

No. 15-141784-00000-0000

Fecha: 2015-06-19 16:36:25
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASC
Eve: 378 FASENACIONAL
Folios: 8



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DIVISIONAL
DE PATENTE DE
INVENCION

T=F=5

TITULO: COMPOSICIONES DEL PÉPTIDO A-BETA Y MÉTODOS

SOLICITANTE: THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA

EXPEDIENTE No. 12-173.790

DIRECCIÓN: 103 - 6190 Agronomy Road Vancouver, British Columbia V6T
1Z3. Canadá.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ: 19 de junio de 2015

P2012/000114A

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & /SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-141784- -00000-0000

Fecha: 2015-06-19 16:36:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO

PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2012/000114A

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: THE UNIVERSITY OF BRITISH
COLUMBIA

Dirección: 103 - 6190 Agronomy Road
Vancouver, British Columbia V6T 1Z3

Nacionalidad o Domicilio: Canadá

Lugar de Constitución: Canadá

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No 34-03 Bogotá D.C.

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número 79782747Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: Neil R. CASHMAN

Dirección: 3793 West King Edward Ave, Vancouver, British Columbia V6S
1M8 Canadá

Nacionalidad o Domicilio: Canadiense

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/CA2011/00023

Fecha Marzo 03, 2011

Publicación Internacional No. WO2011/106885

Fecha Septiembre 09, 2011

6

Título (54) COMPOSICIONES DEL PÉPTIDO A-BETA Y MÉTODOS

**Clasificación Internacional (51) C07K 14/47, A61K 39/00, A61K 39/395, A61P 25/28,
A61P 37/04, C07K 16/18, C12N 15/13, G01N 33/53**

Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	US	Marzo 03, 2010	61/310.167

9

Comprobante de pago No. 15-

Fecha _____



ANEXOS



Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones. Declaración bajo la regla 4.17 (ii) del PCT.



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.



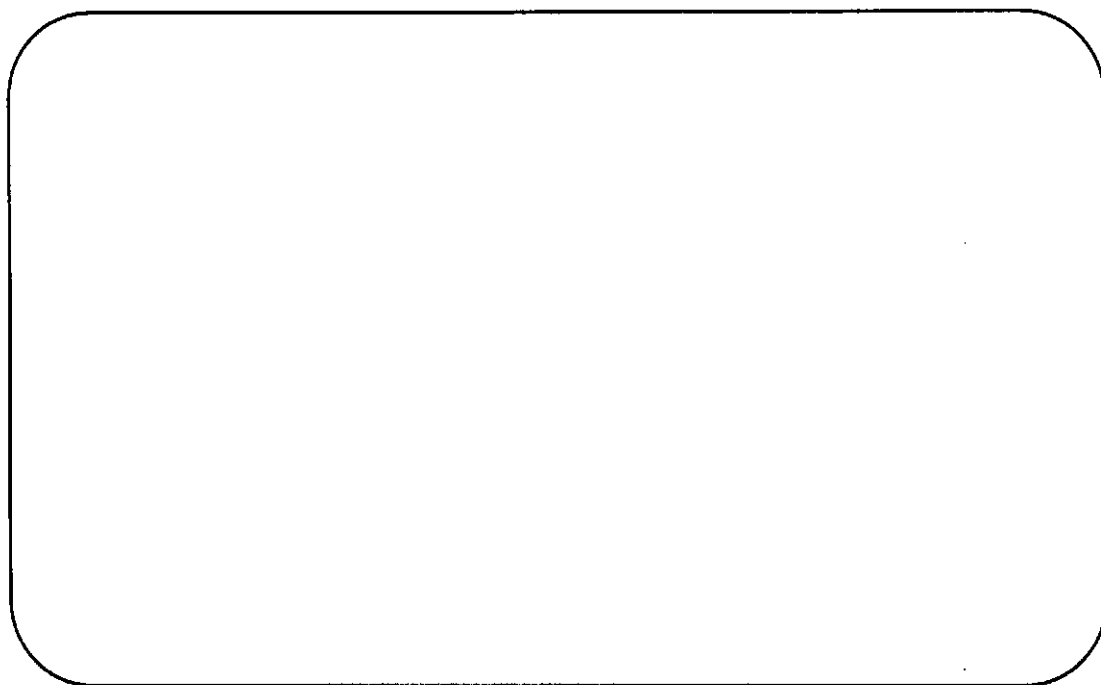
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional

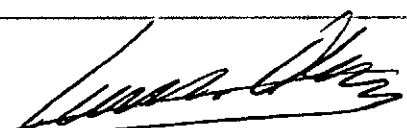


FIGURA CARACTERÍSTICA:



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

☐ Conversión

☒ División

☐ Fusión

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

2. Datos del solicitante

☐ Persona Natural

☒ Persona Jurídica

THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa

☐ Micro☐ Pequeña☐ Mediana☐ Otra

Documento de Identificación

☐ C.C.☐ C.E.☒ NIT☐ Otro

Número

Nacionalidad/Pais de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Canadá	103 - 6190 Agronomy Road Vancouver, British Columbia V6T 1Z3	Vancouver
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

CARLOS R. OLARTE

79.782.747 Bta

74.295

Apellidos y Nombre

Documento de identificación

Tarjeta profesional

Dirección y domicilio	Dirección del titular	Ciudad
Carrera 5 No 34-03 Bogotá D.C.		
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
office@moore.com	601-7799	601-7700

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

4. Datos del trámite:

CONVERSION

Expediente No.

