



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 288 896**

(51) Int. Cl.:
C07K 16/18 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01114005 .0**

(86) Fecha de presentación : **14.02.1996**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1160256**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **05.12.2001**

(54) Título: **Anticuerpo monoclonal específico para péptido β A4 (1-42).**

(30) Prioridad: **14.02.1995 US 388463**

(73) Titular/es: **Wyeth
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940, US
Elan Pharma International Limited**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2008

(72) Inventor/es: **Konig, Gerhard y
Graham, Paul**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2008

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 288 896 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

Anticuerpo monoclonal específico para péptido β -A4 (1-42).

5 **Campo de la invención**

Esta solicitud se refiere a la enfermedad de Alzheimer, en particular, a un anticuerpo monoclonal específico para el péptido β A4 derivado de la proteína precursora de amiloide, células, procedimientos de generar dichos anticuerpos monoclonales, y a procedimientos para detectar la presencia de β A4 en tejido.

10 **Antecedentes**

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno cerebral neurodegenerativa progresivo irreversible. Con el transcurso de los años, la progresión de la AD provoca pérdida de memoria, demencia y finalmente la muerte. Actualmente es la cuarta causa principal de muerte en los Estados Unidos y supone aproximadamente 100.000 muertes anuales. Habitualmente, la AD afecta principalmente a los ancianos y por lo tanto, con el envejecimiento de la sociedad moderna, se espera que sea un problema sanitario creciente en el futuro próximo. Poco después del inicio de la enfermedad, los pacientes requieren asistencia todo el día. Esto representa un tremendo problema psicobiológico así como financiero para nuestra sociedad. Actualmente no existen medios de diagnóstico, prevención, tratamiento o cura de la AD.

Neuropatológicamente, la AD se caracteriza por una masiva pérdida neuronal en ciertas zonas del cerebro y por la deposición de material proteínico en el cerebro de los pacientes de AD. Estos depósitos son los neurofibrilares intracelulares y las placas de β -amiloide extracelulares. El principal componente proteínico de la placa de β -amiloide es el péptido β A4. El análisis de la secuencia del material de las placas de β -amiloide purificado y la espectrometría de masas mostró que la longitud máxima del péptido β A4 es de 43 aminoácidos. Habitualmente, sin embargo, pueden también terminar o bien en la posición 40 o en la posición 42 (Miller y cols., 1993, Arch. Biochem. Biophys. 301: 41-52). De forma similar, en el extremo N pueden observarse ciertas irregularidades, que dan como resultado varias formas diferentes del péptido, que se inician principalmente en la posición 1, 4 u 11 (Miller y cols., 1993).

El clonado molecular reveló que el péptido β A4 se deriva de una proteína precursora mucho mayor denominada "proteína precursora de amiloide" (APP) (Kang y cols., 1987, Nature 325: 733-736) (Figura 1). La Figura 1 ilustra la proteína precursora de amiloide (APP) que es una proteína transmembrana (Tm = región de la membrana) en la que el extremo N está localizado en la zona extracelular y el extremo C está localizado en la zona intracelular (citoplasmática). β A4 está parcialmente incrustado en la membrana. Se han descrito diversas isoformas con ajustes alternativos, que sufren grandes modificaciones postranslacionales (Selkoe, 1994, Ann. Rev. Neurosci. 17: 489-517). La secuencia de β A4 en sí está localizada parcialmente en la zona extracelular y se extiende parcialmente a la región transmembrana (Figura 2). La Figura 2 (SEC ID N.º: 3) ilustra la secuencia de β A4, que se muestra (zona demarcada con un círculo) con su extremo C en la región transmembrana (Tm, area recuadrada) y el extremo N localizado en la parte extracelular. Los asteriscos indican la localización de las mutaciones de las familias del gen APP: o bien flanquean la secuencia de β A4 o están centradas en la sección media de la secuencia de β A4. Se indican los tres sitios principales de escisión (α , β y γ). Por lo tanto se postuló que la liberación de β A4 se producía a través de la acción proteolítica de una o más proteasas en el extremo N (corte en β) y en el extremo C (corte en γ) del péptido (Figura 2) (Selkoe, 1994). El principal evento durante la secreción de APP está en el corte en α (posición 16/17 de β A4 "1-42"). Esta molécula de APP secretada (α APPs) contiene los primeros 16 aminoácidos de la secuencia de β A4 en su extremo carboxilo. El resto de los fragmentos de APP asociados a la célula (los denominados fragmentos del extremo C (CTF)) contienen la porción del extremo C de la secuencia de β A4 y abarcan la región citoplasmática de APP. Por lo tanto, este corte proteolítico produce fragmentos que pueden no procesarse de tal forma que directa o indirectamente produzcan fragmentos amiloidógenos (procesamiento no amiloidógeno) (Selkoe, 1994).

Recientemente, se demostró que las líneas celulares que expresan grandes cantidades de APP a través de una construcción de ADNc de APP transfectada de forma estable producen cantidades de picomolares altas a nanomolares bajas de β A4 y lo liberan rápidamente al medio (Shoji y cols., 1992, Science 258:126-129). También se ha encontrado que casi todos los cultivos celulares primarios y las estirpes celulares liberan β A4 de forma constitutiva (Busciglio y cols., 1993, PNAS USA 90: 2092-2096). Además, se ha demostrado que controles sanos así como pacientes de Alzheimer presentan cantidades nanomolares bajas de β A4 en suero y LCR (Seubert y cols., 1992, Nature 359: 325-327). La mayoría de las especies de β A4 solubles detectadas en estos fluidos corporales y medios acondicionados era β A4 "1-40", lo que no refleja verdaderamente la composición global que se encuentra en las deposiciones de las placas de β -amiloide. Por lo tanto ya no podría mantenerse la noción de que la producción y la posterior liberación de β A4 es suficiente y por lo tanto responsable de la acumulación de placas de β -amiloide en el cerebro de los pacientes de AD; otros factores deben contribuir a la deposición de las placas β -amiloide. Una hipótesis muy sencilla es que la producción excesiva aguda o crónica de β A4 provoca la mayor carga de amiloide que se observa en la AD.

El hallazgo de que mutaciones puntuales específicas en y alrededor de la región β A4 del gen APP están relacionadas con ciertos casos de enfermedad de Alzheimer familiar (FAD) demostraron inequívocamente que el gen APP es un "gen de enfermedad" (Goate y cols., 1991, Nature 349: 704-706; Murrell y cols., 1991, Science 254: 97-99; Levy y cols., 1990, Science 248: 1124-1126; Carter y cols., 1992, Nature Genetics 2: 255-256). En las familias en las que la AD se hereda de forma dominante con una edad específica de inicio, las mutaciones puntuales del gen APP son necesarias y suficientes para provocar AD. Aunque la gran mayoría de los casos de enfermedad de Alzheimer son

esporádicos y probablemente multifactoriales, estas mutaciones familiares de APP pueden enseñarnos mucho sobre la amiloidogénesis, es decir, la generación del pequeño péptido β A4 a partir del precursor mayor y su posterior deposición en placas de β -amiloido.

La doble mutación en un codón de APP 670/671 (la “variante sueca”, en el extremo N de β A4 en APP) provoca una liberación de 5 a 8 veces mayor de β A4 en cultivos celulares transfectados de forma estable con ese ADNc de APP mutado (Figura 2) (Citron y cols., 1992; Cai y cols., 1993). Puede concebirse que esta doble mutación puntual provoque un mayor procesamiento de APP debido a una mayor proteólisis en el corte en β , que a su vez produce un mayor nivel de β A4 liberado. Una mayor cantidad de monómeros β A4, tal como demuestran los estudios de transfección con la “mutación sueca”, puede explicar la cinética más rápida de la agregación de β A4 a las placas de β -amiloido en estas familias.

Otra mutación de una FAD reside en el extremo C de β A4 en la posición 717 (“variante londinense”) y no afecta al nivel de β A4 liberado en el cultivo tisular (Figura 2). Recientemente se ha demostrado que esta mutación en 717 cambia la proporción entre β A4 “1-40/1-42” (Suzuki y cols., 1994, Science 264: 1336-1340). Aunque no está claro por ahora cómo se produce la generación del extremo C de β A4, dado que esta parte está incrustada en la región transmembrana, es tentadora la hipótesis de que la “mutación londinense” afecta a la escisión proteolítica de APP para producir β A4. Posiblemente, esta mutación puntual interfiere con la fidelidad de la escisión de la proteasa específica en el sitio γ . β A4 1-40 muestra, entre otras cosas, una tremenda diferencia de solubilidad en soluciones acuosas comparado con β A4 1-42 (Burdick y cols., 1992, JBC 267: 546-554). Éste es casi insoluble en agua, mientras que 1-40 es soluble en agua hasta varios mg/ml *in vitro*. Pequeñas cantidades de la forma más larga 1-42 pueden potenciar la precipitación de 1-40 *in vitro* de forma notable. Una proporción ligeramente mayor de la especie de β A4 1-42 explicaría el temprano inicio de la deposición de β A4 en las placas de β -amiloido en pacientes con esta “mutación londinense”. La proporción entre la especie 1-42 y la especie 1-40 más corta y más soluble también puede ser uno de los factores críticos en los casos esporádicos de AD (es decir los casos en los que no se ha identificado predisposición genética). Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a la especie 1-42, son por lo tanto de utilidad para investigar la producción y presencia de la especie β A4 que termina en la posición del aminoácido 42, y pueden usarse como indicador diagnóstico de la presencia de especies anormales en la AD.

Los análisis bioquímicos recientes con un anticuerpo que reconoce el β A4 que termina en la posición 40, y un anticuerpo que reconoce la especie de β A4 que se extiende hasta la posición 42 o más, demostró que la contribución de la especie de β A4 más larga puede ser crítica para el inicio de la enfermedad (Suzuki y cols., 1994). Sin embargo, el anticuerpo monoclonal de Suzuki no distingue entre β A4 1-42, 1-43, y especies más largas de β A4. Este es también el caso para otro anticuerpo monoclonal publicado, el 2G9 (Yang y cols., 1994, Neuro Report 5: 2117-2120). Por lo tanto, para evitar esta reactividad cruzada, sería muy útil disponer de anticuerpos que sean específicos para la especie de β A4 que termina en la posición 42 y que excluya las otras formas para evitar la reactividad cruzada con los fragmentos de APP del extremo C asociados a la membrana, que son productos celulares habituales no necesariamente asociados a las placas de β -amiloido.

Se ha descrito un anticuerpo monoclonal que reconoce β A4 1-42 (Murphy y cols., 1994, Am. J. Path. 144: 1082-1088). Sin embargo, no se usó la especie del péptido β A4 1-43 en estos estudios, por lo tanto no se sabe la especificidad exacta de este anticuerpo monoclonal en respuesta al péptido 1-43. Únicamente se realizaron estudios competitivos con péptidos β A4 que terminaban en la posición 40 (“1-40”), y en la posición 44 (“1-44”) y más con este anticuerpo. De forma importante, se reseñó que el anticuerpo teñía amiloide difuso, amiloide fibrilar, ovillos neurofibrilares intraneuronales y extraneuronales, pero no amiloide vascular.

