquinasa, C1r, C1s, C2, B, D, I, la γ -seminoproteína, la calicreína tisular, los factores C y B de las células sanguíneas de *Limulus polyphemus*, las enzimas de la coagulación de la sangre y similares.

45 Recientemente, han sido determinadas las secuencias de ADNc y de aminoácidos de muchas proteasas novedosas mediante PCR utilizando cebadores oligonucleotídicos para las secuencias consenso de las serina proteasas. Según este método, han sido descubiertas proteasas novedosas por diversos investigadores tales como Yamamura y col. (Yamamura, y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 239, 386, 1997), Gschwend, y col. (Gschwend, T.P. y col., *Mol. Cell. Neurosci.*, 9, 207, 1997), Chen y col. (Chen, Z-L, y col., *J. Neurosci.*, 15, 5088, 1995) y otros.

55 En el SEC ID NUM: 3 de JP 9-149790 A se describe la neurosina como una serina proteasa novedosa. La neurosina también ha sido referida en *Biochimica et Biophysica Acta*, 1350, 11-14, 1997. La neurosina que no tiene más del 30% de identidad con las serina proteasas conocidas ha sido obtenida como resultado del reconocimiento de la actividad de la serina proteasa en un sobrenadante de cultivo de células de cáncer de colon humano COLO201 y del aislamiento de todos los genes de la serina proteasa. Por medio de esto, se proporciona un método para la producción en masa de neurosina utilizando el gen de la serina proteasa y un método para rastrear inhibidores específicos utilizando la enzima. Además, se ha demostrado que el método de rastreo es útil para rastrear medicinas para el tratamiento de diversas enfermedades.

60 En la actualidad, las funciones de la neurosina todavía son desconocidas. Sin embargo, puesto que la neurosina es expresada abundantemente en el cerebro, se supone que juega un importante papel en el mantenimiento de las funciones cerebrales. Adicionalmente, existe la posibilidad de que las funciones detalladas adicionales puedan ser elucidadas utilizando proteínas recombinantes.

65 En JP 6-62855 A se describe una serina proteasa novedosa, Zyme, y esto también es referido en *J. Biol. Chem.*, 272(40), 25135-2514, 1997. Las secuencias de ADNc y de aminoácidos de Zyme han sido determinadas mediante amplificación por PCR de secuencias consenso que tienen actividad de tipo quimotripsina para construir una genoteca

de ADNc utilizando el ARNm de cerebro de un paciente con enfermedad de Alzheimer. El ARNm que codifica Zyme es reconocido en diversos mamíferos. Adicionalmente, aunque Zyme es expresada abundantemente en el cerebro, el riñón y las glándulas salivares, en cuanto al cerebro no es expresada en cerebro fetal, sino que es expresada solamente en cerebro adulto. Adicionalmente, Zyme tiene un gen en el cromosoma 19q13.3, y se ha revelado que esta región es una parte ligada a la enfermedad de Alzheimer familiar de comienzo tardío. En tal caso, se considera que Zyme sería útil para elucidar características de enfermedades neurales tales como la Enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down.

En WO 98/11238 y EP-A10576152 se describe una proteasa novedosa, la Proteasa M (también denominada Zyme), y esto ha sido referido en *Molecular Medicine*, 2(5), 624-636, 1996. El ADNc de la proteasa M es obtenido de la línea celular 76 N epitelial mamaria humana normal y tiene una secuencia muy similar a la calicreína, el Antígeno Específico de Próstata (PSA) y la tripsina. Y, el gen de la proteasa M está presente en el cromosoma 19q13.3. La Proteasa M es considerada un marcador útil para el adenocarcinoma de mama primario y el cáncer de ovario primario debido a que, mientras está infra-regulado en la línea celular de cáncer de mama metastásico, su ARNm es fuertemente expresado en la línea celular de cáncer de mama primario, en tejido de cáncer de ovario y en línea celular de cáncer.

Aunque los orígenes de estas neurosina, Zyme y Proteasa M son diferentes, sus secuencias de ADNc y sus secuencias de aminoácidos, y adicionalmente las posiciones en la conformación del cromosoma de los genes que las codifican son completamente idénticos entre sí. Puesto que hay una gran posibilidad de que estas sustancias sean la misma sustancia, el nombre "neurosina" se utiliza aquí para hacer referencia a todas ellas. Como se ha descrito antes, esta serina proteasa ha sido encontrada por diferentes grupos de investigadores casi al mismo tiempo, y sus actividades farmacológicas han sido estudiadas. Se espera, En tal caso, que su importancia sea elucidada en diversas ocasiones en el futuro. Por ejemplo, Games y col. (Games, D. y col., *Nature*, 373, 523, 1995) y Hsiao y col. (Hsiao, K. y col., *Science*, 274, 99, 1996) tuvieron éxito en la expresión de una gran cantidad de proteína precursora β -amiloide (β APP), y la producción de ratones transgénicos en los cuales se observaba el depósito de proteína β -amiloide ($A\beta$) en 1995 y 1996, respectivamente. El papel de la serina proteasa anterior en la enfermedad de Alzheimer y similares será elucidado en el futuro.

Como se describe en JP 6-62855 A, Zyme (es decir, la neurosina) juega un importante papel en la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down. Si bien se ha propuesto que la enfermedad de Alzheimer debe ser dividida en enfermedad de Alzheimer presenil y demencia senil de tipo Alzheimer que se manifiesta en la senectud desde el punto de vista patológico, el término "enfermedad de Alzheimer" se utiliza aquí para hacer referencia a todas ellas.

Clínicamente, la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por un declinar progresivo de diversas funciones de reconocimiento y la principal observación neuropatológica consiste en encontrar estructuras anómalas tales como placa senil y cambios neurofibrilares además de degeneración y deficiencia de células nerviosas (Trojanowsky, J.Q. y col., *Current Neurology*, 16, 93, 1996). Entre ellos, mientras la placa senil también aparece en el caso del envejecimiento normal, aparece mucho más frecuentemente en el caso de la enfermedad de Alzheimer y es una observación patológica que tiene una elevada especificidad para la enfermedad. Adicionalmente, se puede decir que la β -amiloidogénesis es el asunto más importante a elucidar desde el punto de vista patológico, ya que, por ejemplo, el depósito de $A\beta$ que es un componente constitutivo de la placa senil es la observación patológica más temprana en el cerebro con enfermedad de Alzheimer, y adicionalmente se ha encontrado que la enfermedad de Alzheimer familiar que tiene una mutación puntual en el gen β APP es la precursora de $A\beta$.

En el síndrome de Down donde el 21° cromosoma que tiene β APP es una trisomía, se encuentra la misma observación patológica en cerebro que en la enfermedad de Alzheimer en todos los casos después de los treinta años. Teller y col. (Teller, J.K. y col., *Nature Med.*, 2, 93, 1996) han informado que $A\beta$ 42 soluble aumenta proporcionalmente a la edad y la densidad de la placa senil basándose en los resultados de la determinación de $A\beta$ soluble extraída de cerebros de pacientes desde fetales hasta los sesenta con síndrome de Down mediante inmunoprecipitación y transferencia western. Además, han sugerido que el incremento de $A\beta$ soluble tiene que ver con la producción excesiva de β APP y la formación de placa senil debido a que la $A\beta$ soluble se encuentra incluso en los casos de síndrome de Down juvenil en los que no se encuentra presente placa senil, mientras no se observa en un grupo de control. Adicionalmente, Tokuda y col. (Tokuda, T. y col., *Ann. Neurol.*, 41, 271, 1997) han informado que se ha encontrado un incremento significativo de $A\beta$ 1-40 y $A\beta$ 1-42 en plasma (43) en un grupo con síndrome de Down en comparación con un grupo de control. A la vista de estos hechos, existe la posibilidad de que la neurosina tenga una cierta acción sobre el síndrome de Down.

Adicionalmente, también se considera que la neurosina tiene una cierta acción sobre la demencia pugilística y la enfermedad de los cuerpos de Lewy difusos que están íntimamente relacionadas con el Alzheimer.

La placa senil es una estructura puntual que tiene de 50 a 200 μ m de diámetro que aparece principalmente en el córtex cerebral de cerebro con enfermedad de Alzheimer. La placa senil con el paso del tiempo tiene un núcleo amiloide en el centro y se observan una acumulación de axones degenerados y células de la glía reactivas cerca de ella. La $A\beta$ está polimerizada en forma de una estructura en lámina β para formar una fibra amiloide. En general, se considera que la $A\beta$ amiloide polimerizada extracelularmente es tóxica para las células nerviosas (Yankner, B.A. y col., *Science*, 250, 279, 1990; Simmons, L.K. y col., *Mol. Pharmacol.*, 45, 373, 1994). La $A\beta$ es un componente principal del núcleo amiloide que tiene un peso molecular de aproximadamente 4 kDa y está compuesta por aproximadamente 42 aminoácidos. Además de en la placa senil, se acumula en pequeños vasos sanguíneos en la meninge y el córtex para formar la angiostasis amiloide. Kang y col. (Kang y col., *Nature*, 325, 733, 1987) han demostrado que la $A\beta$ deriva

de un precursor más grande, β APP, mediante clonación basada en la información de la secuencia de aminoácidos de $A\beta$ revelada por Glenner y col. (Glenner, G.G. y Wong, C.W.; Biochem. Biophys. Res. Commun., 120, 185, 1984).

La β APP es una glicoproteína que tiene una estructura similar a la de un receptor transmembrana y que tiene un peso molecular de 120.000 a 130.000. La $A\beta$ está integrada en la región desde el dominio transmembrana al dominio extracelular de β APP. En la actualidad, se han identificado 6 clases de β APP. En cuanto a las β APP identificadas que están relacionadas con el depósito amiloide, están la β APP659 que es expresada predominantemente en el cerebro (Kang, J. y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 82, 4245, 1985), β APP751 que tiene una región de aminoácidos compuesta por 56 aminoácidos homólogos a un inhibidor de la serina proteasa de la familia Kunitz, a β APP770 que tiene una región de aminoácidos compuesta por 19 aminoácidos homólogos al antígeno MRC X-2, y similares. La β APP751 y la β APP770 son expresadas predominantemente en órganos corporales completos. Puesto que todas ellas tienen la porción $A\beta$ en el 99º aminoácido desde el extremo C, se considera que están relacionadas con la formación amiloide en el cerebro.

Si bien las funciones fisiológicas de la β APP todavía son desconocidas, se ha informado que las β APP expresadas en las superficies celulares, o las β APP solubles que son escindidas en el dominio $A\beta$ y liberadas de las células actúan extracelularmente como una molécula de adherencia celular (Schubert, D. y Behl, C., Brain Res., 629, 275, 1993), o un cierto factor de nutrimento (Saitoh, T. y col., Cell, 58, 615, 1989). Por otra parte, se supone que la β APP es llevada al extremo del axón con un flujo axónico, seguido de la expresión en la membrana sináptica, jugando de ese modo un importante papel en la formación de la sinapsis o su mantenimiento en las células nerviosas (Schubert, W. Y col., Brain Res., 563, 184, 1991).

En cuanto al metabolismo de la β APP, en general, se suponen dos vías. Esto es, una es una ruta de secreción en la cual el dominio $A\beta$ es escindido en el centro del mismo con la denominada α -secretasa y su extremo N producto es liberado fuera de las células. La otra es una ruta endosómica-lisosómica donde la β APP es incorporada a las células directamente o una vez expresada sobre las superficies celulares y, finalmente, es descompuesta en lisosomas. Aunque la región en la cual es producida la $A\beta$ durante las rutas del metabolismo de la β APP todavía es desconocida, una de las posibilidades que se puede suponer es que la $A\beta$ es cortada inmediatamente después de la incorporación de la β APP a las vesículas endocíticas y liberada fuera de las células inmediatamente (Koo, E.H. y Squazzo, S.L., J. Biol. Chem., 269, 17386, 1994).

Tras el descubrimiento de la $A\beta$, se consideró que el corte de $A\beta$ estaba causado solamente en un estado de enfermedad. No obstante, los últimos estudios han revelado que la $A\beta$ es producida fisiológicamente y está presente en estado soluble en sobrenadantes de cultivo (Haass, C. y col., Nature, 359, 322, 1992; Shoji, M. y col., Science, 258, 126, 1992) o en fluido cerebro espinal (Shoji, M., y col., Science, 258, 126, 1992; Seubert, P. y col., Nature, 359, 325, 1992). Para el corte de $A\beta$ a partir de β APP, se requieren una enzima para escindir el lado N-terminal de $A\beta$ (β -secretasa) y una enzima para escindir el lado C-terminal de $A\beta$ (γ -secretasa) (Haass, C y col., Cell, 75, 1039, 1993). Si bien estas secretasas de $A\beta$ todavía no están identificadas, recientemente, se ha revelado que la escisión con β -secretasa depende estrictamente de la secuencia de aminoácidos (Citron, M. y col., Neuron, 14, 661, 1995).

En la actualidad, por ejemplo, se ha informado que la catepsina B que es una cisteína proteasa (Tagawa, K. y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 177, 377, 1991) y la metaloproteasa que tiene un peso molecular de 105 a 120 kDa (McDermott, J.R. y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 179, 1148, 1991) son candidatos a α -secretasa. Se ha informado que la prolil endopeptidasa (Ishiura, S. y col., FEBS Lett., 260, 131, 1990) es un candidato a γ -secretasa. Se ha informado que la clipsina (Nelson, R.B. y col., J. Biol. Chem., 265, 3836, 1990) y la ingensina (Ishiura, S. y col., FEBS Lett., 357, 388, 1989) son candidatos a β -secretasa.

En estas circunstancias, se ha descubierto la neurosina como una serina proteasa novedosa que escinde el lado N-terminal de β APP entre la Met596 y el Asp597 para producir $A\beta$. Como se ha descrito antes, para realizar estudios más detallados de $A\beta$ y β APP así como de la enfermedad de Alzheimer y del síndrome de Down, se requiere esencialmente un sistema de medida de la neurosina.

Hoy en día, en general, la diagnosis clínica de la enfermedad de Alzheimer se realiza basándose en el patrón de diagnosis de DSM-III-R y NINCDS-ADRDA (Mckhann, G. y col., Neurology, 34, 939, 1994) o el patrón de diagnosis de DSM IV (American Psychiatric Association; Diagnostic and statistical manuals of mental disorders, 4ª ed., Washington DC, American Psychiatric Association, 1994). No obstante, estos patrones están condicionados por el debilitamiento de las funciones de reconocimiento que ocasiona una grave discapacidad en la vida diaria o en la vida social. De este modo, se apunta que la diagnosis es menos objetivamente científica debido a que la diagnosis puede estar influenciada por el nivel de vida social de un individuo y adicionalmente la especialidad y la experiencia del médico que diagnostique las condiciones concretas. Además, la diagnosis definitiva de la enfermedad de Alzheimer se lleva a cabo mediante análisis patohistológico y, respecto a esto, se señala la inconsistencia sustancial entre la diagnosis clínica y la diagnosis en la autopsia.

