

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-173790- -00009-0000

Fecha: 2014-02-28 16:36:03 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 17

Re: Expediente N°. 12-173.790

Solicitud de Patente de Invención titulada: "EPÍTOPO ESPECÍFICO BETA-AMILOIDE OLIGOMÉRICO Y ANTICUERPOS"

Solicitante: THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA

Nuestra Ref.: P2012/000114

RESPUESTA AL OFICIO No. 19565, NOTIFICADO POR FIJACIÓN EN LISTA No. 042

DE FECHA 22 DE OCTUBRE DE 2013

(PRIMER EXAMEN DE FONDO)

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad solicitante, me permito manifestar lo siguiente ante el auto emanado por ese Despacho, dentro del plazo legal de prórroga previsto en el artículo 45 de la Decisión 486, en los siguientes términos:

1. En primer lugar, con el ánimo de brindar mayor claridad a la materia reivindicada, me permito adjuntar un **Capítulo Reivindicatorio Modificado**, que reemplaza en su totalidad al Capítulo Reivindicatorio Modificado presentado el 19 de febrero de 2013.

Así entonces, el Capítulo Reivindicatorio Modificado contiene los siguientes cambios:

- se elimina la Reivindicación 14;
- las nuevas Reivindicaciones 1 a 3 corresponden a las antiguas Reivindicaciones 6 a 8, respectivamente;

- en la nueva Reivindicación 1 se eliminó la expresión “correspondiente a una “región de nudillo” de acceso a anticuerpos y expuesta a solventes del A β oligomérico” y ahora se especifica que la K (lisina) de la secuencia SNK está expuesta a disolvente, y que el péptido cíclico contiene como máximo 7 residuos de aminoácidos, lo cual encuentra soporte en la Figura 4 del Capítulo Descriptivo;
- las nuevas Reivindicaciones 4 a 8 corresponden a las antiguas Reivindicaciones 1 a 5, respectivamente;
- en las nuevas Reivindicaciones 2, 4 y 5 se eliminó la expresión “que corresponde a una “región de nudillo” de acceso a anticuerpos y expuesta a solventes del A β oligomérico”;
- la nueva Reivindicación 2 ahora es dependiente de la Reivindicación 1;
- la Reivindicación 3 ahora es dependiente de las Reivindicaciones 1 o 2, y se especificó que la SEQ ID NO: 1 corresponde a una región expuesta a disolvente;
- las nuevas Reivindicaciones 4 y 5 son dependientes de las Reivindicaciones 1 y 2, respectivamente;
- las nuevas Reivindicaciones 10 y 11 corresponden a las antiguas Reivindicaciones 11 y 10, respectivamente;
- la Reivindicación 12 ahora reclama un kit que comprenda al anticuerpo de las Reivindicaciones 4 a 8, e instrucciones para su uso, de acuerdo con la antigua Reivindicación 14;
- la nueva Reivindicación 14 corresponde a la antigua Reivindicación 15 y depende de las Reivindicaciones 4 a 8.

Adicionalmente, me permito presentar adjunto la Hoja sustituta 14 en la cual se corrige la representación del aminoácido “Tirosina” en la Tabla 1, quedando representado como “Y” en lugar de “T”.

Valga anotar que las modificaciones efectuadas al Capítulo Reivindicatorio y al Capítulo Descriptivo cumplen a cabalidad con lo estipulado en el Artículo 34 de la Decisión 486, ya que éstas de ninguna manera implican una ampliación de la protección correspondiente a la divulgación contenida en la solicitud inicial, pues éstas, por el contrario, corresponden a una drástica limitación de la materia reivindicada.

2. a- La Examinadora señala que el título no corresponde con el objeto de la solicitud pues es poco específico, y sugiere su modificación de acuerdo con el título de la solicitud internacional.

b- Atendiendo la amable sugerencia de la Examinadora, el título se modificó de la siguiente manera:

“EPÍTOPO ESPECÍFICO BETA-AMILOIDE OLIGOMÉRICO Y ANTICUERPOS”

3. a- i) La Examinadora señala que las reivindicaciones carecen de claridad por las siguientes razones:

- Las Reivindicaciones 1 a 5 y 10 no son claras porque deben incluir la estructura completa del anticuerpo que se reclama, mediante las secuencias de la región variable de la cadena ligera o de la cadena pesada; o las secuencias de los 3 CDR de la cadena ligera o de la cadena pesada. El anticuerpo no debe definirse de acuerdo con su resultado esperado, puesto que la definición de un biofármaco en términos de su actividad no permite distinguirlo del estado de la técnica;
- Las Reivindicaciones 6 y 7 caracterizan a un mismo péptido, por lo que sugiere definir relaciones de dependencia;
- La Reivindicación 8 presenta una falsa dependencia, ya que es dependiente de una reivindicación posterior;
- La Reivindicación 9 no es clara puesto que no define el anticuerpo o el rotulador detectable mediante sus características estructurales esenciales.
- La Reivindicación 12 no es clara porque ni el anticuerpo, ni el antígeno ni el rotulador están caracterizados, por lo que se debe presentar su estructura completa. Los mismos argumentos se aplican para la Reivindicación 14;
- La Reivindicación 13 no es clara porque la expresión “uno o más agentes” es relativa y no permite distinguir a la invención del estado de la técnica. La Examinadora sugiere sustituir dicha expresión por un término concreto e incluir la estructura de dichos agentes;
- El Capítulo Reivindicatorio no es conciso porque contiene un número excesivo de reivindicaciones independientes, lo que hace difícil el definir cuál es el objeto que se busca proteger.

ii) La Examinadora argumenta que el Capítulo Descriptivo no es claro pues la información allí contenida no permite que la persona medianamente versada en la materia comprenda el problema técnico y la solución aportada por la invención. En particular, la Examinadora señala:

- en virtud del Artículo 8 de la Decisión 486, se debe presentar la traducción al castellano de la solicitud de patente;
- La Tabla 1 presenta un error en donde se hace referencia al aminoácido "Tirosina", el cual se representa mediante "Y" según el código de una letra, o mediante la expresión "Tyr" de acuerdo con el código de tres letras.
- En el párrafo [00149] y en la Figura 4 se muestra material esencial para la invención que no es mencionado en las reivindicaciones.
- En el Capítulo Descriptivo no se mencionan los procesos de obtención de la SEQ ID NO: 1 flanqueada por cisteínas ni el de la obtención de los anticuerpos monoclonales humanizados, como el 5E3;
- Debido a que la presente solicitud de refiere a secuencias de nucleótidos y aminoácidos se deben presentar las listas de dichas secuencias en forma separada del Capítulo Descriptivo bajo el título "Listado de secuencias", y anexarlas en formato digital.

b- i) En primer lugar, llamo respetuosamente la atención de la Examinadora sobre las modificaciones realizadas en el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto, tal como se explican en el punto 1 del presente memorial.

En particular, frente a las objeciones de las Reivindicaciones 1 a 5, me permito aclarar que la presente invención reclama péptidos antigénicos cíclicos que comprenden un epítipo con una estructura cíclica restringida, y los anticuerpos que se unen a dichos péptidos, como se reclama en las Reivindicaciones 4 a 8. Dicha estructura cíclica restringida del epítipo puede ser reconocida únicamente por anticuerpos que tengan la estereoespecificidad requerida para reconocer la secuencia SNK tal y como se reclama en la Reivindicación 1, en donde el aminoácido K (lisina) se encuentra expuesto a disolventes y en donde el epítipo que tiene SNK contiene como máximo 7 residuos de aminoácidos.

En este punto me permito resaltar que un inventor está en su derecho de reclamar protección para la totalidad de un concepto inventivo desarrollado, sin importar la amplitud de éste, siempre y cuando se conserve el principio de unidad de invención y no haya arte previo que afecte su patentabilidad. Así, la naturaleza de una patente de invención cubre por definición un concepto inventivo global que abarca diferentes modalidades (diversas materializaciones de la invención, tales como diversos anticuerpos, composiciones, conjugados, vacunas etc.) ligadas por un efecto técnico común que finalmente delimita el alcance de la invención.

En el presente caso, el péptido antigénico de la invención (Reivindicaciones 1 y 2) corresponde al concepto inventivo global desarrollado, el cual también abarca los anticuerpos que, como se reclama en las Reivindicaciones 4 a 8, son capaces de unirse a dicho péptido que tiene una configuración cíclica restringida. Es decir, el antígeno y los anticuerpos reclamados responden a la posibilidad de obtener a la invención en diversas modalidades que comparten el mismo concepto inventivo, lo que corresponde a una práctica aceptada a nivel mundial en el ámbito de las patentes. De hecho, restringir los anticuerpos reivindicados a estructuras limitadas que se unan a los péptidos cíclicos derivados de Aβ de la invención, delimitaría excesiva e injustamente el alcance de la protección a la que el inventor tiene derecho.

Teniendo en cuenta lo anterior, los antígenos y anticuerpos de las Reivindicaciones 1 a 8 corresponden a diferentes modalidades de la invención, que comparten un único concepto inventivo, por lo que considero superadas las objeciones relacionadas con dichas reivindicaciones.

ii) De manera similar al punto anterior, y teniendo en cuenta que el alcance de las nuevas Reivindicaciones 1 a 8 fue precisado y limitado, me permito señalar que las composiciones de las Reivindicaciones 9 a 11 están caracterizadas por el péptido antigénico de las Reivindicaciones 1 a 3 o por el anticuerpo de las Reivindicaciones 4 a 8, las cuales corresponden a las características esenciales novedosas e inventivas de dichas composiciones.

Es decir, la patentabilidad de estas composiciones recae en la novedad y nivel inventivo del anticuerpo o péptido antigénico que se encuentran en éstas, más no en las composiciones como tal y mucho menos en excipientes adicionales que puedan contener. Las Reivindicaciones 9 a 11 reclaman una composición farmacéutica (cualquier composición bien sea un inmunoconjugado o una vacuna) que esté caracterizada porque contiene el anticuerpo o péptido antigénico de la presente invención, sin limitación a excipientes, porcentajes o condiciones y sin importar la forma de dosificación.

De hecho, definir los otros ingredientes que conformen dichas composiciones, o establecer proporciones específicas resulta irrelevante, y no proporcionar dicha información no afecta la claridad de las reivindicaciones, tal y como lo establece el Instructivo para el Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelos de Utilidad de la Superintendencia de Industria y Comercio. En dicho documento, la SIC señala que: “Si, por ejemplo, la característica técnica

esencial de la composición es el compuesto activo, el examinador no deberá requerir que se mencionen también otras características estructurales¹.

En vista del lineamiento establecido por la SIC en su Instructivo, las Reivindicaciones 9 a 11, que reclaman una composición definida por el péptido antigénico o anticuerpo de la invención, son absolutamente claras y no debió requerirse que se mencionen otras características estructurales como los excipientes o agentes con los que el ingrediente activo esté presente en la composición.

iii) En adición a lo anterior, vale la pena señalar que la antigua Reivindicación 14 fue eliminada, y la Reivindicación 3 (antigua Reivindicación 8) ahora depende de las Reivindicaciones 1 y 2, por lo que considero superadas las objeciones frente a las mismas.

iv) En cuanto a las observaciones realizadas por la Examinadora respecto al Capítulo Descriptivo, adjunto al presente memorial un disco compacto (CD) que contiene la traducción al castellano en formato pdf.

Adicionalmente, me permito adjuntar al presente memorial el Listado de Secuencias que se presentó ante la oficina Europea de Patentes para ilustrar de manera específica las secuencias de los aminoácidos de los péptidos de la invención, así como de los nucleótidos que codifican al anticuerpo que se une a dichos epítomos.

Como lo señalé en el punto 1 del presente memorial, adjunto también se encuentra la Hoja Sustituta 14, en la que se corrige el error en la representación del aminoácido "Tirosina" ("T"), por la representación correcta ("Y").

v) Ahora bien, respecto a las observaciones de la Examinadora sobre la importancia de la información contenida en los párrafos [00149] y a la Figura 4 y su sugerencia de incluirla en las reivindicaciones, llamo la atención sobre las modificaciones realizadas en el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto, en particular, las Reivindicaciones 2 y 3 incluyen el epítomo caracterizado por tener la SEQ ID NO 1, que corresponde a la estructura que se expone en la Figura 4.

Sin embargo, respecto a la información del párrafo [00149], me permito señalar que como se explicó en el punto 3.b.ii., las reivindicaciones sólo deben incluir los **elementos esenciales** de la

¹ Instructivo Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelo de utilidad. Superintendencia de Industria y Comercio. 2012. Sección 2.6.5.4. Página 40. Relativo a las "Características esenciales" (disponible electrónicamente en http://api.sic.gov.co/Documentos/Guia_Examen_Patentes.pdf)

invención que la distinguen del arte previo, más no aquellas no esenciales. Dichas características no esenciales se divulgan en el Capítulo Descriptivo.

vi) Finalmente, y respecto a la objeción de la Examinadora sobre la no mención de los procesos de obtención de la SEQ ID NO:1 en el Capítulo Descriptivo, me permito llamar respetuosamente su atención sobre el Ejemplo 2 del Capítulo Descriptivo, en el que se describen las etapas generales de la producción del péptido de la presente invención, así como se aclara que para efectuar ciclación de los mismos se pueden emplear varias técnicas conocidas por las personas medianamente versadas en la materia.

4. a- La Examinadora señala que las patentes WO2010/002251 (D1) y WO2010/010469 (D2) afectan el nivel inventivo de la presente solicitud.

La Examinadora argumenta que D1 divulga un péptido cíclico conformacional modificado de A β 1-42 oligomérico, que posee SNK (SEQ NO:2 y 3), y anticuerpos monoclonales dirigidos contra éstos, que reconocen las formas oligoméricas de A β como la forma asociada a depósitos cerebrales de dicha proteína en tejido humano.

Según la Examinadora, la diferencia entre la presente invención y D1 consiste en que la secuencia divulgada por D1 sólo puede tener una glicina flanqueando a la secuencia SNK, en lugar de las dos cisteínas flanqueantes de la secuencia SNK que reclama la presente invención. D1 divulga que dicha secuencia puede contener de 4 a 8 residuos unidos a la lisina (K), que a su vez pueden estar unidos al toxoide tetánico (adyuvante), y en donde el proceso de ciclización involucra residuos C-terminales diferentes a la cisteína, tales como, Y, N, G, K, T, V, L, I o A, o bien sea unidos al extremo N-terminal A, G, E, Q, K, D o N, donde adicionalmente, los anticuerpos y sus variantes reclamados por D1 fueron generados frente al péptido reclamado, pueden estar opcionalmente unidos al toxoide tetánico.

La Examinadora argumenta que no hay evidencia de que la presencia de las dos cisteínas flanqueando la SEQ ID NO:1 del péptido de la invención, que son necesarias para su ciclación proporcione un epítipo cíclico con potencial inmunogénico con un efecto sorprendente, toda vez que D1 enseña péptidos con residuos diferentes e inclusive una cisteína en el extremo C-terminal que proporcionan un determinante antigénico conformacional cíclico que comprende el tripeptido SNK, siendo éste capaz de generar anticuerpos específicos capaces de reconocer la isoforma oligomérica del A β 1-42.

Adicionalmente D2 divulga oligómeros sintéticos Aβ (1X-38..43), en donde X corresponde a cualquiera de los residuos 15 a 22 derivados de la proteína humana Aβ 1-42, comprendiendo al oligómero truncado Aβ 20-42 que contiene a la secuencia SNK. D2 proporciona péptidos inmunogénicos derivados de Aβ humana y anticuerpos específicos con reactividad cruzada sobre la proteína beta amiloide, en especial la isoforma Aβ 1-42 oligomérica asociada a amiloidosis.

Teniendo en cuenta lo anterior, la Examinadora concluye que una persona medianamente versada emplearía péptidos con epítipo conformacional cíclico como se enseñan en D1 y D2 con el fin de generar anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra el tripéptido SNK. D1 enseña péptidos que son capaces de generar un título de anticuerpos de hasta 8000dils y reconocen al péptido oligomérico humano Aβ 1-42 usando concentraciones de 2.5 μM, y D2 divulga anticuerpos monoclonales que reconocen a la forma oligomérica truncada de la proteína Aβ (20-42), así como a la proteína oligomérica Aβ 1-42 a partir de plasma humano, de manera selectiva o con una reactividad baja frente a la isoforma monomérica de Aβ en líquido cefalorraquídeo que tengan una alta afinidad reflejada por un valor de KD de 1X10⁻¹¹ M, por lo que la presente invención no reviste nivel inventivo.

b- i) En primer lugar, me permito señalar nuevamente que los péptidos cíclicos reclamados corresponden a un epítipo conformacional. Es decir, además de su estructura primaria (las secuencias de aminoácidos), la longitud del péptido cíclico y cómo se forma el bucle (qué aminoácidos están involucrados) son también críticos al momento de decidir las propiedades de dicho péptido cíclico. Por ejemplo, una menor cantidad de residuos aminoacídicos involucrados en el bucle generan una mayor tensión estérica en el péptido cíclico. Esto afectará la conformación del péptido y la conformación de las cadenas laterales de dichos residuos aminoácidos.

Ahora bien, el péptido cíclico de la invención requiere una lisina (K) expuesta a disolvente y contiene como máximo 7 residuos de aminoácidos, características esenciales que no están divulgadas en D1. Para ilustrar de una mejor manera las diferencias relevantes que existen entre la presente invención y los documentos citados por la Examinadora, me permito presentar la siguiente tabla comparativa:

	Lys del SNK en el antígeno	Número de aminoácidos en el antígeno
Presente Invención	“Expuesta a disolvente”	7 aminoácidos o menos.
D1	“protegido de solvente” (pág. 16, líneas 9-13)	• 11-15 aminoácidos; • Péptidos de Fórmula: X₁X₂X₃VGSN-Z, X₂X₃VGSNK-Z o X₃VGSNKG-Z;

		donde Z es preferiblemente un péptido de 4 a 8 residuos de aminoácidos 4-8 o una estructura esteroidal • pág. 2, líneas 29-33 citado por la Examinadora: 11-15 aminoácidos • Fig. 2: 10 aminoácidos • Ejemplos 1 y 2: 10 - 11 aminoácidos
D2	No reclama péptidos cíclicos	• Aβ(X - 38 .. 43), donde X se conforma por los aminoácidos 12 ~24: 15-32 ; • Incluyendo al Aβ(20-42): 23 aminoácidos.

Como salta a la vista de la tabla anterior, las características esenciales del péptido cíclico de la invención no están divulgadas en el arte previo. De hecho, a la luz de las enseñanzas de D1 y D2, una persona medianamente versada en la materia no habría podido llegar al péptido cíclico de la invención.

ii) Ahora bien, difiero respetuosamente de la opinión de la Examinadora respecto a los efectos sorprendentes de la invención.

Como se explica en detalle en el Capítulo Descriptivo, el epítopo que contiene los residuos 26-28 SNK, restringido conformacionalmente, no se encuentra presente con esta configuración en el Aβ lineal ni en la proteína APP (proteína precursora de amiloide). Así, **no se esperaría que los anticuerpos dirigidos contra este epítopo restringido conformacionalmente se unieran al Aβ lineal ni a la proteína APP**, y en cambio, serían anticuerpos que se unirían de manera específica a los oligómeros de Aβ.

La conformación cíclica de los residuos SNK, localizado en la región de nudillo de los oligómeros de Aβ, da lugar a un epítopo conformacional novedoso que está expuesto a disolventes y disponible para unirse a anticuerpos. De hecho, los ejemplos de la presente invención evidencian la capacidad del epítopo reclamado de los oligómeros de Aβ para unirse a determinados anticuerpos, lo que evidencia que dicho epítopo novedoso restringido conformacionalmente tiene propiedades ventajosas para unirse de manera selectiva a anticuerpos.

Adicionalmente, el epítopo de la presente invención que presenta una configuración cíclica restringida no está presente en la superficie molecular de la APP y por lo tanto limita el reconocimiento autoinmune de esta proteína. La fracción GSNKG de la proteína APP que se localiza en la superficie celular de las neuronas y de los monocitos no tiene restricciones en cuanto a su estructura, lo que hace que los anticuerpos que reconocen y se unen al epítopo de la presente invención sean incapaces de unirse a esta proteína, como se demuestra en los ejemplos. Adicionalmente, los anticuerpos que reconozcan dicho epítopo muestran una reactividad muy

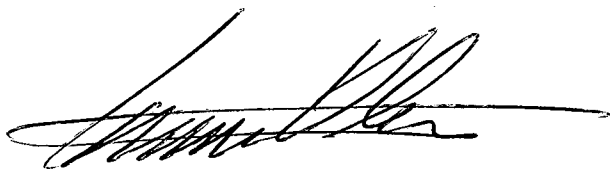
baja o nula frente al A β monomérico y a las fibras de A β debido a restricciones e impedimentos estéricos, así como a otros factores que imposibilitan dicha unión.

A la luz de lo anterior, es posible corroborar que la materia reclamada en la presente invención no sólo es completamente diferente a la que divulga el arte previo, sino que nada en dichos documentos le permitiría a la persona medianamente versada en la materia predecir la actividad que se explicó anteriormente y que se encuentra ilustrada en los Ejemplos.

Es posible concluir entonces que la persona medianamente versada en la materia, partiendo de las enseñanzas de D1 y D2 no habría podido obtener a los péptidos antigénicos cíclicos de la presente invención de manera evidente y con alguna expectativa de éxito, por lo que la presente invención reviste nivel inventivo.