Una prueba diagnóstica bioquímica *in vitro* para la enfermedad de Alzheimer está en las primeras etapas y tampoco existen medios de detectar los individuos con riesgo de contraer AD. El actual diagnóstico de AD requiere una evaluación clínica detallada que no puede dar respuestas claras hasta que se manifiestan síntomas significativos de demencia y pérdida de memoria. A la vista de las investigaciones a las que se ha hecho referencia anteriormente, β A4 1-42 representa un marcador preclínico para la AD. Así, la identificación del nivel o de la acumulación de β A4 1-42, o de otras especies que terminan en el residuo 42 y de cómo esta puede progresar durante el transcurso de la enfermedad, y de cómo se distribuye en el cerebro, proporcionará valiosas perspectivas para controlar el curso además de para el diagnóstico específico y el posible tratamiento de AD.

Sería de utilidad para preparar pruebas diagnósticas, agentes terapéuticos y ensayos de control de AD contar con un anticuerpo monoclonal que, al contrario de lo que sucede con la especificidad de los anticuerpos disponibles actualmente (que presentan reacción cruzada con 1-43; que se reseña que no tiñe amiloide vascular), sí tiñe el amiloide vascular y es específico para el péptido β A4 que termina en el residuo 42, y por lo tanto extiende la capacidad diagnóstica de la técnica, es decir uno que reconozca el extremo C libre de β A4 y tiña amiloide difuso y fibrilar, ovillos neurofibrilares, y amiloide vascular. Dicho anticuerpo es el sujeto de la presente invención.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une de forma específica al péptido β A4 (1-42) asociado a amiloide difuso, amiloide fibrilar, ovillos neurofibrilares y amiloide vascular, y no a los péptidos β A4 (1-40) ni β A4 (1-43).

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que es específico para el péptido β A4, de forma específica el extremo C de β A4 "1-42" y tiñe amiloide difuso y fibrilar, ovillos neurofibrilares, y amiloide vascular. En particular, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que es específico para péptidos β A4 en los que el extremo C es el residuo 42 de la secuencia de aminoácidos de β A4. La presente invención comprende además
 5 fragmentos de anticuerpos y construcciones de los mismos que tienen la misma especificidad de unión. El anticuerpo monoclonal de la presente invención puede emplearse en usos de diagnóstico, purificación y terapéuticos.

Una realización de la presente invención engloba un anticuerpo monoclonal que se une de forma específica al péptido β A4 (1-42) y no a los péptidos β A4 (1-40) ni β A4 (1-43), que puede obtenerse inmunizando a un mamífero
 10 con el péptido Cys-Asp-Gly-Asp-Gly-Asp-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala (SEC. ID. N.º: 1) conjugado con un vehículo inmunológico adecuado.

La presente invención también proporciona una proteína que es un fragmento inmunológicamente activo del anticuerpo monoclonal de la invención.

Se identifica un anticuerpo monoclonal adecuado como 369.2B, y es producido por la estirpe celular depositada en la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de acceso HB 11829.

La invención además proporciona el uso del péptido de la SEC ID N.º 1 conjugado con un vehículo inmunológico adecuado en la fabricación de un medicamento para la generación de anticuerpos monoclonales y respuesta inmunitaria en un mamífero, en el que el conjugado peptídico genera un anticuerpo que se une de forma selectiva al péptido β A4 (1-42) y no a los péptidos β A4 (1-40) ni β A4 (1-43).

La presente invención también proporciona un procedimiento de generar el anticuerpo de la invención, que comprende inmunizar a un mamífero no humano con el péptido Cys-Asp-Gly-Asp-Gly-Asp-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala (SEC ID N.º: 1) conjugado con un vehículo inmunológico adecuado.

La presente invención también proporciona procedimientos para detectar la presencia de péptidos β A4 que terminan en la posición 42 Ala en un tejido, que comprenden poner en contacto una muestra de tejido con un anticuerpo monoclonal o proteína de la presente invención, detectando la presencia de anticuerpo monoclonal o proteína de forma selectiva. La presente invención también proporciona procedimientos para la purificación selectiva de péptidos β A4 que terminan en la posición 42 Ala, que comprenden poner en contacto una muestra a purificar con el anticuerpo monoclonal o la proteína de la presente invención, separar el péptido β A4 que termina en el aminoácido 42 Ala de la muestra a purificar, y aislar el péptido β A4 que termina en el aminoácido 42 Ala. En una realización adicional, la presente invención proporciona procedimientos para la detección del péptido β A4 que termina en el aminoácido 42 Ala asociado a la enfermedad de Alzheimer, que comprenden poner en contacto una muestra a analizar con un anticuerpo monoclonal o proteína de la presente invención, y detectar la presencia de péptidos β A4 que terminan en el aminoácido 42 Ala.

Así, la presente invención también proporciona procedimientos para la prevención de la agregación del péptido β A4 que termina en el aminoácido 42 Ala *in vitro*, que comprenden la administración de un anticuerpo monoclonal o proteína de la presente invención. En una realización preferida el anticuerpo monoclonal es idéntico a 369.2B, o es un fragmento del mismo inmunológicamente activo con una especificidad de unión equivalente.

La presente invención así proporciona un medio para detectar la presencia de péptido β A4 que termina en el aminoácido 42 Ala, que comprende un fragmento inmunológicamente reactivo del anticuerpo monoclonal de la presente invención. Además de un medio para prevenir la agregación del péptido β A4 que termina en el aminoácido 42 Ala que comprende un fragmento inmunológicamente reactivo del anticuerpo monoclonal de la presente invención, la presente invención proporciona un medio para detectar y controlar el nivel de péptido β A4 que termina en el aminoácido 42 Ala en muestras de tejido o fluidos (por ejemplo sangre, otros fluidos corporales, cortes de tejidos, tejidos de biopsias, etc.).

La presente invención también proporciona el anticuerpo monoclonal o la proteína de la presente invención para usar en la detección de la presencia del péptido β A4 que termina en el aminoácido 42 Ala.

La presente invención también proporciona el anticuerpo monoclonal o la proteína de la presente invención para usar en la prevención de la agregación del péptido β A4 que termina en el aminoácido 42 Ala.

La presente invención también proporciona un kit para detectar la presencia de péptido β A4 que termina en el aminoácido 42 Ala que comprende el anticuerpo o la proteína de la invención, y un medio de detectar el anticuerpo o proteína.

La presente invención también proporciona una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo o la proteína de la presente invención. La presente invención también proporciona el anticuerpo monoclonal o la proteína de la presente invención para usar en la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

La presente invención también proporciona el uso del anticuerpo monoclonal o la proteína de la presente invención en la fabricación de un kit para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

Realizaciones específicas preferidas de la presente invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada de ciertas realizaciones preferidas y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La invención se comprenderá más completamente al considerar la siguiente descripción detallada, tomada junto con los dibujos en los que:

La Fig. 1 es una representación esquemática de la porción β A4 de la proteína precursora de amiloide (APP), su localización relativa a la membrana celular y los sitios de escisión α , β y γ ;

La Fig. 2 muestra la porción β A4 de APP, su posición relativa a la región transmembrana de una célula y tres sitios principales de escisión (α , β y γ) en APP;

La Fig. 3 es un diagrama del clon pGK003 que se usó para generar el péptido β 4A 1-42;

La Fig. 4A muestra la SDS-PAGE en un gel de Tris/Tricina al 16%, de β 4A marcado radioactivamente traducido *in vitro* en un sistema de germen de trigo;

La Fig. 4B muestra la SDS-PAGE en un gel de Tris/Tricina al 16%, de β 4A marcado radioactivamente traducido *in vitro* en un sistema de germen de trigo, inmunoprecipitado con MAb 286.8A;

La Fig. 5 es una gráfica que muestra la inmunoprecipitación de β A4 (IVT β 4A) traducido *in vitro* con 286.8A;

La Fig. 6 es un diagrama de los péptidos que se usan para generar la respuesta inmunitaria (inmunógeno) y para cribar el suero de ratones;

La Fig. 7 es una gráfica que muestra la inmunoprecipitación de β A4 traducido *in vitro* en función de la concentración de anticuerpo; -o- 286.8A, -Δ- 369.2B, -□- 369.6;

La Fig. 8 es una gráfica que muestra el % de diversas secuencias de β A4 inmunoprecipitadas mediante el MAb 369.2;

La Fig. 9 es una gráfica que muestra el mapeo de los epítomos de MAb 369.2 mediante ensayo competitivo, donde -■- es 35-42 (OVA) (péptido β A4 35-42 acoplado a ovalbúmina), -□- es el péptido β A4 1-42 y -◆- es el péptido β A4 1-40;

La Fig. 10 es una fotografía que muestra la unión de MAb 369.2B a amiloide vascular y otras placas con diversas morfologías.

Descripción detallada de la invención

Las deposiciones de β -amiloide en el cerebro con enfermedad de Alzheimer están formadas principalmente por péptidos β A4 que muestran heterogeneidad tanto en el extremo N como en el C. La principal especie del extremo C, que se identifica mediante secuenciación peptídica de β -amiloide, purificado a partir de material cerebral postmortem, termina o en la posición 40 ó 42 del péptido β A4 que tiene como máximo 43 residuos de longitud. Los experimentos *in vitro* con péptidos β A4 sintéticos que terminan o bien en la posición 40 o en la 42 indican profundas diferencias fisicoquímicas. Anteriormente, no podía determinarse la distribución de estas dos especies de β A4 en tejido postmortem así como su generación *in vitro* debido a la falta de anticuerpos específicos contra el extremo carboxi que fueran capaces de distinguir entre las subespecies de péptido β A4.