En la actualidad, se emplea la diagnosis por imágenes como medio complementario en la diagnosis clínica del Alzheimer y es posible analizar las funciones cerebrales, por ejemplo, el debilitamiento del metabolismo y la atrofia en sitios específicos tales como el hipocampo, el lóbulo parietal del córtex cerebral y similares que son específicos de la enfermedad de Alzheimer mediante PET y SPECT (Fukuyama, H. y col., J. Nucl. Med., 35, 1, 1994). Si bien es difícil analizar muchos casos mediante PET, existe un informe que muestra que se observa una disminución del

flujo de sangre desde el lóbulo parietal al lóbulo temporal en aproximadamente el 80% de los casos de enfermedad de Alzheimer basándose en los datos de SPECT de observaciones del flujo de sangre en muchos casos (Haruo HANYUU, y col., *Gazoshindan of Alzheimer's Disease*, Nippon Ronen Igaku Zasshi, 31, 683, 1994). No obstante, definir la enfermedad de Alzheimer basándose en la disminución de flujo sanguíneo desde el lóbulo parietal al lóbulo temporal es muy arriesgado y se debe observar que, en algunos casos restantes se encuentra una disminución de flujo sanguíneo en el lóbulo frontal. En cuanto a estas observaciones, para diferenciar la enfermedad de Alzheimer de la atrofia cerebral degenerativa tal como la enfermedad de Pick y la afasia progresiva así como la parálisis supranuclear progresiva, la diagnosis patológica es importante, y el único modo fiable disponible en la actualidad.

Adicionalmente, si bien las observaciones útiles que van a ser utilizadas para los tumores malignos, la angiopatía, las enfermedades con cambios metabólicos son obtenidas mediante análisis de RMS (Espectroscopia de Resonancia Magnética), se encuentran unos pocos informes con respecto a los pacientes con demencia incluyendo la enfermedad de Alzheimer. En particular, en la actualidad, no se puede detectar una observación característica de demencia mediante 1H-MRS debido al solapamiento con la observación de las encefalotrofias tales como el descenso del pico de NAA (N-acetil-aspartato) (Pettegrew, J.W. y col., *J. Neuropathol., Exp., Neurol.* 46, 419, 1987; Barany, M. y col., *Lancet*, I, 517, 1985; Smith, L. y col., *Book of Abstracts, Society of Magnetic Resonance in Medicine* 1986, Vol. 4, Berkeley, Society of Magnetic Resonance, 1836, 1986).

Además, se utiliza la diagnosis por imágenes CT-MRI. Mediante CT, se puede observar la atrofia localizada pesada en el lóbulo temporal y el lóbulo parietal, y la atrofia generalizada progresiva así como el alargamiento ventricular y la baja densidad periventricular (PVL) o el cambio de sustancia blanca alrededor del ventrículo denominada leucoaraisosis paralela a la atrofia. No obstante, las lesiones de la sustancia blanca tales como la atrofia del cerebro, la PVL y similares no son características específicas de la demencia de tipo Alzheimer. Adicionalmente, se ha informado del progreso de la atrofia del cerebro con la edad (Barron, S.A. y col., *Neurology*, 26, 1011, 1976; Zatz, L.M. y col., *AJNR*, 3, 1, 1982). Estas observaciones no se encuentran necesariamente en la demencia de tipo Alzheimer.

La MRI es muy útil porque, en particular, cada sitio del cerebro puede ser observado en cualquier plano de la imagen y puede confirmar la presencia de microangiopatía y similares que no pueden ser encontradas mediante CT de rayos X. En cuanto a la enfermedad de Alzheimer, cuando se forman imágenes en una sección axial y una sección sagital así como una sección coronal, se pueden obtener observaciones que son examinadas por CT. Primero, se ha descubierto que la atrofia del cuerpo caloso puede ser observada mediante formación de imágenes en una sección sagital de una fase temprana de la enfermedad y ha sido posible conducir la observación detallada del lóbulo temporal incluyendo el hipocampo mediante formación de imágenes en una sección coronal. Adicionalmente, en la observación del parénquima del cerebro, puede ser fácilmente diferenciada la cinerea de la sustancia blanca mediante una imagen de protón de densidad pesada. No obstante, puesto que la imagen obtenida mediante MRI varía según la intensidad del campo magnético, el funcionamiento del aparato y las condiciones de formación de imágenes, los datos numéricos obtenidos en diferentes instalaciones no pueden ser comparados entre sí excepto el cambio atrofico. Además, existe un límite para la medida de la formación de imágenes. Aunque se considera que la medida del área es más sensible que la lineal y se considera que la medida del volumen es más sensible que el área de medida, resulta difícil llevar a cabo semejante medida de manera rutinaria. Adicionalmente, el alargamiento del ventrículo puede ser reconocido en casos de demencia vascular y existen casos en los que se observa la atrofia del hipocampo tras la isquemia de la arteria basilar.

En estas circunstancias, se ha solicitado a muchos investigadores que desarrollen marcadores de diagnóstico biológico como medio para proporcionar una mejor precisión y objetividad para el diagnóstico clínico de la enfermedad de Alzheimer. Al mismo tiempo, se esperarán los siguientes papeles importantes en el futuro.

1) Sistema de evaluación objetivo del efecto de los medicamentos para tratar la enfermedad de Alzheimer.

2) Detección de la enfermedad de Alzheimer antes de encontrar un patrón de diagnosis, o se manifiesten las condiciones de la enfermedad.

Adicionalmente, los datos obtenidos en diferentes instalaciones pueden ser comparados entre sí utilizando el mismo marcador de diagnosis. Por lo tanto, se reconoce que el desarrollo de marcadores de diagnosis biológicos es el campo más importante de los campos de estudio de la enfermedad de Alzheimer y se esperan sus perspectivas de futuro.

En general, los enfoques para el desarrollo de los marcadores de diagnóstico biológico hasta ahora se dividen en aquél basado en los componentes constitutivos de los cambios patológicos característicos de la enfermedad de Alzheimer tales como el cambio de la placa senil y las neurofibrillas, y un enfoque basado en otras medidas. Entre los ejemplos del primero se incluyen la proteína tau del fluido cerebroespinal, la A β y su precursora β APP. Entre los ejemplos del último se incluyen ensayos de midriasis con fármacos colinérgicos, Apo E y otros genes relacionados con la enfermedad de Alzheimer. No obstante, no se obtienen buenos resultados.

Los autores de la presente invención esperan que, a partir de ahora, se puedan identificar diversas enfermedades cerebrales (v.g., enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, etc.) utilizando la secreción de neurosina, cuya expresión es reconocida en el cerebro, en el fluido cerebroespinal que es una muestra útil para los estudios fisiológicos del cerebro, y que se pueda utilizar la secreción de neurosina como marcador de diagnóstico biológico incluso en una fase temprana de las enfermedades del cerebro. Para esto, también es esencial el sistema de medida de la neurosina.

Como se describe en WO98/11238, la proteasa M (es decir, la neurosina) también juega un importante papel en las células cancerosas. La razón por la cual el exterminio del cáncer mediante tratamiento quirúrgico o irradiación tópica o de rayos radiactivos es difícil es la capacidad de metástasis del cáncer. Para diseminar las células tumorales sólidas en un organismo, éstas deben perder su adherencia a las células adyacentes originales, seguido de la separación del tejido original, pasando a través de otros tejidos hasta alcanzar el vaso sanguíneo o el nódulo linfático, entrando en el sistema circulatorio a través del estrato basal y la capa endotelial del vaso, dejar el sistema circulatorio en alguna parte, y sobrevivir y proliferar en un nuevo entorno. Si bien la adherencia a las células epidérmicas adyacentes se pierde cuando la expresión de la cadherina que es una molécula adhesiva intercelular del epitelio se detiene, se considera que la rotura de los tejidos depende de las enzimas proteolíticas que descomponen la matriz extracelular. En cuanto a las enzimas que descomponen la matriz, principalmente, se conocen las metaloproteasas (Rha, S.Y. y col., *Breast Cancer Research Treatment*, 43, 175, 1997) y las serina proteasas. Estas cooperan en la descomposición de las proteínas de la matriz tal como el colágeno, la laminina y la fibronectina. Entre las serinas proteasas conocidas por estar implicadas en la descomposición de la matriz, en particular, existe un activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (U-PA) (Kinojo, M. y col., *Br. J. Cancer*, 39, 15, 1979; Danl, K. y col., *Adv. Cancer Res.*, 44, 146, 1985; Nakanishi, K. y col., *Cancer*, 82, 724, 1998; Shiba, E. y col., *J. Cancer Res. Clin. Oncology*, 123, 555, 1997). El U-PA tiene el papel de un disparador específico para la reacción en cadena de descomposición de proteínas. Su diana directa es el plasminógeno. Está presente en la sangre abundantemente y es un precursor de una serina proteasa inactiva que se acumula en sitios reconstruidos de tejidos tales como sitios lesionados y tumores así como sitios inflamatorios. Además, en cuanto a las proteasas que están implicadas en la metástasis y la infiltración de los cánceres, por ejemplo, se conocen un factor tisular (Kinjo, M. y col., *Br. J. Cancer*, 39, 15, 1979), la hidrolasa de tipo lisosomal (Sloane, B.F. y col., *Cancer Res.*, 42, 980, 1982) y la colagenasa (Mignatti, P. y col., *Cell*, 47, 487, 1986).

En la actualidad, el cáncer es la primera causa de muerte en Japón y al año mueren más de 200.000 personas. En tal caso, se estudian intensamente las sustancias específicas que se pueden utilizar como marcadores para la diagnosis y la terapia o la profilaxis del cáncer. Tales sustancias son referidas como marcadores tumorales o biomarcadores relacionados con marcadores tumorales. Se utilizan para ayudar a la diagnosis antes del tratamiento del cáncer, para presunción de órganos carcinogénicos y tipos de tejidos patológicos, para controlar el efecto del tratamiento, para encontrar pronto una recurrencia, para la presunción de la prognosis, y similares. En la actualidad, los marcadores tumorales son esenciales en los análisis clínicos. Entre ellos, la alfa fetoproteína (AFP) que tiene una elevada especificidad para el carcinoma hepatocelular y el tumor del saco endodérmico (Taketa K. y col., *Tumour Biol.*, 9, 110, 1988), y el antígeno carcinoembrionario (CEA) se utilizan en todo el mundo. En el futuro, se requerirán más y más marcadores tumorales, y se desea desarrollar, por ejemplo, marcadores específicos de los órganos y marcadores específicos de las células tumorales que constituyan una diagnosis altamente fiable del cáncer.

Hasta ahora, se ha informado que la calicreína glandular humana (hK2) es una serina proteasa expresada en las células epiteliales prostáticas humanas es un marcador para el cáncer prostático. Y, la hK2 tiene una homología del 78% con la secuencia del antígeno específico prostático (PSA) y el PSA también ha sido ampliamente utilizado como marcador bioquímico del cáncer prostático (Mikolajczyk, S.D. y col., *Prostate*, 34, 44, 1998; Pannek, J. y col., *Oncology*, 11, 1273, 1997; Chu, T.M. y col., *Tumour Biology*, 18, 123, 1997; Hsieh, M. y col., *Cancer Res.*, 57, 2651, 1997). Adicionalmente, se ha informado que la hK2 es útil como marcador no solamente para el cáncer prostático sino también para el cáncer de estómago (Cho, J.Y. y col., *Cancer*, 79, 678, 1997).

Por otra parte, se ha informado que CYFRA (CYFRA 21-1) para la medición del fragmento 19 de citoqueratina en suero es útil para el cáncer de pulmón (Sugiyama, Y. y col., *Japan J. Cancer Res.*, 85, 1178, 1994). Se ha informado que el precursor del péptido de liberación de gastrina (ProGRP) es útil como marcador tumoral (Yamaguchi, K. y col., *Japan, J. Cancer Res.*, 86, 698, 1995). Por lo tanto, se espera que la combinación de CYFRA y ProGRP pueda resultar un medio muy útil en la ayuda a la diagnosis para la diagnosis temprana del cáncer de pulmón.

En particular, los marcadores tumorales se utilizan frecuentemente en la diagnosis del cáncer de ovario, debido, por ejemplo, a que el cáncer de ovario es difícil de encontrar en una fase temprana, en muchos casos se encuentra en su fase avanzada, tiene muchas variedades de tipos de tejidos, es difícil de averiguar el tipo de tejido solamente mediante diagnosis de formación de imágenes, rara vez es un tumor de ovario benigno, y se requiere diferenciarlo de un maligno. En la actualidad, por ejemplo, se utiliza CA125 que es un antígeno relacionado con una cadena de azúcar como marcador del cáncer de ovario clínicamente. No obstante, se ha revelado que el valor medio de CA125 de una persona sana disminuye con la edad o tras la menopausia. En tal caso, se requiere y se desea desarrollar un marcador que refuerce la debilidad de CA125. Además, para el cáncer de mama, por ejemplo, se utilizan CEA, TPA y CA15-3. No obstante, están lejos de ser marcadores excelentes en vista de la sensibilidad y la especificidad y son insuficientes para la diagnosis temprana.

En estas circunstancias, se ha descubierto una serina proteasa, la neurosina, que puede ser utilizada como marcador para el cáncer de mama temprano y el cáncer de ovario temprano. Como se ha descrito antes, es esencial un sistema de medida de la serina proteasa, es decir, de la neurosina, para estudios detallados adicionales del mecanismo de la metástasis y la infiltración del cáncer. Además, a partir de ahora, se espera que sea un marcador de diagnosis biológico que puede identificar el cáncer de ovario temprano y el cáncer de mama temprano, así como diagnosticarlos eficazmente. Para esto, también se desea un sistema de medida de la neurosina.

Además, aunque en WO98/11238 y EP-A1 0 576 952 se describe un anticuerpo monoclonal, de hecho, no se produce realmente ningún hibridoma ni se ha obtenido realmente ningún anticuerpo monoclonal que tenga especifici-

dad por una serina proteasa. Aunque estos documentos describen que el anticuerpo monoclonal puede ser producido mediante mecanismos conocidos, es dudoso que un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a una serina proteasa pueda ser obtenido en una etapa de rastreo de hibridomas o no.

5 **Objetos de la invención**

A la vista de las circunstancias anteriores, los autores de la presente invención han acometido la producción de un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a una serina proteasa.

10 De este modo, el principal objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a neurosina que pueda ser utilizado para medir la serina proteasa, neurosina, donde dicho anticuerpo monoclonal es producido por una cepa de Hibridoma 2B2-6 (FERM P-16843) o la cepa de Hibridoma S2E5 (FERM P-16844) descritas en la presente memoria.

15 Este objeto así como otros objetos y ventajas de la presente invención se harán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción con referencia a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

20 La Fig. 1 es un mapa génico del plásmido de expresión pSecTaq/neurosina.

La Fig. 2 ilustra la comparación de los resultados de la transferencia western del anticuerpo monoclonal de la presente invención (fotografía electroforética).

25 La Fig. 3 es una curva de calibración de una neurosina recombinante.

La Fig. 4 es un gráfico que ilustra la correlación entre las sustancias coexistentes y la densidad óptica que muestra que las sustancias coexistentes no tienen influencia sustancial sobre la determinación de la neurosina mediante un sistema ELISA.

30 La Fig. 5 ilustra la comparación de la correlación entre la transferencia western y un sistema de ELISA de especímenes de pacientes (fotografía electroforética).

35 La Fig. 6 es un patrón de electroforesis de neurosina derivada de CSF humano y aislada y purificada mediante una columna de intercambio catiónico.

La Fig. 7 ilustra los resultados de la secuenciación de aminoácidos del extremo N de la neurosina derivada de CSF humano.