5. Por todo lo anterior, considero que las objeciones presentadas por la Examinadora en su primer examen de fondo, han sido resueltas y por consiguiente solicito respetuosamente que el Despacho tenga por cumplidos los requisitos de patentabilidad y proceda con la concesión de la patente.

Atentamente,



CARLOS R. OLARTE

C.C. No. 79.782.747 de Bogotá

T.P. 74.295

Anexos:

- Capítulo Reivindicatorio Modificado.
- Listado de Secuencias.
- Hoja Sustituta Página 14 del Capítulo Descriptivo.
- CD que contiene la traducción al castellano del Capítulo Descriptivo en formato pdf.

CAPÍTULO REIVINDICATORIO MODIFICADO

(Primer Examen de Fondo)

1. Un péptido antigénico cíclico que comprende un epítipo que tiene una configuración cíclica restringida, en donde el epítipo tiene una secuencia de aminoácidos de al menos SNK, en donde la K (lisina) está expuesta a disolvente, y en donde el epítipo que tiene SNK contiene como máximo 7 residuos de aminoácidos.
2. Un péptido antigénico de acuerdo con la Reivindicación 1 que comprende un epítipo que tiene una configuración cíclica restringida, en donde el epítipo comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la SEQ ID NO: 1.
3. El péptido antigénico de las Reivindicaciones 1 o 2, en donde la SEQ ID NO: 1 corresponde a una región expuesta a disolvente, "región de nudillo" de acceso a anticuerpos del A β oligomérico, y en donde la región expuesta a disolvente, "región de nudillo" de acceso a anticuerpos del A β oligomérico corresponde a los residuos 25 a 29 del A β oligomérico (1-40) o del A β oligomérico (1-42).
4. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un péptido antigénico cíclico de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el péptido antigénico cíclico comprende un epítipo que tiene una configuración cíclica restringida que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos SNK, en donde la K (lisina) está expuesta a disolvente, y en donde el péptido antigénico cíclico contiene como máximo 7 residuos de aminoácidos.
5. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un péptido antigénico cíclico de acuerdo con la Reivindicación 2, en donde el péptido antigénico cíclico comprende un epítipo que tiene una configuración cíclica restringida que tiene la secuencia de aminoácidos que corresponde a la SEQ ID NO: 1.
6. El anticuerpo aislado de las Reivindicaciones 4 o 5, en donde el anticuerpo se une específicamente con mayor afinidad a una forma oligomérica de A β que a una forma no oligomérica de A β .

12

7. El anticuerpo aislado de cualquiera de las Reivindicaciones 4 a 6, en donde el anticuerpo es monoclonal.
8. El anticuerpo aislado de cualquiera de las Reivindicaciones 4 a 7, en donde el anticuerpo es humanizado.
9. Un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de cualquiera de las Reivindicaciones 4 a 8 conjugado con un rotulador detectable.
10. Una composición de vacuna anti-oligomérica que comprende el péptido antigénico cíclico de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
11. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo aislado de cualquiera de las Reivindicaciones 4 a 8, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
12. Un kit que comprende al anticuerpo aislado de cualquiera de las Reivindicaciones 4 a 8, e instrucciones para su uso.
13. El kit de la Reivindicación 12 que además comprende uno o más agentes de detección.
14. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo aislado de cualquiera de las Reivindicaciones 4 a 8.

SEQUENCE LISTING

<110> UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA
<120> OLIGOMER-SPECIFIC AMYLOID BETA EPITOPE AND ANTIBODIES
<130> JA65067P.EPP
<140> EP11750124.7
<141> 2011-03-03
<150> PCT/CA2011/000238
<151> 2011-03-03
<150> US 61/310,167
<151> 2010-03-03
<160> 7
<170> PatentIn version 3.5.1
<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide epitope
<400> 1
Gly Ser Asn Lys Gly
1 5

<210> 2
<211> 6
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide epitope
<400> 2
Phe Arg His Asp Ser Gly
1 5

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide epitope
<400> 3
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
1 5

<210> 4
<211> 489
<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> monoclonal antibody 5E3, heavy chain, 3' read

<400> 4

nnnnnnnnnt	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	annatagccc	ttgnnnnngca	tcccagggtc	60
accatggagt	tagtttgggc	agcagatcca	ggggccagt	gatagacaga	tgggggtgtc	120
gttttggctg	aggagactgt	gagagtgggtg	ccttggcccc	agtagtgagc	ctcgtaatcc	180
atccttgac	agaaatagac	cgcagagtcc	tcagagggtca	atctgctgag	ctgcatgtag	240
gctgtgctgg	aggatttgtc	tgcagtcagt	gtggccttgc	ccttgaactt	ctcattgtac	300
ttagtattaa	catttccagg	ataaatccat	ccaatccact	caagtccctg	tccaggcctg	360
tgtatcacc	actgtatata	gtagcttgtg	aatatgtagc	cagaagcctt	gcaggatata	420
ctcactgaag	ccccaggctt	caccagctca	ggtccagact	cctgcagctg	cacctcnaa	480
ttnnnnnnn						489

<210> 5

<211> 486

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> monoclonal antibody 5E3, heavy chain, 5' read

<400> 5

nnnnnnnnntg	gngancctgg	ggcttcngtg	agganatcct	gcaaggcttc	tggctacata	60
ttcacaagct	actatataca	gtgggtgata	cacaggcctg	gacagggact	tgagtggatt	120
ggatggattt	atcctggaaa	tgtaataact	aagtacaatg	agaagttcaa	gggcaaggcc	180
acactgactg	cagacaaatc	ctccagcaca	gcctacatgc	agctcagcag	attgacctct	240
gaggactctg	cggtctatatt	ctgtgcaagg	atggattacg	aggctcacta	ctggggccaa	300
ggcaccactc	tcacagtctc	ctcagccaaa	acgacacccc	catctgtcta	tccactggcc	360
cctggatctg	ctgcccacaa	taactccatg	gtgaccctgg	gatgcctggg	caagggctat	420
ttccctgagc	cagtgcacagt	gacctggaac	tctggatccc	tgtccagcgg	tgtnnnnaac	480
ctttnnn						486

<210> 6

<211> 373

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> monoclonal antibody 5E3, light chain, 3' read

<400> 6

nnnnnnnnnn	ngtttnattn	nngettggtg	cctcctccga	acgtccgagg	ataattatga	60
tattgtagac	agttgttgtc	tgacaaatct	tctcactcaa	gggtgctgat	ggggagagaa	120
taatctgaca	cccacctact	gccactgagc	ctttttggga	cacctcaatc	ttgagtggat	180
gcggcgtaaa	tcangcgttt	aatagttccg	tctggtttct	gctgaagcca	ggttaagtaa	240
ccactaattt	cctgacttgc	ccgacgagtg	agactgactc	tttctccctc	agaggcagat	300
aangaggatg	ganactgggt	catctggatg	tcacatctgg	tacctggnaa	ccngannnc	360
aaaaaancag	caa					373

<210> 7

<211> 374

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> monoclonal antibody 5E3, light chain, 5' read

<400> 7

nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	ngtcnnntcc	tccttatctg	cctctctggg	agaaaaagtc	60
------------	------------	------------	------------	------------	------------	----

cgtctcactt	gtcgggcaag	tcnagaaatt	agtgttact	taacctggct	tcagcagaga	120
ccccatggaa	ctattagacg	cccgatctaa	ccccatcct	ctttagattc	tggtgtccca	180
aaaaggggcc	ctgccaggat	gtctgggtca	gattattcta	tcaacatcac	catccttgag	240
tctgaagatt	atgaagacga	tgctgtcta	caatatggta	attatcctcg	gaagttcagt	300
ggaggcaacg	agctagaaat	ctaacaggct	gatgtctgaa	caactgtatc	catcttccca	360
ccatcacacc	atca					374

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> peptide epitope

<400>
 Cys Gly Ser Asn Lys Gly Cys
 1 5

Lisina	Lys	K
Leucina	Leu	L
Metionina	Met	M
Asparagina	Áspid	N
Proline	Pro	P
Glutamina	Gln	Q
Arginina	Arg	R
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Valina	Val	V
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y

El epítopo se compone de los residuos fuertemente polares/cargados que son expuestos a disolventes y restringidos estructuralmente en la superficie de oligómeros Aβ. El epítopo se compone de al menos los residuos 26-28, SNK, en una configuración cíclica limitada. En otro aspecto, el epítopo se compone de los residuos 25 a 28, GSNK, en una configuración cíclica restringida. En un aspecto adicional, el epítopo se compone del residuo 26-29, SNKG, en una configuración cíclica limitada. En otro aspecto, el epítopo está compuesto de los residuos 25-29, GSNKG (SEQ ID NO: 1) en una configuración cíclica limitada.

En un aspecto, la estructura del epítopo novedoso de conformación específica depende de una disposición espacial relativamente rígida de los residuos de aminoácidos.

En contraste con los epítopos conocidos identificados como SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, que se unen a anticuerpos conocidos 6E10 y 4G8, respectivamente, que se expresan en la superficie expuesta al disolvente de oligómeros Aβ y en la superficie de células que soportan la expresión de la proteína APP precursora (tanto las neuronas como los monocitos), el novedoso epítopo conformacional que tiene una configuración cíclica restringida no está presente en la superficie molecular de APP limitando así el reconocimiento autoinmune de APP. El motivo GSNKG de APP que se encuentra en la superficie celular de las neuronas y monocitos es en gran parte no estructurado. Los

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: <i>2020</i>		Fecha: <i>14 / 02 / 28</i> AAAA MM DD	Recorrido: <i>4</i>
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:			Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	12-173790	9	4
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
<i>4</i>	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones: <i>El 10 Anexo contiene un total de 1 Archivo 1 en formato pdf, el cual fue procesado.</i>
<i>[Signature]</i>

COMPOSICIONES DEL PÉPTIDO A-BETA Y MÉTODOS REFERENCIA RECÍPROCA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente EE.UU. No. 61/310.167 presentada el 03 de marzo de 2010, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

CAMPO

La presente invención se relaciona con novedosos epítopes conformacionales en oligómeros A-beta, composiciones de anticuerpos relacionados y métodos de uso.

ANTECEDENTES

La enfermedad de Alzheimer (AD) es una enfermedad neurodegenerativa demencial común (memoria y cognición trastornada) asociada con la acumulación cerebral de placas extracelulares compuestas predominantemente de los péptidos A-beta (1-40), A β (1-42) y A β (143) (también denominados como amiloides β o A β), todos los cuales son productos proteolíticos de la proteína precursora amiloide (APP). Además, los ovillos neurofibrilares, compuestos principalmente de la proteína tau anormalmente fosforilada (a proteína neuronal asociada a microtúbulos), se acumulan intracelularmente en las neuronas que van muriendo. El A β (1-42) es la especie dominante en las placas amiloides de los pacientes con AD.

Las formas familiares de AD pueden ser causadas por mutaciones en el gen APP, o en los genes de presenilina 1 o 2, los productos proteicos de la cual están implicados en el procesamiento de APP a A β . Las variantes alélicas de la apolipoproteína E también influyen en la edad de inicio de tanto la forma esporádica y la forma familiar de la enfermedad de Alzheimer. Más recientemente, se ha encontrado que una especie particular molecular de A β , en la que el péptido se oligomeriza, media el componente principal de neurotoxicidad observado en modelos murinos de AD de la enfermedad (Walsh . 2002). La toxicidad de oligómeros A β puede manifestarse por la disfunción de receptores neuronales de insulina (Zhao 2008.), y por la interferencia con la función sináptica normal, particularmente en el hipocampo, por activación ectópica de los receptores glutamatérgicos (De Felice 2007; Nimmrich 2008). Una interacción de unión de afinidad nanomolar se informó entre

oligómeros A β y la isoforma celular normal de la proteína priónica PrPC (Lauren 2009). Además, la interacción entre PrPC y varias rutas de señalización PrPC y diversas rutas de señalización tóxica (Solforosi 2004; Lefebvre-Roque 2007), incluyendo subunidades de receptores de glutamato (Khosravani 2008), pueden conducir a un mecanismo unificador para la toxicidad de los oligómeros A β .

Es bien sabido que el reconocimiento inmune de A β puede conducir a la mejora tanto en la patología como en el comportamiento de los ratones transgénicos que expresan la proteína precursora amiloide humana mutante. Sin embargo, hay peligros inherentes en el tratamiento de seres humanos con inmunoterapias A β "no selectivas". Por ejemplo, ocurrió meningoencefalitis autoinmune en aproximadamente el 10% de los pacientes que recibieron una vacuna contra el Alzheimer que contenía un inmunógeno A β no selectivo (Gelinas 2004; Robinson 2004; Broytman y Malter 2004, Mathews y Nixon, 2003). Aunque la meningoencefalitis resultante era probablemente debido a la activación inmune celular a A β , también se demostró que los anticuerpos pasivamente infundidos A β monoclonales (mAbs), divorciados de una respuesta inmune celular, se asociaron con microhemorragias cerebrales (Goni y Sigurdsson 2005). Otro riesgo de inmunización no selectiva con A β es el reconocimiento inmune de la proteína precursora APP, que está expuesta en la superficie de las neuronas del cerebro y monocitos circulantes (Jung 1996; Jung 1990.). Tal reconocimiento de una molécula de membrana de superficie celular puede desencadenar lisis o la interferencia con el funcionamiento del dominio extracelular de la proteína APP, que puede incluir actividad trófica (Morimoto 1998; Mileusnic 2005; Mileusnic 2000).

Otro problema con el reconocimiento "no específico" del péptido A β es que el péptido A β es sólo un precursor de la especie molecular tóxica A β , los oligómeros A β . Se ha mostrado que los oligómeros A β eliminan líneas celulares y neuronas en cultivo (Lambert 2007; Lacor 2007; Ronicke 2008) y bloquear una actividad sináptica crítica que promueve la memoria, referida como potenciación a largo plazo (LTP), en cultivos de cortes en láminas y animales vivos (Balducci 2010; Shankar 2008; Selkoe 2008; Klyubin 2005; Walsh, 2002; Wang 2002). Oligómeros A β específicos han sido identificados por su relación con la aparición de los defectos de memoria en ratones, y que cuando se purifican y se infunden en ratas jóvenes normales reproducen defectos negativos de comportamiento que se encuentran en ratones (Lesne 2006). Investigaciones similares han demostrado que PrPC pueden servir

como un receptor para oligómeros A β , y pueden transducir sus efectos tóxicos en la interrupción sináptica LTP (Lauren 2009).

Aunque las vacunas A β y los anticuerpos monoclonales se han planteado en el pasado contra los péptidos A β , no se ha probado hasta la fecha que produzcan el efecto terapéutico deseado sin causar también efectos secundarios graves en animales y/o humanos. Hay una necesidad terapéutica por el desarrollo de agentes biológicos que detengan o retarden la progresión de la enfermedad sin inducir efectos negativos y potencialmente letales en el cuerpo humano. La necesidad es particularmente evidente en vista del aumento de la longevidad de la población general y, con este aumento, un aumento asociado en el número de patentes anualmente diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer. Sería deseable identificar epítomos inmunológicos que son epítomos específicos de la enfermedad (DSE) y desarrollar inmunoterapias que aborden específicamente las especies moleculares oligoméricas A β tóxicas. También es deseable desarrollar inmunoterapias para abordar especies moleculares oligoméricas A β tóxicas y evitar el reconocimiento autoinmune de APP en la superficie celular. Tales epítomos DSE serían objetivos para la inmunoterapias y vacunas profilácticas, que específicamente neutralizan la toxicidad de las proteínas objetivo. También es deseable el desarrollo de herramientas de diagnóstico para proporcionar una indicación de las poblaciones en riesgo de desarrollar AD, para la diagnosis diferencial para distinguir AD de otros síndromes de demencia, y para monitorizar la respuesta del biorotulador a la terapia AD.

Por lo tanto, es deseable proporcionar un epítomo específico de la enfermedad que sea exclusivo para especies moleculares oligoméricas A β .

RESUMEN

Un objeto de la presente divulgación es obviar o mitigar al menos una desventaja de los epítomos, anticuerpos y composiciones anteriores y métodos para el diagnóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad de Alzheimer.

En un primer aspecto, la presente divulgación se basa, en parte, en el sorprendente descubrimiento de un novedoso epítomo estructural en A β con propiedades ventajosas para la unión selectiva de anticuerpos.

En una realización, está provisto un péptido cíclico derivado de A β , que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos SNK correspondiente a una “región de nudillo” de acceso a anticuerpos y expuesta a solventes del A β oligomérico.

5 En otra realización, se proporciona un péptido antigénico que comprende un epítipo que tiene una configuración cíclica limitada, el epítipo que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos SNK correspondiente a una “región de nudillo” de acceso a anticuerpos y expuesta a solventes del A β oligomérico.

10 En otra realización, se proporciona un péptido antigénico que comprende un epítipo que tiene una configuración cíclica restringida, el epítipo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 1 que corresponde a una “región de nudillo” de acceso a anticuerpos y expuesta a solventes del A β oligomérico.

En un aspecto, el epítipo del péptido antigénico corresponde a los residuos 25 a 29 del A β (1-40) oligomérico o A β (1-42) oligomérico.

15 En otra realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a un péptido cíclico derivado de A β , el péptido cíclico que comprende un epítipo conformacional que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos SNK correspondiente a una “región de nudillo” de acceso a anticuerpos y expuesta a solventes del A β oligomérico.

20 En otra realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a un péptido cíclico derivado de A β , el péptido cíclico que comprende un epítipo conformacional que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 1 que corresponde a una “región de nudillo” de acceso a anticuerpos y expuesta a solventes del A β oligomérico.

25 En un aspecto, el anticuerpo aislado específicamente se une con mayor afinidad a una forma oligomérica de A β que a una forma no oligomérica de A β .

En otro aspecto, el anticuerpo aislado es monoclonal.

En otro aspecto, el anticuerpo aislado es humanizado.

30 En otra realización, se proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo aislado que se une específicamente a un péptido cíclico derivado de A β , el péptido cíclico que comprende un epítipo conformacional que tiene una secuencia de

aminoácidos de al menos SNK que corresponde a una “región de nudillo” de acceso a SNK y expuesta a solventes del A β oligomérico, conjugada con una etiqueta detectable..

En otro aspecto, se proporciona un ácido nucleico que codifica el anticuerpo aislado.

5 En otra realización, se proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo aislado que se une específicamente a un péptido cíclico derivado de A β , el péptido cíclico que comprende un epítipo conformacional que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos SNK correspondiente a una “región de nudillo” de acceso a anticuerpos y expuesta a solventes de A β oligomérico, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

10 En otra realización, se proporciona una composición de vacuna anti-oligomérica que comprende un péptido antigénico que comprende un epítipo que tiene una configuración cíclica restringida, el epítipo que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos SNK correspondiente a una “región de nudillo” de acceso a anticuerpos y expuesta a solventes del A β oligomérico, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

15 En otro aspecto, se proporciona un método de tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer en un paciente en necesidad de dicho tratamiento que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo aislado o inmunconjugado.

20 En otro aspecto, se proporciona un método de tratamiento o prevención de Enfermedad de Alzheimer en un paciente en necesidad de dicho tratamiento que comprende la administración de la vacuna.

25 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un paciente sospechoso de padecer la enfermedad de Alzheimer, que comprende las pasos de: a) aislar una muestra biológica del paciente, b) poner en contacto la muestra biológica con el anticuerpo aislado por un tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir la formación de complejos antígeno/anticuerpo en la muestra, y c) detectar la presencia de los complejos antígeno/anticuerpo en la muestra, en donde la presencia de los complejos indica un diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en el paciente.

30 En otra realización, se proporciona un kit que comprende por: el anticuerpo aislado y un conjugado que comprende un antígeno unido a un compuesto generador de señal.

En un aspecto adicional, el kit comprende uno o más agentes de detección.

En otra realización, se proporciona un artículo de fabricación que comprende: el anticuerpo aislado, un conjugado que comprende un antígeno unido a un compuesto generador de señal, y las instrucciones de uso en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

En otro aspecto, se proporciona el uso del anticuerpo o inmunoconjugado para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer.

En otro aspecto, se proporciona el uso de la vacuna para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer.

En otra realización, se proporcionan anticuerpos aislados que son capaces de unirse a un péptido cíclico derivado de A β y que tienen una secuencia de aminoácidos de SNK correspondiente a una región de nudillo expuesta a solventes del A β oligomérico. En un aspecto, tales anticuerpos se unen formas oligoméricas de A β con mayor afinidad que a formas no oligoméricas de A β .

En otra realización, se proporciona un método de tratamiento de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Alzheimer, el método que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que es capaz de unirse a un péptido cíclico derivado de A β que tiene una composición de aminoácidos que comprende la secuencia de SNK. En un aspecto, el anticuerpo se une formas oligoméricas de A β con mayor afinidad que a formas no oligoméricas de A β .

En otra realización, se proporciona un método para prevenir el desarrollo o la progresión de la AD en un sujeto, el método que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido antigénico que comprende un epítipo que tiene una configuración cíclica restringida que tiene una secuencia de amino ácidos de SNK correspondiente a una región de nudillo del A β oligomérico. En la administración, el péptido antigénico produce una respuesta inmune contra A β oligomérico. Los anticuerpos producidos son capaces de unirse específicamente al A β oligomérico. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se une a formas oligoméricas de A β con mayor afinidad que a formas no oligoméricas de A β .