Indicios recientes sugieren que la liberación de β A4 es un evento normal en casi en todos los cultivos celulares. Habitualmente pueden medirse concentraciones de picomolares altas a nanomolar bajas de β A4 en el suero y en el líquido cefalorraquídeo (Seubert y cols., 1993). Este hallazgo fue sorprendente porque se había asumido que la producción de β A4 es un evento patológico dado que β A4 se deposita masivamente en forma de placas de β -amiloide en las regiones cortical e hipocámpica del cerebro de los pacientes de la enfermedad de Alzheimer. El análisis detallado de la secuencia del β A4 liberado por el cultivo celular reveló que la especie principal termina en la posición 40 (Selkoe, 1994). Las placas de β -amiloide purificadas de cerebro postmortem muestran una realidad ligeramente diferente: los depósitos de amiloide de la angiopatía amiloide congófila (CAA) son agregados de β A4 que rodean los vasos sanguíneos y son predominantemente β A4 1-40, mientras que por el contrario, los núcleos de las placas de β -amiloide (APC) que están presentes en el parénquima cerebral y no están asociados a los vasos sanguíneos muestran unos extremos N irregulares (que empiezan lo más habitualmente en los residuos 1, 4 y 11) y terminan principalmente o bien en la posición 40 ó 42 (Glenner y Wong, 1984, Biochem. Biophys. Res. Comm. 120: 885-890; Masters y cols., 1985, PNAS USA 82: 4245-4249; Miller y cols., 1993). Ocasionalmente se han descrito especies más largas que terminan en el 43 o que se extienden incluso más (Miller y cols., 1993). Debido a que la longitud del extremo C hidrófobo es crítica para la capacidad del péptido de agregarse *in vitro* (Burdick y cols., 1992; Jarrett y cols., 1993, Biochem. 32: 4693-4697), es completamente posible que los dos agregados patológicos diferentes, APC y CAA y otras placas de β -amiloide vasculares puedan justificarse gracias a las diferentes propiedades de las dos especies 1-40 y 1-

42. Este podría ser el caso también de las denominadas “placas difusas” (Selkoe, 1994) que se observan con frecuencia en el cerebro de seres humanos ancianos y que no están asociadas a la AD pero que, sin embargo, se ha propuesto que son precursoras de los depósitos β -amiloide fibrilar. Se ha sugerido una agregación no fibrilar de β A4 para estas estructuras. Por lo tanto es de importancia capital determinar la producción específica de tejido de estas especies más
5 largas de β A4 (es decir, las que terminan en la posición 42) y su aparición patológica en el cerebro de los pacientes de AD. Recientemente, se han publicado tres artículos en los que se han descrito anticuerpos que distinguen las especies 1-42 y 1-40 de β A4 (Suzuki y cols., 1994; Murphy y cols., 1994; Yang y cols., 1994). Al contrario que los anticuerpos de la presente invención, los anticuerpos reseñados por Suzuki y cols., y Yang y cols., presentan reacción cruzada en un grado significativo tanto con la especie 1-43 como con la 1-42 el péptido β A4. El anticuerpo de Murphy y cols.,
10 aunque no se ha analizado su unión a la especie 1-43 del péptido β A4, muestra un patrón diferente de unión a los tejidos que los anticuerpos de la presente invención, y por lo tanto debe reconocer un epítipo diferente, o modificado, del que reconocen los anticuerpos de la presente invención.

Las posiciones 29 a 42 del péptido β A4 quedan completamente dentro de la putativa región transmembrana de la proteína precursora de amiloide y son de naturaleza hidrófoba (Miller y cols., 1993). Los péptidos sintéticos en
15 las secuencias del extremo C de esta región deben contrarrestar la capacidad de la secuencia de 34-42 de formar una estructura inusualmente estable que es casi insoluble en agua y desnaturalizantes potentes (Halverson y cols., 1990, Biochem. 29: 2639-2644) si van a usarse para provocar una buena respuesta inmunitaria contra β A4 soluble. Los presentes inventores diseñaron un espaciador hidrófilo de cinco residuos de longitud que resolvería esos problemas de
20 insolubilidad y que también separarían el presunto epítipo del vehículo. Para reducir las probabilidades de reactividad cruzada con la especie de β A4 más corta pero principal, 1-40, los presentes inventores eligieron un epítipo peptídico mínimo de 8 residuos que corresponde a las posiciones 35-42 de la secuencia de β A4. Toda la secuencia sintética diseñada de este modo se acopló, mediante un grupo sulfhidrido libre en un residuo de cisteína del extremo N, a KLH (hemocianina de la lapa californiana).

El uso con éxito de espaciadores y residuos hidrófilos en la producción de anticuerpos contra péptidos está bien documentado al igual que el uso de estructuras hidrófilas para solubilizar haptenos insolubles para su conjugación (McMillan y cols., 1983, Cell 35: 859-863; Makela y Seppala, 1986, en Handbook of Experimental Immunology, Volumen 1: Immunochemistry, Wier, D.M., editor. Blackwell Scientific Publicaciones, Oxford, páginas 3.1-3.13). El
30 éxito de este procedimiento para producir anticuerpos específicos puede atribuirse al menos en parte a la presencia de un extremo carboxilo cargado libre, especialmente en el contexto de una secuencia hidrófila, ya que los residuos terminales de los antígenos peptídicos dan lugar a proporciones significativas de anticuerpos contra péptidos (Gras-Masse y cols., 1985, en Synthetic Peptides in Biology and Medicine, Alitalo, K. y cols., editores, Elsevier, Ámsterdam, página 105). Esto, junto con el uso selectivo y novedoso de una secuencia mínima de β A4 que se usa como inmunógeno
35 maximizó la probabilidad de producir un anticuerpo que podría distinguir entre la especie de β A4 que termina en la posición 42 y las que no. Aunque los estudios competitivos de péptidos no localizaban exactamente el determinante antigénico, las secuencias de β A4 distintas de 1-42 no se unían de forma eficaz. El hecho de que 1-42 no competía totalmente con β A4 traducido *in vitro* marcado con 35 S-metionina puede deberse o bien a las propiedades particulares de la molécula misma o al hecho de que el inmunógeno peptídico 35-42 se presentó en el contexto de un espaciador y/o
40 vehículo específicos, o a que un exceso de 200-1000 veces de péptido sin marcar no es suficiente para inactivar la señal. Los efectos no específicos de los residuos del extremo N en la actividad antigénica también están bien documentados (Benjamini y cols., 1968, Biochem. 7: 1261-1264).

El intrigante hallazgo de que 25-35 de hecho potencia la capacidad de 369.2B y otros anticuerpos de unirse a β A4
45 puede deberse a una peculiar interacción entre el péptido acortado y la secuencia de β A4 de longitud completa. Se cree que los residuos 26-33 existen en forma de un enrollamiento aleatorio en solución acuosa (Halverson y cols. 1990) y pueden ser capaces de interactuar con β A4 soluble de tal forma que haga que el extremo C sea más accesible a los sitios de unión de los anticuerpos.

El anticuerpo altamente específico de la presente invención, del que 369.2B es un ejemplo particular, se produjo
50 contra un péptido β A4 sintético que tenía los residuos 35-42, y no reconoce la especie más corta de β A4 1-40 en solución o en una fase sólida. Además, tanto 1-40 y 1-43 fueron incapaces de eliminar por absorción el anticuerpo cuando se usa inmunocitoquímicamente. Se aplicó un procedimiento de cribado secundario con capacidad de procesamiento
55 media para el cribado de sobrenadantes de hibridoma usando β A4 traducido *in vitro* marcado radiativamente de forma que los anticuerpos seleccionados en el cribado primario pudieran seleccionarse además por su capacidad de inmunoprecipitar β A4 soluble. Este procedimiento puede adaptarse fácilmente a otras proteínas/anticuerpos de interés. El MAb resultante 369.2B representa una herramienta superior para investigar el papel de los péptidos β A4 que terminan en la posición 42 *in situ*, en tejido postmortem, en animales transgénicos y para la generación *in vitro* de péptidos β A4 en modelos establecidos de producción de β A4 celular, para uso en el diagnóstico y terapéutico.

El anticuerpo monoclonal de la presente invención representa una herramienta importante necesaria para establecer
60 un kit de prueba diagnóstica. Permite medir/cuantificar la cantidad del β A4 1-42 o de sus derivados (por ejemplo la especie 4-42 y otras formas truncadas con el extremo carboxi “42”) en fluidos corporales humanos (LCR, suero, orina, etc.) o en tejidos. También puede usarse para estudiar el patrón de distribución de 1-42 o de la especie de β A4 que
65 termina en el residuo 42, en cerebros con AD comparando con controles sanos. Su avidez excepcionalmente alta hace que sea una herramienta superior y novedosa para dichas pruebas. El anticuerpo monoclonal que se describe aquí puede usarse también en sistemas de modelos biológicos como por ejemplo cultivos de células transfectadas o modelos animales (ratones transgénicos), diseñados para medir y/o influenciar la presencia y/o producción de la especie de β A4

que termina en el aminoácido 42. Estos sistemas en modelos representan un medio para identificar los moduladores selectivos de la producción de β A4 que terminan en la posición del aminoácido 42 de β A4 en sistemas biológicos. Los anticuerpos de la presente invención proporcionan procedimientos de prevenir la agregación del péptido β A4 debido a que la especificidad del anticuerpo permitirá la interferencia específica con el residuo del extremo C libre, interfiriendo así y alterando la agregación que puede ser patógena en la AD.

De forma sorprendente, el anticuerpo de la presente invención difiere del de la técnica anterior en que tiñe amiloide difuso y fibrilar, ovillos neurofibrilares, y amiloide vascular aunque es específico para el residuo 42 del extremo C libre del péptido β A4. Este patrón de unión único muestra que el anticuerpo de la presente invención reconoce un epítipo diferente del de la técnica anterior y que la distribución tisular o accesibilidad del péptido β A4 que reconoce el anticuerpo de la presente invención es también diferente. Además, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que puede precipitar el péptido β A4 de la solución que no demuestran los anticuerpos de la técnica anterior. Así, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales únicos que reconocen un subconjunto único de especie de β A4 que tiene una distribución tisular distinta que lo más probablemente es un mejor indicador diagnóstico que los anteriormente disponibles, y una diana única para la intervención terapéutica.

Así, la presente invención proporciona anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y construcciones de los mismos que son específicos para la especie del péptido de β A4 en la que el extremo C termina en el residuo 42. Dichos anticuerpos, fragmentos de unión y sus construcciones pueden usarse en procedimientos de diagnóstico, análisis, terapia y purificación bioquímica que emplean la especificidad de unión de los presentes anticuerpos monoclonales y su uso en formulaciones farmacéuticas.

Los siguientes ejemplos explicarán la presente invención adicionalmente y se muestran a modo de ilustración, no a modo de limitación. Los siguientes ejemplos ilustran ciertos aspectos de los procedimientos y composiciones identificados anteriormente así como los resultados ventajosos.

Ejemplo 1

Sistema de expresión del péptido β A4

Preparación del plásmido pGK002

Los procedimientos generales de clonado y de biología molecular se encuentran por ejemplo en Sambrook, Fritsch, y Maniatis, 1989, Molecular Cloning 2ª edición, Cold Spring Harbor Lab Press. El plásmido pM 11-26, que es un clon Bluescript KS que contiene 2.415 kb (pares de kilobases) de la secuencia de APP con un codón de terminación TAG seguido de un sitio BamHI situado en marco mediante mutagénesis dirigida al sitio después del codón del aminoácido 42 de la región β A4, se modificó escindiendo un fragmento de 1,8 kb de XbaI/Bgl II y volviendo a ligar el plásmido después de completar los extremos. La construcción resultante, denominada pGK002, introduce el codón de iniciación que contiene la secuencia consenso de la secuencia de β A4 inmediatamente aguas abajo del promotor de Bluescript T7.

Preparación del plásmido pGK003

El plásmido pGK003 (Fig. 3), que se usó en todas las traducciones de β A4 *in vitro* en el sistema de germen de trigo que se describe anteriormente, se preparó subclonando un fragmento de 590 bp (pares de bases) NotI/Xho I de pGK002 que contiene toda la secuencia de β A4 humano con la terminación mutagenizada/Bam HI en un vector pSP64 polyA (Promega Corp.). Para preparar este plásmido, se digirió pGK002 con Not I y Xho I y el fragmento de 590 bp se completó con Klenow, se aisló y se ligó con pSP64polyA linealizado con Sma I. La Figura 3 es un diagrama del Clon pGK003. El marco de lectura abierto de β A41-42 se expresa *in vitro* a partir del promotor bacteriano SP6. La región 3' sin traducir (3'-UT) región de APP se muestra en negro.