40 La Fig. 8 ilustra los resultados del análisis de inmunotransferencia utilizando un tejido cerebral obtenido de un paciente neurológicamente normal. Las calles W, C, y M son los resultados obtenidos utilizando una fracción de producto homogeneizado, una fracción de citosol y una fracción de membrana, respectivamente.

45 La Fig. 9 ilustra los resultados de la inmunotinción de tejidos de cerebro con un anticuerpo anti-neurosina. A y B son aquellos obtenidos utilizando tejidos de cerebro neurológicamente normales. C-F son aquellos obtenidos utilizando tejidos de cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer.

A: Los núcleos de las células nerviosas presentes en la cinerea del lóbulo parietal y que tienen axones fueron teñidos de un modo similar a otras células.

50 B: Los núcleos de las células gliales fueron teñidos en la sustancia blanca del lóbulo parietal.

C, D: Solamente unas pocas células nerviosas del lóbulo parietal y que tenían axones fueron teñidas en el caso del cerebro con enfermedad de Alzheimer. Los núcleos y nucleolos de las células nerviosas eran manchas (mostradas por una punta de flecha). La placa senil también fue teñida con anticuerpos anti-neurosina (mostrado por una flecha).

E: Las células del cono presentes en la región CA4 del hipocampo y que tienen axones eran células neurosina positivas.

60 F: La región de cambio de neurofibrillas extracelulares presente en la región CA1 del hipocampo era neurosina positiva.

La Fig. 10 ilustra los resultados de la inmunotinción de tejidos de cerebro con anticuerpos anti-neurosina. A y B son aquellos obtenidos utilizando tejidos de cerebro neurológicamente normales. C y D son aquellos obtenidos utilizando tejidos del mesencéfalo de pacientes con enfermedad de Parkinson.

A: Muchas células nerviosas presentes en el nervio oculomotor eran neurosina positivas de un modo similar a las células gliales.

B: Algunas de las células que contenían melanina eran neurosina positivas.

C: En el cerebro con enfermedad de Alzheimer, el número de las que contenían melanina era muy escaso y un pequeño número de las células nerviosas restantes eran neurosina positivas.

La Fig. 11 es una curva patrón de un ELISA mejorado.

La Fig. 12 es el nivel de neurosina en suero determinado por el ELISA mejorado.

10 Compendio de la invención

Los autores de la presente invención han estudiado extensamente para proporcionar un método para la determinación de la neurosina que tenga una excelente especificidad y una buena sensibilidad. Como resultado se ha descubierto que un anticuerpo monoclonal como se ha descrito en la presente memoria que tiene una excelente especificidad puede ser obtenido utilizando neurosina recombinante como antígeno. De este modo, se ha completado la presente invención. La presente invención proporciona al menos un anticuerpo monoclonal como se describe en la presente memoria, que puede ser utilizado para la determinación de la neurosina en un espécimen.

Adicionalmente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer y un método de diagnosis de la misma utilizando el anticuerpo monoclonal de la presente invención. La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para diagnosticar la enfermedad de Parkinson y un método de diagnóstico de la misma.

25 Descripción detallada de la invención

Según la presente invención, se han obtenido anticuerpos monoclonales contra la neurosina producidos por dos clases de hibridomas, la cepa de células 2B2-6 y la cepa de células S2E5. Estos hibridomas han sido depositados en el National Institute of Bioscience and Human Technology (NIBH), Agency of Industrial Science & Technology of 1-1-3 Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón con los números de acceso FERM P-1684 y FERM P-16844, respectivamente, desde el 17 de Junio de 1998. Ambos anticuerpos monoclonales producidos por estos hibridomas de la cepa de células 2B2-6 y de la cepa de células S2E5 tienen el isotipo de la IgG1 para la IgG1 de la cadena H y κ para la cadena L. En la presente invención se incluyen los mutantes de cambio de clase de los anticuerpos anteriores, por ejemplo, los mutantes pertenecientes al isotipo IgG3, IgG1, IgG2b, IgG2a y otras subclases de inmunoglobulina, y tales mutantes puede ser producidos según el método de Marin y col. (Coco, Martin y col., J. Immunol. Methods, 145, 1118, 1991).

Para la producción de un anticuerpo contra la neurosina, se requiere neurosina que se va a utilizar como antígeno inmunogénico. La neurosina natural como antígeno puede ser más altamente purificada sometiendo, por ejemplo, a cromatografía de afinidad utilizando un anticuerpo policlonal. Además de la de origen natural, se puede obtener neurosina por medio de células cultivadas, células productoras de neurosina. Entre los ejemplos de las células productoras de neurosina se incluyen células derivadas de cerebro humano, células derivadas de glándulas salivares humanas, células derivadas de riñón humano, células cancerosas y similares. Estas células productoras de neurosina pueden ser cultivadas mediante un medio de cultivo y un método de cultivo conocidos en este campo de la técnica o sustancialmente los mismos. La neurosina producida en un sobrenadante de cultivo puede ser purificada, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio iónico, y/o cromatografía de afinidad utilizando un anticuerpo policlonal.

Además, se puede utilizar neurosina recombinante. Específicamente, las células huésped son transformadas mediante un vector recombinante que contiene un fragmento génico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la neurosina, seguido de cultivo del transformante resultante para producir un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos de la neurosina y de la utilización de la misma como antígeno. Se puede construir un vector recombinante que contiene ADNc de neurosina mediante mecanismos de recombinación génica convencionales, por ejemplo, inserción en un vector plasmídico. Entre los ejemplos del vector que va a ser utilizado se incluyen virus tales como el virus vaccinia, baculovirus y similares además de plásmidos y fagos.

Entre los ejemplos del huésped que se va a utilizar se incluyen procariotas tales como *E.coli*, *Bacillus subtilis* y *actinomyces*, así como eucariotas tales como diversas células, por ejemplo células animales y cepas de células asequibles comercialmente, v.g., células CHO, y adicionalmente, células vegetales y células de insecto. Entre los ejemplos del promotor que se va a utilizar para procariotas se incluyen el operón de la triptófano sintasa, el operón de la lactosa y similares. Entre los ejemplos del promotor que se va a utilizar para eucariotas se incluyen los promotores de virus, el promotor de la alcohol deshidrogenasa, el promotor de la enzima de la ruta glicolítica y similares. Además, también se pueden utilizar vectores y plásmidos asequibles comercialmente que tengan sitios de clonación múltiple, promotor, gen de resistencia, ori, terminador, sitio de unión al ribosoma y similares. Entre los genes de resistencia se incluyen los de tetraciclina, ampicilina, neomicina o similar. La neurosina así preparada puede ser convertida adicionalmente en un producto conjugado antigénico, o puede ser utilizada tal cual para inmunizar el animal mezclándolo con un coadyuvante adecuado.

De este modo, el antígeno puede ser obtenido a partir de diversas sustancias de partida, por ejemplo, materias primas productoras de antígenos tales como células cultivadas, tejido cultivado y células transformantes purificando

según un método conocido, por ejemplo, precipitación por adición de sal tal como precipitación con sulfato de amonio, filtración en gel con Sephadex o similar, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía en gel de pigmentos, electroforesis, diálisis, ultrafiltración, cromatografía de afinidad, o cromatografía líquida de alta resolución.

5 Adicionalmente, la neurosina puede ser un producto fragmentado de la misma, o un fragmento polipeptídico obtenido clonando y determinando una secuencia de ADNc de neurosina, deduciendo la secuencia de aminoácidos, seleccionando una región de la secuencia característica basada en la secuencia de aminoácidos para diseñar y polipéptido y sintetizando después el polipéptido diseñado químicamente. El fragmento puede ser anclado a diversas proteínas portadoras por medio de un agente condensante para formar productos inmunoconjugados hapteno-proteína. Esto puede ser utilizado para diseñar un anticuerpo monoclonal que pueda reconocer solamente una secuencia específica. Para facilitar la preparación de un producto conjugado inmunogénico, se puede añadir un resto cisteína o similar a un polipéptido designado de antemano.

15 Según la presente invención, se proporciona al menos un anticuerpo monoclonal como se describe en la presente memoria que se une específicamente a la neurosina. El anticuerpo monoclonal de la presente invención puede ser producido por etapas tales como la inmunización del animal con neurosina recombinante como inmunógeno, seguido de la fusión celular de las células de mieloma y las células productoras de anticuerpos, la selección y monoclonación de un hibridoma, la producción del anticuerpo monoclonal y, si fuera necesario, la recolección de ascitis. Es necesario preparar células de mieloma antes de la fusión celular. La cepa de células tumorales que va a ser utilizada antes de la fusión celular puede ser seleccionada entre aquellas que no producen inmunoglobulina.

25 Entre los ejemplos de coadyuvante que se va a utilizar junto con el antígeno se incluyen el coadyuvante completo de Freund, el coadyuvante RIBI, el coadyuvante pertussis, BCG, liposomas, hidróxido de aluminio, gel de sílice y similares. Para la inmunización de un animal, por ejemplo, se pueden utilizar ratones tales como un ratón Balb/c, un ratón F1 y similares.

30 Por otra parte, según la presente invención, es posible producir un anticuerpo policlonal contra la neurosina utilizando neurosina recombinante. El anticuerpo puede ser un antisuero. Este puede ser un anticuerpo purificado adicionalmente.

35 La fusión celular de células productoras de anticuerpo y células de mieloma se puede llevar a cabo como sigue. Las células de bazo o las células de nódulo linfático de un animal inmunizado son separadas para obtener una suspensión celular. La suspensión celular resultante y las células de mieloma se colocan en medio de cultivo MEM, DMEM o RPMI-1640 y a esto se le añade un agente promotor de la fusión tal como polietilenglicol o similar. Si fuera necesario, se añade una pequeña cantidad de dimetilsulfóxido para promover adicionalmente la fusión celular.

40 Los hibridomas así obtenidos pueden ser seleccionados utilizando un medio de cultivo tal como medio de cultivo MEM o medio de cultivo RPMI 1640 conteniendo hipoxantina, aminopterina y timidina y adicionalmente FCS. Los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas son sometidos a rastreo, por ejemplo, mediante radioinmunoanálisis, ELISA, FIA, o citometría de flujo utilizando neurosina o su péptido fragmentario como antígeno, o anticuerpo anti-ratón marcado para separar el hibridoma deseado.

45 El hibridoma así clonado es cultivado y utilizado para producir el anticuerpo monoclonal. El hibridoma puede ser cultivado en un medio de cultivo adecuado tal como medio de cultivo MEM o medio de cultivo RPMI 1640 conteniendo FCS, y el anticuerpo monoclonal deseado puede ser obtenido a partir del sobrenadante de cultivo. Para obtener una gran cantidad del anticuerpo monoclonal, el hibridoma puede ser recogido en ascitis. En este caso, cada hibridoma puede ser transplantado intraperitonealmente a un animal que tenga histocompatibilidad con el animal del cual derivan las células de mieloma y en las que proliferan, o cada hibridoma puede ser implantado en un ratón carente de sistema inmune o similar, seguido de la recolección del anticuerpo monoclonal producido en la ascitis. Se administra al animal Pristane o similar intraperitonealmente antes del trasplante de los hibridomas. El fluido de la ascitis puede ser utilizado tal cual, o puede ser purificado mediante un método convencional. Por ejemplo, puede ser purificado mediante precipitación por adición de sal tal como precipitación con sulfato de amonio, filtración en gel, electroforesis, diálisis, ultrafiltración, cromatografía de afinidad, o cromatografía de líquidos de alta resolución.

55 Entre los ejemplos de la sustancia que se va a utilizar para marcar el anticuerpo se incluyen enzimas, sustratos de enzimas, coenzimas, precursores de enzimas, apoenzimas, sustancias fluorescentes, sustancias pigmentadas, compuestos luminiscentes químicos, sustancias luminosas, sustancias productoras de color, sustancias magnéticas, partículas metálicas, sustancias radiactivas y similares. Para el marcaje del anticuerpo, por ejemplo, se puede utilizar la reacción de un grupo tiol con un grupo maleimida, la de un grupo piridilsulfuro con un grupo tiol, o la de un grupo amino con un grupo aldehído.

65 En cuanto a las realizaciones de la presente invención, el anticuerpo de la presente invención puede ser utilizado en la inmunotinción, por ejemplo tinción de un tejido o células inmunológicamente, inmunoprecipitación, inmunotransferencia, inmunoanálisis, por ejemplo, inmunoanálisis competitivo o no competitivo, radioinmunoanálisis, ELISA, aglutinación en látex, purificación de proteínas, columna de afinidad y similares. En el caso del ELISA, se prefiere un análisis de tipo sandwich. Entre los inmunoanálisis se incluyen todos los métodos tales como los estudios inmu-

nohistológicos, la inmunotransferencia, y los métodos en los que se utilizan reacciones inmunológicas, por ejemplo, inmunoprecipitación y similares.

5 Los especímenes y las muestras a las cuales se puede aplicar el anticuerpo monoclonal de la presente invención pueden estar en cualquier forma incluyen soluciones, fluidos coloidales y muestras no fluidas. Preferiblemente, son muestras derivadas de organismos vivos tales como sangre, suero, fluido articular, fluido cerebroespinal, saliva, fluido amniótico, orina, otros fluidos corporales, fluido de cultivo celular, fluido de cultivo de tejidos, producto homogeneizado tisular, muestras de biopsias, células, tejido, tejido cerebral, línea celular derivada de cerebro, línea celular nerviosa, línea celular derivada de nervios, línea celular derivada de línea mamaria, tejido de línea mamaria, línea celular derivada de ovario, tejido de ovario, células cancerosas, tejido canceroso y similares.

10 Por consiguiente, la presente invención también proporciona semejante cepa de células de hibridoma, un inmunoenálisis y un estuche de análisis. Adicionalmente, la presente invención proporciona el anticuerpo monoclonal que reconoce la neurosina específicamente, un inmunoenálisis para la detección y la determinación cuantitativa de la neurosina caracterizado por el uso de este anticuerpo y un estuche de análisis para llevar a cabo este inmunoenálisis.

15 Además, como se observa en el Ejemplo 4 más adelante, el anticuerpo monoclonal obtenido mediante la presente invención no muestra reactividad cruzada con la IgG, la albúmina y el tripsinógeno y tiene una elevada especificidad para la neurosina. De ese modo, es muy útil para la detección y determinación cuantitativa de la neurosina.

20 Adicionalmente, como se observa en el Ejemplo 5 más adelante, el anticuerpo monoclonal de la presente invención tiene inmunorreactividad no solamente con la neurosina de tipo maduro sino también con su forma pro. En general, tras la traducción, las proteínas experimentan diversas clases de maduración para producir proteínas de tipo activo. Primero, muchas proteínas secretoras son sintetizadas en los ribosomas en una célula en forma de proteínas de tipo precursor inactivo (forma pro). Semejante forma pro inactiva tiene un péptido (señal de secreción) que está implicado en la secreción y está compuesto, normalmente, por aproximadamente 15 a 60 restos aminoácido en el extremo N de la correspondiente proteína de tipo activo. Esta porción del péptido está relacionada con el mecanismo de paso de la proteína a través de la membrana celular y, en casi todos los casos, es escindida y separada por una enzima específica tras pasar a través de la membrana para formar la correspondiente proteína de tipo maduro. La señal de secreción tiene una amplia región hidrófoba compuesta por aminoácidos hidrófobos en el centro de la misma y también tiene un resto aminoácido alcalino en un sitio próximo a su extremo N. Adicionalmente, existe una cierta proteína que tiene una señal de secreción adicional en el extremo N de una proteína de tipo precursor inactivo (forma pro) y semejante proteína es referida como pre-pro-proteína (forma prepro).