Otros aspectos y características de la presente divulgación se harán evidentes para los expertos en la materia tras la revisión de la siguiente descripción de realizaciones específicas en relación con las figuras anexas.

5 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES**

Las realizaciones de la presente divulgación se describirán ahora, a modo de ejemplo solamente, con referencia a las figuras adjuntas.

La figura. 1 ilustra gráficamente los resultados de dispersión de luz dinámica que muestran las propiedades dinámicas de A β monomérico;

10 La figura. 2 ilustra gráficamente los resultados de dispersión de luz dinámica que muestran las propiedades dinámicas de A β oligomérico;

La figura. 3 ilustra gráficamente los resultados de dispersión de luz dinámica que muestran las propiedades dinámicas de A β oligomérico;

15 La figura. 4 es un modelo tridimensional del péptido ciclado por disulfuro que comprende el epítipo SNK;

La figura. 5 ilustra gráficamente los resultados de Biacore TM de un ciclo analítico representativo en búsqueda de uniones de anticuerpos monoclonales anti-SNK a un péptido conformacional que comprenda SNK.

20 La figura. 6 ilustra gráficamente los resultados de los traslapes de sensorgramas Biacore TM que muestra la unión de péptidos lineales o cíclicos conjugados por BSA que comprenden el epítipo SNK a anticuerpos monoclonales lineales (3F5, 3G2), cíclicos (5E3, 5D8) e intermedios específicos (4D11 4D12,) y la reactividad de estos anticuerpos con oligómeros A β 1-42 sintéticos;

25 La figura. 7 ilustra gráficamente los resultados de Biacore TM sensorgrama superposiciones que muestran la unión de péptidos lineales o cíclicos conjugados por BSA que comprende el epítipo SNK a anticuerpos monoclonales lineales (3F5, 3G2), cíclicos (5E3, 5D8) e intermedios específicos (4D11 4D12,), y la reactividad de estos anticuerpos con los oligómeros sintéticos A β 1-42;

30 La figura. 8 ilustra gráficamente los resultados del análisis Biacore TM que muestra la unión a oligómeros sintéticos A β 1-42 al anticuerpo monoclonal cíclico 5E3 a concentraciones variables;

La figura. 9 es una traza de citometría de flujo que muestra la comparación de las células que se unen al anticuerpo rotulado 6E10 y un control negativo al APP localizado en la superficie celular;

La figura. 10 es una traza de citometría de flujo que muestra la comparación de las células que se unen al anticuerpo 5E3 rotulado y un control negativo al APP localizado en la superficie celular;

La figura. 11 ilustra gráficamente los resultados de un análisis de la toxicidad neuronal que muestra el grado de supervivencia de las células para las células incubadas con un control, A β 1-40 monomérico y oligomérico soluble en presencia y en ausencia de anticuerpo 5E3 a diferentes concentraciones;

La figura. 12 ilustra los resultados de un inmunoblot que muestra el tejido cerebral homogenizado en TBS, fraccionado en geles de Tris-Tricina, y aplicado inmunoblot con anticuerpo pan-A β 6E10;

La figura. 13 ilustra los resultados de una inmunotransferencia que muestra el tejido cerebral homogenizado en TBS, fraccionado en geles de Tris-Tricina, y sometido a inmunoblot con el anticuerpo 5E3;

La figura. 14 muestra los resultados de experimentos de dispersión de luz estática para probar la polimerización A β en presencia ("5E3") o ausencia ("C") de anticuerpos 5E3, y

La figura. 15 ilustra secuencias de nucleótidos para la cadena pesada y ligera, ambas lecturas 5' y 3' de anticuerpo 5E3.

DIVULGACIÓN DETALLADA

En general, la presente divulgación proporciona un novedoso epítipo peptídico restringido derivado de A β , conocido en la presente como "epítipo novedoso" o "novedoso epítipo conformacional" y composiciones de anticuerpos relacionadas. Los anticuerpos capaces de unirse al novedoso epítipo conformacional son útiles como agentes diagnósticos y terapéuticos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. El epítipo peptídico novedoso restringido derivado de A β es útil en vacunas para la prevención de AD y otras demencias relacionadas. Los anticuerpos capaces de unirse al novedoso epítipo conformacional también son útiles en el diagnóstico, tratamiento y prevención de demencias relacionadas con Alzheimer.

Los términos que no se definen en la presente directamente se entenderá que tienen los significados comúnmente asociados con ellos como se entiende en la técnica de la invención.

5 Tal como se utiliza en la presente, el término "anticuerpo aislado" se utiliza en la presente para referirse a anticuerpos capaces de unirse al novedoso epítipo conformacional, que son esencialmente puros y libres de material extraño celular incluyendo otros anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas. Un anticuerpo aislado que se une específicamente al novedoso epítipo conformacional puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos. Un experto en la materia apreciará fácilmente que las condiciones experimentales pueden ser optimizada para cualquier anticuerpo dado para maximizar la unión específica. El término anticuerpo pretende incluir fragmentos del mismo que también reaccionan específicamente con el novedoso epítipo conformacional de acuerdo con la invención. Los anticuerpos pueden ser fragmentados utilizando técnicas convencionales y los fragmentos seleccionados para la utilidad de la misma manera como se describió anteriormente. Por ejemplo, los fragmentos pueden ser generados por tratamiento de un anticuerpo con pepsina. El fragmento resultante se puede tratar adicionalmente para reducir los puentes de disulfuro.

20 Como se usa en la presente, el término "sujeto" se refiere a un animal, tal como un ave o un mamífero. Animales específicos incluyen rata, ratón, perro, gato, vaca, oveja, caballo cerdo, o primate. Un sujeto puede ser un humano, denominado alternativamente como un paciente. Un sujeto puede ser además un animal transgénico. Un sujeto puede ser además un roedor, tal como un ratón o una rata.

25 Tal como se utiliza en la presente, el término "epítipo" se refiere a una región dentro de una molécula, que puede ser reconocida por un anticuerpo específico, o que induce la formación de anticuerpos específicos.

30 Tal como se utiliza en la presente, el término "epítipo conformacional" se refiere a un epítipo en la secuencia de aminoácidos tiene una determinada estructura tridimensional. Los anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo de conformación específica reconocen la disposición espacial de los aminoácidos de dicho epítipo de conformación específica.

Tal como se usa en la presente, el término 'A β ' alternativamente se puede denominar como "beta amiloide", "amiloide β ", o 'A β '. Beta amiloide es un péptido de 39-43 aminoácidos que parece ser el principal constituyente de las placas amiloides en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer. La oligomerización de A β se ha demostrado que es una parte clave de la neurotoxicidad en la enfermedad de Alzheimer, como se describe en otra parte de esta solicitud.

Tal como se utiliza en la presente, el término "mayor afinidad" en la presente se refiere al grado de unión del anticuerpo, donde un anticuerpo X se une a un objetivo Y de manera más fuerte y con una constante de disociación menor que al objetivo Z, y en este contexto el anticuerpo X tiene un mayor afinidad con el objetivo Y que con el objetivo Z. Igualmente, el término "afinidad menor" en la presente se refiere a un grado de unión del anticuerpo, donde un anticuerpo X se une a un objetivo Y menos fuertemente y con una constante de disociación mayor que con un objetivo Z, y en este contexto el anticuerpo X tiene una afinidad menor con el objetivo Y que con el objetivo Z.

Tal como se utiliza en la presente, el término "monómero A β " en la presente se refiere a la forma lineal aislada del péptido A β (X-Y), preferiblemente, una forma del péptido A β (X-Y) que no está implicado esencialmente en interacciones no covalentes con otros péptidos A β .

Tal como se utiliza en la presente, el término "oligómero A β " se refiere en la presente a una forma aislada del péptido A β donde el monómero A β precursor no es agregado de manera covalente en una estructura tridimensional ordenada de menos de aproximadamente 50 monómeros.

Tal como se utiliza en la presente, el término "fibrilla A β " se refiere en la presente a una estructura molecular que comprende conjuntos de péptidos A β (X-Y) individuales no covalentemente asociados que muestran una estructura fibrilar bajo un microscopio electrónico. La estructura fibrilar es típicamente una estructura "beta entrecruzada"; no hay límite superior teórico sobre el tamaño de los multímeros, y las fibrillas pueden comprender miles de monómeros.

Tal como se utiliza en la presente, el término "antígeno" se refiere en la presente a una molécula, tal como una proteína, polipéptido o fragmento del mismo, que contiene uno o más epítomos, que estimulan el sistema inmune del huésped para producir una respuesta

humoral y/o celular antígeno específica. El término se utiliza indistintamente con el término "inmunógeno". Los anticuerpos tales como anticuerpos anti-idiotipo, o fragmentos de los mismos, y mimotopos de péptidos sintéticos, que pueden imitar un antígeno o determinante antigénico, también se capturan bajo la definición de antígeno como se utiliza en la presente.

5 De manera similar, un oligonucleótido o polinucleótido que expresa un antígeno o determinante antigénico in vivo, tal como en aplicaciones de inmunización de ADN, también se incluye en la definición de antígeno en la presente.

10 La nomenclatura utilizada para describir los péptidos de la presente invención sigue la práctica convencional donde se presenta el grupo amino a la izquierda y el grupo carboxilo a la derecha de cada residuo aminoácido. En las secuencias que representan realizaciones específicas seleccionadas de la presente invención, los grupos amino-y carboxilo-terminales, aunque no se muestra específicamente, se entiende que están la forma que asumirían a valores de pH fisiológicos, a menos que se especifique lo contrario.

15 En la descripción, para fines de explicación, numerosos detalles se exponen con el fin de proporcionar una comprensión exhaustiva de las realizaciones. Sin embargo, será evidente para un experto en la técnica que estos detalles específicos no son necesarios.

20 La estructura de oligómeros A β a nivel atómico no se ha resuelto de manera concluyente a nivel atómico debido a las limitaciones de la cristalografía y RMN en solución y paradigmas de estado sólido. Los datos bioquímicos, biofísicos e inmunoquímicos sugieren un modelo fibrilla/oligómero en donde los monómeros A β están empaquetados en estructuras de cremallera estérica hairpin β amplia (Luhers 2005;. Sawaya 2007;. Rauk 2009). Los péptidos A β monoméricos de origen natural experimentan un cambio de conformación ante la agregación involucrando doblamientos y ocurre la formación de la estructura A β oligomérica de cremallera estérica. A β (1 - 42) tiene una mayor propensión a la agregación de hojas- β . La estructura detallada de A β oligomérico es desconocida, sin embargo, las estructuras de oligómeros A β se han caracterizado utilizando una combinación de simulación de dinámica molecular, microscopía de fuerza atómica, y las mediciones de intercambio de hidrógeno y amida. La estructura del oligómero A β (1-42) y A β (1-40) ha sido analizada utilizando los métodos indicados anteriormente. La orientación de las hebras p de los oligómeros A β se conoce por los expertos en la técnica por incluir un puente de sal intermolecular entre los residuos D23 y K28. En esta configuración, el residuo K28 está

25

30

orientado sustancialmente internamente para formar este puente de sal entre D23 y K28 y estabilizar el giro del hairpin (Lurs . 2005) y Rauk 2008).

Un examen de las estructuras oligoméricas A β propuestas conocidas en la técnica se llevó a cabo para identificar las regiones contra las cuales se puede dirigir específicamente una respuesta inmune, y para las cuales los anticuerpos específicos a oligómeros A β pueden ser desarrollados. La inspección de los modelos oligómeros A β ilustró tres regiones que tienen residuos potencialmente accesibles por anticuerpos, expuestos a disolventes disponibles para unión: el extremo N de oligómero A β reconocido por el mAb 6E10 (residuos 4-9) del péptido A β (FRHDSG identificado como SEQ ID NO: 2), un dominio hidrofóbico polar mixto en el tercio N-terminal del péptido oligomérico A β (LVFFAEDV identificado como SEQ ID NO 3) reconocido por el mAb 4G8 (residuos 17-24), y un dominio de giro limitado del péptido oligomérico A β formado por los residuos 25-29 (GSNKG). El descubrimiento del epítipo de dominio de giro restringido que comprende los residuos SNK 26-28 es conformacionalmente restringido y no estaría presente en A β o APP lineal. Los anticuerpos dirigidos contra este epítipo conformacionalmente restringido no se esperaba que se unan a A β o APP lineal, y serían anticuerpos específicos a oligómeros A β .

La captura de imágenes de modelado de la dinámica molecular de un péptido cíclico unido a disulfuro que comprende los residuos 25-29 (CGSNKGC) se llevó a cabo; cisteínas no nativas se añadieron para el enlace de disulfuro. Esta modelación revela que la cadena lateral de la lisina 28 está orientada externamente tal como se muestra en la Figura 4, en contraste con la cadena lateral de la lisina internamente orientada 28 citada en la referencia de Lurs (2005) y Rauk (2008). El sorprendente descubrimiento de la orientación hacia el exterior del residuo de lisina 28 es consistente con la alta inmunogenicidad de este péptido cíclico que comprende los residuos 25-29 (CGSNKGC), el lado de la lisina es expuesto a disolvente, grande y cargado a través de un grupo ϵ -amino. Los anticuerpos dirigidos a un epítipo de ciclo conformacional que comprende al menos los residuos de SNK se han mostrado en los siguientes ejemplos para neutralizar eficazmente la toxicidad de oligómeros A β , véase por ejemplo la Figura 11. El sorprendente descubrimiento de la orientación hacia el exterior del residuo de lisina 28 es también coherente con auténticos oligómeros A β que presentan también una orientación similar de cadena lateral de lisina en el disolvente en una manera accesible a anticuerpos. Los residuos de serina 26, asparagina 27 y

lisina 28, SNK, localizados en la región de nudillo de oligómeros A β son todos cargados o polares, y tienen una mayor inmunogenicidad que aminoácidos pequeños no polares. La conformación cíclica de los residuos SNK, ubicados en la región de nudillo del oligómeros A β , forman un novedoso epítipo conformacional que es expuesto a disolvente y es disponible para unión de anticuerpos. Los siguientes ejemplos descritos a continuación confirman el descubrimiento de la disponibilidad del epítipo SNK conformacionalmente restringido de oligómeros A β para la unión. El descubrimiento de este novedoso epítipo estructuralmente restringido en la superficie de oligómeros A β tiene propiedades ventajosas para la unión de anticuerpos selectivos.

El novedoso epítipo conformacional puede incluir además una glicina nativa situada en cada extremo de la secuencia de epítopos SNK. El novedoso epítipo conformacional puede incluir además residuos de glicina nativa en ambos extremos de la secuencia de epítopos. En un aspecto, los residuos de glicina nativa tienen poca o ninguna contribución a la inmunogenicidad del novedoso epítipo conformacional, sin embargo, los residuos de glicina pueden aliviar alguna tensión estérica inherente en la ciclización del péptido. En las fórmulas de estructuras aminoácidas, cada residuo puede ser generalmente representado por una designación de una letra o de tres letras, correspondientes al nombre trivial del aminoácido, de acuerdo con la siguiente Tabla 1.

Tabla 1: Nomenclatura y abreviaturas de los 20 aminoácidos L estándar comúnmente encontrados en péptidos de origen natural.

Nombre completo de Aminoácidos	Abreviatura de tres letras	Abreviatura de una letra
Alanina	Ala	La
Cisteína	Cys	C
Ácido aspártico	Áspid	D
Ácido glutámico	Glu	E
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Histidina	Su	H
Isoleucina	Ile	Yo

Lisina	Lys	K
Leucina	Leu	L
Metionina	Met	M
Asparagina	Áspid	N
Proline	Pro	P
Glutamina	Gln	Q
Arginina	Arg	R
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Valina	Val	V
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	T

El epítopo se compone de los residuos fuertemente polares/cargados que son expuestos a disolventes y restringidos estructuralmente en la superficie de oligómeros A β . El epítopo se compone de al menos los residuos 26-28, SNK, en una configuración cíclica limitada. En otro aspecto, el epítopo se compone de los residuos 25 a 28, GSNK, en una configuración cíclica restringida. En un aspecto adicional, el epítopo se compone del residuo 26-29, SNKG, en una configuración cíclica limitada. En otro aspecto, el epítopo está compuesto de los residuos 25-29, GSNKG (SEQ ID NO: 1) en una configuración cíclica limitada.

En un aspecto, la estructura del epítopo novedoso de conformación específica depende de una disposición espacial relativamente rígida de los residuos de aminoácidos.

En contraste con los epítomos conocidos identificados como SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, que se unen a anticuerpos conocidos 6E10 y 4G8, respectivamente, que se expresan en la superficie expuesta al disolvente de oligómeros A β y en la superficie de células que soportan la expresión de la proteína APP precursora (tanto las neuronas como los monocitos), el novedoso epítopo conformacional que tiene una configuración cíclica restringida no está presente en la superficie molecular de APP limitando así el reconocimiento autoinmune de APP. El motivo GSNKG de APP que se encuentra en la superficie celular de las neuronas y monocitos es en gran parte no estructurado. Los

anticuerpos específicos de conformación que se unen al novedoso epítipo conformacional que tienen una configuración cíclica restringida tienen poco o ningún reconocimiento del motivo GSNKG no estructurado en APP de superficie celular como se muestra en los ejemplos siguientes. Los anticuerpos que reconocen el novedoso epítipo conformacional muestran poca o ninguna reacción con A β monomérico. En otro aspecto, los anticuerpos que reconocen el novedoso epítipo conformacional muestran poca o ninguna reacción con fibrillas A β , debido a un efecto estérico del epítipo y/o otros aspectos desfavorables.

En otro aspecto de la presente divulgación se proporcionan anticuerpos al novedoso epítipo conformacional. El análisis indica que los anticuerpos que se unen al novedoso epítipo conformacional que tienen una configuración cíclica restringida reconocen la estructura no lineal del epítipo entre las subunidades de la región de los aminoácidos 25-29 de los oligómeros A β . La especificidad de los anticuerpos con el novedoso epítipo conformacional permite que anticuerpos actúen de manera específica sobre la forma oligomérica de A β y de tal manera, evitar actuar sobre A β y APP monoméricos que se conocen por tener impacto sobre la función neuronal e inmune y aumentan la disponibilidad del anticuerpo para unión cuando el A β monomérico está presente en cantidades mucho mayores que A β oligomérico.

Los anticuerpos capaces de unirse al novedoso epítipo conformacional son útiles como agentes tanto diagnósticos como terapéuticos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, y en otro aspecto de la presente invención se proporcionan vacunas para la prevención de AD.

Los anticuerpos que se unen específicamente al péptido cíclico, que comprenden el novedoso epítipo conformacional, derivado a partir de A β como se describe en la presente incluyen anticuerpos sintetizados a partir del péptido cíclico de disulfuro que comprende el novedoso epítipo conformacional.

Para utilizar como un agente terapéutico, un anticuerpo que se une específicamente a un péptido cíclico derivado a partir de A β , donde el péptido cíclico comprende un epítipo conformacional que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos SNK que corresponde a una región de nudillo del A β oligomérico, se puede hacer utilizando métodos estándares bien establecidos de la fabricación de anticuerpos. Una composición

terapéutica comprende un anticuerpo que se une específicamente a un péptido cíclico derivado a partir de A β , donde el péptido cíclico comprende un epítipo que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos SNK que corresponde a una región de nudillo del A β oligomérico en combinación con un adyuvante farmacéuticamente aceptable. Tal agente terapéutico puede administrarse a un paciente en necesidad de tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer. En un aspecto, tal agente terapéutico puede retrasar la aparición de la enfermedad de Alzheimer.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aceptable para su uso en las técnicas farmacéuticas y veterinarias, es decir, no es inaceptablemente tóxico o de otra manera inadecuado. Ejemplos de adyuvantes farmacéuticamente aceptables son aquellos que se utilizan convencionalmente con fármacos basados en péptidos, tales como diluyentes, excipientes y similares. Se puede hacer referencia a "Remington: The Science and Practice of Pharmacy ", 21 Ed, Lippincott Williams & Wilkins, 2005, para obtener orientación sobre las formulaciones de fármacos en general. La selección del adyuvante depende del modo pretendido de administración de la composición. En una realización de la invención, los compuestos son formulados para ser administrados por infusión o por inyección ya sea de manera subcutánea, intramuscular o intravenosa, y en consecuencia se utilizan como soluciones acuosas en forma estéril y libre de pirógenos y opcionalmente tamponados o hechos isotónicos. Así, los compuestos pueden administrarse en agua destilada o, más deseablemente, en solución salina, solución salina tamponada con fosfato o solución de dextrosa al 5%. Las composiciones para administración oral por medio de tableta, cápsula o suspensión se preparan usando adyuvantes que incluyen azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y derivados de los mismos, incluyendo carboximetilcelulosa sódica, acetatos de etilcelulosa y celulosa; tragancanto en polvo ; malta; gelatina; talco; ácidos esteáricos; estearato de magnesio, sulfato de calcio, aceites vegetales, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva y aceite de maíz; polioles tales como propilenglicol, glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; agar, ácidos algínicos, agua, solución salina isotónica y soluciones de buffer de fosfato. Agentes humectantes, lubricantes, tales como lauril sulfato sódico, estabilizadores, agentes de entabletado, antioxidantes, conservantes, agentes colorantes y agentes aromatizantes también pueden estar presentes.