Ejemplo 2

Transcripción y Traducción de pGK003 in vitro

El plásmido pGK003 se linealizó con EcoRI y la digestión completa se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa. La muestra se extrajo dos veces con fenol/cloroformo, seguido de dos extracciones con cloroformo y precipitación con etanol. El sedimento resultante se lavó una vez en etanol al 70%, se secó parcialmente a vacío y se volvió a suspender en TE a una concentración de 1 μ g/ μ l.

Los transcritos *in vitro* usando plantillas linealizadas a 30 μ g/ml se prepararon en tampón de HEPES 80 mM-KOH (a pH 7,5) que contenía MgCl₂ 16 mM, espermidina 2 mM, DTT 40 mM, ATP/CTP/GTP/UTP 3 mM, 800 unidades/ml de Inhibidor de ribonucleasas RNAsin (Promega Corp.), 5 unidades/ml de pirofosfatasa inorgánica de levaduras (Sigma Corp.), y 1800 unidades/ml de RNA polimerasa SP6 (Promega Corp.). La mezcla de reacción se mantuvo a 37°C durante 4 horas. El transcrito resultante se verificó mediante electroforesis a través de un gel de agarosa al 1,2%/TBE/EtBr con muestras desnaturalizadas (65°C x 10 minutos).

Los transcritos se tradujeron usando extracto de germen de trigo (Sigma Corp.). Resumiendo, los transcritos se calentaron (65°C x 10 minutos), se mezclaron con el extracto de germen de trigo que contenía KAc, RNAsin, y una mezcla aminoácidos sin metionina, y se tradujeron a 25°C durante 1 hora en presencia de metionina marcada con ³⁵S (Amersham). La traducción de una proteína β A4 de 4 kD (kilodaltons) se verificó mediante SDS-PAGE usando gel de Tris al 16%/Tricina (Novex). Los geles se fijaron y las proteínas se visualizaron fluorográficamente usando un sistema comercial "Amplify" (Amersham).

La incorporación del marcador a β A4 traducido *in vitro*, que contiene uno residuo de metionina por molécula, se determinó mediante separación en gel. Se solubilizaron geles de 2 mm en 1 ml de peróxido de hidrógeno al 30%, NH₄OH 0,75 M hasta la mañana siguiente a 37°C. Después se añadió un volumen de 10 ml de un cóctel de centelleo "Ready Value" (Beckman) y se determinaron las DPM (desintegraciones por minuto) usando un escintilómetro Beckman LS6000IC en modo auto DPM. Las reacciones típicas producen ~250 ng de β A4/ml o ~56 nM.

La transcripción *in vitro* seguida de la traducción del clon de β A4, pGK003, en un sistema de germen de trigo produjo una única proteína de producto de 4 kD cuando se visualizó mediante fluorografía en un gel de SDS de poliacrilamida y Tris al 16%-Tricina (Figura 4A). La Figura 4A muestra los resultados de la SDS-PAGE en un gel de Tris al 16%/Tricina. Carril 1: Marcadores de PM alto. Carril 2: Marcadores de PM bajo. Carril 3: β A4 traducido *in vitro* en un sistema de germen de trigo. La identidad de este producto de 4 kD se confirmó mediante inmunoprecipitación con anticuerpos específicos contra β A4 (Figura 4B). La Figura 4B muestra los resultados de la SDS-PAGE en un gel de Tris al 16%/Tricina. Carril 1: Marcadores de PM alto. Carril 2: Marcadores de PM bajo. Carril 3: β A4 traducido *in vitro* a partir de un sistema de germen de trigo inmunoprecipitado con el MAbs 286.8A. La transcripción y traducción de este así como de otros clones de β A4 en un sistema de lisado de reticulocitos combinado (TnT) no produjo el mismo rendimiento ni pureza de β A4 marcado radioactivamente (no se muestran los datos). Esto podría deberse a lo corto del transcrito o a la peculiar naturaleza del péptido β A4 mismo.

El anticuerpo monoclonal 286.8A, que se produjo contra el péptido 1-42 en bruto y cubre la región de 3-8 de β A4 fue capaz de precipitar esta proteína de forma dependiente de la concentración (Figura 5). La Figura 5 representa esta inmunoprecipitación de β A4 traducido *in vitro* (IVT β A4). Se inmunoprecipitaron cantidades crecientes de IVT β A4 con una cantidad fija de 286.8A (7,4 μ g) en 100 μ l de tampón RIPA.

Ejemplo 3

Preparación de péptidos inmunógenos y de cribado

Los péptidos se prepararon mediante procedimientos estándar de Fmoc en fase sólida (véase por ejemplo Gras-Masse y cols., 1985).

El Péptido n.º 959, un péptido sintético de 14 residuos que tiene una cisteína en el extremo N unida a un espaciador hidrófilo DGDGD y los residuos 35-42 de β A4 humano (que daba la secuencia completa: CDGDGDMVGGVVIA (SEC. ID. N.º: 1)), se acopló a un vehículo de KLH (hemocianina de lapa californiana) activada con maleimida usando el kit de conjugación de inmunógenos activados "Inject" disponible comercialmente (Pierce). Resumiendo, 2 mg de péptido se disolvieron en 200 μ l de tampón de conjugación y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas con 2 mg de KLH activada con maleimida reconstituidos. El conjugado se purificó mediante filtración en gel y se usó como inmunógeno para la producción de anticuerpos monoclonales usando protocolos estándar tal como se describe en el Ejemplo 4.

El péptido n.º 958, un péptido sintético de 14 residuos que tiene una cisteína en el extremo N unida a un espaciador GGGGG y los residuos 35-42 de β A4 humano (que daba la secuencia completa: CGGGGGMVGGVVIA (SEC. ID. N.º: 2)), se acopló a ovalbúmina disolviendo 2 mg de péptido en 200 μ l de guanidina 6 M, fosfato 0,01 M a pH 7,0 y se conjugó como anteriormente a 2 mg de una ovalbúmina activada con maleimida reconstituida. El conjugado purificado se usó en un cribado mediante ELISA de productos monoclonales de la fusión. Los anticuerpos cribados de esta forma son específicos para el determinante "35-42" no para el espaciador, ni para las porciones del puente de cisteínas ni de vehículo del inmunógeno.

Figura 6: Ilustra el péptido que se usó para generar la respuesta inmunitaria (el inmunógeno) y se muestra el péptido que se usó para cribar el suero de ratones, así como las fusiones, en la placa de inmunoensayo enzimático (EIA). La secuencia de β A4 35-42 se sintetizó junto con un espaciador y una cisteína en el extremo C, que después se usó para acoplarla covalentemente mediante un puente de maleimida a una gran molécula de vehículo. Tanto el espaciador como la molécula de vehículo en el péptido inmunógeno y de cribado son diferentes para poder seleccionar los anticuerpos específicos contra una secuencia de β A4.

ELISA (Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas)

Biotinilación de MAbs

Se usa el éster N-hidroxisuccinimidínico de biotina para biotinilar el anticuerpo monoclonal 286.8A. Primero se verifica la integridad del reactivo observando su hidrólisis espontánea en ausencia de las aminos primarias: se monitoriza una solución de 0,2 mg/ml de NHS-LC-Biotina (Vector Labs, Burlingame, CA) en PBS a 260 nm en

ES 2 288 896 T3

función del tiempo. Una OD260 de 1,0 después de aproximadamente 2 horas (que aumenta a partir de una OD260 inicial de 0,55) indica la hidrólisis esperada.

En la reacción de biotinilación se ha encontrado que una relación molar de 66:1 entre biotina y 286.8A monoclonal a pH neutro proporciona resultados óptimos cuando se analiza 286.8A biotinilado en un formato de Elisa. Se añaden 0,6 mg de NHS-LC-Biotina en H₂O a una concentración de 0,1 mg/ml (en el plazo de 5 minutos a partir de la disolución) a 1 ml (2 mg) de 286.8A en PBS. Se deja que se produzca el ataque nucleófilo del éster de NHS a 25°C durante 4 horas después de lo cual se añaden 10 mg de glicina en 50 µl de H₂O para terminar la reacción. La reacción después se introduce en una columna de desalación de dextrano reticulado de 10 ml equilibrada con PBS y se recogen alícuotas de 0,5 ml. El primer pico que representa el pico de IgG se agrupa y se almacena a 4°C hasta su uso.

Procedimientos de Elisa

Se recubren placas de Elisa Corning 25801 de 96 pocillos hasta la mañana siguiente a 4°C con 100 µl de 4GB u otro anticuerpo de captura a 5 µg/ml habitualmente en H₂O o tampón. La placa después se lava con PBS que contiene Tritón X-100 al 1% en un Dynatech Ultrawash plus. Después los pocillos se bloquean durante 90 minutos con 300 µl de PBS que contiene Tritón X-100 al 1% y BSA de calidad de Elisa al 1% (tampón de bloqueo). Después de lavar, se añade el antígeno o la incógnita diluidos en tampón de bloqueo a los pocillos por triplicado y se incuban a temperatura ambiente durante 2 horas. La placa se lava 2 veces y se añaden 400 ng de 286.8A biotinilado o de otro anticuerpo de detección. Después de 30 minutos, la placa se lava más profusamente (lavado 2 veces, remojado de 2 minutos, lavado 2 veces) y se añaden 100 µl de complejos de Avidina-Biotina-Fosfatasa alcalina previamente formados (Vector Labs). La placa se lava (lavado 2 veces, remojado de 2 minutos, lavado 2 veces, remojado de 5 minutos, 4 lavados) y se añade sustrato MUP a 0,06 mg/ml 1 x tampón de dietanolamina. Las placas se leen en un Millipore Cytoflour después de 15 minutos usando un filtro de excitación de 360 nm y un filtro de emisión de 460 nm.

Ejemplo 4

Generación de anticuerpos monoclonales

Se inmunizó a ratones Balb/c con inoculaciones múltiples por vía i.p. de péptido n.º 959 conjugado con KLH. Los esplenocitos de los animales inmunizados se fusionaron con el mieloma de ratón AG8 usando protocolos estándar (Wunderlich y cols., 1992, J. Immunol. Methods 147:1-11). Los sobrenadantes de los hibridomas resultantes se cribaron para detectar la inmunorreactividad contra el péptido n.º 958 acoplado a ovoalbúmina usando protocolos estándar de Elisa tal como se describe anteriormente. Los hibridomas positivos para la expresión de los MAb inmunorreactivos se clonaron al menos dos veces mediante dilución limitada y se realizó un análisis del isotipo de los MAb. Se preparó IgG de MAb purificada a partir de fluido de ascitis usando cromatografía por afinidad con Proteína-A.