30 Por ejemplo, la tripsina existe en forma prepro inmediatamente después de la traducción a aminoácidos y, después de la secreción desde la célula, existe en forma pro. Luego, experimenta una descomposición limitada con enteropeptidasa o la propia tripsina en el duodeno para convertirse en una tripsina de tipo activo.

35 El "término porción pro" utilizado en la presente memoria representa la porción de una forma pro de la cual se separa la correspondiente proteína de tipo activo. El término "porción pre" utilizado en la presente memoria representa la parte de una forma prepro de la cual se separa la correspondiente forma pro. El término "porción prepro" utilizado en la presente memoria representa la porción de una forma prepro de la cual se separa la correspondiente parte de la proteína de tipo activo.

40 Sin excepción, la neurosina también es traducida en la forma prepro. Después, ésta es convertida en su forma pro y la porción pro es separada para formar la neurosina activa.

45 Como se ha descrito antes, se ha encontrado que el anticuerpo monoclonal de la presente invención tiene inmunorreactividad no solamente con la neurosina de tipo maduro sino también con su forma pro. Esto es, se ha descubierto que la neurosina presente en el fluido cerebroespinal está en forma pro y que el anticuerpo monoclonal obtenido por medio de la presente invención tiene inmunorreactividad no solamente con la neurosina activa recombinante sino también con la neurosina de origen natural.

50 El anticuerpo monoclonal de la presente invención puede ser utilizado para la diagnosis de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

55 Existe un informe en el que las serina proteasas del cerebro están implicadas en la fase de desarrollo, la plasticidad sináptica y las enfermedades neurológicas incluyendo la enfermedad de Alzheimer. Recientemente, Davies y col. han informado que el activador del plasminógeno tisular (RNK-Met-1) así como BSP1 y BSP2 que son serina proteasas del cerebro son altamente expresadas a partir de hipocampo de cerebro de rata (Davies, B.J. y col., J. Biol. Chem., 273, 23004-23011, 1998). BSP1 y BSP2 son proteasas de tipo tripsina novedosas y BSP1 ha sido definida como neuropsina (Chen, Z.-L. y col., J. Neurosci., 15, 5083-5097, 1995).

60 Recientemente, ha sido clonada una serina proteasa de tipo tripsina novedosa altamente expresada en cerebro y definida como neurosina (Yamashiro, K. y col., Biochem. Biophys. Acta, 1350, 11-14, 1997). La neurosina está compuesta por 244 aminoácidos y es similar a la familia de las serina proteasas. Adicionalmente, la neurosina tiene una homología del 28,4% con el tripsinógeno humano 1, un 26,3% de homología con el tripsinógeno humano 2, un 22,9% de homología con la calicreína humana, un 13,8% de homología con el factor X humano y un 12,5% de

homología con el quimotripsinógeno humano. No obstante, no escinde sustratos para la trombina, la quimotripsina y la plasmina. A la vista de esto, se considera que la neurosina juega un papel de tipo tripsina en el cerebro.

Adicionalmente, como se muestra en los Ejemplos 6 y 7 más adelante, como resultado de la inmunotinción de una porción de tejido cerebral con el anticuerpo monoclonal de la presente invención, todos los núcleos presentes en el cerebro fueron teñidos. Además, en cuanto a las células nerviosas, sus citoplasmas nerviosos, sus núcleos de células nerviosas y sus axones fueron teñidos. Por el contrario, los axones presentes en un sitio del cerebro con los trastornos de un paciente con enfermedad de Alzheimer fueron escasamente teñidos. La presencia de la neurosina fue confirmada en la placa senil, la región de intercambio de la neurofibrilla extracelular y los cuerpos de Lewy. A la vista de esto, se considera que la neurosina está implicada en la descomposición de las proteínas tal como el β -amiloide.

Además, según la presente invención, se ha demostrado que la neurosina está presente en diversas clases de células cerebrales.

En contraste con las células de la glia donde la neurosina está específicamente presente en sus núcleos, en cuanto a las células nerviosas, el citoplasma, los núcleos, los nucleolos y sus axones son neurosina positivos. La neurosina está escasamente contenida en las células nerviosas de un sitio con trastornos de un paciente con enfermedad de Alzheimer. En el cerebro con enfermedad de Alzheimer, la neurosina está presente en diversas placas seniles y en la región de cambio de las neurofibrillas.

Las proteínas precursoras amiloides (APP) se dividen en tres tipos (APP695, APP751 y APP770) según el número de aminoácidos. APP751 y APP770 contienen 56 aminoácidos que tienen funciones de inhibidor de serina proteasa de tipo Kunitz (KPI). Recientemente, Moir y col. han informado que el cerebro de un paciente con enfermedad de Alzheimer tiene una razón significativamente superior de especies de APP incluyendo KPI en comparación con un cerebro normal (Moir, R.D. y col., *J. Biol. Chem.*, 273, 5013-5019, 1988). Ellos han sugerido que, en la enfermedad de Alzheimer tardía, un incremento de estos productos formadores de amiloide está implicado en la precipitación del amiloide.

La isoforma secretada que contiene el dominio KPI es la misma que la proteasa nexina 2 (PN-2). Se sabe que la PN-2 es un inhibidor de las serina proteasas tales como la tripsina (Kitaguchi, N. y col., *Nature*, 331, 530-532, 1988; Sinha, S. y col., *J. Biol. Chem.*, 265, 8983-8985, 1990), la Quimotripsina (Kitaguchi, N. y col., *Nature*, 331, 530-532, 1988, Sinha, S. y col., *J. Biol. Chem.*, 265, 8983-8985, 1990), el Factor IXa (Schamaier, A.H. y col., *J. Clin. Invest.*, 92, 2540-2543, 1993), Xa (Mahdi, F. y col., *J. Biol. Chem.*, 270, 23468-23474, 1995) y XIa (Van Nostrand, W.E. y col., *J. Biol. Chem.*, 265, 9591-9594, 1990). Existen informes que muestran que la tripsina (Smith, M.A. y col., *Mol. Chem. Neuropathol.*, 27, 145-154, 1996; Wiegand, U. y col., *Gene*, 136, 167-175, 1993), el Factor Xa (Haas, C. y col., *Bioch. Biophys. Acta*, 1343, 85-94, 1997), XIa (Saportito-Irwin, S.M. y col., *J. Biol. Chem.*, 270, 26265-26269, 1995), otras serina proteasas y trombina (Igarashi, K. y col., *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 185, 1000-1004, 1992), y una enzima de tipo quimotripsina novedosa (Little, S.P. y col., *J. Biol. Chem.*, 272, 25135-25142, 1998) son enzimas implicadas en la maduración de la APP. Adicionalmente, se ha demostrado que la trombina (Akiyama, H. y col., *Neurosci. Lett.*, 146, 142-154, 1992) y la tripsina (Smith, M.A. y col., *Mol. Chem. Neuropathol.*, 27, 145-154, 1996) están localizadas en el sitio con el β -amiloide precipitado del cerebro con enfermedad de Alzheimer.

Los autores de la presente invención han demostrado que la neurosina es una enzima implicada en la precipitación del amiloide ya que está localizada en la placa senil. Adicionalmente, existe un informe acerca de que la APP se une a una membrana y es escindida con una secretasa (Roberts, S.B. y col., *J. Biol. Chem.*, 269, 3111-3116, 1994; Vassilacopoulou, D. y col., *J. Neurochem.*, 64, 2140-2146, 1995). Se considera que la neurosina está implicada en la maduración de la APP ya que también está presente en una fracción de membrana. Se considera que la neurosina es secretada desde los nervios y juega cierto papel en la proteólisis de la estructura del tejido patológico ya que el cambio de las neurofibrillas extracelulares es teñido por el anticuerpo anti-neurosina. Ya se ha informado que la tripsina está presente en una región de cambio de neurofibrillas (Smith, M.A. y col., *Mol. Chem. Neuropathol.*, 27, 145-154, 1996). Existe la posibilidad de que la neurosina tenga una función proteolítica de agregación de la estructura puesto que está presente en los cuerpos de Lewy.

Esto es, se considera que la neurosina está concentrada en la enfermedad de Alzheimer y en la enfermedad de Parkinson y, por lo tanto, es posible diagnosticar enfermedades en las cuales está implicada la neurosina detectando y determinando la cantidad expresada de neurosina.

Además, si bien los Ejemplos 6 y 7 de más adelante son sistemas experimentales que utilizan el anticuerpo monoclonal contra la neurosina, se puede esperar el mismo efecto que el de estos sistemas experimentales utilizando un sistema experimental que esté dirigido al ARNm de la neurosina. En tal caso, las enfermedades anteriores también pueden ser diagnosticadas utilizando ARNm obtenido de una muestra o espécimen.

Adicionalmente, puesto que los anticuerpos monoclonales obtenidos en la presente invención tienen diferente especificidad para la neurosina, se puede obtener una especificidad adicionalmente mejorada combinándolos, y por lo tanto la diagnosis de las enfermedades anteriores puede ser llevada a cabo con una elevada sensibilidad.

Por otra parte, cuando el anticuerpo monoclonal de la presente invención es administrado a un ser humano para la diagnosis o el tratamiento de una enfermedad relacionada con la neurosina, se puede emplear un método para

minimizar la antigenicidad contra el ser humano. Esto es, esto se puede realizar convirtiendo el anticuerpo monoclonal de la presente invención en un anticuerpo quimera o un anticuerpo humanizado según un método conocido. En el anticuerpo monoclonal de la presente invención se incluyen estos anticuerpos que disminuyen su antigenicidad contra un ser humano. En adelante, se ilustrará un método para producir el anticuerpo.

5 El término "anticuerpo quimera" representa una molécula quimera de un anticuerpo de ratón y un anticuerpo humano. Es posible producir un anticuerpo inmunizando un ser humano con cualquier antígeno desde el punto de vista ético. Después el ratón es inmunizado y la región variable del anticuerpo (región V) que se une a un antígeno es cortada de un gen del anticuerpo monoclonal de ratón, uniéndolo después a un gen de la región constante del anticuerpo (región C) derivado de un tumor de hueso humano para producir un gen quimera. Se puede producir un anticuerpo monoclonal de humano-ratón expresando el gen quimera en una célula huésped. Puesto que el anticuerpo quimera tiene menos antigenicidad contra el ser humano, puede ser utilizado como anticuerpo monoclonal para la administración a un ser humano para tratar una enfermedad o para conducir la diagnosis por imágenes. En cuanto a las técnicas relacionadas con los anticuerpos quimera conocidos, se encuentran las descritas en JP 5-304989 A, JP 4-33-295, WO91/06649, JP 63-036786 A, JP 6-98021 y similares.

No obstante, recientemente, se ha desarrollado un anticuerpo humanizado que es más útil que un anticuerpo quimera. Se obtiene un anticuerpo humanizado transplantando solamente una secuencia génica de un sitio de unión al antígeno (CDR: región determinante de la complementariedad) a una molécula de anticuerpo en un gen de anticuerpo humano (injerto CDR) para humanizar la molécula completa excepto la CDR de la molécula de anticuerpo. Puesto que la porción del anticuerpo de ratón de este anticuerpo es menor que la de un anticuerpo quimera de humano-ratón, se dice que este anticuerpo tiene menos antigenicidad y mayor seguridad que el anticuerpo quimera de humano-ratón. En Japón, en la actualidad, se realiza un ensayo clínico de anticuerpo humanizado contra la leucemia de las células T en adultos. Las solicitudes de patente dirigidas a los procedimientos de producción de anticuerpos humanizados y las técnicas relacionadas han sido presentadas por una compañía de los Estados Unidos, Genentech (WO92/22653, WO98/45332, WO94/04679, WO98/37200, WO94/04679), una compañía británica, Celltech (WO94/29451, WO94/29351, WO94/13805, WO93/06231, WO92/01059, WO91/16927, WO91/16928, WO91/09967, WO89/01974, WO89/01783), y similares.

30 Existe riesgo en la administración de un anticuerpo monoclonal de ratón debido a que el anticuerpo es una proteína foránea para el ser humano y es susceptible de ocasionar efectos secundarios. En tal caso, es deseable un anticuerpo monoclonal humano. No obstante, hasta ahora, la eficacia de la fusión era insuficiente y resultaba difícil de obtener un híbrido que produzca establemente un anticuerpo. Sin embargo, en la actualidad, un avance de la tecnología hace posible producir un anticuerpo monoclonal humano.

35 En cuanto al procedimiento de producción de un anticuerpo monoclonal humano, además de la técnica de fusión celular, existen, por ejemplo, la transformación con el virus Epstein-Barr (EBV), la fusión de las células transformadas obtenidas con dicho virus con células parentales, y un método para producir un anticuerpo quimera y un anticuerpo humanizado utilizando la ingeniería genética. Un anticuerpo quimera es un anticuerpo obtenido uniendo fragmentos de genes de inmunoglobulinas de animales de diferentes especies entre sí. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo obtenido modificando un anticuerpo heterogéneo para un ser humano tal como un anticuerpo de ratón para reemplazar su estructura primaria distinta de la CDR de la cadena H y la cadena L por la correspondiente estructura primaria de un anticuerpo humano. Cuando se utiliza la cepa SHM-D 33 (ATCC CRL 1668) o la cepa RF-S1 que es un heteromioma de ser humano/ratón como células parentales para producir un anticuerpo monoclonal humano, se puede obtener la misma elevada eficacia de fusión que cuando se utilizan células parentales de ratón. Un híbrido obtenido utilizando estas células parentales puede ser clonado sin células alimentadoras. Después, se puede producir un anticuerpo de tipo IgG de manera relativamente estable en una gran cantidad. Para cultivar las células parentales, se utiliza medio de cultivo ERDF suplementado con FCE al 15% y el otro procedimiento es el mismo que el de ratón. Además, para producir un anticuerpo monoclonal humano de tipo IgG, se prefiere utilizar linfocitos humanos recogidos de sangre periférica que sea suficientemente sensibilizada con un antígeno. Cuando los linfocitos suficientemente sensibilizados con un antígeno son difícilmente asequibles, la sensibilización con un antígeno puede ser realizada *in vitro*.

Utilizando el método anterior, el anticuerpo de la presente invención puede ser humanizado y es muy útil para la administración a un ser humano.

55 Los siguientes Ejemplos ilustran adicionalmente la presente invención con detalle pero no se debe considerar que limitan el alcance de la misma.

60 Ejemplo 1

Producción de anticuerpo monoclonal anti-neurosina

Se produjo un anticuerpo monoclonal anti-neurosina según el siguiente procedimiento.

65 (a) *Preparación de antígeno (producción de células que expresan la proteína neurosina recombinante)*

De la misma manera que se describe en JP 9-14790 A o Biochim. Biophys. Acta, 1350, 11, 1997, se preparó ARNm a partir de células COLO201, seguido de síntesis de ADNc y clonación de pSPORT/neurosina.

ES 2 273 496 T3

Se obtuvo una región de traducción de la proteína madura a partir de pSPORT/neurosina mediante PCR y ésta se introdujo en pSecTagB (fabricado por Invitrogen) para construir un plásmido de expresión. Primero, las secuencias reconocidas por la enzima de restricción BamHI fueron añadidas a los extremos 5' y 3' de la región de traducción de la neurosina para preparar cebadores. Estos se muestran por medio de los SEC ID NO: 1 y 2.