Cremas, lociones y ungüentos pueden prepararse para aplicación tópica utilizando una base apropiada tal como una base de triglicéridos. Tales cremas, lociones y ungüentos también pueden contener un agente activo de superficie. Formulaciones en aerosol, por ejemplo, para administración nasal, también pueden prepararse en las cuales se utilizan co-adyuvantes propelentes adecuados. Otros co-adyuvantes también pueden agregarse a la composición independientemente de cómo se vayan a administrar, por ejemplo, agentes antimicrobianos pueden agregarse a la composición para evitar el crecimiento microbiano durante períodos de almacenamiento prolongados. Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo condiciones de fabricación y almacenamiento.

Para su uso como una vacuna, un péptido antigénico que comprende un epítipo conformacionalmente restringido que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos SNK correspondiente a una región de nudillo del A β oligomérico en combinación con un adyuvante farmacéuticamente aceptable, que al administrarse genera anticuerpos que actúan específicamente sobre el A β oligomérico. Estos anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos SNK que corresponde a una región de nudillo del A β oligomérico. Una vacuna comprende un péptido antigénico que comprende un epítipo conformacionalmente restringido que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos SNK correspondiente a una región de nudillo del A β oligomérico en combinación con un adyuvante farmacéuticamente aceptable. La vacuna bloquea el desarrollo de amiloidosis cerebral a través de la neutralización del A β oligomérico y actúa para prevenir el desarrollo de la AD. Cuando el A β oligomérico es bloqueado, su toxicidad asociada es bloqueada. Tal toxicidad puede incluir, por ejemplo, disfunción sináptica y muerte celular neuronal. En otro aspecto, los anticuerpos generados en la administración de una vacuna descrita anteriormente retrasan la propagación de A β oligomérico, de tal manera que los anticuerpos retrasan la agregación de A β monomérico en la forma tóxica de A β oligomérico. En un aspecto adicional, los anticuerpos generados en la administración de una vacuna descrita anteriormente bloquean la propagación de A β oligomérico, de tal manera los anticuerpos bloquean la agregación de A β monomérico a la forma tóxica de A β oligomérico.

Ejemplos de adyuvantes farmacéuticamente aceptables pueden incluir hidróxido de aluminio, alumbre, Alhydrogel TM (trihidrato de aluminio) u otras sales que comprenden

aluminio, virosomas, ácidos nucleicos que comprenden motivos CpG, escualeno, aceites, MF59, QS21, varias saponinas, partículas similares a virus, monofosforil-lípido A/dicorinomicolato de trehalosa, agonistas de receptores tipo toll, copolímeros tales como polioxipropileno y polioxietileno, o similares.

5 La vacuna puede administrarse a una población de pacientes en riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer, por ejemplo, una población de edad avanzada, una población conocida de individuos en "riesgo" portadores de una mutación conocida que promueve AD.

10 En una realización, para el tratamiento con una vacuna, los sujetos se inmunizan bajo un esquema que puede variar de una vez al día, a una vez por semana, una vez al mes, una vez al año, a una vez cada década. Un régimen típico incluye una inmunización seguida por inyecciones de refuerzo a 6 intervalos semanalmente. Otro régimen consiste en la inmunización seguida por inyecciones de refuerzo 1, 2 y 12 meses más tarde.

15 Alternativamente, las inyecciones de refuerzo pueden variar dependiendo de la respuesta inmune y la condición fisiológica del sujeto. Para inmunización, la vacuna anti-oligomérica puede administrarse en una dosis que varía desde 0,0001 microgramos a 10 gramos aproximadamente, de 0.01 microgramos a 1 gramo aproximadamente, de 1 microgramo a 1 mg aproximadamente y de 100 a 250 microgramos aproximadamente por tratamiento. En una realización, el horario en la administración del tratamiento se encuentra en uno o más de los
20 siguientes: 0 meses, 2 meses, 6 meses, 9 meses, y/o 12 meses. En un régimen, la dosificación es a 2, 6, 9, y 12 meses después de la primera inmunización. En otro régimen, la dosificación es a 2 y 4 semanas después de la primera inmunización, y después mensualmente. En un régimen alternativo, la dosificación varía dependiendo de la condición fisiológica del sujeto y/o la respuesta del sujeto a inmunizaciones previas. La vía de administración opcionalmente
25 incluye, pero no se limita a, inyecciones intramusculares e intraperitoneales. En una realización, la composición se inyecta en el músculo deltoides.

Para el uso como un biorotulador de diagnóstico o sensible a tratamiento, una muestra biológica adecuada es aislada desde un paciente, la muestra se pone en contacto con un anticuerpo que une específicamente a un péptido cíclico derivado a partir A β , donde el
30 péptido cíclico comprende un epítipo que tiene un secuencia de aminoácidos de al menos SNK correspondiente a una región de nudillo del A β oligomérico durante un período de

tiempo bajo condiciones que son adecuadas para permitir la formación de complejos de antígeno/anticuerpo, y la presencia de los complejos es detectada. Cuando se detectan los complejos existe una indicación de un diagnóstico de AD en el paciente. Una muestra biológica adecuada para este fin incluye tejidos, células y biofluidos incluyendo por ejemplo fluidos cefalorraquídeo (CSF) y sangre.

En uso, los anticuerpos que unen el novedoso epítipo conformacional son de gran valor diagnóstico en la AD. Para ayudar en la identificación de sujetos que son candidatos para el tratamiento con las composiciones de anticuerpos o vacunas de la invención, la presente invención proporciona además la detección de un epítipo mediante métodos de diagnóstico *in vitro* o *in vivo*.

Para detectar la presencia de A β oligomérico en cualquier muestra dada, la presente invención proporciona un método de detección en el que una muestra sospechosa de contener A β oligomérico es tratada con un anticuerpo o fragmento de unión que se une selectivamente al novedoso epítipo conformacional presentado únicamente por el A β oligomérico relativo a A β y APP monomérico, y que determina si un complejo antígeno: anticuerpo se ha formado, la formación del mismo es indicativa de la presencia en la muestra de un A β oligomérico. La presencia de los complejos antígeno: anticuerpo indica además, un diagnóstico de AD en el paciente.

Cuando se aplica *in vitro*, el método de detección implica el análisis de una muestra biológica de fluido corporal o muestra de tejido u órgano de un sujeto, generalmente un sujeto del cual se sospecha tiene la AD. Una muestra de tejido u órgano, tal como la obtenida a partir de un tejido u órgano sólido o semi-sólido, puede digerirse, extraerse o de otra manera convertirse en una forma líquida. Una muestra o muestras biológicas pueden tomarse de un sujeto en cualquier momento adecuado, incluyendo antes de que el sujeto este diagnosticado con AD, o se sospeche que tiene AD o una demencia relacionada, durante un régimen terapéutico para el tratamiento o alivio de los síntomas de dicha enfermedad o trastorno, después de la muerte del sujeto (independientemente de la causa, o causa sospechada). Alternativamente, una muestra biológica puede incluir fluido o tejido corporal donado, tal como sangre, plasma o plaquetas cuando esté al cuidado de una organización o institución de suministro de sangre centralizado.

La presencia de A β oligomérico en la muestra se confirma si el anticuerpo forma un complejo de antígeno: anticuerpo detectable. La formación de tal complejo puede determinarse utilizando una amplia variedad de protocolos que incluyen ELISA, RIA, citometría de flujo, Western blots, inmunohistoquímica y similares. Para revelar el complejo y por lo tanto la presencia del novedoso epítipo conformacional en la muestra, el anticuerpo de manera deseable se proporciona como un anticuerpo etiquetado por conjugación o acoplamiento a un agente que es detectable visualmente o con la ayuda de instrumentación.

El agente, o etiqueta, es capaz de producir, ya sea directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, la etiqueta puede ser radio-opaca o un radioisótopo, tal como ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I; un compuesto fluorescente (fluoróforo) o quimioluminiscente (cromóforo), tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; una enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante; un agente formador de imagen, o un ion de metal.

Alternativamente, el novedoso epítipo conformacional puede revelarse utilizando un reactivo secundario etiquetado que se une al anticuerpo epítipo, tal como un anticuerpo etiquetado que fija el anticuerpo de epítipo, para revelar la presencia del epítipo indirectamente. La presencia de un complejo anticuerpo:antígeno puede detectarse por medios indirectos que no requieren que los dos agentes estén en la solución. Por ejemplo, el complejo es indirectamente detectable utilizando citometría de flujo, donde el anticuerpo se fija a, y forma un complejo anticuerpo: antígeno con, el epítipo presentado sobre la superficie de una célula intacta. También se apreciará que el complejo antígeno: anticuerpo también puede identificarse por métodos basados en no anticuerpos, que incluyen aquellos que ordenan proteínas con base en tamaño, carga y movilidad, tales como electroforesis, cromatografía, espectroscopia de masas y similares.

En una realización relacionada, los anticuerpos etiquetados de la invención, o forma etiquetada de un fragmento de unión del mismo, pueden utilizarse in vivo para crear una imagen de la presencia del A β oligomérico al que se une el anticuerpo. Para este fin, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento en una forma acoplada a un agente útil para la creación de imágenes in vivo, tales como isótopos de tecnecio, gadolinio, y similares.

En otro aspecto, se proporciona un artículo de fabricación (también conocido como un paquete comercial), que comprende material de empaque y una composición farmacéutica. La composición comprende un adyuvante farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo conformacionalmente sensible que se une específicamente a un péptido cíclico derivado a partir de A β , donde el péptido cíclico comprende un epítipo que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos SNK correspondiente a una región de nudillo del A β oligomérico. El material de empaque puede etiquetarse para indicar que la composición es útil para tratar la enfermedad de Alzheimer. El material de empaque puede ser cualquier material adecuado utilizado generalmente para empaquetar agentes farmacéuticos que incluye, por ejemplo, vidrio, plástico, papel aluminio y cartón.

En otro aspecto, se proporciona un artículo de fabricación, que comprende material de envasado y una composición farmacéutica. La composición que comprende un péptido que comprende un epítipo conformacionalmente restringido que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos SNK correspondiente a una región de nudillo del A β oligomérico en combinación con un adyuvante farmacéuticamente aceptable, como se describe en la presente. La composición puede incluir un excipiente fisiológicamente o farmacéuticamente aceptable, y el material de empaque puede incluir una etiqueta que indica los ingredientes activos de la composición (por ejemplo, el péptido). La etiqueta puede incluir además un uso previsto de la composición, por ejemplo como un reactivo terapéutico o profiláctico, o como una composición para inducir una respuesta inmune en un sujeto con el propósito de producir antisueros o anticuerpos específicos a A β oligomérico, para utilizarse con kits según lo establecido en la presente.

En una realización adicional, se proporciona un kit que comprende una composición que comprende un péptido como se describe en la presente, junto con las instrucciones para el uso del compuesto o composición para la producción o tamizaje de anticuerpos conformacionalmente sensibles para la identificación de A β oligomérico. El kit puede ser útil para la producción y/o identificación de anticuerpos específicos A β oligoméricos o antisueros, y las instrucciones pueden incluir, por ejemplo, concentraciones de dosis, intervalos de dosis, métodos de administración preferidos, métodos para pruebas o tamizajes inmunológicos, o similares.

En otra realización, se proporciona un kit para la preparación de un medicamento, que comprende una composición que comprende uno o más péptidos como se describen en la presente, junto con las instrucciones para su uso. Las instrucciones pueden comprender una serie de pasos para la preparación del medicamento, el medicamento es útil para inducir una respuesta inmune terapéutica o profiláctica en un sujeto al que se administra. El kit puede comprender además instrucciones de uso del medicamento en el tratamiento, para el tratamiento, prevención o mejora de uno o más síntomas de AD o demencias relacionadas, e incluyen, por ejemplo, concentraciones de dosis, intervalos de dosis, métodos preferidos de administración o similares.

En otra realización, se proporciona un kit para diagnosticar AD o demencias relacionadas. El kit comprende uno o más anticuerpos conformacionalmente sensibles y anticuerpos selectivos o antisueros como se describen en la presente, junto con instrucciones para su uso. El anticuerpo puede además acoplarse a un reactivo de detección. Ejemplos de reactivos de detección incluyen los anticuerpos secundarios, tales como un anticuerpo anti-ratón, un anticuerpo anti-conejo o similares. Tales anticuerpos secundarios pueden estar acoplados con una enzima que, cuando se proporciona con un sustrato adecuado, proporciona una reacción colorimétrica o quimioluminiscente detectable. El kit puede comprender además reactivos para realizar la reacción de detección, incluyendo enzimas tales como proteinasa K, buffers de boqueo, buffers de homogeneización, buffers de extracción, buffers de dilución o similares.

En otra realización, se proporciona un kit para detectar la presencia de A β oligomérico en una muestra biológica. El kit comprende uno o más anticuerpos conformacionalmente sensibles o antisueros que unen específicamente al A β oligomérico, junto con las instrucciones para su uso. El anticuerpo puede además acoplarse con un reactivo de detección. Ejemplos de reactivos de detección incluyen anticuerpos secundarios, tales como un anticuerpo anti-ratón, un anticuerpo anti-conejo o similares. Tales anticuerpos secundarios pueden estar acoplados con una enzima que, cuando se proporciona con un sustrato adecuado, proporciona una reacción colorimétrica o quimioluminiscente detectable. El kit puede comprender además reactivos para la realización de la reacción de detección, incluyendo enzimas tales como la proteinasa K, buffers de bloqueo, buffers de homogeneización, buffers de extracción, buffers de dilución o similares.

Pueden utilizarse métodos convencionales para preparar los anticuerpos conformacionalmente sensibles que incluyen antisueros policlonales o anticuerpos monoclonales. Para producir anticuerpos policlonales, un mamífero (por ejemplo, un ratón, hámster o conejo) puede ser inmunizado con una forma inmunogénica del novedoso epítipo conformacional que provoca una respuesta de anticuerpos en el mamífero. Por ejemplo, un péptido ciclado ligado a disulfuro que comprende la secuencia de novedoso epítipo conformacional puede estar limitado en una conformación de bucle utilizando un enlace de disulfuro entre cisteínas en los extremos N-y C de este péptido. El péptido ciclado ligado a disulfuro- se puede sintetizar usando técnicas convencionales e introduciéndolo en un mamífero.

Las técnicas para conferir inmunogenicidad en un péptido son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, conjugación con vehículos. El péptido puede ser administrado en la presencia del adyuvante. El progreso de la inmunización puede monitorearse por la detección de títulos de anticuerpos en plasma o suero. ELISA estándar u otros procedimientos de inmunoanálisis pueden utilizarse con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos. Después de la inmunización, se pueden obtener antisueros y, si se desea, anticuerpos policlonales aislados a partir de suero.

Para producir anticuerpos monoclonales, células productoras de anticuerpos (linfocitos B) se obtienen a partir de un animal inmunizado y se fusionan con células de mieloma mediante procedimientos de fusión celular somáticos estándar para formar células de hibridoma inmortales. Tales técnicas son bien conocidas en la técnica, (por ejemplo, la técnica de hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein (Nature 256, 495-497 (1975)), así como otras técnicas tales como la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbor, Immunol. Today 4, 72 (1983)), la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole, Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy (1985) Allen R. Bliss, Inc., páginas 77-96), y el tamizaje de bibliotecas de anticuerpos combinatoriales (Huse, Science 246, 1275 (1989)). Las células de hibridoma pueden seleccionarse inmunoquímicamente para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con un novedoso epítipo conformacional y los anticuerpos monoclonales pueden ser aislados.

Un anticuerpo típico se compone de dos "cadenas pesadas" de inmunoglobulina (Ig) y dos "cadenas ligeras" de Ig y se puede considerar como adoptando una configuración de forma de Y general. Existen varios tipos de cadena pesada que definen la clase o isotipo de un anticuerpo. Existen cinco tipos de cadena pesada de inmunoglobulina de mamífero: γ , δ , α , μ , y ϵ , y éstos definen clases de inmunoglobulinas: IgG, IgD, IgA, IgM e IgE, respectivamente. Existen dos tipos de cadena ligera en mamíferos: cadena kappa (κ), y cadena lambda (λ).

Cada cadena pesada tiene dos regiones: una región constante, que es la misma para todas las inmunoglobulinas de la misma clase, pero difiere entre clases (las cadenas pesadas γ , α y δ tienen una región constante compuesta por tres dominios de inmunoglobulina en tándem (CH1, CH2, CH3), pero también tiene una región de bisagra para una mayor flexibilidad; las cadenas pesadas μ y ϵ tienen una región constante compuesta por cuatro dominios), y una región variable (VH) que difiere entre células B diferentes, pero es la misma para todas las inmunoglobulinas producidas por la misma célula B o clon de células B. El dominio variable de cualquier cadena pesada se compone de un dominio de inmunoglobulina único. Estos dominios son de 110 aminoácidos de longitud aproximadamente.

Cada cadena ligera está compuesta por dos dominios de inmunoglobulina tándem: un dominio constante (CL), y un dominio variable (VL) que es importante para la unión de antígenos.

Algunas partes de un anticuerpo tienen funciones únicas. Los brazos de la "Y", por ejemplo, contienen los sitios que pueden unir dos antígenos (en general idénticos) y, por tanto, reconocer objetos extraños específicos. Esta región del anticuerpo se denomina región "Fab" (unión de fragmentos, antígenos). Está compuesta por un dominio constante y un dominio variable desde cada cadena pesada y ligera del anticuerpo. El "paratopo" se forma en el extremo amino terminal del monómero de anticuerpo por los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras. El dominio variable también se conoce como la región FV y es la región más importante para la unión a antígenos. Más específicamente, bucles variables de hebras β , tres cada uno en las cadenas ligeras (VL) y pesadas (VH) son responsables de la unión al antígeno. Estos bucles se conocen como las regiones determinantes de complementariedad ("CDRs").

Las regiones determinantes de complementariedad ("CDRs") son regiones dentro de anticuerpos donde estas proteínas complementan una forma de antígeno. Así, las CDRs determinan la afinidad y especificidad de la proteína con antígenos específicos. Las CDRs son la parte más variable de la molécula, y contribuyen a la diversidad de estas moléculas, permitiendo que el anticuerpo reconozca un vasto repertorio de antígenos.

En la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de un receptor de antígenos existen tres CDRs (CDR1, CDR2 y CDR3), dispuestas no consecutivamente. Dado que los receptores de antígenos se componen típicamente de dos dominios variables (en dos cadenas de polipeptídicas diferentes, cadena pesada y ligera), existen seis CDRs para cada receptor de antígenos que colectivamente pueden entrar en contacto con el antígeno. Una molécula de anticuerpo único tiene dos receptores de antígenos, por lo tanto, contiene doce CDRs.

La base general de la forma "Y" de un anticuerpo desempeña un papel en la modulación de la actividad celular inmune. Esta región es llamada la región Fc (fragmento, cristizable), y se compone por dos cadenas pesadas que contribuyen dos o tres dominios constantes que dependen de la clase del anticuerpo. La región Fc asegura de que cada anticuerpo genere una respuesta inmune apropiada para un antígeno dado, mediante la unión a una clase específica de receptores Fc, y otras moléculas inmunes, tales como proteínas de complemento. Al hacer esto, media diferentes efectos fisiológicos, incluyendo el reconocimiento de partículas opsonizadas, lisis de células, o desgranulación de mastocitos, basófilos o eosinófilos.

Existen varias maneras para designar las CDRs en una secuencia de aminoácidos. La definición de "Kabat" se basa en la variabilidad de secuencia y se utiliza con mayor frecuencia. La definición de "Chothia" se basa en la ubicación de las regiones de bucle estructurales. La definición de "AbM" es un compromiso entre los dos utilizados por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. La definición de "contacto" se basa en un análisis de estructuras cristalinas complejas disponibles.

Un experto en la materia podría identificar fácilmente las CDRs en cualquier secuencia dada que comprenda las CDRs, utilizando patrones conocidos y métodos de alineación de secuencias. En otro aspecto, modelación u otros métodos conocidos por el experto en la materia también pueden ser utilizados para la identificación de CDRs. Existen

pautas bien conocidas, por ejemplo las establecidas en la siguiente página web (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>), en la técnica para ayudar a la persona experta en la identificación de las CDRs en una secuencia de anticuerpos.

Las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo 5E3 se secuenciaron. La secuencia de cadena pesada y la secuencia de cadena ligera corresponden a las secuencias identificadas en la Figura 15. Un experto en la materia apreciará que las porciones de la secuencia anterior que son determinantes de la unión de antígenos podrían ser transferidas a otro marco de anticuerpos, por ejemplo, para generar un anticuerpo "quimérico" o "humanizado".

Un experto en la materia podría fácilmente alinear las lecturas de secuencia 5' y 3' ilustradas en la Figura 15 para generar una secuencia de consenso (por ejemplo, utilizando paquetes de software disponibles, tales como GCG o Sequencher), y podría examinar las trazas de secuencia cuando sea necesario para resolver discrepancias. Cualquier discrepancia restante podría resolverse mediante un re-secuenciamiento. Las discrepancias, por ejemplo, un codón de parada intermedia ubicado en una secuencia de nucleótidos será conocido por un experto en la técnica como un error nucleótido obvio. Se conoce muy bien en el arte que cuando secuencias aminoácidas o nucleótidas que secuencian errores, éstas pueden ocurrir cuando un método de secuenciamiento nombra una o más bases de manera incorrecta conllevando a una lectura imprecisa.. Debido a los caprichos de la biología molecular, métodos de secuenciación de ADN no basados en laboratorios son perfectamente precisos, se sabe que todos nombren equivocadamente las bases de manera ocasional en las máquinas. Tales errores se hacen evidentes cuando la lectura de secuencias se alinea contra otras lecturas o contra una referencia.