Después el cribado de la fusión demostró que la inmunización de los ratones con el péptido n.º 959 conjugado con KLH y el cribado en formato ELISA de fase sólida con el péptido n.º 958 acoplado a ovoalbúmina produjo seis señales progenitoras positivas (numeradas de 369.1 a 369.6). Ambos péptidos tienen la región de β A4 de los aminoácidos 35-42, diferentes espaciadores en el extremo N y una cisteína para el acoplamiento covalente a las proteínas de vehículo (Figura 6). El extremo C libre con el grupo carboxi cargado y una longitud limitada de sólo 8 aminoácidos favorece la generación de anticuerpos que se dirigen de forma específica contra formas más largas de los péptidos β A4; por lo tanto, los péptidos β A4 que terminan antes del aminoácido 42 no serían reconocidos.

La Figura 6 representa el diagrama de la estructura del inmunógeno (vehículo-péptido) y el péptido de cribado (vehículo-péptido de cribado) que se usa.

Dos de las seis señales parentales finalmente no pudieron clonarse. De las cuatro restantes, dos dieron señales de inmunoprecipitación/centelleo superiores a los controles no inmunitarios normales sólo en un pequeño porcentaje; los otros dos (identificados como 369.6 y 369.2) mostraron señales del 18% y el 19%, respectivamente. Se llevó a cabo la producción de anticuerpos monoclonales a partir del fluido de ascitis y la posterior inmunopurificación de estos clones. La Tabla 1 compara los datos obtenidos con el IPSA para los sobrenadantes de los hibridomas y los anticuerpos purificados.

TABLA 1

Estirpe celular	Isotipo	IPSA (sobrenadante)	IPSA (purificado)
369.1	IgG1/IgG2b	3%	N.D.
369.2	IgG1	19%	25% (con 5 µg)
369.3	IgG1	2%	N.D.
369.6	IgG2b	18%	7% (con 10 µg)

Tabla 1. Comparación de las actividades de los anticuerpos en estirpes celulares de hibridoma. Los datos de los IPSA representan el porcentaje de β A4 traducido *in vitro* que pudo ser inmunoprecipitado o bien por los sobrenadantes de los hibridomas o por el anticuerpo purificado.

Ejemplo 5

Ensayo de inmunoprecipitación/centelleo para el cribado de hibridomas

Para desarrollar y cribar anticuerpos monoclonales que reconocen el péptido β A4 en solución en lugar de cuando está unido a una fase sólida, se desarrolló un ensayo en el que se cuantifica la inmunoprecipitación de un β A4 traducido *in vitro* (IVT β A4) marcado con 35 S-metionina. Se permite que una cantidad estándar de β A4 traducido *in vitro* forme complejos de anticuerpo/antígeno en una solución que puede optimizarse para determinar la potencia iónica, el pH, y la composición del detergente. Después, los complejos inmunitarios se precipitan con Proteína G (células Omnisorb) y se lavan profusamente, la radioactividad unida se cuenta en un escintilómetro de líquidos, se resta el ruido de fondo y se calcula la eficacia de la precipitación. Este ensayo de inmunoprecipitación/centelleo (IPSA) permite la rápida identificación y caracterización de anticuerpos, y se ha usado para analizar una variedad de anticuerpos contra β A4. El ensayo puede aplicarse en general a sobrenadantes de hibridomas monoclonales así como a suero policlonal para identificar anticuerpos que pueden usarse para inmunoprecipitaciones. Habitualmente pueden realizarse 18 IPSA en un día. Por lo tanto este es un procedimiento de cribado secundario de hibridomas rápido e informativo.

Resumiendo, se añadieron aproximadamente $1,5 \times 10^5$ DPM de β A4 traducido *in vitro* marcado con 35 S-metionina (IVT β A4) a 10 µl de 10 x tampón de inmunoprecipitación (NaCl 150 mM, NP-40 al 10%, ácido desoxicólico al 5%, SDS ~1%, Tris 500 mM a pH 8). A esto, se añadieron 90 µl de sobrenadante de células monoclonales de la fusión monoclonal de interés (denominada n.º 369) y se dejaron reaccionar durante 2 horas a 4°C. El ruido de fondo se determinó usando 90 µl de sobrenadante de un clon no reactivo; el control positivo era 90 µl de sobrenadante que contenía anticuerpo monoclonal 286.8A que se había obtenido primero contra una preparación de β A4 (1-42) sintético en bruto. Después de 2 horas, se añadieron 40 µl de una solución al 10% de células Omnisorb (Calbiochem) equilibradas en 1 x tampón de inmunoprecipitación (tampón de RIPA, NaCl 150 mM, NP-40 al 10%, ácido desoxicólico al 0,5%, SDS al 0,1%, Tris 50 mM a pH 8) y se dejaron reaccionar durante otras 2 horas más a 4°C agitando. Las células se sedimentaron mediante centrifugación durante 5 minutos a 4500 x g y a 4°C, y se lavaron 3 veces con 800 µl de tampón de inmunoprecipitación frío. Los sedimentos se transfirieron cuantitativamente a viales de centelleo y se contaron en un contador de centelleo Beckman LS6000 en modo Auto DPM. Se calculó el porcentaje de β A4 inmunoprecipitado.

Los ensayos de inmunoprecipitación/centelleo se realizaron con 1 µg de anticuerpo monoclonal purificado 369.2B en un volumen total de 100 µl x tampón de inmunoprecipitación al que se añadieron 5 µg de péptido competitivo. Las incubaciones y precipitaciones fueron las descritas anteriormente.

La Figura 7 representa el porcentaje de IVT β A4 inmunoprecipitado en función de la concentración de anticuerpo para los MAb 369.2, 369.6 y el MAb 286.8A. En las condiciones de este ensayo, 369.2 (y además el subclon 369.2B) es aproximadamente cuatro veces mejor que 369.6 para inmunoprecipitar IVT β A4 soluble, pero precipita un poco menos de la mitad que 286.8A. La Figura 7 muestra los resultados de la inmunoprecipitación de

β A4 traducido *in vitro* en función de la concentración de anticuerpo (μ g de anticuerpo/100 μ l de tampón de RIPA) donde:

$$\% \text{ de } \beta\text{A4 inmunoprecipitado} = \frac{(\text{dpm con MAb}) - (\text{dpm con control no o preinmunitario})}{(\text{dpm totales de } \beta \text{ A4/reacción})}$$

Los porcentajes con una concentración de MAb dada variaban únicamente algunos puntos porcentuales entre los experimentos.

IPSA para la caracterización monoclonal

Se añadieron aproximadamente $1,5 \times 10^5$ DPM de β A4 traducido *in vitro* marcado con ^{35}S -metionina a diversas cantidades de anticuerpo monoclonal purificado, o bien 369.2B, 369.6, o 286.8A, en un volumen total de 100 μ l de tampón de inmunoprecipitación, y se dejaron reaccionar tal como se describe anteriormente. Los complejos inmunitarios se precipitaron con Omnisorb, se lavaron y se contaron tal como se describe anteriormente.

Ejemplo 6

Caracterización del MAb 369.2B

Para caracterizar adicionalmente la mejor estirpe celular, 369.2B, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación/centelleo competitivo (IPSA competitivo). En esta variación se añadió 369.2B a un exceso molar de aproximadamente 200 veces de un péptido competidor marcado al mismo tiempo que β A4 1-42 traducido *in vitro* marcado. Tal como era de esperar, los péptidos de la región de β A4 humano, 1-40, 1-11, 1-28, 12-28, así como el péptido inverso 40-1 no compitieron con el β A4 traducido *in vitro* marcado con ^{35}S -metionina en la inmunoprecipitación, mientras que el péptido 1-42 sí (Figura 8).

Estos resultados fueron corroborados en un formato ELISA en fase sólida: el péptido de cribado acoplado a ovoalbúmina absorbido que contiene la región de β A4 35-42, así como el péptido 1-42 compiten, mientras que 1-40 no (Figura 9). La menor competitividad del péptido 1-42 comparado con el 35-42 acoplado a ovoalbúmina puede deberse a factores de conformación y/o solubilidad relacionados con el determinante antigénico, o quizá simplemente a la estequiometría particular de la conjugación (ovoalbúmina, un vehículo con peso molecular de 45 kD comparado con 4 kD del péptido 1-42, y que tiene entre 5 y 15 grupos maleimida conjugables por mol de vehículo).

La Figura 8 muestra el ensayo de competición de péptidos por inmunoprecipitación/centelleo para la determinación de los epítomos de MAb 369.2. El péptido competidor (5 μ g) se mezcló con β A4 traducido *in vitro* ($\sim 1,5 \times 10^5$ DPM o ~ 200 pg) después se inmunoprecipitó con 2 μ g de 369.2, donde:

$$\% \text{ de } \beta\text{A4 inmunoprecipitado} = \frac{(\text{dpm con MAb}) - (\text{dpm con control no o preinmunitario})}{(\text{dpm totales de } \beta \text{ A4/reacción})}$$

Los porcentajes con una concentración de MAb dada variaban habitualmente sólo algunos puntos porcentuales entre los experimentos.

La Figura 9 muestra la situación de los epítomos del MAb 369.2 mediante el ensayo competitivo. C369.2 (50 ng de IgG/100 μ l) se preincubó con o sin competidores peptídicos sintéticos (22°C, 1 hora), después se sometió a Elisa contra 35-42 acoplado a ovoalbúmina unido a la placa (200 ng/pocillo). La competición porcentual se calculó relativa a la unión de MAb en ausencia de competidor, es decir donde:

$$\% \text{ de competición} = \frac{(\text{señal sin competidor}) - [(\text{señal con competidor}) - (\text{ruido de fondo})]}{(\text{señal sin competidor})}$$

El cuadrado negro es el conjugado peptídico 35-42 (OVA); el cuadrado blanco es el péptido 1-42; y el diamante negro es el péptido 1-40.

A partir de estos datos, los presentes inventores concluyen que 369.2B monoclonal es específico para el extremo C del péptido β A4 de longitud completa (1-42). Aunque el determinante antigénico exacto no se ha localizado exactamente, claramente afecta a los residuos posteriores al 40 y, dado que el anticuerpo se produjo contra un péptido sintético corto, es improbable que el determinante afecte a otros residuos de β A4 que pueden estar yuxtapuestos por la conformación. De forma específica, 369.2B es una herramienta muy importante en el reconocimiento de la especie β A4 que termina en la posición 42.

Una observación adicional e interesante del ensayo de competición de péptidos es la capacidad de inmunoprecipitación mejorada de β A4 traducido *in vitro* por el decapeptido 25-35. Este fenómeno se observó también en ensayos que usaban otro anticuerpo monoclonal (es decir, 286.8A) así como un antisero policlonal de conejo (no se muestran los datos). Los presentes inventores también saben por otros experimentos en los que se usaron cantidades variables

de detergente, específicamente SDS, en ensayos de IPISA con MAb 286.8A, que puede inmunoprecipitarse más β A4 con cantidades crecientes de detergente (no se muestran los datos). De forma interesante, se ha demostrado que SDS es ineficaz para solubilizar agregados de β A4, al menos tal como se muestra mediante SDS-PAGE (Burdick y cols., 1992). Sin embargo, no está completamente claro porqué SDS mejora la capacidad de inmunoprecipitación de β A4.