SEC ID NO: 1: CGCGGATCCTTGGTGCATGGCGGACCC
SEC ID NO: 2: CGCGGATCCTCACTTGGCCTGAATGGT

La amplificación mediante PCR se llevó a cabo utilizando estos cebadores y pSPORT/neurosina como molde para obtener una secuencia de reconocimiento BamHI añadida a la región traducida de la neurosina. Este producto de la PCR y pSecTagB fueron digeridos con la enzima de restricción BamHI y ligados utilizando un estuche de ligadura Ver. 1 (fabricado por Takara) para la transformación en *E. coli* JM109 (fabricado por Takara). Entre las colonias transformadas, se confirmó mediante PCR una colonia que contenía el gen de la neurosina para obtener un plásmido de expresión pSecTag/neurosina. Este mapa génico se muestra en la Fig. 1.

Se produjo una proteína neurosina recombinante utilizando el plásmido pSecTag/neurosina expresado y las células CHO. Las células CHO (1×10^6 células) fueron sembradas en una placa de cultivo de 10 cm de diámetro (fabricada por Corning). Al día siguiente, las células fueron enjuagadas con Opti-MEM® (Medio Esencial Mínimo, 5 ml) (fabricado por GIBCO), seguido de la adición de Opti-MEM® de nueva aportación (5 ml) y cultivo a 37°C durante 2 horas. Después, se añadieron pSecTag/neurosina (1 µg) y Lipofectamine® (fabricado por GIBCO BRL) (10 µl) al sobrenadante de cultivo y el sobrenadante se cultivó a 37°C durante 6 horas. Tras el cultivo, las células fueron lavadas con α-MEM al que se había añadido suero bovino fetal al 10% y fueron cultivadas en un matraz en forma de T de 25 cm². Tras la introducción del gen, se añadió al medio Zeosin® (fabricado por Invitrogen) y se seleccionaron mediante selección con fármaco solamente las células en las que se había introducido el plásmido. El medio se cambió dos veces a la semana y el cultivo continuó hasta que las células se volvieron confluentes. Las células cultivadas de este modo hasta la confluencia fueron liberadas del matraz y subcultivadas.

Las células que expresaban la neurosina obtenidas de este modo fueron cultivadas en medio libre de suero y se obtuvo neurosina recombinante del sobrenadante de cultivo. Después, el sobrenadante de cultivo se centrifugó a 1.500 rpm durante 15 minutos, se sometió a diálisis utilizando tampón MES (Dozin), y se hizo pasar a través de dos resinas de intercambio iónico (Hitrap-SP® y Mono-S® fabricadas por Pharmacia) equilibradas con el mismo tampón. A continuación, se purificó haciéndolo pasar a través de una columna de filtración en gel (Sephacril S-200® fabricada por Pharmacia) con PBS (Solución Salina Tamponada con Fosfato) para obtener una solución de antígeno.

Por ejemplo, en caso de utilizar otro vector que no tenga señal de secreción, las células son precipitadas con PBS conteniendo Triton-X 100® o Tween-20® y las células precipitadas son desorganizadas para obtener neurosina recombinante. Alternativamente, las células son desorganizadas químicamente, por ejemplo con un homogeneizador o un sonicator para obtener neurosina recombinante. También se puede utilizar un sobrenadante de una fracción soluble que se purifica mediante el método anterior después de la centrifugación de las células desorganizadas.

Además, se construye un plásmido de expresión, pdKCR/Trp59, según el método descrito en JP 9-14790 A o Biochim. Biophys. Acta, 1350, 11, 1997 y las células CHO son transformadas mediante la introducción del plásmido en ellas. Las células CHO transformadas son cultivadas según el método descrito antes y la neurosina recombinante es purificada del sobrenadante de cultivo. Esto también puede ser utilizado como solución de antígeno.

Adicionalmente, se puede purificar la neurosina de origen natural de un sobrenadante de cultivo (10 litros) de una cepa celular cultivada de elevada producción de proteína libre de neurosina natural, HPC-Y3, mediante filtración en gel, columna de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, electroforesis en acrilamida preparativa y similares. Esto también puede ser utilizado como inmunógeno.

(b) Inmunización

La solución de antígeno para la inmunización preparada en el apartado (a) anterior fue mezclada con coadyuvante completo de Freund (fabricado por DIFCO) en una proporción 1:1 y la mezcla fue emulsionada. La emulsión fue inyectada subcutáneamente en cinco ratones Balb/C hembra (8 semanas de edad, aproximadamente 100 µg/ratón de proteína neurosina). Después, se llevó a cabo una inmunización de refuerzo (aproximadamente 100 µg/ratón de proteína neurosina) tres veces a intervalos de aproximadamente 2 semanas mediante inyección subcutánea de una mezcla emulsionada de la solución de antígeno para inmunización y coadyuvante de Freund incompleto (fabricado por DIFCO) en una proporción 1:1. Tres días después del tercer refuerzo, se recogió una muestra de sangre de la vena de la cola y el título de anticuerpo en el suero fue medido mediante ELISA después de eso. Dos semanas después del tercer refuerzo, se administró una solución de la solución de antígeno para inmunización en solución salina (aproximadamente 100 µg/ratón de proteína neurosina) al ratón intraperitonealmente. Tres días después de la administración, las células de bazo fueron preparadas a partir de los ratones inmunizados para utilizarlas en la fusión celular más adelante.

ES 2 273 496 T3

(c) ELISA (método en fase sólida directa)

Una solución de proteína neurosina preparada de la misma manera que la preparación del antígeno de inmunización fue ajustada a 5 µg/ml con PBS y la solución (50 µl/pocillo) fue adsorbida mediante una placa de ELISA durante 2 horas. La placa fue bloqueada diluyendo cuatro veces con Blockace® (fabricado por Snow Brand Milk Products) en PBS. Tras lavar la placa, se añadió el suero obtenido en el apartado (b) anterior diluido 5.000 veces (50 µl/pocillo) del suero obtenido en el apartado (b) anterior en un tampón de dilución de suero (PBS conteniendo FBS al 5%) a cada pocillo de la placa y se hizo reaccionar a la temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar la placa, se añadió a cada pocillo de la placa anticuerpo IgG de ratón marcado con fosfatasa alcalina (fabricada por ICN/Cappel) diluido 2.000 veces (50 µl/pocillo) y se hizo reaccionar a la temperatura ambiente durante 1 hora. Se disolvió fosfato de p-nitrofenilo disódico (tablas de sustrato de fosfatasa SIGMA 104) en una mezcla de sustrato de reacción (tampón dietanolamina al 9,6% conteniendo cloruro de magnesio 0,5 mM, pH 9,7) a una concentración de 2 mg/ml para preparar una solución de sustrato. La placa fue lavada 7 veces con agua purificada y la solución de sustrato (50 µl/pocillo) fue añadida a esta. Tras la reacción con la solución de sustrato, se añadió NaOH 3N (50 µl) para detener la reacción y se midió la absorbancia a 405 nm.

(d) Fusión celular y producción de hibridoma

Tres días después de la última inmunización, los bazo fueron extirpados de los tres ratones que mostraban un incremento en el título de anticuerpo contra la proteína neurosina como resultado del ELISA anterior y, según un método convencional, fueron preparadas las células de bazo. Las células parentales que iban a ser fusionadas eran la cepa celular SP de mieloma derivada de ratón Balb/c que se había confirmado que era una cepa carente de hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRT) de antemano mediante selección con un medio de cultivo que contenía 8-azaguanina (20 µg/ml). Se combinaron células SP2 (2 x 10⁷ células) y células de bazo (1 x 10⁸ células) y la fusión celular se llevó a cabo de la manera convencional utilizando polietilenglicol 4000 (PEG4000®, fabricado por Merck) como promotor de la fusión celular. Una vez completada la fusión celular, las células fueron suspendidas en un medio de cultivo (medio HAT) preparado añadiendo hipoxantina, aminopterina y timidina a medio Esclone® (fabricado por Sanko Pure Chemicals) a una concentración de 3,0 x 10⁸ células/ml en términos de las células de bazo, y distribuidas en una microplaca de 96 pocillos (fabricada por Corning) (100 µl/pocillo). Las células fusionadas fueron cultivadas en una incubadora con CO₂ (37°C, CO₂ al 5%) cambiando la mitad del medio cada 3 a 5 días. Solamente los hibridomas que sobrevivían en el medio fueron seleccionados y cultivados.

(e) Rastreo de hibridoma

Con respecto a los pocillos cuya formación de colonias se había confirmado, el rastreo se llevó a cabo mediante el mismo ELISA que en el apartado (c) anterior para confirmar la presencia de un anticuerpo contra la proteína neurosina en el sobrenadante de cultivo. Dos clases de placas sobre las que se habían adsorbido neurosina y tripsinógeno, respectivamente, fueron utilizadas y las colonias que reaccionaban fuertemente con la proteína neurosina fueron seleccionadas y clonadas.

(f) Rastreo de hibridomas

La clonación de los hibridomas que producían anticuerpos que se unían a la proteína neurosina fue repetida tres veces mediante dilución limitada para obtener dos clases de hibridomas, la cepa de células 2B2-6 y la cepa de célula S2E5 que producían anticuerpos que se unían específicamente a la proteína neurosina y tenían una capacidad de proliferación estable. Estos hibridomas fueron depositados en el National Institute of Bioscience and Human-Technology (NIBH), Agency of Industrial Science & Technology of 1-1-3 Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón, 17 de Junio de 1998 con los números de acceso FERM P-16843 y FERM P-16844, respectivamente.

(g) Tipaje del anticuerpo monoclonal

El isotipo fue examinado utilizando sobrenadantes de cultivo (cada uno 0,5 ml) de los dos hibridomas obtenidos antes, la cepa de células 2B2-6 y la cepa de células S2E5 con el Mouse Antibody Isotyping Kit® (fabricado por Gibco BRL). Ambos isotipos de anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas de la cepa de células 2B2-6 y la cepa de células S2E5 eran el mismo. Es decir, la cadena H era IgG1 y la cadena L era k.

(h) Preparación y purificación de anticuerpo monoclonal

Se administró pristano (0,5 ml/ratón) a ratones Balb/c hembra (8 semanas de edad) intraperitonealmente y, diez días después de la administración, se inyectaron intraperitonealmente los dos hibridomas de la cepa de células 2B2-6 y de la cepa de células S2E5 obtenidos en la clonación anterior (d) (aproximadamente 10⁷ células/0,5 ml/ratón, respectivamente). Desde aproximadamente el día 10, se observó una hipertrofia abdominal en el ratón. En tal caso, se recogió la ascitis mediante una aguja de inyección de 18G. La ascitis recogida se centrifugó a 1.000 rpm a 4°C durante 10 minutos y el sobrenadante se dejó estar a 37°C durante 30 minutos. Adicionalmente, se dejó estar a 4°C durante la noche. Tras la centrifugación a 12.000 rpm a 4°C durante 10 minutos, el sobrenadante resultante se sometió a columna de afinidad con Sepharose-Protein A® (fabricado por Pharmacia Biotech) para purificar el respectivo anticuerpo monoclonal. La absorbancia de una solución del anticuerpo fue medida a 260, 280 y 320 nm y la concentración de anticuerpo fue determinada mediante el método de Werlbug-Christian.

ES 2 273 496 T3

(i) *Transferencia Western*

La expresión de la proteína neurosina recombinante fue conformada como sigue.

5 Tras la recuperación del sobrenadante de cultivo de las respectivas células clonadas, éste se mezcló con una cantidad igual de 2 x tampón de carga SDS (fabricado por Daiichi Kagaku) y la mezcla se calentó en un baño hirviendo durante 5 minutos. Esto se utilizó como solución de muestra. La solución de muestra se sometió a electroforesis sobre gel de poliacrilamida al 10-20% (fabricado por Daiichi Kagaku) utilizando un aparato de electroforesis SDS (fabricado por Daiichi Kagaku) y tampón Tris-glicina (fabricado por Daiichi Kagaku). Por otra parte, para la transferencia, se sumergieron dos hojas de papel de filtro 3MM (fabricado por Whatman) en Tampón A (fabricado por Daiichi Kagaku), una hoja del papel de filtro se sumergió en tampón B (fabricado por Daiichi Kagaku) y tres hojas de papel de filtro se sumergieron en Tampón C (fabricado por Daiichi Kagaku) durante la electroforesis. Adicionalmente, se sumergió una membrana de poli(fluoruro de vinilideno) (membrana PVDF, fabricada por Millipore) en metanol y después en agua para adaptarla al agua.

15 La transcripción de la proteína a la membrana de PVDF se llevó a cabo sacando el gel del aparato después de la electroforesis, y colocando 2 hojas del papel de filtro sumergido en Tampón A, una hoja de papel de filtro sumergida en Tampón B, la membrana de PVDF, el gel y 3 hojas de papel de filtro sumergido en Tampón C en un trazador (fabricado por Pharmacia) desde el lado de su cátodo en este orden y aplicando un voltaje de 8 mV durante 1,5 horas. Tras la transcripción, la membrana de PVDF fue bloqueada sacudiéndola junto con Blockace® (fabricada por Snow Brand Milk Products) a la temperatura ambiente durante 1 hora. La membrana se hizo reaccionar con una dilución de anticuerpo policlonal anti-neurosina de conejo preparado en el Ejemplo 2 más adelante con PBS al que se había añadido suero bovino fetal al 5% a 4°C durante la noche. Después, se añadió a esto anticuerpo IgG de ratón marcado con fosfatasa alcalina y, tras reaccionar a la temperatura ambiente durante 1 hora, se desarrolló color por medio de una solución de NBT-BCIP para confirmar la expresión de la proteína neurosina recombinante en el sobrenadante de cultivo.

Ejemplo 2

Producción de anticuerpo policlonal anti-neurosina

30

(a) *Inmunización*

La proteína neurosina purificada producida mediante mecanismos recombinantes de genes (100 µg) se mezcló con coadyuvante completo de Freund, y se llevó a cabo la inmunización inicial con la mezcla. Después, se llevó a cabo la inmunización de refuerzo a intervalos de 2 semanas según el mismo método de inmunización. En total, se llevaron a cabo cuatro inmunizaciones de refuerzo.

35

(b) *Purificación de antisuero*

40 Se purificaron los anti-sueros de conejo obtenidos de los conejos inmunizados antes mediante columna de afinidad con Sepharose-Protein A® (fabricada por Pharmacia Biotech) para obtener una fracción de IgG.

(c) *Preparación de una columna de antígeno de neurosina y purificación de anticuerpo*

45 Una resina portadora de afinidad activada que había sido embebida con agua (0,3 g, FMP: tolueno-4-sulfonato de 2-fluoro-1-metilpiridinio, fabricado por Seikagaku Kogyo) se cargó en una columna y se lavó con agua purificada (10 ml). La proteína neurosina purificada obtenida mediante mecanismos de recombinación de genes (10 µg) se disolvió en un tampón de acoplamiento (tampón carbonato de sodio-bicarbonato de sodio 50 mM, pH 8,5). El antígeno disuelto en el tampón de acoplamiento se cargó en la columna y ambos extremos de la columna fueron sellados con películas de parafina. La columna fue invertida y mezclada a 4°C durante la noche. Después, la columna fue lavada con tampón de acoplamiento (5 ml). Adicionalmente, la columna fue lavada con tampón de bloqueo (20 ml) y el tampón de bloqueo (10 ml) fue añadido a la columna. Ambos extremos de la columna fueron sellados con películas de parafina y la columna fue invertida y mezclada a la temperatura ambiente durante 3 horas. Después, la columna fue lavada con agua purificada (20 ml), Gly-HCl 1M (pH 2,5, 20 ml) y después agua purificada (20 ml). La fracción de IgG purificada en el apartado (b) anterior fue purificada mediante esta columna de antígeno de neurosina según la manera convencional.