Los anticuerpos "quiméricos" también se contemplan dentro del alcance de la invención. Los anticuerpos quiméricos pueden comprender secuencias a partir de dos anticuerpos diferentes. Pueden comprender las secuencias a partir de anticuerpos desde dos especies diferentes. Moléculas de anticuerpos quiméricos pueden incluir, por ejemplo, el dominio de unión de antígenos a partir de un anticuerpo de ratón, rata, u otra especie con una región de péptido constante humana. Métodos convencionales se pueden utilizar para producir anticuerpos quiméricos que contienen la región variable de inmunoglobulina que reconoce el novedoso epítipo conformacional de la invención (véase, por ejemplo, Morrison, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 81,6851 (1985); Takeda, Nature 314, 452 (1985), Cabilly,

Patente EE.UU. No. 4.816.567; Boss, Patente EE.UU. No. 4.816.397; Tanaguchi, publicación de patente europea EP171496;. Publicación de Patente Europea 0173494 , patente del Reino Unido GB 2177096B).

Los "anticuerpos humanizados" comprenden secuencias de anticuerpos a partir de especies no humanas cuyas secuencias de proteínas han sido modificadas para aumentar su similitud con las variantes de anticuerpos producidas de forma natural en los seres humanos. Estos pueden ser considerados como un subconjunto específico de anticuerpos quiméricos, en algunos casos. Sin embargo, la "humanización" es generalmente vista como algo distinto de la creación de una simple quimera. Habiendo dicho esto, el proceso de humanización puede incluir la creación de una quimera de ratón-humano en una etapa inicial (por ejemplo, un Fab murino puede ser empalmado a un Fc humano). A partir de esto la quimera puede ser humanizada adicionalmente por la alteración selectiva de la secuencia de aminoácidos en la porción Fab de la molécula. El proceso suele ser "selectivo" para conservar la especificidad para la cual se desarrolló el anticuerpo originalmente. Por ejemplo, aparte de los segmentos de CDR, las porciones de la secuencia de Fab que se difieren a partir de aquellos en humanos pueden mutarse mediante el intercambio de aminoácidos apropiados individuales. Esto se realiza al nivel de ADN usando mutagénesis. Es posible producir un anticuerpo humanizado sin crear un intermedio quimérico. La creación "directa" de un anticuerpo humanizado se puede lograr mediante la inserción de los segmentos de codificación de CDR adecuados (responsable de las propiedades de unión deseadas) en un "andamio" de anticuerpos humanos. Como se discutió anteriormente, esto se logra a través de métodos de ADN recombinante utilizando un vector apropiado y expresión en células mamíferas. Esto es, después de que un anticuerpo se desarrolla en un ratón (por ejemplo) que presente las propiedades deseadas, el ADN que codifica el anticuerpo puede ser aislado, clonado en un vector y secuenciado. La secuencia de ADN correspondiente a las CDRs de anticuerpos, se pueden determinar. Una vez que se conozca la secuencia precisa de las CDRs deseadas, una estrategia puede ser concebida para la inserción de estas secuencias apropiadamente en un constructo que contiene el ADN para una variante de anticuerpos humana. La estrategia también puede emplear la síntesis de fragmentos de ADN lineales con base en la lectura de secuencias de CDRs. Bibliotecas de diversidad pueden generarse usando cebadores oligonucleótidos que contienen diversidad sintética. El grupo resultante de clones puede

clasificarse adicionalmente para identificar clones de anticuerpos humanizados optimizados usando métodos conocidos.

En algunas realizaciones, los anticuerpos quiméricos o monoclonales específicamente reactivos con el novedoso epítipo conformacional de la invención como se describen en la presente pueden ser humanizados adicionalmente mediante la producción de quimeras de la región constante humana, en las que las partes de las regiones variables, particularmente las regiones variables conservadas del dominio de unión de antígenos, son de origen humano y sólo las regiones hipervariables son de origen no humano. Tales moléculas de inmunoglobulina pueden realizarse mediante técnicas conocidas en la técnica, (por ejemplo, Teng, Proc Natl Acad Sci EE.UU., 80, 7308 a 7312 (1983); Kozbor, Immunology Today, 4, 7279 (1983); Olsson, Meth Enzymol, 92, 3-16 (1982)), y publicación PCT WO92/06193 o EP 0239400) Los anticuerpos humanizados también pueden ser producidos comercialmente (Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Gran. Bretaña).

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo quimérico o humanizado que comprende las secuencias de cadenas pesadas y/o ligeras de 5E3, o una porción o porciones de las mismas. Las porciones pueden ser los determinantes de la unión de antígenos. En algunas realizaciones, los determinantes pueden comprender las secuencias de CDR de 5E3. Tales anticuerpos fijan el mismo epítipo que 5E3. También pueden fijar un epítipo que al menos superpone parcialmente aquel fijado por 5E3.

En algunas realizaciones, el anticuerpo quimérico o humanizado puede comprender secuencias CDR sustancialmente idénticas a las secuencias CDR de 5E3. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede tener cambios de secuencia conservadores en comparación con las secuencias de 5E3.

Entre los aminoácidos comunes una "sustitución aminoácida conservadora" es ejemplificada por una sustitución entre aminoácidos dentro de cada uno de los siguientes grupos: (1) glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina, (2) fenilalanina, tirosina, y triptófano, (3) serina y treonina, (4) aspartato y glutamato, (5) glutamina y asparagina, y (6) lisina, arginina e histidina.

La tabla BLOSUM62, la cual es bien conocida en la técnica, es una matriz de sustitución de aminoácidos derivada a partir de 2.000 alineaciones múltiples locales aproximadamente de segmentos de secuencias de proteínas, que representan regiones

altamente conservadas de más de 500 grupos de proteínas relacionadas (Henikoff y Henikoff, Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU. 89:10915 (1992)). Por consiguiente, las frecuencias de sustitución de BLOSUM62 pueden utilizarse para definir las sustituciones aminoácidas conservadoras que pueden introducirse en las secuencias de aminoácidos de la presente invención. Aunque es posible diseñar sustituciones de aminoácidos basadas únicamente en propiedades químicas (como se analizó anteriormente), la expresión "sustitución aminoácida conservadora" se refiere preferiblemente a una sustitución representada por un valor BLOSUM62 mayor que -1. Por ejemplo, una sustitución aminoácida es conservadora si la sustitución se caracteriza por un valor BLOSUM62 de 0, 1, 2, o 3. De acuerdo con este sistema, las sustituciones aminoácidas conservadoras preferidas se caracterizan por un valor BLOSUM62 de al menos 1 (por ejemplo, 1, 2 o 3), mientras que sustituciones aminoácidas conservadoras más preferidas se caracterizan por un valor BLOSUM62 de al menos 2 (por ejemplo, 2 o 3).

En algunas realizaciones, el anticuerpo puede comprender secuencias de CDR que son al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85% o al menos 90% idénticas a las secuencias de CDR de 5E3. También pueden ser al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o más de un 99% idénticas a las secuencias de CDR de 5E3.

Técnicas de clonación molecular y ADN recombinante estándar utilizadas en la elaboración de anticuerpos son bien conocidas en la técnica y se describen más detalladamente en Sambrook, J., Fritsch, EF y Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989 (en lo sucesivo "Sambrook").

El término "recombinante" se refiere a una combinación artificial de dos segmentos separados de secuencia, por ejemplo, mediante síntesis química o mediante la manipulación de segmentos aislados de ácidos nucleicos mediante técnicas de ingeniería genética.

La dosificación de las composiciones o compuestos de algunas realizaciones de la invención puede variar dependiendo de la vía de administración (oral, inhalación, intravenosa, o similares) y la forma en que se administre la composición o compuesto

(solución, liberación controlada o similares). La determinación de las dosificaciones apropiadas está dentro de la capacidad de un experto en la técnica.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o buffers, que aumenten la vida útil o eficacia del anticuerpo o porción de anticuerpo.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad efectiva", "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente efectiva" de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o porción de anticuerpo puede ser determinada por una persona experta en la técnica y puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o porción de anticuerpo es sobrepasado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, puesto que una dosis profiláctica se usa en sujetos antes de o en una fase anterior de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva. La cantidad efectiva puede ser calculada sobre una base de masa/masa (por ejemplo, microgramos o miligramos por kilogramo de sujeto), o puede ser calculada sobre una base de masa/volumen (por ejemplo, concentración, microgramos o

miligramos por mililitro). Utilizando una unidad de masa/volumen, un anticuerpo puede presentarse en una cantidad desde 0,1 µg/ml a 20 mg/ml aproximadamente, o cualquier cantidad intermedia, por ejemplo 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160 180, 200, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 5000, 10000, 20000

5 ug/ml, o cualquier cantidad intermedia, o desde 1 µg/ml a 2000 µg/ml aproximadamente, o cualquier cantidad intermedia, por ejemplo 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0, 40.0, 50.0 60.0, 70.0, 80.0, 90.0, 100, 120, 140, 160 180, 200, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, µg/ml o cualquier cantidad intermedia, o desde 10ug/ml aproximadamente a 1000ug/ml aproximadamente o cualquier cantidad intermedia, por ejemplo 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0, 40.0, 50.0 60.0, 70.0, 80.0, 90.0, 100, 120, 140, 160 180, 200, 250, 500, 750, 1000

10 ug/ml, o cualquier cantidad intermedia, o desde 30µg/ml a 1000ug/ml aproximadamente o cualquier cantidad intermedia, por ejemplo, 30.0, 35.0, 40.0, 50.0 60.0, 70.0, 80.0, 90.0, 100, 120, 140, 160 180, 200, 250, 500, 750, 1000 µg/ml.

Las cantidades y/o concentraciones pueden ser calculadas sobre una base de masa/masa (por ejemplo, microgramos o miligramos por kilogramo del sujeto), o puede ser calculada sobre una base de masa/volumen (por ejemplo, concentración, microgramos o miligramos por mililitro). Utilizando una unidad de masa/volumen, un anticuerpo o péptido puede presentarse en una cantidad desde 0,1 µg/ml a 20 mg/ml aproximadamente, o cualquier cantidad intermedia, por ejemplo 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160 180, 200, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 5000, 10000, 20000 ug/ml, o cualquier cantidad intermedia, o desde 1 µg/ml a 2000 ug/ml aproximadamente, o cualquier cantidad intermedia, por ejemplo 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0, 40.0, 50.0 60.0, 70.0, 80.0, 90.0, 100, 120, 140, 160 180, 200, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, ug/ml o cualquier cantidad intermedia, o desde 10µg/ml a 1000µg/ml aproximadamente o cualquier cantidad intermedia, por ejemplo, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0, 40.0, 50.0 60.0, 70.0, 80.0, 90.0, 100, 120, 140, 160 180, 200, 250, 500, 750, 1000 µg/ml, o cualquier cantidad intermedia, o desde 30µg/ml a 1000ug/ml aproximadamente o cualquier cantidad intermedia, por ejemplo, 30.0, 35.0, 40.0, 50.0 60.0, 70.0, 80.0, 90.0, 100, 120, 140, 160 180, 200, 250, 500, 750, 1000 µg/ml.

15

20

25

Los anticuerpos de la invención pueden incorporarse en una composición farmacéutica adecuada para, por ejemplo, administración parenteral. Preferiblemente, el anticuerpo se preparará como una solución inyectable que contiene una cantidad efectiva de anticuerpo. La solución inyectable puede estar compuesta por una forma de dosificación líquida o liofilizada en un frasco de vidrio flint o ámbar, en una ampolleta o jeringa pre-llenada. Cualquier buffer adecuado puede usarse en la preparación de las composiciones farmacéuticas. Ejemplos de tales buffers incluyen pero no se limitan a, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio. Pueden incluirse crioprotectores y agentes de volumen para una forma de dosificación liofilizada. Pueden usarse estabilizadores en formas de dosificaciones tanto líquidas como liofilizadas.

Las composiciones según varias realizaciones de la invención, incluyendo composiciones terapéuticas, se pueden administrar como una dosis que comprende una cantidad efectiva de un anticuerpo o péptido. La dosis puede comprender de 0,1 ug/kg a 20mg/kg aproximadamente (con base en la masa del sujeto), por ejemplo 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160 180, 200, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 5000, 10000, 20000 ug/kg, o cualquier cantidad intermedia, o desde 1 µg/kg aproximadamente a 2000ug/kg aproximadamente o cualquier cantidad intermedia, por ejemplo 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0, 40.0, 50.0 60.0, 70.0, 80.0, 90.0, 100, 120, 140, 160 180, 200, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 ug/kg, o cualquier cantidad intermedia, o desde 10µg/kg a 1000ug/kg aproximadamente o cualquier cantidad intermedia, por ejemplo 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0, 40.0, 50.0 60.0, 70.0, 80.0, 90.0, 100, 120, 140, 160 180, 200, 250, 500, 750, 1000 µg/kg, o cualquier cantidad intermedia, o desde 30µg/kg aproximadamente a 1000ug/kg aproximadamente o cualquier cantidad intermedia, por ejemplo, 30.0, 35.0, 40.0, 50.0 60.0, 70.0, 80.0, 90.0, 100, 120, 140, 160 180, 200, 250, 500, 750, 1000 µg/kg.

Un experto en la técnica será capaz fácilmente de interconvertir las unidades como sea necesario, dada la masa del sujeto, la concentración de la composición farmacéutica, los componentes individuales o combinaciones de los mismos, o el volumen de la composición farmacéutica, componentes individuales o combinaciones de los mismos, en un formato adecuado para la aplicación deseada.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo pretendido de la administración y aplicación terapéutica. Las composiciones típicas preferidas están en forma de soluciones inyectables o de infusión, tales como composiciones similares a las usadas para inmunización pasiva de humanos con otros anticuerpos. El modo preferido de administración es parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). En una realización preferida, el anticuerpo se administra mediante infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, el anticuerpo se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden administrar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la vía/modo preferido de administración es la inyección subcutánea, inyección intravenosa o infusión. Como se apreciará por el experto en la técnica, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo puede prepararse con un vehículo que protegerá al compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Polímeros biodegradables, biocompatibles pueden utilizarse, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, JR Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención puede administrarse oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también puede incluirse en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimirse en tabletas, o incorporarse directamente en la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, los compuestos pueden incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Para administrar un

compuesto de la invención de otra manera diferente a la administración parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación.

Compuestos suplementarios activos también pueden incorporarse en las composiciones farmacéuticas. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención es co-formulado y/o co-administrado con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para tratar AD o demencias relacionadas. Por ejemplo, uno de los anticuerpos de la presente invención o porción de anticuerpo del mismo puede co-formularse y/o co-administrarse con uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otros objetivos.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la presente invención o un fragmento del mismo puede estar vinculado a un vehículo prolongador de vida media conocido en la técnica. Tales vehículos incluyen, pero no están limitados a, el dominio Fc, glicol de polietileno (PEG) y dextrano. Tales vehículos se describen, por ejemplo, en la solicitud EE.UU. Ser. N ° 09/428, 082 y la solicitud PCT publicada No. WO 99/25044, las cuales están incorporadas en la presente como referencia para cualquier propósito.

En una realización de la invención, se proporciona un péptido antigénico que comprende un epítipo que tiene una configuración cíclica restringida, el epítipo que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos SNK, el epítipo que corresponde a una “región de nudillo” de acceso a anticuerpos y expuesta a solventes del A β oligomérico.

En otra realización de la invención, se proporciona un péptido antigénico que comprende un epítipo que tiene una configuración cíclica restringida, el epítipo tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 1, el epítipo que corresponde a una “región de nudillo” de acceso a anticuerpos y expuesta a solventes del A β oligomérico.

En otra realización de la invención, se proporcionan anticuerpos que son capaces de fijar un péptido cíclico derivado de A β , el péptido cíclico que comprende un epítipo conformacional que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos SNK, y que corresponde a una “región de nudillo” de acceso a anticuerpos y expuesta a solventes del A β oligomérico.

En una realización adicional de la invención, se proporcionan anticuerpos que son capaces de unir un péptido cíclico derivado de A β , el péptido cíclico que comprende un epítipo conformacional que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID

NO: 1, y que corresponde a una “región de nudillo” de acceso a anticuerpos y expuesta a solventes del A β oligomérico.

En ciertas realizaciones, dichos anticuerpos pueden fijar formas oligoméricas de A β con mayor afinidad que las formas no oligoméricas de A β .

En otra realización, se proporciona un método de tratamiento para un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Alzheimer, el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que es capaz de unirse a un péptido cíclico derivado de A β , donde el péptido cíclico comprende un epítipo conformacional que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos SNK que corresponde a una “región de nudillo” de acceso a anticuerpos y expuesta a solventes del A β oligomérico. En ciertas realizaciones, el anticuerpo puede fijar formas oligoméricas de A β con mayor afinidad que las formas no oligoméricas de A β .

En otra realización, se proporciona un método para prevenir el desarrollo o progresión de AD en un sujeto, el método que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que es capaz de unirse a un péptido que específicamente fijan un péptido cíclico derivado de A β , donde el péptido cíclico comprende un epítipo conformacional que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos SNK que corresponde a una “región de nudillo” de acceso a anticuerpos y expuesta a solventes del A β oligomérico. En ciertas realizaciones, el anticuerpo puede fijar formas oligoméricas de A β con mayor afinidad que las formas no oligoméricas de A β .

Aspectos adicionales de la invención se harán evidentes a partir de la consideración de la descripción de realizaciones preferidas de la invención. Una persona experta en la técnica entenderá que otras realizaciones de la invención son posibles y que los detalles de la invención pueden modificarse en un número de formas, todos ellos sin apartarse del concepto inventivo. Por lo tanto, las ilustraciones, descripciones y ejemplos deben ser considerados como de naturaleza ilustrativa y no restrictiva.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Purificación y Agregación de A β y Caracterización de Oligómeros

Transformación, expresión y purificación

Células de E. coli BL21 (DE3) pLysS y células de E. coli DH5a se transformaron con un constructo que codifica A β 1-40. Células de E. coli procedentes de 1L de cultivo se resuspendieron en 25 ml de buffer de lisis (50 mM Tris HCl pH 8,0 + 1 mM ácido etilendiamino tetracético (EDTA)) para obtener una suspensión homogénea (no se agregaron inhibidores de la proteasa). La suspensión se transfirió a un tubo de centrifugación de 40 mL (JA-20), se puso en hielo y se sometió a sonicación durante un período de 3 min a una intensidad de 6 (es decir, la máxima configuración de una punta de ultrasonido pequeña) e intermitencia de 50HZ, seguido por un paso de centrifugación de 10 min a 18000 g a 4 ° C. Este proceso de sonicación se repitió 3 veces. Las fracciones solubles se recuperaron cada vez y se analizaron mediante SDS-PAGE (la precipitación TCA no fue necesaria en este caso). Finalmente, el pellet se resuspendió en 12.5 mL de buffer que contiene 8 M urea, 10 mM Tris HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, seguido de una etapa de sonicación adicional y una etapa de centrifugación (18000 rpm durante un período de 10 min). Posteriormente, esta solución se diluyó 4 veces (adición de 37,5 ml) con 10 mM Tris pH 8,0 + 1 mM EDTA. Esta solución de proteína se incubó luego con DEAE-celulosa (D52 de Whatman, esto fue regenerado primero con 0.5 N NaOH durante un período de 15 min, seguido por un lavado con agua y 0.5 M HCl, seguido de varios lavados con agua y finalmente una solución buffer concentrada (50 mM Tris pH 8.0 + 1 mM EDTA)) que fue finalmente equilibrada con el buffer actual para la purificación (25 mM Tris pH 8,0 + EDTA 1 mM). El péptido se dejó unir a la resina en un lote bajo condiciones de agitación suave (es decir, en un tubo Falcon con un imán en el interior, colocado en la placa de agitación magnética) durante periodos de 20 min. Las proteínas no unidas se recolectaron en el flujo, después de centrifugación durante un periodo de 1 min a 1200 rpm para sedimentar las perlas. Estas perlas se retiraron con una pipeta.

Varios lavados se llevaron a cabo, cada uno con un tiempo de incubación de 5 min y una etapa de centrifugación corta (1 min a 1200 rpm) para eliminar las fracciones: 25 mM Tris HCl pH 8,0 + 1 mM EDTA, respectivamente con 0, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 500 mM NaCl se utilizaron. Las fracciones eluidas se mantuvieron en hielo para preservar el estado monómero de los péptidos.

Con este enfoque, 250 uL de las fracciones recogidas se analizaron mediante SDS-PAGE después de la precipitación con TCA. Para la precipitación TCA, las muestras

fueron incubadas en ácido tricloroacético al 20% (TCA) durante al menos 30 min en hielo, luego se centrifugaron durante 15 min a 14.000 rpm. El sobrenadante se desechó y el pellet se lavó con 750 uL de acetona fría, luego se centrifugó durante un período de 5 min a 14.000 rpm. Se separó la acetona y los restos se dejaron evaporar. El pellet se volvió a disolver con tinte de carga de proteínas y se analizó 8-10 uL en SDS-PAGE.

Protocolo de Agregación del A β y Oligomerización del A β

Para lograr la monomerización de A β , A β purificado se dializó contra agua miliQ y se liofilizó. Después de la liofilización, el A β se recuperó en uno de ácido fórmico o TCA y luego se evaporó para formar una capa de monómero molecular en un tubo de vidrio. El A β monomérico se resuspendió en PBS (5 mM) a un pH de aproximadamente 6,8 para mantener A β en la forma monomérica.