Ejemplo 7

Estudios inmunocitoquímicos

Los presentes inventores han acometido estudios inmunocitoquímicos con 369.2B. El patrón de tinción de 369.2B (dilución de 1/10.000 de una solución de anticuerpo purificado de ascitis a 22 mg/ml) mostró diferencias interesantes con el anticuerpo monoclonal 286.8A que los presentes inventores han demostrado que reconoce el 3-8 de β A4 y es específico para β A4 humano (no se muestran los datos). Los resultados obtenidos a partir de la inmunocitoquímica demostraron que 369.2B es un anticuerpo excelente (a una dilución de 1/10.000) para marcar de forma específica los núcleos de las placas de β -amiloide difusas, así como los depósitos de amiloide fibrilar y los depósitos de amiloide vascular (Figura 10).

La Figura 10 es una fotomicrografía que muestra las placas de β -amiloide, los vasos sanguíneos y los depósitos perivasculares de β A4 en un corte de 10 μ m de grueso embebido en parafina del cerebro de una paciente de 76 años con enfermedad de Alzheimer. Las secciones de los tejidos se pretrataron con ácido fórmico al 88% (30 minutos), después se marcaron usando un kit de avidina-biotina-peroxidasa (Vector Laboratories, Burlington, CA) con níquel-diaminobencidina como cromógeno. El anticuerpo monoclonal 369.2B marca placas con una variedad de morfologías, entre otras placas nucleadas, perivasculares, y difusas (no amiloidóticas). También marca un subconjunto de vasos sanguíneos amiloidóticos. Estudios adicionales han demostrado también que el péptido β A4 1-43 no es capaz de competir por la tinción (a un exceso de más de 1000 veces de péptido), mientras que β A4 1-42 suprimió completamente la señal (Tabla 2). De nuevo, tal como era de esperar, 1-40 ó 40-1 no compitieron por la tinción. A partir de estos estudios los presentes inventores pueden concluir ya que este anticuerpo es una herramienta excelente para las pruebas inmunocitoquímicas. Tal como sugieren los estudios *in vitro* que muestran diferencias fisicoquímicas entre 1-40 y 1-42, es posible que estas dos especies de β A4 muestren patrones distintos en el cerebro con enfermedad de Alzheimer. Con el anticuerpo monoclonal de la presente invención, los presentes inventores son ahora capaces de comenzar a responder a esta pregunta. Así, el anticuerpo monoclonal y los procedimientos de la presente invención son de utilidad para el uso diagnóstico y terapéutico en todas las metodologías inmunológicas y relacionadas que pueden aplicarse a la detección, control, extracción, inhibición y modificación de una única especie de β A4, en el diagnóstico y tratamiento de AD tal como se define en las reivindicaciones.

TABLA 2

Anticuerpo monoclonal usado para la tinción

Péptido competitivo	MAb 286.8A contra el extremo N	MAb 369.2B contra el extremo C
Ninguno/tampón	+	+
Ninguno/DMSO	+	+
"40-1" humano	+	+
"1-16" humano	-	+
"1-16" murino	+	+
"1-40" humano	-	+
"1-42" humano	-	-
"1-43" humano	-	+
"35-42" humano con espaciador	+	-
Tabla 2. Resultados de los experimentos de unión competitiva e inhibición de la tinción, + + + indica una tinción fuerte. – Indica una tinción no detectable.		

Debería entenderse que la descripción anterior enfatiza ciertas realizaciones específicas de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se une de forma específica al péptido β A4 (1-42) asociado a amiloide difuso, amiloide fibrilar, ovillos neurofibrilares, y amiloide vascular, y no a los péptidos β A4 (1-40) ni β A4 (1-43).

2. Un anticuerpo monoclonal que se une de forma específica al péptido β A4 (1-42) y no a los péptidos β A4 (1-40) ni β A4 (1-43), que puede obtenerse inmunizando a un mamífero con el péptido Cys-Asp-Gly-Asp-Gly-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala (SEC ID N.º: 1) conjugado con un vehículo inmunológico adecuado.

3. Un anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2 que es un anticuerpo de la clase IgG.

4. Un anticuerpo monoclonal de la reivindicación 3 que es un anticuerpo de la subclase IgG1 o IgG2b.

5. Una proteína que es un fragmento inmunológicamente activo del anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Un procedimiento de detectar la presencia del péptido β A4 que termina en el aminoácido 42 Ala en tejido, que comprende poner en contacto una muestra de tejido con el anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la proteína de la reivindicación 5, y detectar la presencia de dicho anticuerpo monoclonal o proteína.

7. Un procedimiento para purificar de forma selectiva el péptido β A4 que termina en el aminoácido 42 Ala, que comprende poner en contacto una muestra a purificar con el anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la proteína de la reivindicación 5, separar el péptido β A4 que termina en el aminoácido 42 Ala de la muestra a purificar, y aislar el péptido β A4 que termina en el aminoácido 42 Ala.

8. Un procedimiento de detectar péptido β A4 que termina en el aminoácido 42 Ala asociado a la enfermedad de Alzheimer, que comprende poner en contacto una muestra a analizar con el anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la proteína de la reivindicación 5 y detectar la presencia del péptido β A4 que termina en el aminoácido 42 Ala.

9. Un procedimiento de prevenir la agregación del péptido β A4 que termina en el aminoácido 42 Ala *in vitro*, que comprende administrar el anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la proteína de la reivindicación 5.

10. El anticuerpo monoclonal tal como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la proteína de la reivindicación 5 para usar en la detección de la presencia del péptido β A4 que termina en el aminoácido 42 Ala.

11. El anticuerpo monoclonal tal como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la proteína de la reivindicación 5 para usar en la prevención de la agregación del péptido β A4 que termina en el aminoácido 42 Ala.

12. Un kit para detectar la presencia del péptido β A4 que termina en el aminoácido 42 Ala, que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la proteína de la reivindicación 5, y un medio de detectar el anticuerpo o proteína.

13. Un procedimiento de obtener el anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende inmunizar a un mamífero no humano con el péptido Cys-Asp-Gly-Asp-Gly-Asp-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala (SEC ID N.º: 1) conjugado con un vehículo inmunológico adecuado.

14. Uso del péptido de la SEC ID N.º: 1 conjugado con un vehículo inmunológico adecuado en la fabricación de un medicamento para la generación de una respuesta inmunitaria en un mamífero, en el que el conjugado peptídico genera un anticuerpo que de forma selectiva se une al péptido β A4 (1-42) y no a los péptidos β A4 (1-40) ni β A4 (1-43).

15. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la proteína de la reivindicación 5.

16. Uso del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o de la proteína de la reivindicación 5 en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

17. Uso del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o de la proteína de la reivindicación 5 en la fabricación de un kit para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

18. El anticuerpo monoclonal tal como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la proteína de la reivindicación 5 para usar en la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