55

Ejemplo 3

Desarrollo del sistema ELISA utilizando anticuerpo anti-neurosina

60 El anticuerpo monoclonal obtenido en el Ejemplo 1 fue diluido con PBS a una concentración de 5 µg/ml. Cada porción de 100 µl del mismo se añadió a cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos (fabricada por Corning) y se hizo reaccionar a la temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar 5 veces con agua purificada, la placa fue bloqueada con Blockace® diluido 4 veces (fabricado por Snow Brand Milk Products) en PBS (300 µl). La solución de bloqueo fue descartada, y cada una de las porciones de 100 µl de proteína neurosina purificada producida mediante mecanismos de recombinación de genes y diluida con PBS a una concentración adecuada (0 a 1.000 ng/ml) fue añadida a esto, seguido de reacción a la temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar 5 veces con agua purificada, el

65

ES 2 273 496 T3

antisuero de conejo obtenido en el Ejemplo 2 fue diluido con un tampón de dilución de suero (PBS conteniendo FBS al 5%) a una concentración de 5 ng/ml y cada porción de 100 μ l de la dilución fue añadida a cada pocillo y la reacción fue llevada a cabo a la temperatura ambiente durante 2 horas. La placa fue lavada y después cada porción de 100 μ l de anticuerpo IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina diluido 2.000 veces (fabricado por ICN/Cappl) fue añadida a esto, seguido de reacción a la temperatura ambiente durante 1 hora. Se preparó una solución de sustrato disolviendo fosfato de p-nitrofenilo disódico (tabletas de sustrato de fosfatasa SIGMA 104) en una solución de reacción de sustrato (tampón dietanolamina al 9,6% conteniendo cloruro de magnesio 0,5 mM, pH 9,7) a una concentración de 2 mg/ml. La placa fue lavada 7 veces con agua purificada y la solución de sustrato (100 μ l/pocillo) fue añadida a esto. Tras la reacción con la solución de sustrato durante 30 minutos, se añadió a esto NaOH 3 N (100 μ l) para detener la reacción y la absorbancia fue medida a 405 nm.

(b) *Influencia de las sustancias co-existentes en el inmunoanálisis con enzima sandwich*

Se examinaron la influencia de la albúmina humana, la inmunoglobulina humana (IgG) y el tripsinógeno.

De la misma manera que se ha descrito con respecto al ELISA anterior, se llevó a cabo el mismo análisis excepto que, cuando la reacción con el antígeno se llevaba a cabo, a la proteína neurosina (200 ng/ml, 50 μ l) se le añadían albúmina humana a una concentración adecuada (0 a 2.000 μ g/ml), inmunoglobulina humana (IgG) a una concentración adecuada (0 a 20.000 μ g/ml) y tripsinógeno a una concentración adecuada (0 a 40 μ g/ml), respectivamente.

Ejemplo 4

Medida de especímenes de pacientes

(a) *Especificidad de anticuerpo monoclonal*

Para estudiar la reactividad específica de los anticuerpos monoclonales establecidos mediante la presente invención, 2B2-6 y S2E5 para neurosina, se llevó a cabo una transferencia western. Los resultados se muestran en la Fig. 2 (patrón de electroforesis). Estos resultados muestran que 2B2-6 y S2E5 reconocen la neurosina recombinante. Adicionalmente, se ha descubierto que 2B2-6 y S2E5 son específicos para la neurosina debido a que no se unen al tripsinógeno que tiene una elevada homología con la neurosina. Además, al mismo tiempo, se hicieron reaccionar un sobrenadante de cultivo de una cepa de células de cáncer de páncreas de origen natural HPC-Y3 y adicionalmente fluido cerebroespinal (CSF) desde el punto de vista de una posible diferencia entre la neurosina recombinante y la de origen natural. Como resultado, se confirmaron bandas que tenían el mismo tamaño.

(b) *Preparación de la curva de calibración*

Si bien se puede preparar una curva de calibración de ELISA por medio del anticuerpo monoclonal establecido, primero, se preparó una curva de calibración de neurosina recombinante para el control positivo. Cuando la curva de calibración es correcta, se puede obtener una curva sigmoidea. Los resultados se muestran en la Fig. 3. En la Fig. 3, la abscisa representa la concentración de neurosina (ng/ml) y la ordenada representa la densidad óptica (a 405 nm). Como se observa a partir de los resultados, se obtenía una curva sigmoidea en el intervalo de concentración de neurosina de 5 a 1.000 ng/ml y se obtenía linealidad en el intervalo de 10 a 500 ng/ml. Es decir, se puede determinar un espécimen cuantitativamente dentro de este intervalo. Adicionalmente, se puede mejorar la sensibilidad mediante la adición de una cantidad adecuada de BSA (v.g., 5 μ g/ml).

(c) *Estudio de la influencia de sustancias co-existentes*

En el ELISA para determinar muestras humanas, existen muchas sustancias co-existentes que influyen sobre la reacción antígeno-anticuerpo. En tal caso, la influencia de las sustancias co-existente sobre el análisis de la presente invención utilizando un sistema de ELISA fue estudiada utilizando el método descrito en el Ejemplo 3 anterior. Entre las proteínas, se considera que la albúmina y los anticuerpos ocasionan problemas. En tal caso, se llevó a cabo la determinación cuantitativa mezclándolos con una cierta cantidad de neurosina. Adicionalmente, aunque también se había mezclado tripsinógeno que tenía una elevada homología, no se reconocía ninguna influencia. Los resultados se muestran en las Figs. 4A a 4C. En estos dibujos, las abscisas representan la concentración (μ g/ml) de las sustancias co-existentes, la IgG, la albúmina y el tripsinógeno, respectivamente. Las ordenadas representan la densidad óptica (a 405 nm). Como se observa a partir de estos resultados, se puede entender que se puede determinar la cantidad precisa de neurosina sin la influencia sustancial de las sustancias co-existentes mediante el método de análisis de la presente invención utilizando un sistema de ELISA.

(d) *Determinación de neurosina en CSF*

Especímenes de fluido cerebroespinal (CFS) obtenidos de pacientes con diversas enfermedades incluyendo enfermedad de Alzheimer fueron realmente comparados entre sí mediante transferencia western y ELISA. En el ELISA, los especímenes de CSF fueron diluidos 1/10.

Los resultados se muestran en la Fig. 5 (patrón de electroforesis). Como se observa a partir de los resultados, se obtienen los mismos resultados mediante transferencia western y ELISA. Adicionalmente, se encuentra variación en

las cantidades de neurosina en los especímenes de los pacientes. Por lo tanto, es posible probar la relación con cada enfermedad determinando la cantidad de neurosina.

Ejemplo 5

5

Purificación de neurosina en CSF

(a) Preparación de la columna de anticuerpo

10 El anticuerpo (S2E5, 10 mg) purificado mediante una columna de Protein A fue sometido a diálisis con hidrogeno-
carbonato de sodio 0,2 M conteniendo cloruro de sodio 0,5 M (pH 8,3). El anticuerpo sometido a diálisis fue añadido
a una columna de Sepharose High Performer® activada con NHS (Pharmacia) activada de antemano con ácido clor-
hídrico 1 mM y la reacción se llevó a cabo a la temperatura ambiente durante 3 horas. La columna fue lavada con un
volumen diluido 6 veces de una solución de lavado A (solución de etanolamina 0,5 M conteniendo cloruro de sodio 0,5
15 M, pH 8,3) y adicionalmente con un volumen diluido 6 veces de una solución de lavado B (solución de ácido acético
0,1 M conteniendo cloruro de sodio 0,5 M, pH 4,0). De nuevo, la columna fue lavada con un volumen diluido 6 veces
de solución de lavado A y la columna cargada con la solución de lavado A se dejó estar a la temperatura ambiente
durante 1 hora. Después, la columna fue lavada con un volumen diluido 6 veces de solución de lavado B. El lavado
con las soluciones de lavado A y B fue repetido una vez y, finalmente, la columna fue equilibrada con PBS.

20

(b) Purificación de neurosina en CSF

Tras la centrifugación del CSF (10 ml) a 15.000 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante se sometió a diálisis con
PBS. El CSF sometido a diálisis fue aplicado a una columna de anticuerpo S2E5 que había sido equilibrada con PBS
25 de antemano. La columna se hizo eluir con tiocianato de sodio 5 M y PBS. Después, la fracción eluida se sometió a
diálisis con tampón MES 20 mM (pH 6,0). La fracción sometida a diálisis fue añadida a una columna de intercambio
catiónico (High Trap SP®, Pharmacia) que había sido equilibrada con tampón MES 20 mM (pH 6,0) de antemano.
La columna fue sometida a elución en gradiente con cloruro de sodio (0 a 0,2 M). Todas las etapas de purificación se
llevaron a cabo a 4°C.

30

(c) Electroforesis y transferencia western de la fracción eluida

La fracción eluida con cloruro de sodio fue sometida a SDS-PAGE como se muestra en el Ejemplo 1 y el gel fue
teñido mediante tinción con plata. Adicionalmente, se llevó a cabo la electroforesis y después, de la misma manera que
35 se ha descrito antes, se llevó a cabo la transferencia western, seguido de inmunotinción con el anticuerpo monoclonal
S2E5 utilizado en la columna de anticuerpo. Los resultados se muestran en la Fig. 6. Como se observa a partir de la
Fig. 6, se detectaba una única banda (A) alrededor del marcador de peso molecular de aproximadamente 30.000 por
medio de la tinción con plata. Esta banda fue encontrada en la fracción eluida con cloruro de sodio aproximadamente
0,15 M. Adicionalmente, cuando esta fracción era sometida a inmunotinción con el anticuerpo monoclonal S2E5, se
40 detectaba la misma banda (B).

(d) Análisis de la estructura primaria de la neurosina derivada de CNF purificada

La secuencia de aminoácidos N-terminal de la neurosina derivada de CSF purificada fue analizada utilizando un
secuenciador de aminoácidos (Applied Biosystems, Modelo 473A). La fracción eluida con cloruro de sodio 0,15 M
45 fue purificada mediante una columna de intercambio catiónico, concentrada y adsorbida sobre una membrana PVDF
con ProSorb® (Pharmacia) y aplicada al secuenciador de aminoácidos. Como resultado, se confirmó la secuencia de
aminoácidos del lado N-terminal. La secuencia de aminoácidos corresponde a la secuencia de aminoácidos de la forma
pro deducida de una secuencia de nucleótidos de neurosina. En tal caso, se encontró que el anticuerpo monoclonal de
50 la presente invención tiene inmunorreactividad con la forma pro de la neurosina (Fig. 7).

Ejemplo 6

Transferencia Western de tejido de cerebro

55

Con respecto a la especificidad inmunológica del anticuerpo anti-neurosina, se llevó a cabo el análisis de inmu-
notransferencia utilizando tejido de cerebro obtenido de dos cerebros normales y dos cerebros con enfermedad de
Alzheimer. Cada espécimen del lóbulo parietal fue homogeneizado con un volumen de tampón multiplicado por cinco
(Tris-HCl 20 mM (pH = 7,4), EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, leupeptina 10 µM, pepstatina 1 µM y aprotinina 0,3 µM)
60 y el producto homogeneizado fue centrifugado a 15.000 rpm a 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante fue recogido
en forma de una fracción de sol de células brutas. El producto precipitado se disolvió de nuevo en el tampón de
homogeneización para utilizarlo como fracción de membrana. Un espécimen parcial conteniendo las proteínas (50
µg) de cada fracción fue sometido a electroforesis en gel de poli(acrilamida)-SDS (gel de poli(acrilamida) al 15%) con
condiciones reductoras, seguido de transcripción sobre una membrana de nitrocelulosa utilizando tampón Tris-glicina
65 25 mM conteniendo etanol al 20% (pH = 8,3). La membrana de nitrocelulosa utilizada se pre-trató con Tris 25 mM
conteniendo NaCl 150 mM (TBS) (pH = 7,4) y polvo de leche desnatada al 5% y se hizo reaccionar con el anticuerpo
anti-neurosina (2B2-6) diluido 1/1.000 con TBS conteniendo polvo de leche desnatada al 2% a 4°C durante 18 horas.
La membrana completa se lavó con TBS conteniendo Tween 20 al 0,1% y se hizo reaccionar con anticuerpo anti-

ratón unido a fosfatasa alcalina en TBST conteniendo leche desnatada al 1% a la temperatura ambiente durante 2 horas. Después, la membrana se lavó con tampón sustrato para la fosfatasa alcalina (Tris-HCl 0,1 M conteniendo 0,33 mg/ml de nitroazul de tetrazolio (BRL), 0,44 mg/ml de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfórico (BRL), NaCl 0,1 M y MgCl₂ 50 mM).

Los resultados se muestran en la Fig. 8. Como se observa en la Fig. 8, respecto a la fracción homogeneizada (W) y a la fracción de membrana (M), se confirmó una única banda con el anticuerpo anti-neurosina, mientras no se observaba en la fracción de sol celular (c). Por lo tanto, se ha demostrado que la neurosina está presente en una fracción de membrana en el tejido cerebral.

Ejemplo 7

Inmunotinción de tejido cerebral

(a) *Preparación de tejido cerebral*

Se obtuvieron tejidos cerebrales de 7 pacientes neurológicamente normales sin enfermedad de Alzheimer, 6 pacientes con enfermedad de Alzheimer y 5 pacientes con enfermedad de Parkinson y se utilizaron en este experimento. La enfermedad de Alzheimer fue diagnosticada según el patrón del National Institute on Aging (Khachaturian, Z.S. y col., Arch. Neurol., 42, 1097-1105, 1985). La enfermedad de Parkinson fue diagnosticada según el patrón de Calne y col. (Calne, D.B. y col., Ann. Neurol., 32, S125-127, 1992). Los pacientes neurológicamente normales 3 hombres y 4 mujeres tenían de 60 a 82 años de edad. Los pacientes con enfermedad de Alzheimer dos hombres y tres mujeres tenían de 67 a 82 años de edad. Los pacientes con enfermedad de Parkinson dos hombre y tres mujeres tenían de 70 a 75 años de edad. Cada tejido cerebral fue obtenido entre las 2 y 12 horas después de la muerte del paciente.

(b) *Inmunotinción*

Se extirparon porciones de tejido de los respectivos tejidos del lóbulo parietal, hipocampo y mesencéfalo y se fijaron en un tampón fosfato conteniendo paraformaldehído al 4% durante 2 días. Después, fueron almacenados en tampón fosfato 0,1 M conteniendo sacarosa al 15% (pH = 7,4) en condiciones de baja temperatura a 4°C hasta que fueron utilizados en el experimento. Cuando se utilizaba en el experimento, cada porción de tejido fue congelada y cortada en rebanadas de 20 μm de grosor con un microtomo y teñida mediante mecanismos inmunohistológicos (McGeer, P.L. y col., Can. J. Neurol. Sci., 16, 516-526, 1989). El anticuerpo anti-neurosina (S2E5) fue diluido 1/1.000 veces y el anticuerpo primario y la porción de tejido se hicieron reaccionar a baja temperatura durante 48 horas, seguido de lavado con PBS conteniendo Triton X-100 al 0,3% (PBST). Después, se hizo reaccionar adicionalmente con complejo de avidina-biotina HRP (Vector), seguido de reacción adicional con anticuerpo IgG anti-ratón de unión a biotina (Vector) a la temperatura ambiente durante 2 horas. Tras lavar con PBST, la marca de peroxidasa fue visualizada con una solución que contenía 3,3'-diaminobenzidina al 0,001%, níquelosulfato de amonio al 0,6%, imidazol al 0,05% y H₂O₂ al 0,0003%. Cuando se observaba el desarrollo de un color púrpura oscuro, se detenía la reacción. La porción se lavaba, se montaba sobre un porta de vidrio, se deshidratava con alcohol y después se protegía con Enteran.