Para lograr oligomerización de A β , A β monomérico se utilizó como material de partida y se incubó a 200 μ m bajo sonicación durante un período de 12 horas a 33 °C. Este procedimiento conduce a la formación de oligómeros A β en cambio de fibrillas A β .

Caracterización de Oligómeros

El tamaño de oligómero se caracteriza por la dispersión de luz dinámica (DLS), una técnica bien conocida que se puede utilizar para determinar el perfil de distribución de tamaño de partículas en suspensión. Cuando la fuente de luz es un láser, y es monocromática y coherente, se observa una fluctuación dependiente del tiempo en la intensidad de dispersión. Estas fluctuaciones son el resultado de las pequeñas moléculas en solución están experimentando movimiento browniano y por lo tanto la distancia entre los dispersores en la solución está cambiando constantemente con el tiempo. Cuando la luz golpea las partículas pequeñas la luz se dispersa en todas las direcciones, lo que se conoce como dispersión de Rayleigh. Esta luz dispersada a continuación se somete bien sea a interferencia constructiva o destructiva por las partículas circundantes y dentro de esta fluctuación de la intensidad, la información está contenida sobre la escala de tiempo de movimiento de los dispersores. DLS se utilizó para determinar la distribución de tamaño de la muestra Abeta en solución, y para confirmar si Abeta estaba en una forma monomérica u oligomérica.

La Figura 1 ilustra que la muestra A β analizada utilizando DLS fue A β monomérica. A β disponible comercialmente (1-40) (50 μ m) se incubó en 5 mM PBS a 10 °

C. Un radio de hidratación (Rh) de menos de 1 nm se calculó. Estos resultados son consistentes con un Rh esperado de menos de aproximadamente 1 nm para A β monomérico que sería conocido por un experto en la técnica por ser típico de A β monomérico.

La Figura 2 ilustra que la muestra de A β analizada utilizando DLS fue A β oligomérico. A β disponible comercialmente (1-40) (80 μ M) se incubó en 150 mM PBS a 10 ° C. Los resultados indican una población casi monodispersa. Un radio de hidratación (Rh) de 200 nm se calculó. Los resultados son consistentes con un Rh esperado entre aproximadamente 100 nm-200 nm para A β oligomérico que sería conocido por un experto en la técnica por ser típico de A β oligomérico.

La Figura 3 ilustra que la muestra de A β analizada utilizando DLS fue A β oligomérico. A β disponible comercialmente (1-40) (50 μ m) se incubó en 150 mM PBS a 10 ° C. Los resultados indican una población casi monodispersa. Un radio de hidratación (Rh) de 190 nm se calculó. Los resultados son consistentes con un Rh típico de A β oligomérico.

Ejemplo 2: Producción de péptido Cíclico que Comprende un Epítipo Conformacionalmente Restringido

Un péptido cíclico que comprende el novedoso epítipo conformacional se construyó en una conformación de bucle restringida mediante un enlace de disulfuro entre residuos de cisteína localizados en los extremos N-y C- de este péptido. Dos cisteínas no nativas fueron agregadas a la secuencia GSNKG, una en el extremo-C y una en el extremo-N. Las dos cisteínas se oxidaron bajo condiciones controladas para formar un puente de disulfuro.

La estructura del péptido cíclico fue configurada para imitar la conformación en "nudillo" y la orientación de la región de nudillo del A β oligomérico que comprenden el novedoso epítipo conformacional.

La Figura 4 ilustra un modelo tridimensional del péptido ciclado por disulfuro que comprende el novedoso epítipo conformacional SNK.

Una persona con conocimientos en la técnica entenderá que otros métodos de formación de un epítipo restringido son conocidos en el campo. Por ejemplo, un péptido se puede ciclar mediante la formación de un enlace entre dos residuos del péptido, proporcionando un bucle cerrado. Los péptidos cíclicos se pueden describir como homodéticos (donde todos los enlaces son enlaces peptídicos) o heterodéticos (donde hay dos

enlaces peptídicos, y otros tipos de unión, tales como enlaces de éster, éter, amida o disulfuro dentro del péptido cíclico). Los péptidos se pueden ciclar mediante métodos químicos o enzimáticos. La publicación de patente EE.UU. 2009/0215172 describe proteínas recombinantes que catalizan la ciclización de cabeza a cola de péptidos por medio de enlaces de amidas, de una manera independiente de la secuencia del péptido. Las secuencias de reconocimiento en un prepéptido que rodea el péptido de interés dictan la ciclización. Bourne (Methods in Molecular Biology, 2005 298:151-166) describe métodos combinatorios para la preparación de una serie de péptidos cíclicos mediante el uso de un ligante amida retenedor de seguridad y un procedimiento ordenado. La publicación de patente EE.UU. 2004/0014100 describe un método para la producción in vivo de péptidos cíclicos. La publicación de patente EE.UU. 2010/0240865, publicación de patente EE.UU. 2010/0137559, y la patente EE.UU. 7.569.541 describen diversos métodos para la ciclización de péptidos, por ejemplo, los péptidos se pueden ciclar a través de la oxidación de los residuos que contienen tiol o mercaptano en el extremo-N ó extremo-C, o internos al péptido. Ejemplos de residuos que contienen tiol incluyen cisteína, homocisteína, penicilamina. En algunas realizaciones, un primer residuo que contiene tiol es cisteína; en algunas realizaciones ambos un primero y un segundo residuo que contiene tiol son cisteína. Los dos residuos que contienen tiol en el péptido pueden ser oxidados para formar un dímero de cisteína de aminoácidos, unido mediante un enlace de disulfuro. Una variedad de reactivos de oxidación se pueden utilizar para lograr tal conversión tiol-disulfuro, por ejemplo, oxígeno (aire), sulfóxido de dimetilo, glutatión oxidado, ferricianuro de potasio, trifluoro acetato de talio (III), u otros reactivos oxidantes, tales como pueden ser conocidos para los expertos en la técnica y se utilizan con métodos tales como los conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos de tales métodos se describen en la publicación PCT WO01/92466, y Andreu, 1994. Methods in Molecular Biology 35:91169.

Ejemplo 3: Derivación y Tamizaje de Anticuerpos Monoclonales A β Oligómero-Específicos

Se generaron anticuerpos monoclonales (mAbs) contra el epítipo conformacional específico a oligómero A β (SEQ ID NO: 1) mediante la producción de un anticuerpo dirigido a un epítipo restringido en una conformación de bucle con enlace de disulfuro entre las cisteínas en los extremos N-y C- de este péptido como se describe en el Ejemplo 2.

Ratones BALB/C se inmunizaron con el epítipo novedoso de bucle restringido (CLE), denominado en la presente como el GSNKG-CLE, ligado al péptido antígeno múltiple (MAP) o hemocianina de lapa californiana (KLH), que se han utilizado para PrP y epítopos específicos de SOD1 mal doblados (Paramithiotis 2003; Rakhit 2007). Los sueros de ratón fueron tamizados sobre GSNKG-CLE unido con albúmina sérica bovina (BSA), y fusión de bazo y la selección de hibridoma se realizó en los ratones con la interacción específica y fuerte con GSNKG-CLE y A β soluble no estructurado. Clones secretores de IgG positivos fueron sometidos a producción a gran escala y caracterización posterior por métodos inmunológicos con GSNKG-BSA cíclico y lineal, oligómeros A β sintéticos y oligómeros A β derivados de cerebro con AD.

Se generaron anticuerpos monoclonales (mAb) contra péptidos cíclicos GSNKG y pre-tamizados en búsqueda de uniones con ELISA basado en péptidos. Algunos anticuerpos generados contra péptidos cíclicos GSNKG preferentemente péptidos cíclicos reconocidos, algunos péptidos lineales y algunos tanto cíclicos como lineales. La capacidad de los anticuerpos para reconocer péptidos tanto lineales como cíclicos puede, por ejemplo, relacionarse con el reconocimiento inmunológico de un péptido cíclico que ha sido parcial o completamente linealizado mediante la reducción del puente cisteína in vivo. Los anticuerpos generados para péptidos GSNKG intermedios representan anticuerpos que reconocen el péptido tanto cíclico como lineal. Basado en los resultados del ELISA, dos anticuerpos específicos cíclicos (5D8, 5E3), dos específicos lineales (3F5, 3G2), y dos clones IgG específicos intermedios (4D11, 4D12) se eligieron para su posterior análisis. Una plataforma Biacore TM, una tecnología que utiliza el fenómeno óptico de resonancia de plasmón superficial para monitorear las interacciones biomoleculares en tiempo real y sin la necesidad de etiquetado, se utilizó para el análisis adicional.

La Figura 5 muestra los resultados de ejemplo TM Biacore. Los anticuerpos monoclonales fueron capturados a partir de sobrenadantes de cultivo de tejido utilizando un anticuerpo Fc específico anti-ratón de conejo (RAMFc) que se inmovilizó covalentemente sobre un sensorchip CM5. La unión de péptidos GSNKG BSA-conjugados (lineales y cíclicos) y oligoméricos A β (1-42) se examinó luego al fluir estos analitos sobre el mAb capturado. Las respuestas de unión fueron citadas contra de una celda de flujo que contenía RAMfc inmovilizado pero no mAb capturado, y blanqueado adicionalmente con diluyente de

muestra que consistía en solución salina tamponada con Hepes (HBS) que contiene 1mg/ml de carboximetil dextrano. Además, las respuestas observadas se normalizaron frente a la cantidad de mAb capturado, para permitir con precisión las comparaciones entre los diferentes mAbs.

La Figura 6 y la Figura 7 representan los sensogramas resultantes Biacore™, y muestra que los clones de preferencia lineal seleccionados mediante ELISA no unieron péptidos acoplados con BSA lineales ni cíclicos sobre los chips sensores Biacore; clones intermedios ELISA-seleccionados (4D11, 4D12) unidos tanto a péptido lineal como cíclico sobre los chips sensores Biacore, y los clones cíclicos seleccionados por ELISA (5D8, 5E3) se unieron principalmente a BSA acoplado cíclico sobre los chips sensores Biacore. Los clones cíclicos 5E3 y 5D8 demostraron fuerte unión a oligómeros A β (1-42) y péptidos cíclicos, mientras que también demostraron poca o ninguna unión de los péptidos lineales en comparación con los clones intermedios. Los datos que ilustran el anticuerpo 5E3 demuestran la mayor unión a oligómeros A β (1-42), aunque ambos 5E3 y 5D8 se unen al péptido cíclico. Estos resultados indican, en la detección de los anticuerpos producidos utilizando el péptido cíclico del Ejemplo 2, un subconjunto de los anticuerpos específicos cíclicos produjeron el reconocimiento de anticuerpos preferenciales del epítipo del A β oligomérico.

La Figura 8 muestra que el mAb 5E3, un clon cíclico-preferencial, unido a oligómeros A β (1-42) de una manera dependiente de la concentración. Esta observación demuestra un epítipo accesible y conformacionalmente restringido en los oligómeros A β que es valorable, consistente con una interacción antígeno-anticuerpo autentica inmunológica. Así, los análisis Biacore demuestran que el péptido cíclico-GSNKG y A β (1-42) oligomérico de longitud completa comparten una firma molecular común, el epítipo conformacionalmente restringido, que se reconoce específicamente por el mAb 5E3 conformacionalmente sensible.

mAbs específicos a oligómeros A β (1-42) pueden ser probados adicionalmente para el propósito terapéutico en modelos celulares y animales de AD, y para la actividad de neutralización en ensayos neurofisiológicos de la función sináptica alterada por oligómeros A β .

Ejemplo 4: Análisis de Citometría de Flujo

Un análisis de citometría de flujo se llevó a cabo para determinar el grado de unión de anticuerpos de APP sobre la superficie celular.

Ratones adultos sanos Black/6 fueron sacrificados en una cámara de dióxido de carbono. Los cerebros se extrajeron inmediatamente y se perfundieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS), seguido por la inmersión en PBS + suero fetal bovino al 1% (FBS). Suspensiones de células fueron generadas al picar sesos con tijeras disecadoras y el paso serial a través de tamices 100 μm y 70 μm . Las células se incubaron en PBS + FBS al 1% como una etapa de bloqueo durante 30 min a temperatura ambiente. Las células se incubaron a continuación (o no) en 100 μL de PBS + FBS al 1% más ya sea 10 $\mu\text{g/mL}$ o 1 $\mu\text{g/mL}$ de 6E10 y 5E3, por separado. Después de 1 h a temperatura ambiente las células se lavaron dos veces (400 $\times\text{g}$ durante 5 min) y se resuspendieron en PBS + FBS al 1% y anticuerpos anti-ratón conjugados con aloficocianina (APC) o fluoresceína (FITC), ambos a una dilución de 1:1000. Además de un control sin teñir, algunas células se incubaron con anticuerpo secundario solo para controlar la interacción no específica. Los anticuerpos secundarios fueron incubados con la muestra durante 30 min a temperatura ambiente después de lo cual las células se lavaron y se analizaron inmediatamente o se fijaron durante la noche en paraformaldehído al 4 ° C. Se utilizó un citómetro de flujo BD LSR II para recopilar datos y FlowJo se utilizó para el análisis de datos.

La **Figura 9** y la **Figura 10** representan los resultados del análisis de citometría de flujo. La Figura 9 es una traza de citometría de flujo que muestra la comparación de las células que fijan anticuerpo pan-A β 6E10 rotulado y un control negativo de anticuerpo secundario al APP localizado en la superficie celular. La Figura 10 muestra la comparación de células que fijan el anticuerpo 5E3 rotulado y un control negativo de anticuerpo secundario al APP localizado en la superficie celular. El anticuerpo 6E10 mostrado en la Figura 9 ilustra una proporción significativa de las células que fijan 6E10 FITC rotulado al APP localizado en la superficie celular. En contraste, el anticuerpo 5E3 mostrado en la Figura 10 ilustra que hay muy poca unión de 5E3 FITC rotulado a las células en comparación con el control. Estos resultados ilustran claramente que 5E3 rotulado con FITC muestra significativamente menos unión de APP en la superficie celular en comparación con 6E10 rotulado con FITC. Los resultados de estos análisis indican que el novedoso epítipo conformacional específico a oligómero estructuralmente restringido no está presente en la

superficie celular de las neuronas que es coherente con un carácter lineal no estructurado del motivo GSNKG en APP nativo. La ausencia del novedoso epítipo conformacional estructuralmente restringido conformacional en la superficie celular indica que una respuesta inmune contra el epítipo cíclico utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer no actúa sobre APP nativo. Estos resultados demuestran que los anticuerpos que se unen específicamente al epítipo cíclico-GSNKG de A β oligomérico tienen un perfil de seguridad preferido en comparación con el anticuerpo 6E10 conocido.

Ejemplo 5: Análisis Neuronales

Un análisis de toxicidad neuronal se llevó a cabo para determinar el grado de supervivencia de las células para células incubadas con un control (medio solo), soluble (lineal), y A β 1-40 oligomérico en presencia y en ausencia de anticuerpo 5E3 a diferentes concentraciones. El control se trató con medio solo (sin anticuerpo).

96 pozos que contenían 10.000 neuronas primarias de rata/poczo fueron cultivadas en un pozo tratado con poli-L-lisina (Sciencell # 0403; 2 micrograms/cm², 1 hr, 37 grados centígrados, lavado 3 X con PBS) de una placa de 96 - pozos, con 0.2 ml de medio neuronal (Sciencell # 1521) en cada pozo. El medio de cultivo se cambió cada dos días durante 7 días. A β (1-40) soluble y oligomérico se incubaron 4 horas en ausencia o en presencia del anticuerpo 5E3 a diferentes concentraciones (véase la Figura 11) en medio neuronal a temperatura ambiente en un dispositivo giratorio. 0.2 ml de esta mezcla se agregaron a las neuronas después de la eliminación del medio. Después de un período de 24 horas, la supervivencia celular se midió utilizando un kit de Proliferación Celular Roche II (# 11465015001) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las densidades ópticas se determinaron con un lector de placas.

La Figura 11 ilustra los resultados de los ensayos de toxicidad neuronal. A β es tóxico para las neuronas tanto en la configuración monomérica lineal A β como la configuración oligomérica A β . El anticuerpo 5E3 dirigido contra el epítipo A β conformacionalmente restringido ha demostrado ser protector contra formas oligoméricas de A β . El anticuerpo 5E3 no ha demostrado ser protector para el A β lineal. Estos resultados demuestran la especificidad de conformación de la unión del anticuerpo 5E3.

Ejemplo 6: Análisis de Inmunoblot

Se realizó un análisis inmunoblot para determinar la unión relativa del anticuerpo 6E10 y el anticuerpo 5E3 a APP, A β monomérico y A β oligomérico. Homogeneización

Muestras de tejido cerebral se pesaron y posteriormente sumergieron en un volumen de TBS fresco, enfriado con hielo (suplementado con 5 mM ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), 5 mM EDTA y cóctel inhibidor de proteasa) tal que la concentración final de tejido cerebral fue 20% . El tejido se homogeneizó en este buffer utilizando un homogeneizador mecánico de la siguiente manera: el tejido se sometió a homogeneizador 3 veces durante un período de 30 segundos cada uno con un periodo de 30 s en hielo entre homogeneizaciones. Las muestras homogeneizadas de TBS fueron luego sometidas a ultracentrifugación (70.000 xg durante 90 min). Se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -80 ° C.

La concentración de proteína de los homogenatos de TBS se determinó utilizando el ensayo de proteína BCA. En algunos casos, una cantidad igual de proteína se fraccionó por SDS-PAGE usando geles de Tris-Tricina 4-20% después de la ebullición en buffer de muestra Tris-Tricina (Invitrogen) y se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno 0.2 μ m (PVDF). Después de la transferencia, las membranas se sumergieron en PBS y se sometieron a bullición 2 veces durante un período de 3 minutos cada uno para la recuperación térmica del epítipo. Las membranas se sometieron a inmunoblot usando bien sea 6E10 o el anticuerpo 5E3 específico oligomérico como el anticuerpo primario. Ambos se utilizaron a una concentración de 1 μ g/ml.

La Figura 12 ilustra los resultados de un inmunoblot que muestra el tejido cerebral homogenizado en TBS, fraccionado en geles de Tris-Tricina, y manchado con inmunoblot con anticuerpo pan-A β 6E10. La reacción con APP y con formas monoméricas del A β es evidente, así como la reactividad menor con las bandas del oligómero A β .

La **Figura 13** ilustra los resultados de un ensayo inmunoblot para el anticuerpo 5E3. El anticuerpo 5E3 específicamente reconoció especies de oligómeros de aproximadamente 45-55 kDa, aparentemente SDS estable, lo que indica una fuerte interacción no covalente de monómeros A β en las especies de oligómeros. No se observó reacción con la forma monomérica de A β , aunque algo de reactividad limitada con APP es evidente en este inmunoblot que se presume que está asociada con la desnaturalización y renaturalización parcial nativa y no nativa sobre la membrana blot. El anticuerpo pan-A β

6E10 mostró poco o ningún reconocimiento de las especies oligoméricas. Los datos de Biacore TM discutidos en el Ejemplo 3 (con base en una fórmula Biacore TM empírica y asumiendo la estequiometría entre 5E3 y Ab42 es 1) está de acuerdo con el inmunoblot, e indica que la especie de A β (1-42) que se une al 5E3 está entre un decámero y tridecamero; dado un peso molecular de 4.0-4.3 kDa por monómero, los datos Biacore predicen una especie de oligómero de ~ 50 kDa, consistente con el peso molecular de las bandas principales detectadas por el mAb 5E3.

Ejemplo 7: Análisis de Inhibición de la Formación de Oligómeros A β

Un análisis de la inhibición de A β fue realizado para determinar la capacidad del anticuerpo 5E3 para inducir un retraso en la propagación de oligómeros A β .

La dispersión de luz estática (SLS) es una técnica en la química física que mide la intensidad de la luz dispersada para obtener el peso molecular promedio (Mw) de una macromolécula como un polímero o una proteína. La medición de la intensidad de dispersión en muchos ángulos permite el cálculo de la media cuadrática del radio, también llamado el radio de giro (Rg). Mediante la medición de la intensidad de dispersión de muchas muestras de varias concentraciones, se puede calcular el segundo coeficiente virial A₂. Para experimentos de dispersión de luz estática, una luz monocromática de alta intensidad, generalmente un láser, se lanza puso en una solución que contiene las macromoléculas. Uno o varios detectores se utilizan para medir la intensidad de dispersión en uno o muchos ángulos (9) en una longitud de onda determinada (X).

Con el fin de medir directamente el peso molecular promedio en peso, sin necesidad de calibración, a partir de la intensidad de dispersión de la luz, la intensidad del láser, la eficiencia cuántica del detector y el volumen de dispersión total y el ángulo sólido del detector necesita ser conocido. Puesto que esto no es práctico, todos los instrumentos comerciales se calibran usando un dispersor fuerte, conocido como el tolueno ya que la relación de Rayleigh de tolueno y otros pocos disolventes se midió usando un instrumento de dispersión de luz absoluta.

La **Figura 14** ilustra la capacidad del anticuerpo 5E3 para retrasar la agregación de monómero A β en la forma tóxica de oligómero A β . La formación de oligómero A β se probó en ausencia de 5E3 ("C" en la figura 14) o en la presencia de 5E3 ("5E3" en la Figura 14). A β de origen comercial (1-40) (23uM) se incubó a 39 ° C en un volumen de reacción de

150μL con anticuerpo 5E3 (2,0 mcm) El cambio en la intensidad SLS indicado por la flecha corresponde a la contribución del anticuerpo 5E3 a la intensidad dispersada. La Figura 14 ilustra que la incubación con anticuerpo 5E3 resulta en un retraso significativo en formación de oligómeros Aβ.