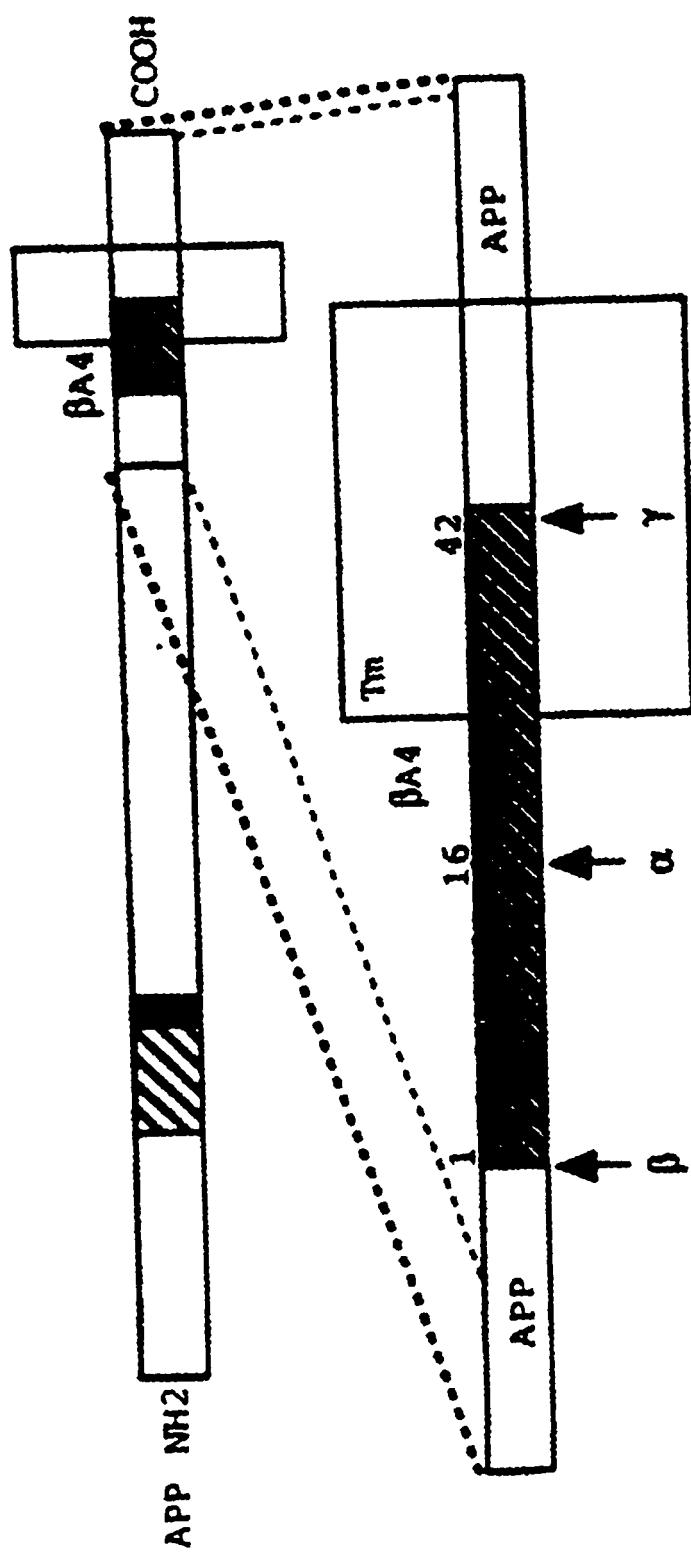


Figura 1

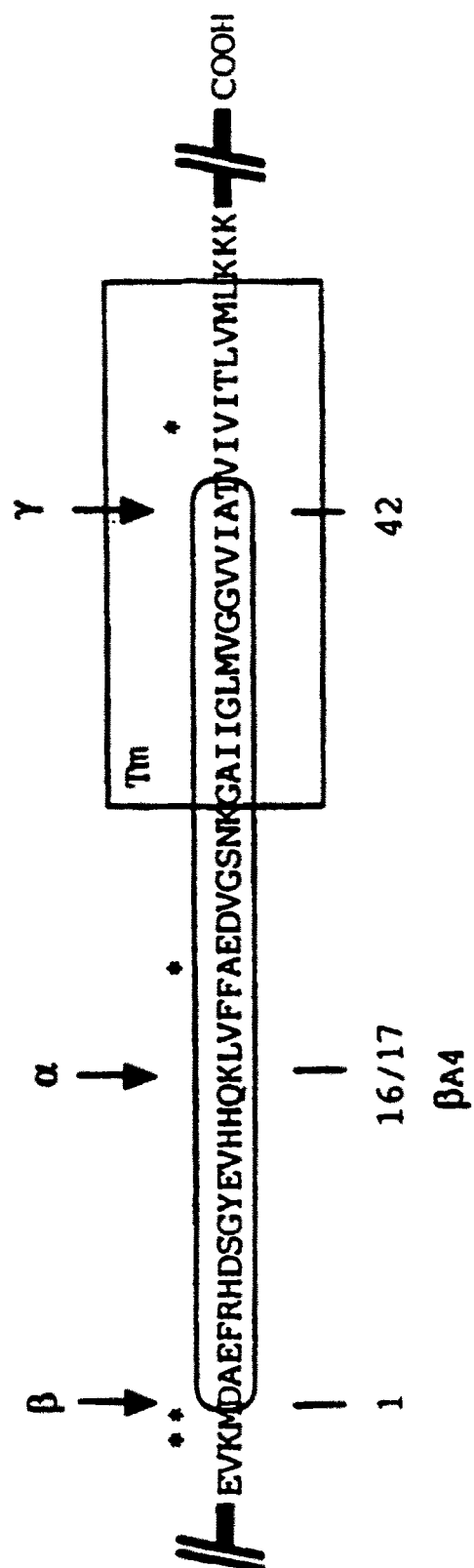


Figura 2

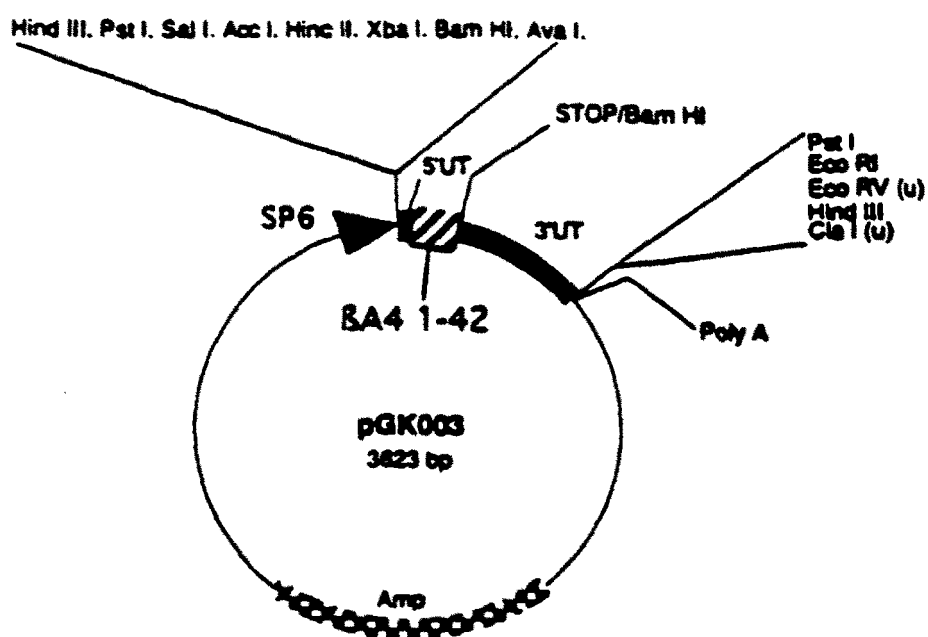


Fig. 3

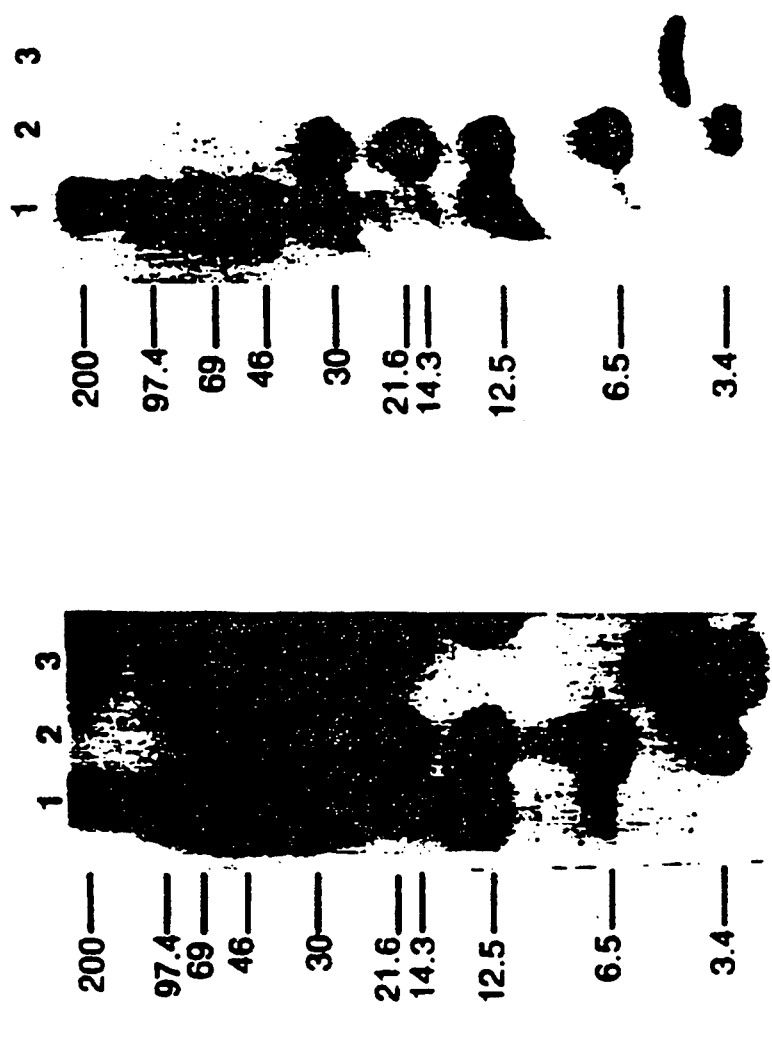


Fig. 4A.

e gel.

Fig 4B.

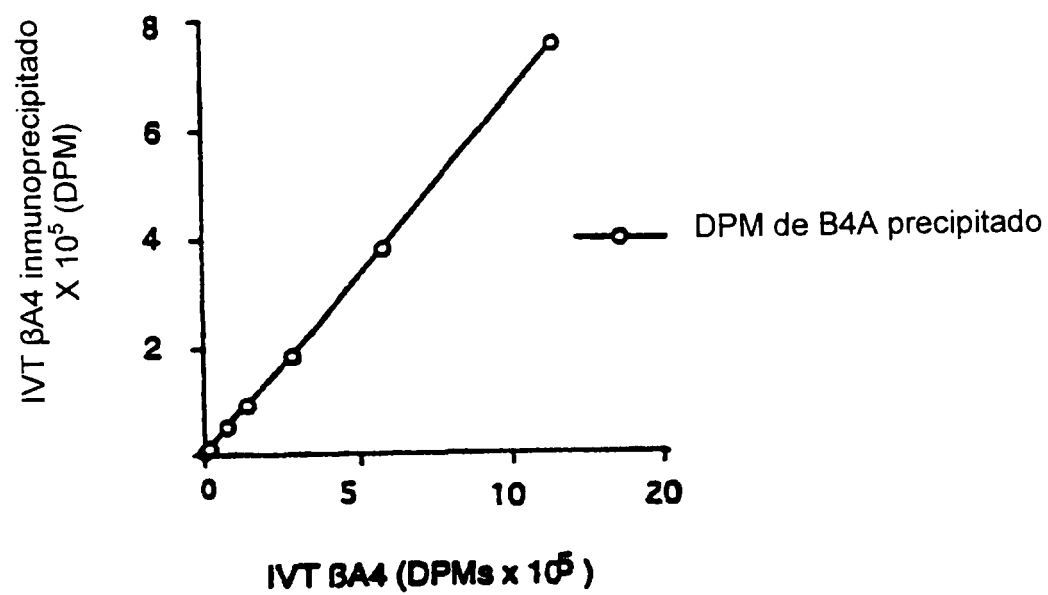


Fig. 5

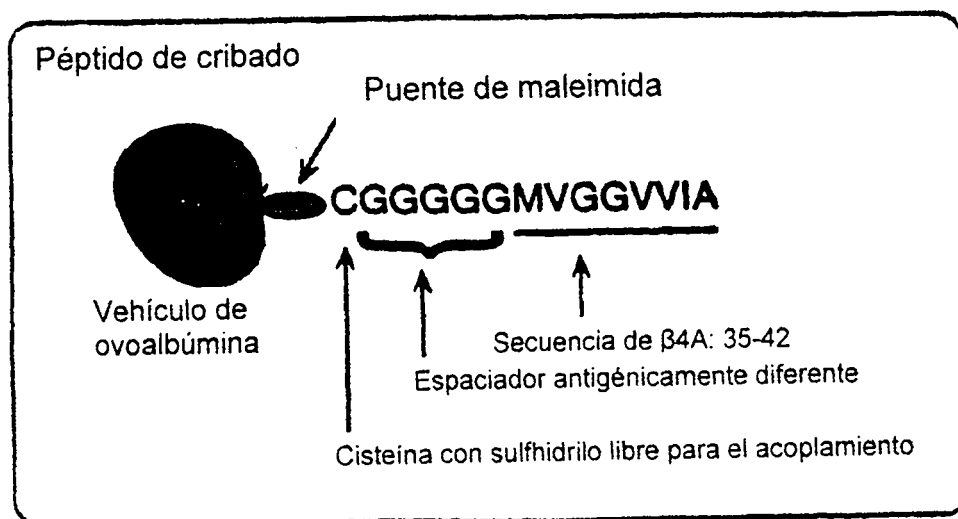
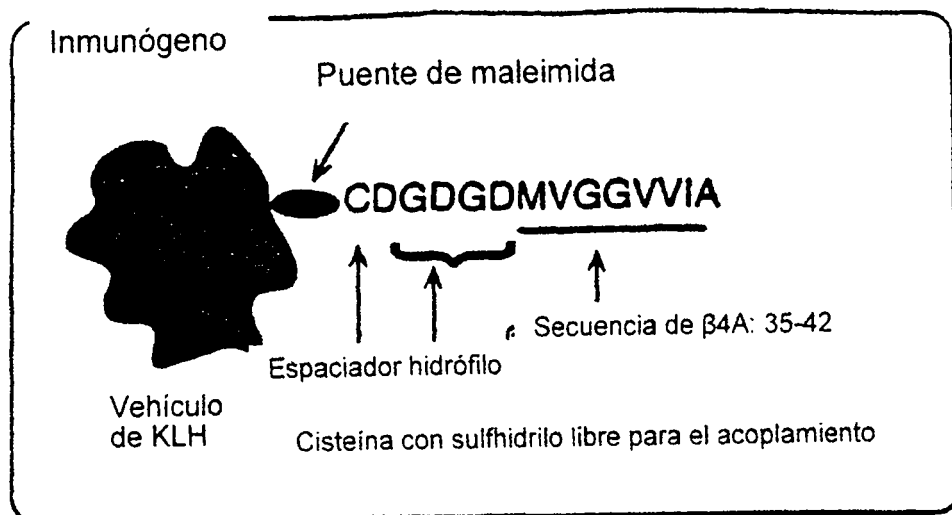