(c) *Resultados*

Los resultados obtenidos utilizando los tejidos de cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer se muestran en la Fig. 9 y los obtenidos con los tejidos de cerebro de pacientes con enfermedad de Parkinson se muestran en la Fig. 10.

En la tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-neurosina, todos los núcleos de las neuronas del cerebro utilizadas en el control fueron teñidas (Fig. 9). Y, los otros componentes de las neuronas tales como los nucleolos, los axones y citoplasmas también fueron teñidos (Figs. 9A y 9B). Se obtuvieron resultados similares con respecto a la tinción de los núcleos de todos los cerebros utilizados en el experimento.

En los cerebros de los pacientes con enfermedad de Alzheimer, las neuronas que tenían axones eran escasamente teñidas en la región dañada tal como el lóbulo parietal (Fig. 9C) y la región CA1 del hipocampo (Fig. 9F). Solamente los núcleos de las neuronas fueron teñidos en esta región. No obstante, todos los componentes de la neurona eran claramente teñidos en la región CA4 del hipocampo (Fig. 9E). Numerosas placas seniles fueron teñidas (Figs. 9C y 9D) y la región de cambio de las fibrillas nerviosas extracelular también era neurosina positiva (Fig. 9F). La región de cambio de las fibrillas nerviosas intracelular era neurosina negativa.

En el tejido del mesencéfalo de los pacientes con enfermedad de Parkinson, todas las neuronas del núcleo oculomotor eran neurosina positivas (Fig. 10A). En el cerebro de control, numerosas células nerviosas que contenían melanina en la nigra eran neurosina positivas (Fig. 10B). En el cerebro con enfermedad de Parkinson, apenas se observaban neuronas que eran neurosina positivas y que contenían melanina (Fig. 10C). Los cuerpos de Lewy eran neurosina positivos (Fig. 10D).

Como se observa en las Figs. 9 y 10, entre los tejidos cerebrales de los pacientes con enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y pacientes normales, los resultados de la inmunotinción con el anticuerpo anti-neurosina son diferentes entre sí. En tal caso, esta enfermedad puede ser diagnosticada por medio de un ensayo inmunohistológico.

Ejemplo 8

*Mejora del ELISA*5 (a) *ELISA mejorado (método sandwich)*

El anticuerpo monoclonal (S2E5) obtenido en el Ejemplo 1 fue diluido a 5 $\mu\text{g/ml}$ con PBS. Cada porción de 100 μl del mismo fue añadida a cada pocillo de una placa de 96 pocillos (fabricada por Corning), seguido de reacción a la temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar con PBS 5 veces, la placa fue bloqueada con Blockace®
 10 diluido 4 veces (fabricado por Snow Brand Milk Products) en PBS (300 μl). La solución de bloqueo fue descartada y, de nuevo, lavada con PBS conteniendo Tween 20® al 0,05% (PBS-T). Después, la proteína neurosina recombinante producida y purificada en el Ejemplo 1 fue diluida con PBS conteniendo BSA al 0,5% (PBS-B) hasta una concentración adecuada (0 a 1.000 ng/ml). Cada porción de 100 μl de la misma fue añadida a cada pocillo, seguido de reacción a la temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar 5 veces con PBS-T, cada porción de 100 μl del anti-
 15 suero obtenido en el Ejemplo 2 y diluido a 5 $\mu\text{g/ml}$ con PBS-B fue añadida a cada pocillo, seguido de reacción a la temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar la placa con PBS-T, cada porción de 100 μl de anticuerpo IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina diluido 5.000 veces (fabricado por Biochem) en PBS-B fue añadida a cada pocillo, seguido de reacción a la temperatura ambiente durante 1 hora. Se disolvió p-nitrofenilfosfato disódico (tabletas de sustrato de fosfatasa SIGMA 104) en una mezcla de reacción de sustrato (tampón dietanolamina al 9,6% conteniendo cloruro de magnesio 0,5 mM, pH 9,7) a una concentración de 2 mg/ml para preparar una solución de sustrato. La placa fue lavada 7 veces con PBS-T y la solución de sustrato (100 $\mu\text{l/pocillo}$) fue añadida a la placa. Tras la reacción con la solución de sustrato durante 20 minutos, se añadió NaOH 3N (100 μl) para detener la reacción y se midió la absorbancia a 405 nm.

25 La curva de ELISA patrón tras la mejora se muestra en la Fig. 11. En la Fig. 11, la abscisa representa la concentración de neurosina (ng/ml) y la ordenada representa la densidad óptica (a 405 nm). Como se observa a partir de estos resultados, se obtenía una linealidad en el intervalo de concentración de neurosina de 1 a 30 ng/ml y la sensibilidad aumentaba significativamente utilizando el ELISA mejorado anterior.

30 (b) *Medida de neurosina en suero*

Los niveles de neurosina en suero de personas normales y de pacientes (con enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y otras enfermedades diversas) fueron medidos por medio del ELISA mejorado anterior. Como resultado, se encontró que el nivel de neurosina en suero podía ser medido con una elevada sensibilidad incluso a una
 35 concentración de 80 ng/ml utilizando el sistema experimental ELISA. Como se observa a partir de la Fig. 12, de los 50 especímenes medidos, 48 especímenes apenas contenían neurosina en suero, mientras 2 especímenes tenían niveles elevados de neurosina en suero.

40 (c) *Correlación entre las diversas enfermedades y el nivel de neurosina en el CSF*

El nivel de neurosina en el CSF de un paciente fue medido mediante el ELISA anterior. Como resultado, el nivel de neurosina en CSF de un paciente con una enfermedad del sistema nervioso periférico diferente de una enfermedad del sistema nervioso central (un grupo de control para las enfermedades del sistema nervioso central) aumentaba a medida que el paciente se hacía mayor. Y, la demencia de las enfermedades del sistema nervioso central se dividió
 45 en tres grupos, es decir, demencia degenerativa, demencia vascular y demencia de tipo Alzheimer y se midieron los niveles de neurosina en su CSF. Como resultado, en el grupo de demencia degenerativa, de un modo similar al grupo de control, el nivel de neurosina en el CSF aumentaba a medida que el paciente se hacía mayor y se distribuía en la zona de concentración más elevada. Por otra parte, en el grupo de demencia vascular, no se observaba correlación entre la edad y el nivel de neurosina en el CSF. En particular, el nivel de neurosina en el CSF de un paciente con
 50 enfermedad de Alzheimer se distribuía en la zona de concentración más baja. Este resultado apoya los resultados de la inmunotinción de los tejidos.

Como se ha descrito en la presente memoria antes, según la presente invención, se proporciona el anticuerpo monoclonal que tiene especificidad para la neurosina. El anticuerpo anti-neurosina de la presente invención hace
 55 posible detectar la neurosina en una muestra (v.g., CSF).

Adicionalmente, el anticuerpo monoclonal de la presente invención no muestra reactividad cruzada alguna con IgG, albúmina, y tripsinógeno que se considera que son los contaminantes en un espécimen o muestra. En tal caso, se puede establecer que el sistema de ELISA tiene una buena sensibilidad.

60 Se puede decir que por medio de la presente invención se ha establecido una diagnosis novedosa ya que el nivel de neurosina hace referencia a diversas enfermedades.

Además, por ejemplo, las láminas de cerebro pueden ser teñidas mediante inmunotinción utilizando el anticuerpo anti-neurosina de la presente invención. En tal caso, esto hace posible analizar diversas enfermedades inmunohistológicamente.

ES 2 273 496 T3

Lista de secuencias texto libre

SEQ ID NO: 1

5 Cebador oligonucleotídico diseñado para amplificar el gen de la neurosina

SEQ ID NO: 2

10 Cebador oligonucleotídico diseñado para amplificar el gen de la neurosina

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 273 496 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal que se une selectivamente a la neurosina y/o su precursor, donde dicho anticuerpo monoclonal es producido por la cepa de Hibridoma 2B2-6 (FERM P-16843) o la cepa de Hibridoma S2E5 (FERM P-16844).
2. Un hibridoma que es la cepa de Hibridoma 2B2-6 (FERM P-16843), o la cepa de Hibridoma S2E5 (FERM P-16844).
- 10 3. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, que no muestra reactividad cruzada con IgG, albúmina y tripsinógeno.
- 15 4. Un anticuerpo contra la neurosina obtenible mejorando el anticuerpo según la reivindicación 1 o 3 de manera que disminuya su antigenicidad frente al ser humano.
- 20 5. Un método para la determinación cuantitativa de la neurosina y/o su precursor contenidos en una muestra que se va a someter a ensayo que comprende utilizar el anticuerpo según las reivindicaciones 1, 3 y/o 4.
6. El método según la reivindicación 5, donde el método es utilizado en un sistema ELISA.
7. Un método de ensayo inmunohistológico para confirmar la presencia de neurosina y/o su precursor en un tejido que comprende utilizar el anticuerpo según las reivindicaciones 1, 3 y/o 4.
- 25 8. Un método *in vitro* para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer o Parkinson que comprende utilizar el anticuerpo según las reivindicaciones 1, 3 y/o 4.
9. Un medicamento para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer o Parkinson que comprende el anticuerpo según las reivindicaciones 1, 3 y/o 4.
- 30 10. El uso del anticuerpo según las reivindicaciones 1, 3 y/o 4 en la fabricación de un medicamento para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer o Parkinson.
- 35 11. Un medicamento que comprende el anticuerpo según las reivindicaciones 1, 3 y/o 4.

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

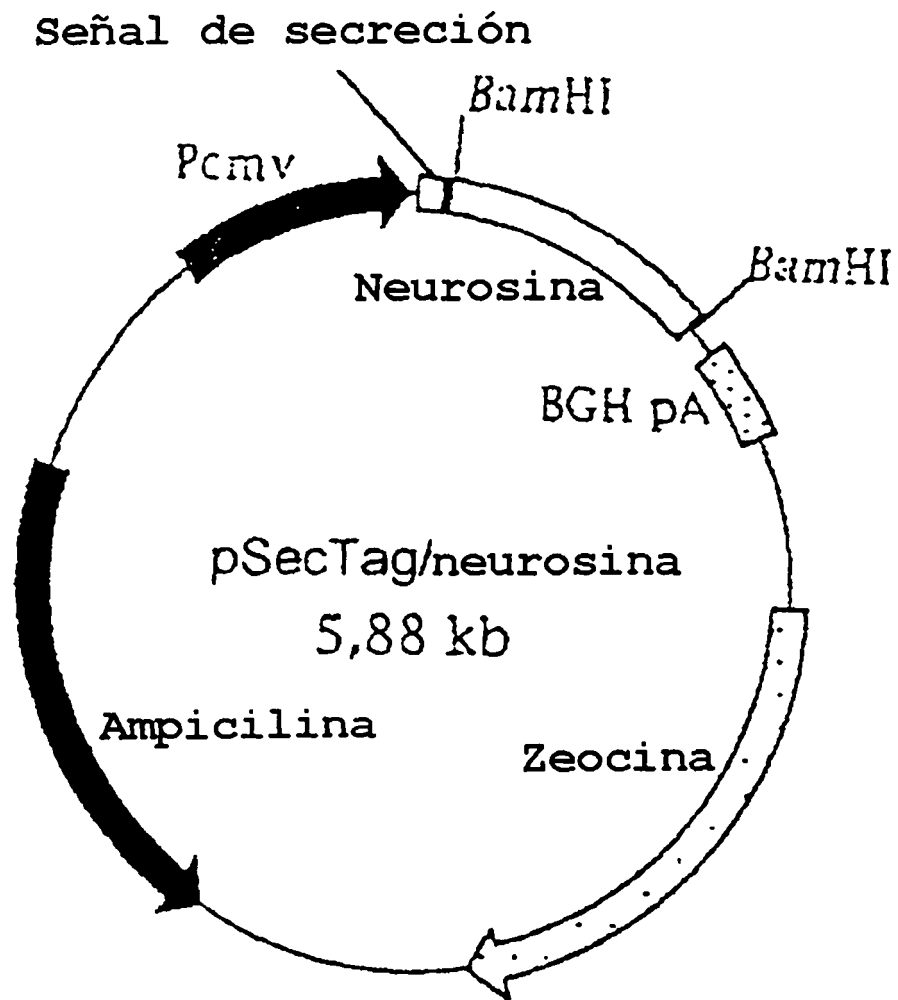
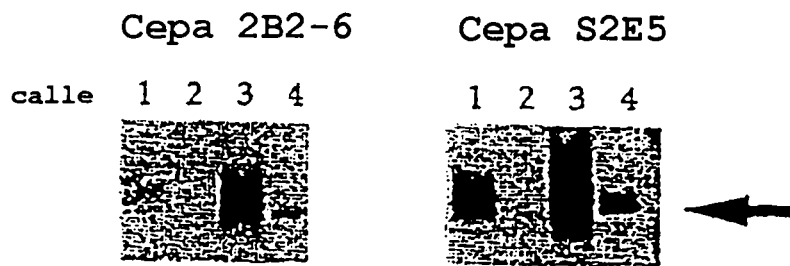