5 Este efecto inhibidor sobre la polimerización es de apoyo de un papel terapéutico para el anticuerpos 5E3, anticuerpos humanizados y quiméricos relacionados con el mismo, y para el epítipo novedoso de conformación mismo, por ejemplo en una composición de vacuna.

Ejemplo 8: Detección de Oligómeros Aβ en Muestras Biológicas

10 Se prevé que el anticuerpo 5E3 purificado utilizarse para detectar oligómeros Aβ en muestras biológicas, tales como homogenatos desde tejidos, incluyendo el cerebro. Esta detección puede llevarse a cabo utilizando una variedad de plataformas de detección, incluyendo la plataforma Biacore TM, y podría tener valor diagnóstico y/o pronóstico.

Ejemplo 9: Tratamiento con 5E3 y Anticuerpos y Vacunas Relacionadas

15 El tratamiento con anticuerpos 5E3 podría servir para específicamente y/o selectivamente depurar oligómeros tóxicos Aβ, y puede ser útil en el tratamiento y/o prevención de la aparición o progresión de enfermedades relacionadas con toxicidad de oligómeros Aβ, tales como la enfermedad de Alzheimer. Los anticuerpos humanos o humanizados dirigidos al mismo epítipo que el 5E3 serían útiles para tratar y/o prevenir la
20 enfermedad de Alzheimer. En otro aspecto, un epítipo que se superpone al epítipo reconocido por 5E3 sería útil para tratar y/o prevenir la enfermedad de Alzheimer.

De manera similar, el novedoso epítipo conformacional descrito en la presente es probable que sea útil para provocar una respuesta inmune específica al oligómero Aβ, que sería útil para el tratamiento o la prevención de, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

25 Las realizaciones descritas anteriormente pretenden ser solamente ejemplos. Alteraciones, modificaciones y variaciones se pueden efectuar a las realizaciones particulares por los expertos en la técnica sin apartarse del alcance, lo cual se define únicamente por las reivindicaciones adjuntas a la misma.

REIVINDICACIONES:

- 5 1. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un péptido cíclico derivado de A β , en donde el péptido cíclico comprende un epítipo conformacional que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos SNK correspondiente a una “región de nudillo” de acceso a anticuerpos y expuesta a solventes del A β oligomérico.
- 10 2. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un péptido cíclico derivado de A β , en donde el péptido cíclico comprende un epítipo conformacional que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 1 que corresponde a una “región de nudillo” de acceso a anticuerpos y expuesta a solventes del A β oligomérico.
- 15 3. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo específicamente se une con mayor afinidad a una forma oligomérica de A β que a una forma no oligomérica de A β .
- 20 4. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo es monoclonal.
5. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo es humanizado.
- 25 6. Un péptido antigénico que comprende un epítipo que tiene una configuración cíclica restringida, en donde el epítipo que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos SNK correspondiente a una “región de nudillo” de acceso a anticuerpos y expuesta a solventes del A β oligomérico.
- 30 7. Un péptido antigénico que comprende un epítipo que tiene una configuración cíclica restringida, en donde el epítipo que tiene una secuencia de

aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 1 que corresponde a una “región de nudillo” de acceso a anticuerpos y expuesta a solventes del A β oligomérico.

5 8. El péptido antigénico de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde la “región de nudillo” de acceso a anticuerpos y expuesta a solventes del A β oligomérica corresponde a los residuos 25 a 29 de A β (1-40) oligomérico o A β (1-42) oligomérico.

10 9. Un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 conjugado con un rotulador detectable.

15 10. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

 11. Una composición de vacuna anti-oligomérica que comprende el péptido antigénico de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

20 12. Un método de tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer en un paciente en necesidad de dicho tratamiento que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el inmunoconjugado o de la reivindicación 9.

25 13. Un método de tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer en un paciente en necesidad de dicho tratamiento que comprende la administración de dicha vacuna de la reivindicación 12.

30 14. Un método para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un paciente sospechoso de padecer la enfermedad de Alzheimer, que comprende las etapas de:

 a) aislar una muestra biológica del paciente;

- b) poner en contacto la muestra biológica con el anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir la formación de complejos antígeno/anticuerpo en la muestra; y
- 5 c) detectar la presencia de los complejos antígeno/anticuerpo en la muestra, en presencia de los complejos indica un diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en el paciente.
- 10 15. Un kit para que comprende:
el anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y
un conjugado que comprende un antígeno unido a un compuesto generador de señal.
- 15 16. El kit de la reivindicación 16 que comprende uno o más agentes de detección.
- 20 17. Un empaque comercial que comprende:
el anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5;
un conjugado que comprende un antígeno unido a un compuesto generador de señal; y las instrucciones de uso en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.
- 25 18. Uso de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el inmunoconjugado de la reivindicación 9 para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer.
19. El uso de una vacuna de acuerdo con la reivindicación 13 para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer.
20. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

RESUMEN

Un epítipo peptídico novedoso restringido derivado de A β , composiciones de anticuerpos relacionados y métodos de uso. Se describe un anticuerpo aislado que se une específicamente a un péptido cíclico que comprende el epítipo conformacional que corresponde a una “región de nudillo” de acceso a anticuerpos y expuesta a solventes del A β oligomérico. También se describe un péptido antigénico que comprende un epítipo que tiene una configuración cíclica restringida, que corresponde a una “región de nudillo” de acceso a anticuerpos y expuesta a solventes del A β oligomérico. También se describen métodos de tratamiento, prevención y diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