Fig 6

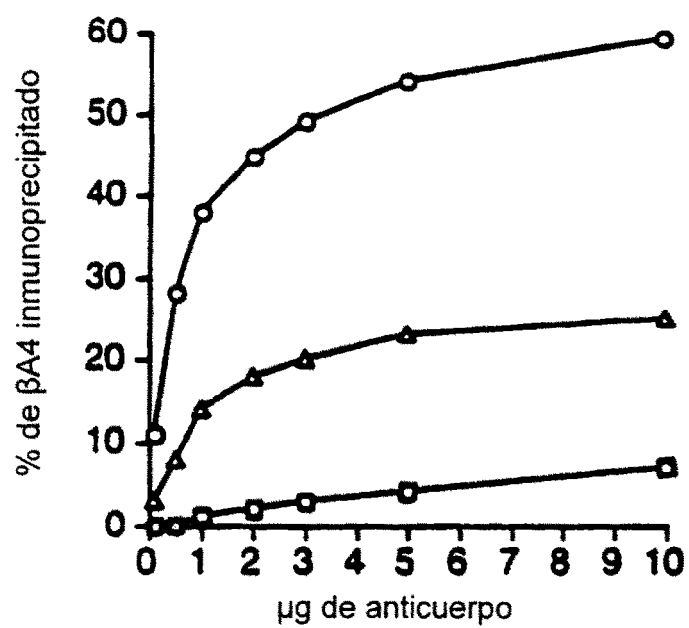


Fig. 7.

—○— 288.8A, —△— 369.2B, —□— 369.6

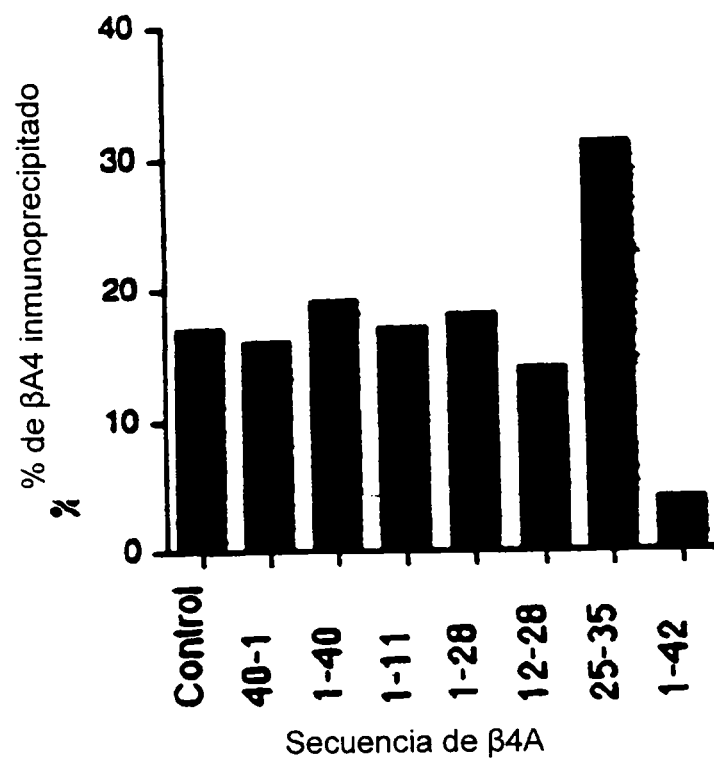


Fig. 8.

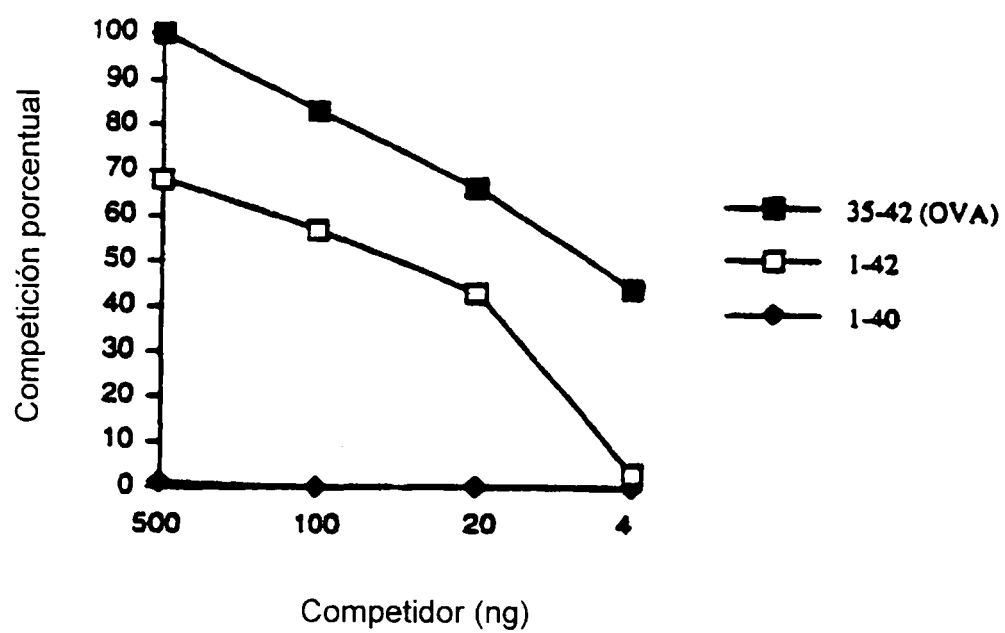


Fig. 9.

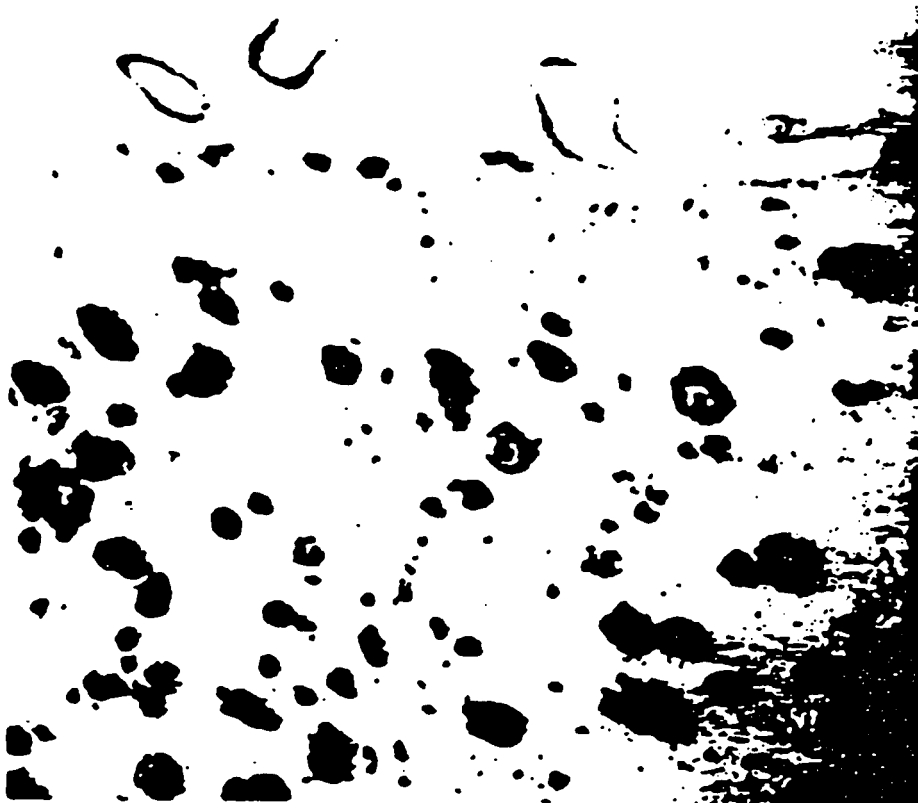


Fig. 10

ES 2 288 896 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: König, Gerhard Graham, Paul
- (ii) TÍTULO DE INVENCION: Anticuerpo monoclonal específico para el péptido β A4
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 3
- 10 (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: Allegretti & Witcoff, Ltd.
- (B) CALLE: 10 South Wacker Drive Suite 3000
- 15 (C) CIUDAD: Chicago
- (D) ESTADO: Illinois
- (E) PAÍS: Estados Unidos
- 20 (F) CÓDIGO POSTAL: 60606
- (v) FORMA DE LECTURA INFORMATIZADA:
- (A) TIPO DE MEDIO: disquete
- (B) ORDENADOR: PC compatible con IBM
- 25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) PROGRAMA: PatentIn Release n.º 1.0, Versión 1.25
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- 30 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
- (C) CLASIFICACIÓN:
- 35 (viii) INFORMACIÓN DEL REPRESENTANTE LEGAL/AGENTE:
- (A) NOMBRE: McDonnell, John J
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 26.949
- 40 (C) NÚMERO DE REFERENCIA/ARCHIVO: 95.216
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES
- (A) TELÉFONO: 312-715-1000
- 45 (B) TELEFAX: 312-715-1234

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. N.º:1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 50 (A) LONGITUD: 14 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: única
- 55 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N.º:1:
- 60 Cys Asp Gly Asp Gly Asp Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
- 1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. N.º:2:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 14 aminoácidos

ES 2 288 896 T3

- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N.º:2:

10

Cys Gly Gly Gly Gly Gly Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º:3:

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 59 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

20

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

25

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: sitio de escisión

(B) LOCALIZACIÓN: 4 .. 5

30

(D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /marcador- Beta /nota- “sitio de escisión beta en APP”

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio de escisión

(B) LOCALIZACIÓN: 20 .. 21

35

(D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /marcador- Alfa / nota= “sitio de escisión alfa en APP, residuos 16/17 de β A4.”

(ix) CARACTERÍSTICA:

40

(A) NOMBRE/CLAVE: Sitio de escisión

(B) LOCALIZACIÓN: 46..47

(D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /marcador= gamma /nota= “sitio de escisión gamma en APP”

45

(ix) CARACTERÍSTICA

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 5 .. 47

(D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /marcador- β A4/nota= “péptido β A4”

50

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Región

(B) LOCALIZACIÓN: 33 .. 56

55

(D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /marcador- Tm /nota- “región transmembrana de APP”

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Región

60

(B) LOCALIZACIÓN: 1.. 32

(D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /marcador- Ex. /nota- “parte extracelular del extremo N de APP”

65

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N.º:3:

ES 2 288 896 T3

	Glu	Val	Lys	Met	Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val
	1				5					10					15	
5	His	His	Gln	Lys	Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys
				20					25					30		
	Gly	Ala	Ile	Ile	Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val	Val	Ile	Ala	Thr	Val
			35					40					45			
10	Ile	Val	Ile	Thr	Leu	Val	Met	Leu	Lys	Lys	Lys					
		50					55									
15																
20																
25																
30																
35																
40																
45																
50																
55																
60																
65																