Fig. 2



1: neurosina recombinante

2: tripsinógeno

3: sobrenadante cultivo HPC-Y3 (concentrado 100 veces

4: CSF

Fig. 3

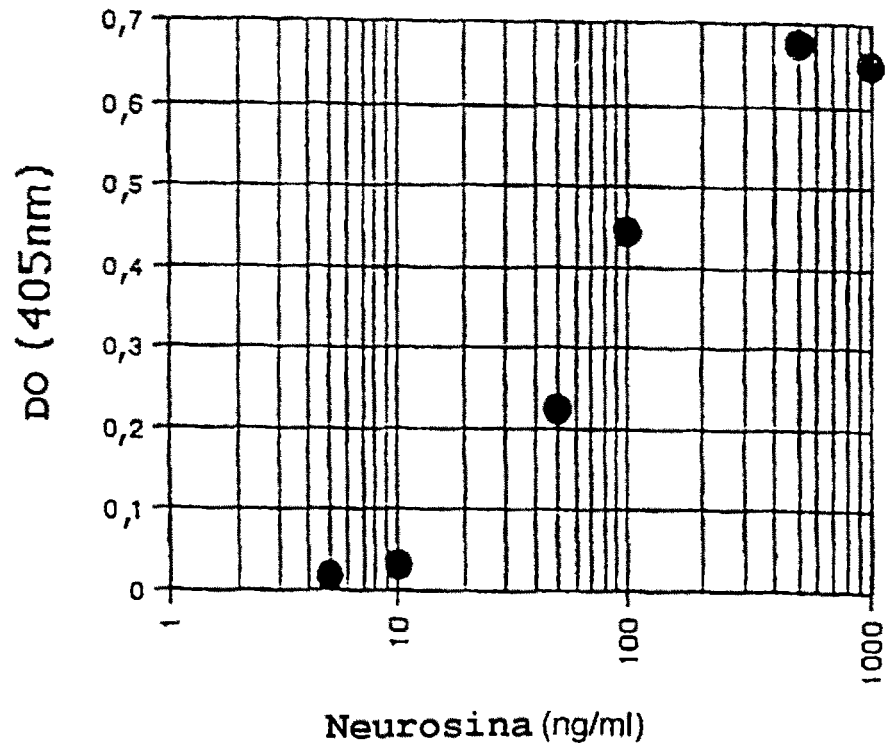


Fig. 4

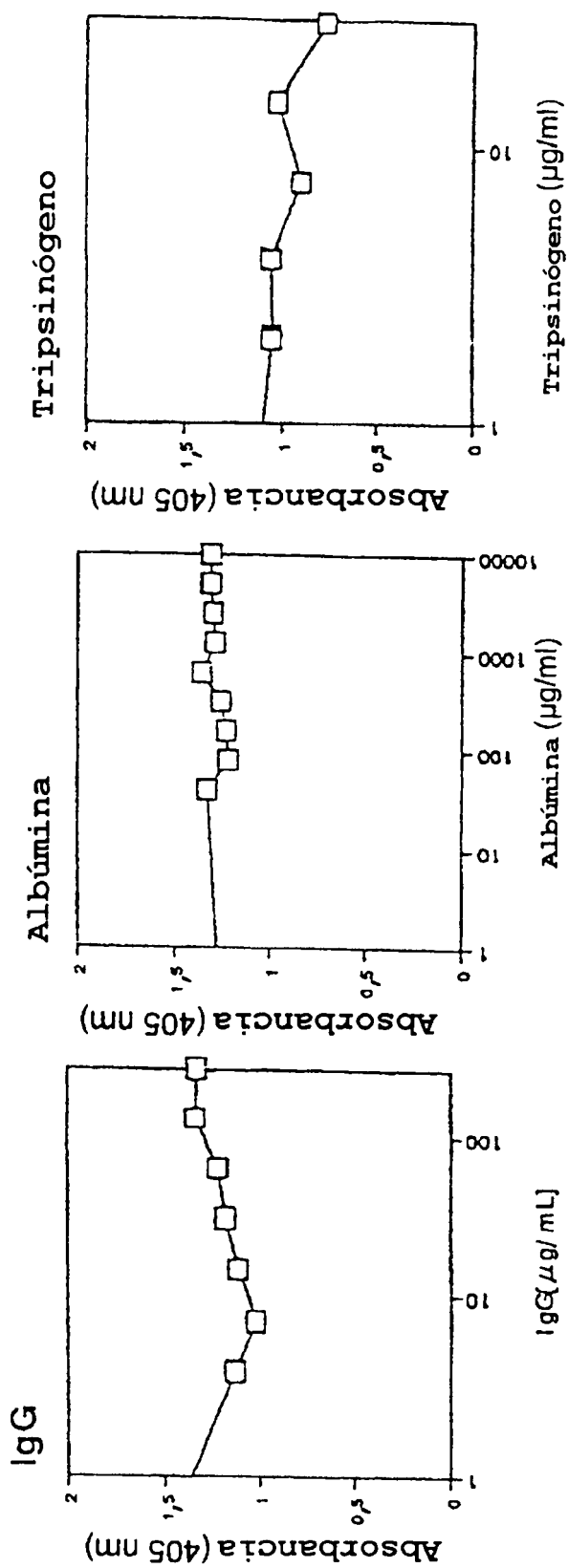


Fig. 5

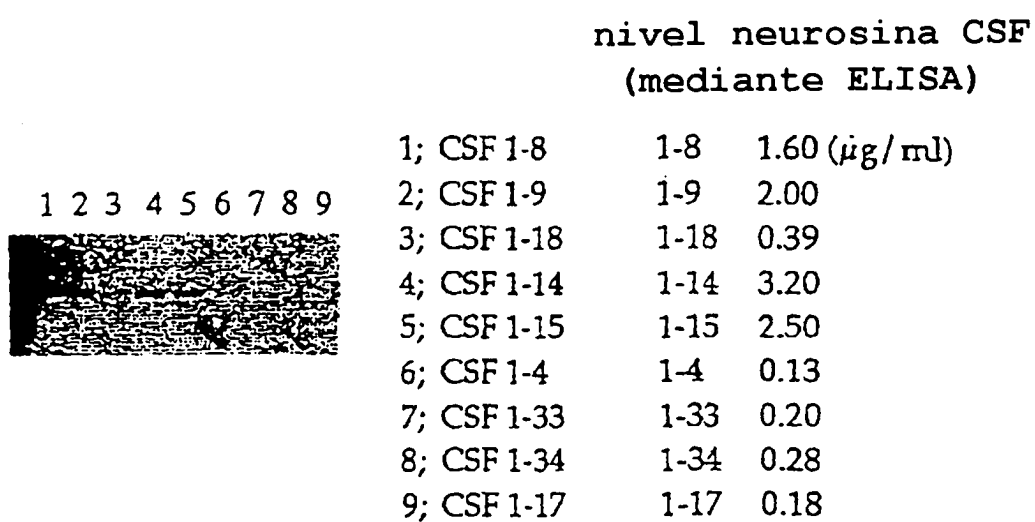
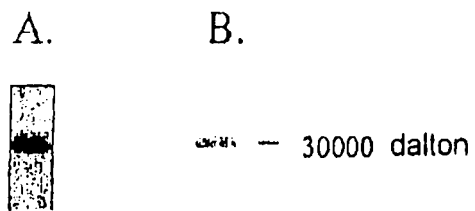


Fig. 6

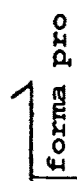


Patrón de electroresis e unmunotinción de
neurosina derivada de CSF purificado

A. Tinción con plata

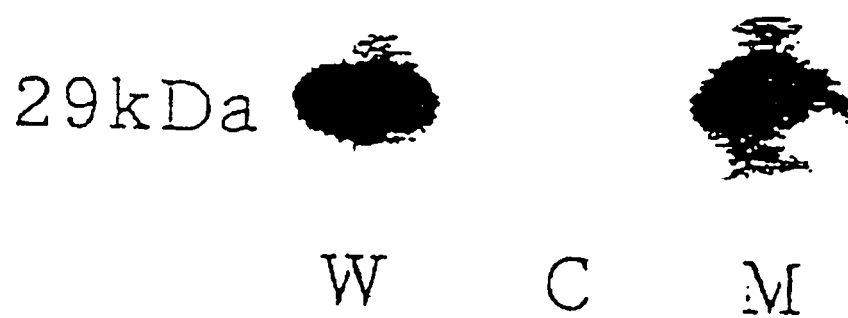
B. Inmunotinción

Fig. 7

		
Neurosina		MKKLMVVLSLIAAWAEEEQNKLVHGGPCDKTSHPYQAALY.....
Neurosina madura		LVHGGPCDKTSHPYQAALY.....
Neurosina derivada de CSF		EEQNKLVHGGPCDK

Secuencia de aminoácidos N-terminal de neurosina derivada de CSF

Fig. 8



W: Fracción producto homogeneizado

C: Fracción sol celular

M: Fracción membrana

Fig. 9



Fig. 10

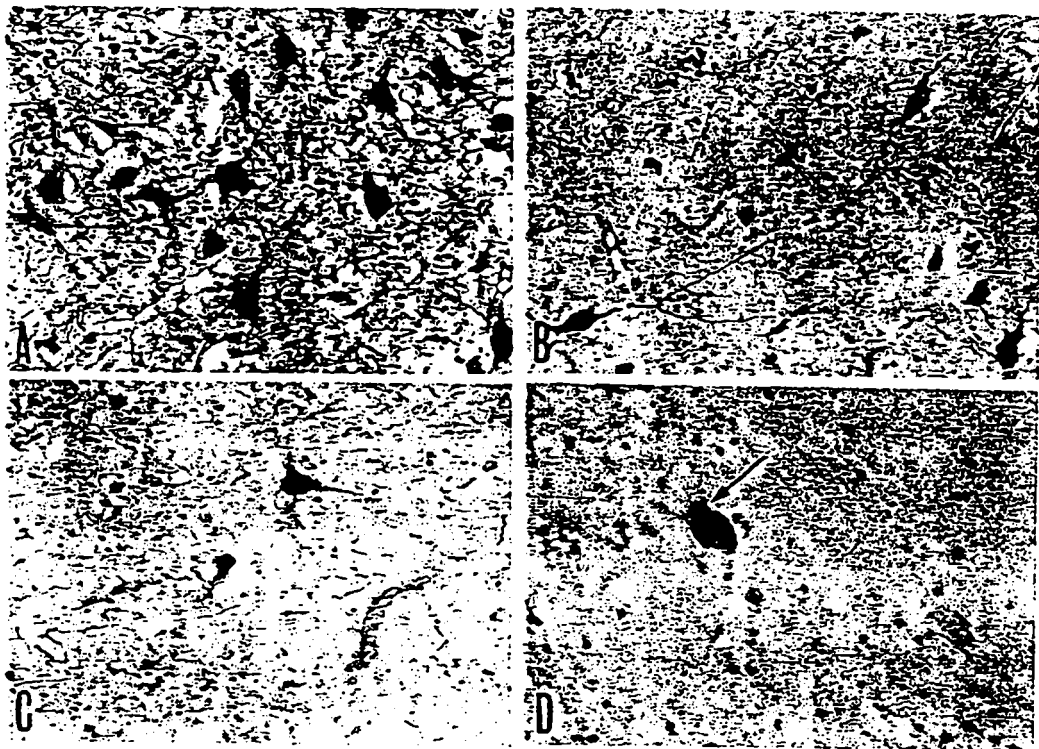


Fig. 11

Curva Patrón ELISA Mejorado

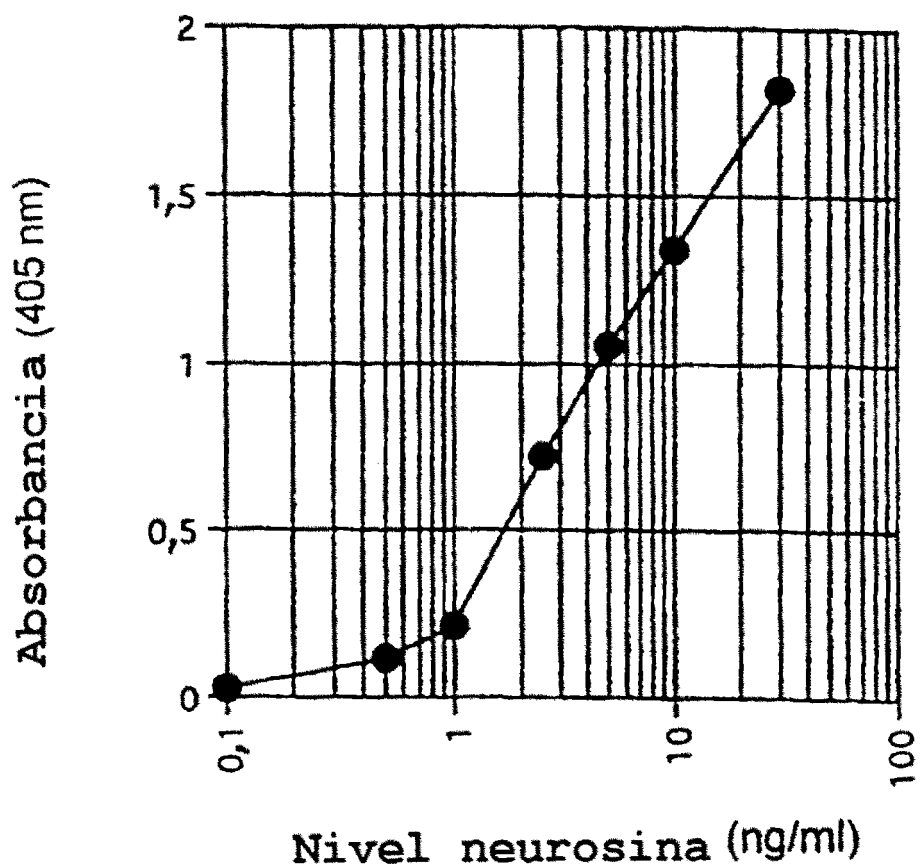
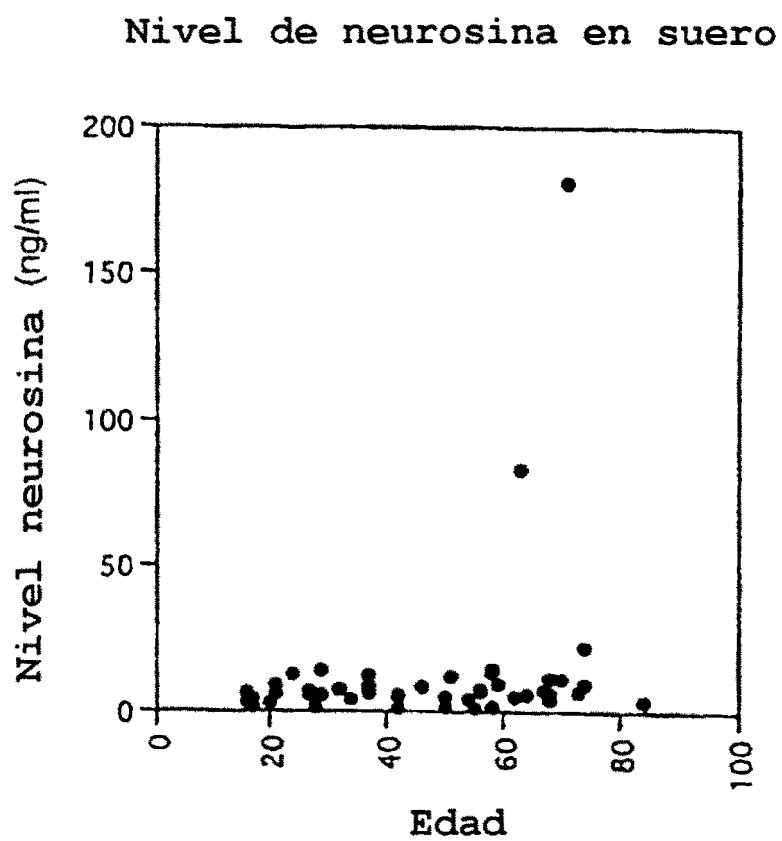


Fig. 12



ES 2 273 496 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Katsuya, Kominami y col.; Fuso Yakuhin Kogyo Kabushikigaisya
- 5 <120> Anticuerpos monoclonales específicos de serina proteasas y su uso
- <130> 661405
- 10 <150> JP 10/187506
- <151> 1998-07-02
- <160> 2
- 15 <210> 1
- <211> 27
- <212> ADN
- 20 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 25 <223> Cebador oligonucleotídico diseñado para amplificar el gen de la neurosina
- <400> 1
- 30 CGCGGATCCT TGGTGCATGG CGGACCC 27
- <210> 2
- <211> 27
- <212> ADN
- 35 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 40 <223> Cebador oligonucleotídico diseñado para amplificar el gen de la neurosina
- <400> 2
- 45 CGCGGATCCT CACTTGGCCT GAATGGT 27
- 50
- 55
- 60
- 65