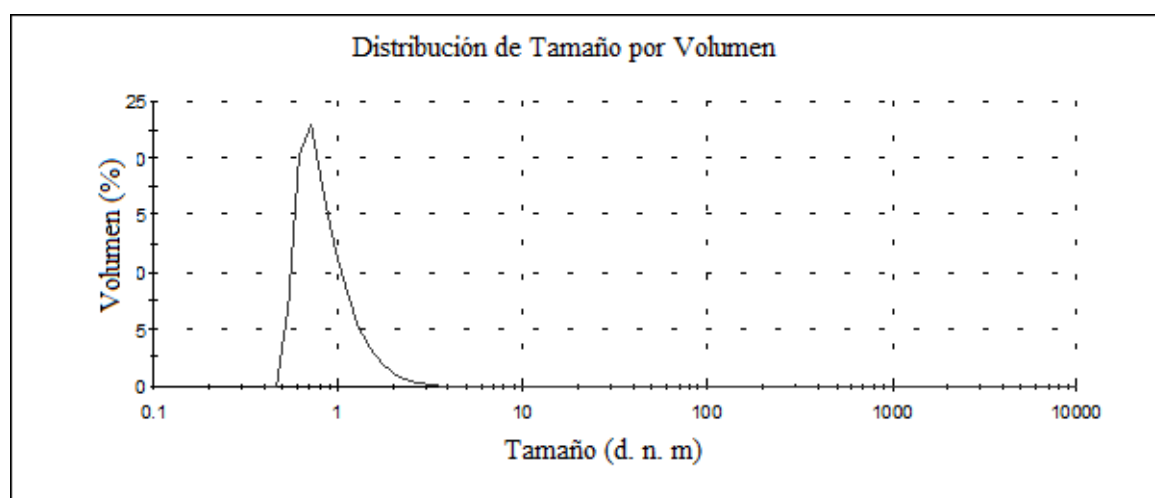


Fig. 1

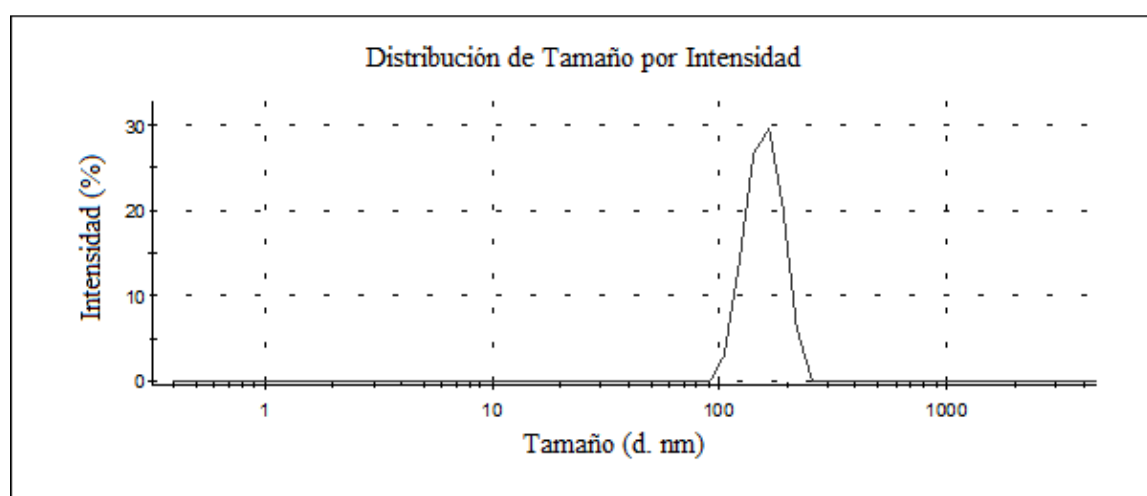


Fig. 2

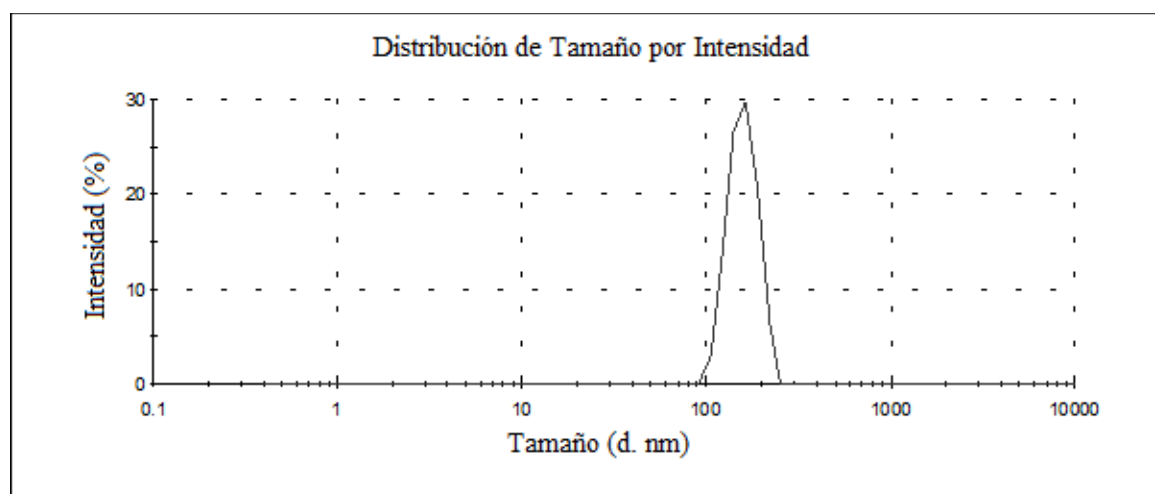


Fig. 3

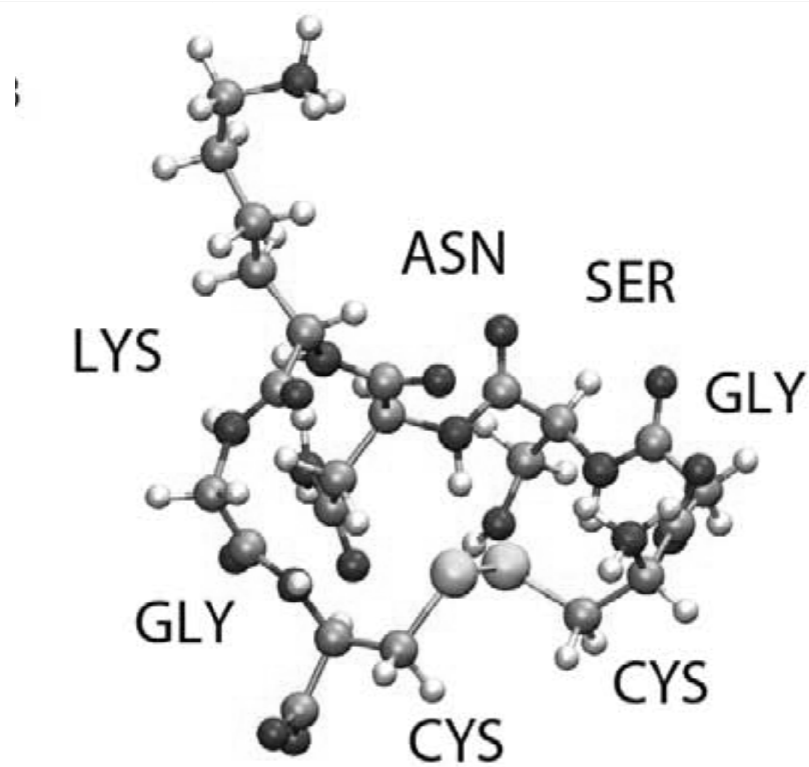


Fig. 4

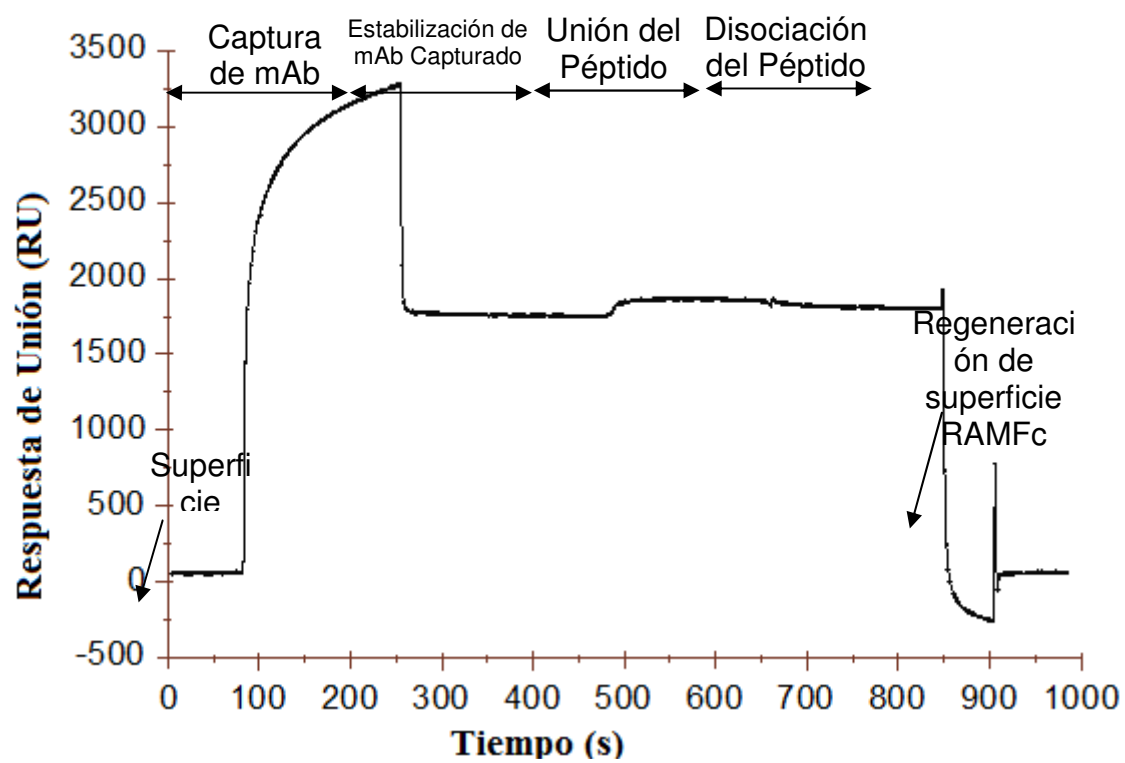


Fig.5

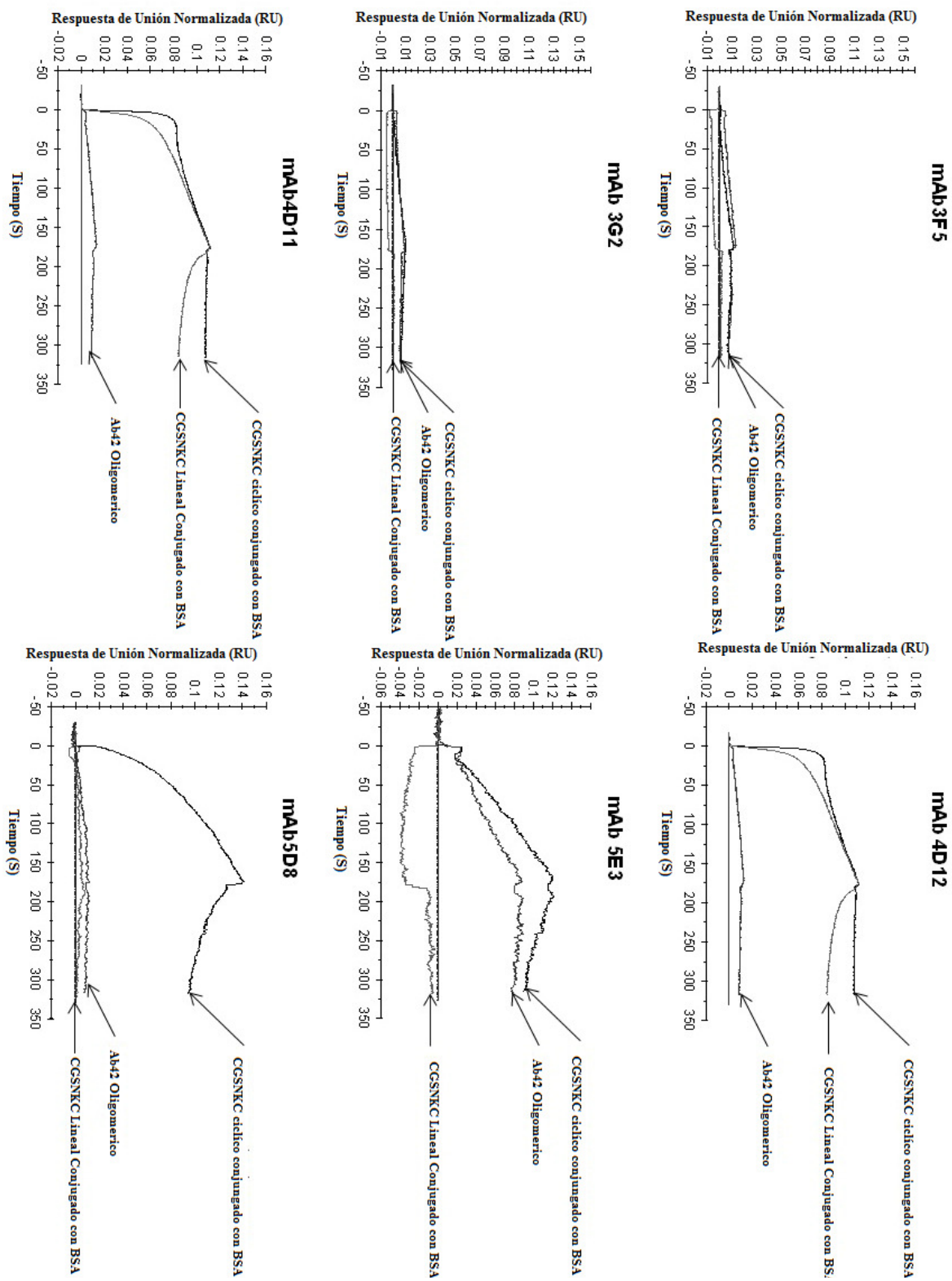


Fig. 6

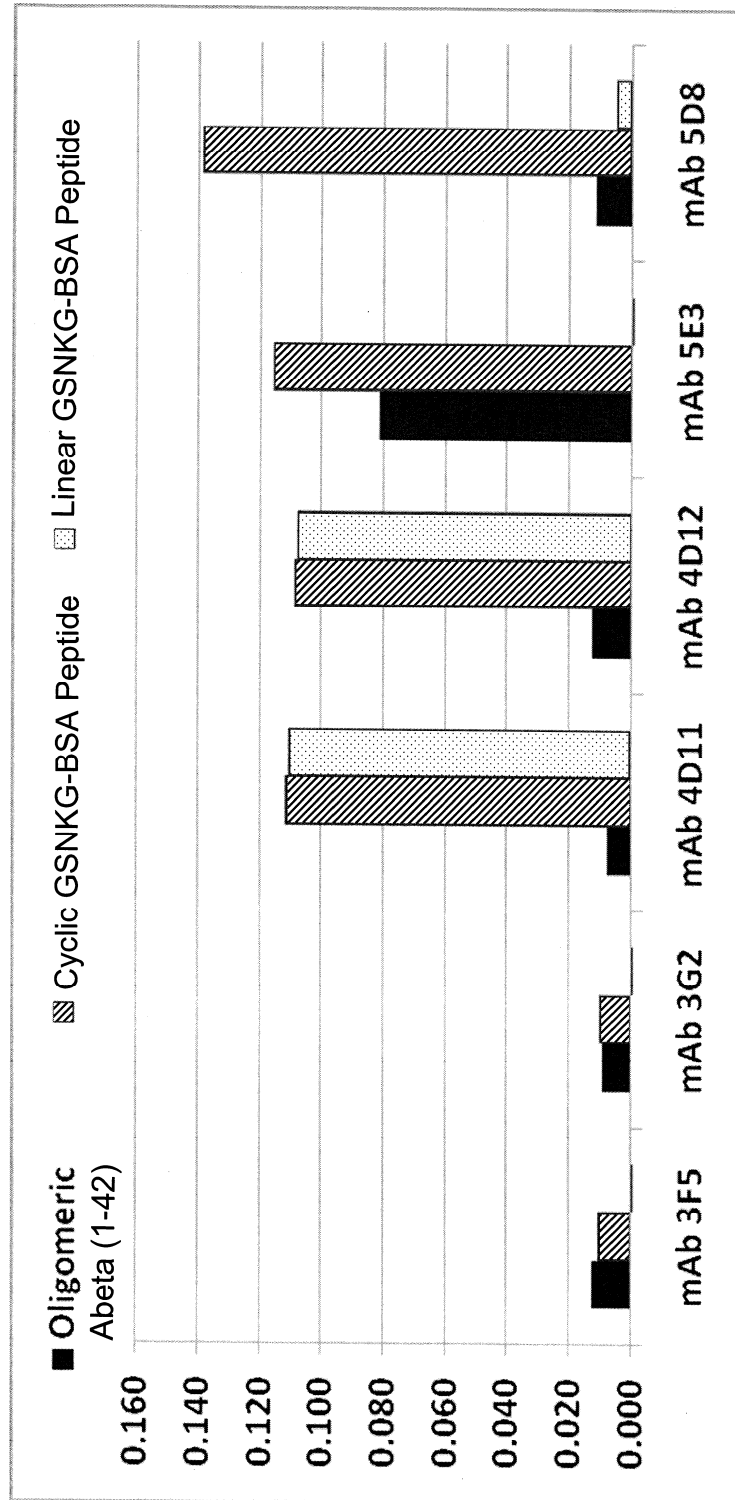


Fig. 7

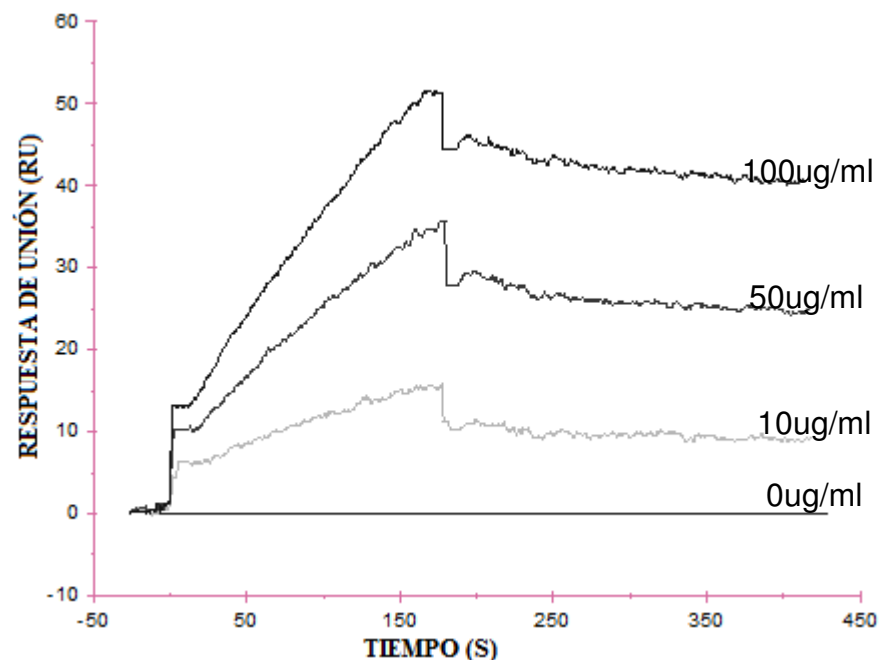
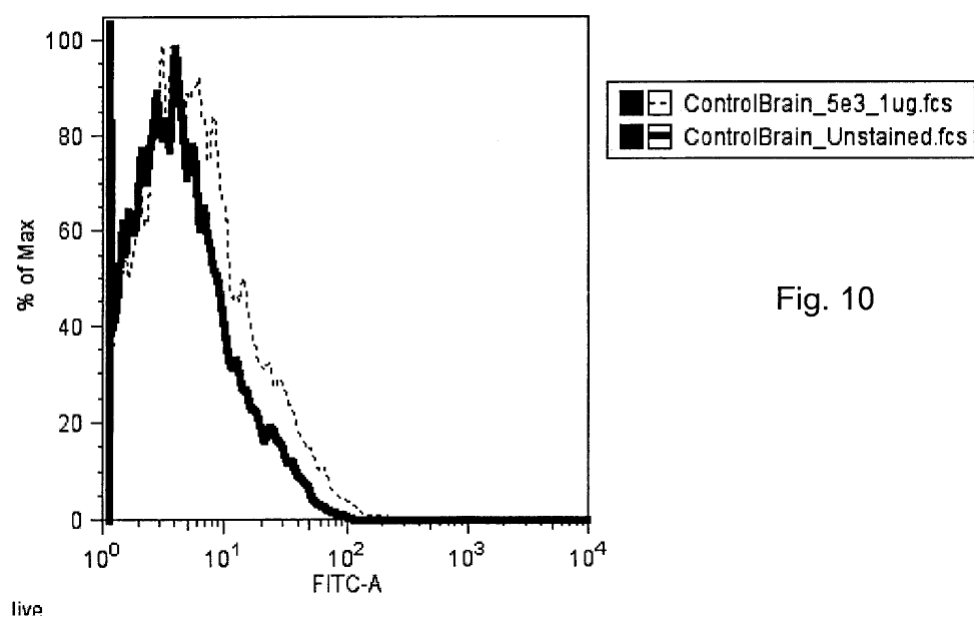
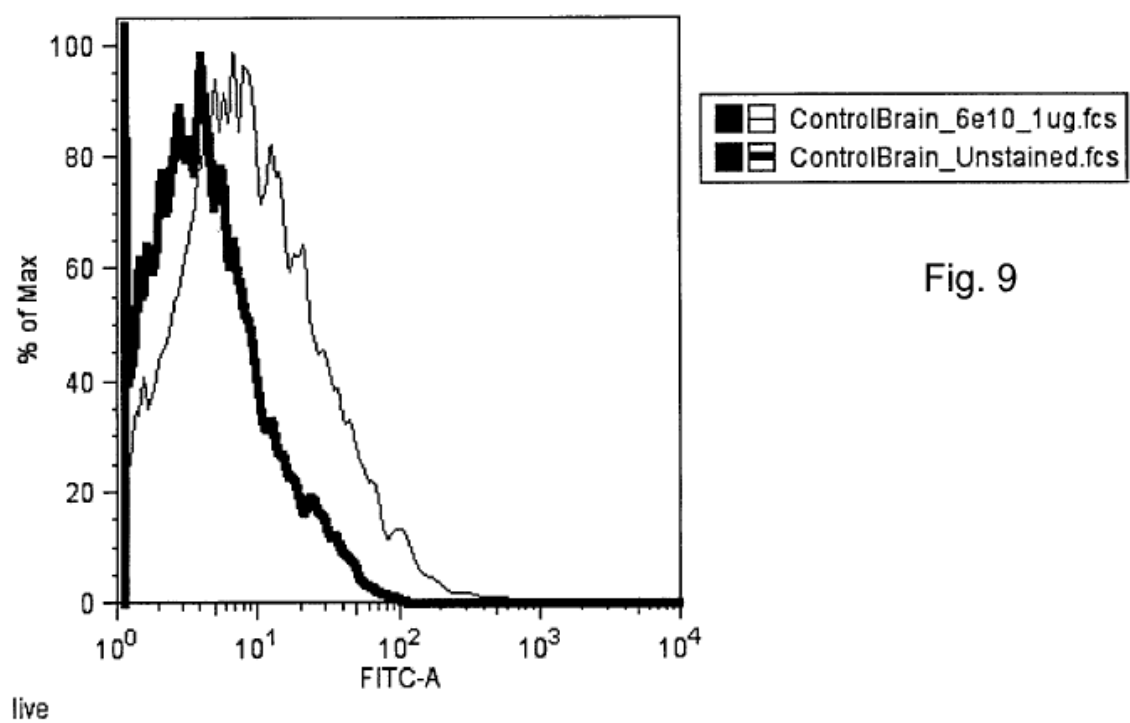


Fig. 8



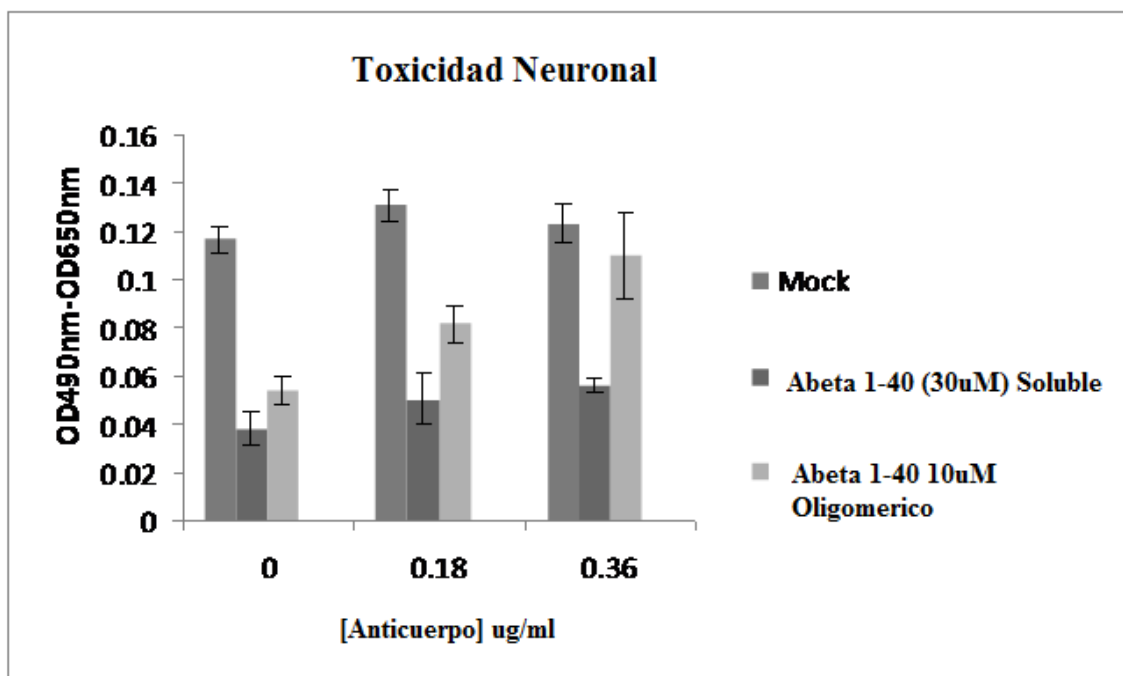


Fig. 11

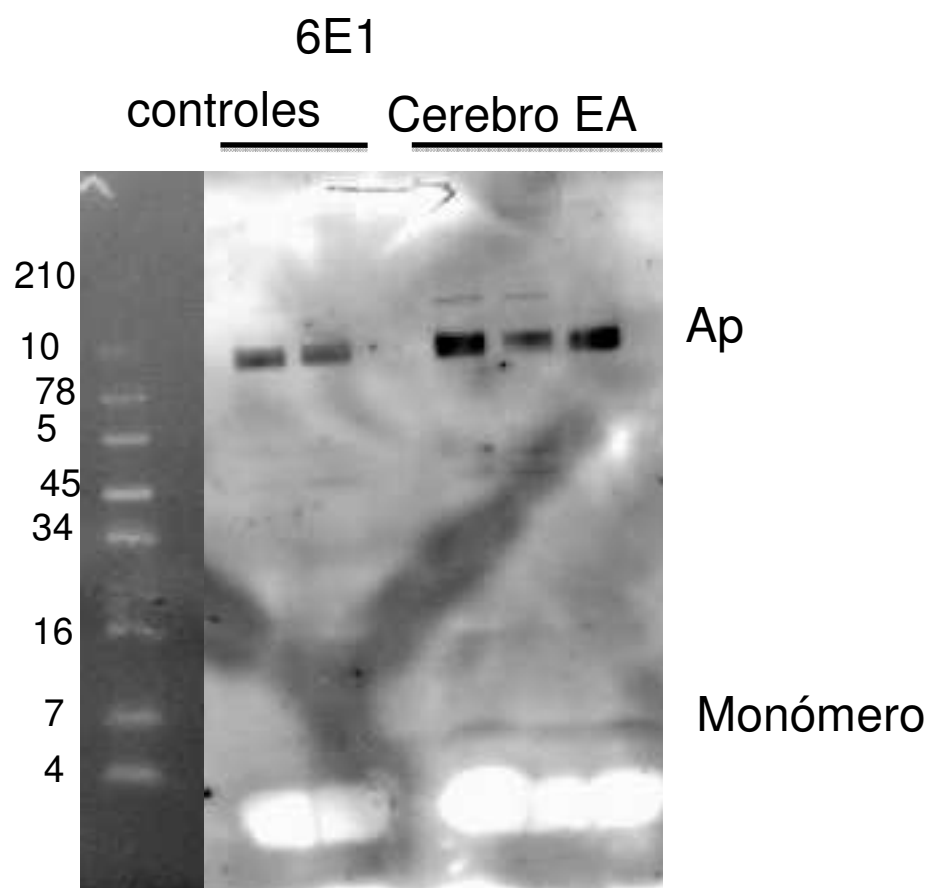


Fig. 12

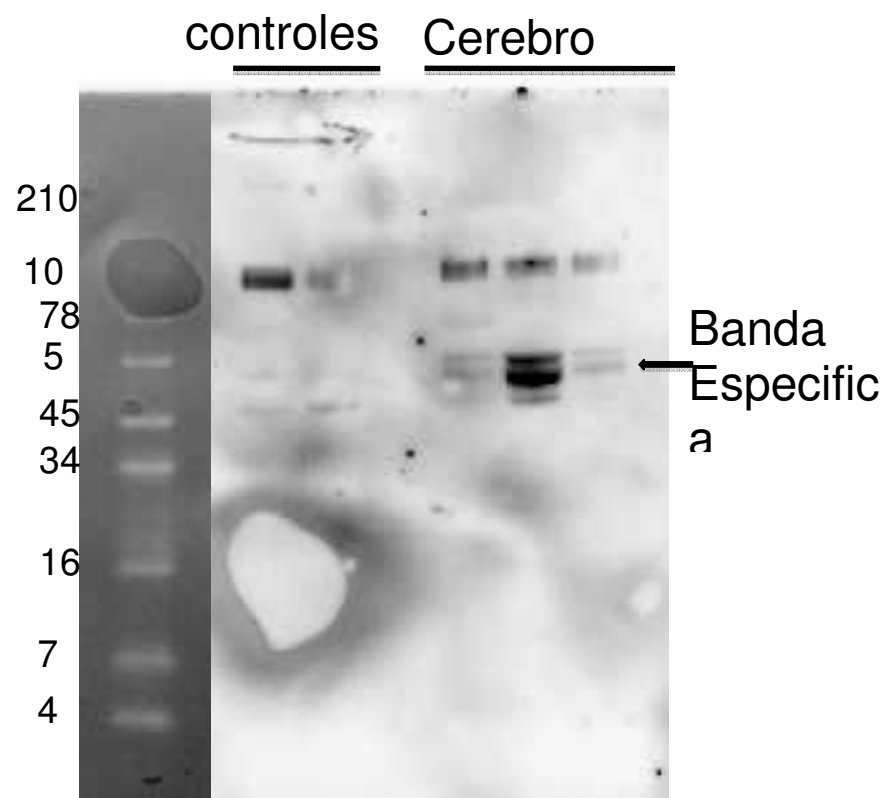


Fig. 13

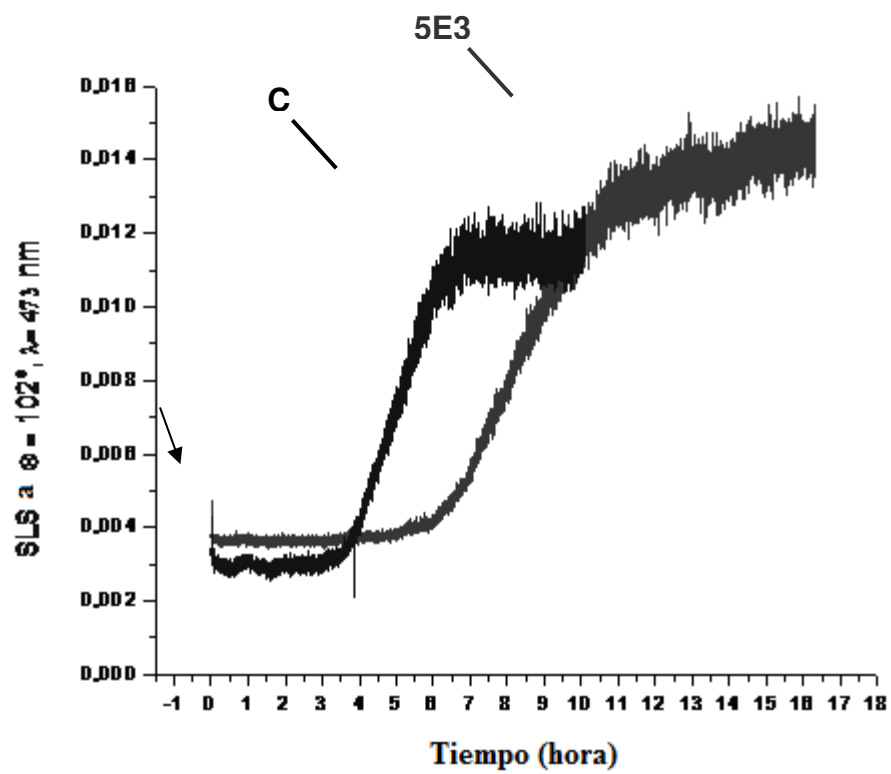


Fig. 14

SEQ ID NO: 4

H-IgH1st3prime 489 48 426 0.05

NNNNNNNNNTNNNNNNNNNNNNNANNNNNNNNNANNATAGCCCTTGNNNNNGCATCCCA
GGGTCACCATGGAGTTAGTTTGGGCAGCAGATCCAGGGGGCCAGTGGATAGACAG
ATGGGGGTGTCGTTTTGGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCCTTGGCCCCAGTA
GTGAGCCTCGTAATCCATCCTTGCACAGAAATAGACCGCAGAGTCCTCAGAGGTC
AATCTGCTGAGCTGCATGTAGGCTGTGCTGGAGGATTTGTCTGCAGTCAGTGTGG
CCTTGCCCTTGAACCTTCTCATTGTACTTAGTATTAACATTTCCAGGATAAATCCATC
CAATCCACTCAAGTCCCTGTCCAGGCCTGTGTATCACCCACTGTATATAGTAGCTT
GTGAATATGTAGCCAGAAGCCTTGCAGGATATCCTCACTGAAGCCCCAGGCTTCA
CCAGCTCAGGTCCAGACTCCTGCAGCTGCACCTCNNAATTNNNNNNN

SEQ ID NO: 5

H-IgH1st5prime 486 16 450 0.05

NNNNNNNNNTGGNGANCCTGGGGCTTCNGTGAGGANATCCTGCAAGGCTTCTGGC
TACATATTCACAAGCTACTATATACAGTGGGTGATACACAGGCCTGGACAGGGACT
TGAGTGGATTGGATGGATTTATCCTGGAAATGTTAATACTAAGTACAATGAGAAGTT
CAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAG
CTCAGCAGATTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGGATGGATTA
CGAGGCTCACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACG
ACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCCAAATACTCCAT
GGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACC
TGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTNNNNAACCTTNNN

SEQ ID NO: 6

3prime Kappa

NNNNNNNNNNNGTTTNATTNNNGCTTGGTGCCTCCTCCGAACGTCCGAGGATAAT
TATGATATTGTAGACAGTTGTTGTCTGCACAATCTTCTCACTCAAGGGTGCTGATGG
GGAGAGAATAATCTGACACCCACCTACTGCCACTGAGCCTTTTTGGGACACCTCAA
TCTTGAGTGGATGCGGCGTAAATCANGCGTTTAATAGTTCCGTCTGGTTTCTGCTG
AAGCCAGGTAAAGTAACCACTAATTTCTGACTTGCCCGACGAGTGAGACTGACTC
TTTCTCCCTCAGAGGCAGATAANGAGGATGGANACTGGGTCATCTGGATGTCACAT
CTGGTACCTGGNAACCNGANN CNCAAAAAANCAGCAA

SEQ ID NO: 7

5prime Kappa

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCNNGTCNNNTCCTCCTTATCTGCCTCTCTGGGAGAAA
AAGTCCGTCTCACTTGTGCGGGCAAGTCNAGAAATTAGTGCTTACTTAACCTGGCTT
CAGCAGAGACCCCATGGAACATTAGACGCCCGATCTAACCCCATCCTCTTTAGA
TTCTGGTGTCCCAAAAAGGGTCCCTGCCAGGATGTCTGGGTCAGATTATTCTATCA
ACATCACCATCCTTGAGTCTGAAGATTATGAAGACGATGCCTGTCTACAATATGGT
AATTATCCTCGGAAGTTCAGTGGAGGCAACGAGCTAGAAATCTAACAGGCTGATGC

TGCAACAACCTGTATCCATCTTCCCACCATCAGACCATCA

Fig. 15