De:

A:

DIVISION

Expediente No.

12-173.790

No. de divisionales

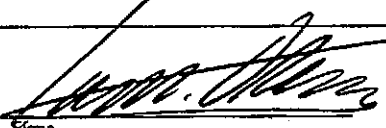
FUSION

Expediente No.

Expediente No.

5. Comprobante de Pago No	Fecha
---------------------------	-------

6. Anexos	
☒	Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
☒	Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
☒	Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
☐	Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
☒	Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
CARLOS R. OLARTE	
Nombre y apellidos	Firma
79.782.747	74.295
C.C.	Tarjeta Profesional

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	TESTIGO DOCUMENTAL	Folio: <u>5</u>
--	---------------------------	-----------------

Dependencia Jerárquica: DEL PROPIEDAD INDUSTRIAL		Código: 2000
Dependencia Productora: GRUPO DE NUEVAS CREACIONES		Código: 2020
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐		
Radicator:		
DESCRIPCIÓN DE LA PRUEBA		
Nombre de la Serie / Subserie:		Código:
Expediente: <u>15-141784-0</u>	Solicitante / <i>Quejoso</i> / <i>Demandante</i> / <i>otros</i> .	
Prueba excluida: <u>cd</u>		
N°. de Pruebas excluidas: <u>1</u>		
Fecha de emisión de la Prueba:		
UBICACIÓN DE LA PRUEBA EN LA SECCIÓN DE MATERIAL GRÁFICO		
N°. de bloque:		Otras especificaciones:
N°. de rodante:		
N°. de estante:		
N°. de archivador:		
N°. de entrepaño:		
N°. de gaveta:		
N°. de caja:		
IMPORTANTE: - El material gráfico o <i>especial</i> que se encuentra <i>dentro o anexo a</i> las unidades documentales o expedientes, debe extraerse y llevarse a aquella sección del archivo que se haya dispuesto para conservar documentos en distintos formatos. - Entiéndase por material gráfico todos aquellos dibujos, croquis, mapas, planos, fotografías, ilustraciones, pictografías, códigos, prensa, objetos tridimensionales, entre otros.		
Observaciones: <u>El cd Contiene:</u> <u>8 Archivos Pdf los</u> <u>Cuales son Pasados y</u> <u>Cargados al Sistema.</u>		Unidad de Conservación ☐ Bolsa ☐ Caja ☐ Libro ☐ Sobre ☐ Tomo ☐ Otro
		Soporte Documental ☒ CD ☐ Disquete ☐ DVD ☐ Folleto ☐ Periódico ☐ Plano ☐ Publicación Periódica ☐ USB ☐ Otro

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

**Industria y Comercio**
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0066451

Bogotá D.C., Junio 11 de 2015 - 10:41:17

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS

NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	705549390	10/06/2015	8.240.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERE	478.000.00	478.000.00
			\$478.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-141784- -00000-0000

Fecha: 2015-06-19 16:36:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: Info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Junio 11 de 2015 - 10:41:22

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0069853

Bogotá D.C., Junio 19 de 2015 - 15:53:06

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS

NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	66458	11/06/2015	132.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
4 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	32.000.00	128.000.00
			\$128.000.00

SON: **CIENTO VEINTIOCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-141784-00000-0000

Fecha: 2015-06-19 16:36:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Junio 19 de 2015 - 15:53:07



No. 15-141784- -00000-0000

Fecha: 2015-06-19 16:36:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE U1

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Descripción de la invención
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
 - ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

	Espacio reservado para el adhesivo de radicación
---	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

☐ Conversión	☒ División	☐ Fusión
☒ Patente de Invención		
☐ Patente de Modelo de Utilidad		

2. Datos del solicitante

☐ Persona Natural	☒ Persona Jurídica
--	--

THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa ☐ Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra

Documento de Identificación ☐ C.C. ☐ C.E. ☒ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/Pais de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Canadá	103 - 6190 Agronomy Road Vancouver, British Columbia V6T 1Z3	Vancouver
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☐	Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico
--------------------------	--

3. Datos del apoderado:

CARLOS R. OLARTE	79.782.747 Bta	74.295
Apellidos y Nombre	Documento de identificación	Tarjeta profesional

Dirección y domicilio	Dirección del titular	Ciudad
Carrera 5 No 34-03 Bogotá D.C.		
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
office@mour.com	601-7799	601-7700

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

4. Datos del trámite:

CONVERSION Expediente No. _____ De: _____ A: _____	DIVISION Expediente No. 12-173.790 No. de divisionales _____	FUSION Expediente No. _____ Expediente No. _____
--	--	--

5. Comprobante de Pago No _____	Fecha	<table><tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table>			

6. Anexos

X	Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
X	Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
X	Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
	Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
X	Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma

CARLOS R. OLARTE	
Nombre y apellidos	Firma
79.782.747	74.295
C.C.	Tarjeta Profesional



Espacio reservado para el adhesivo de radicación.

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DIVISIONAL DE
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2012/000114A

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: THE UNIVERSITY OF BRITISH
COLUMBIA

Dirección: 103 - 6190 Agronomy Road
Vancouver, British Columbia V6T 1Z3

Nacionalidad o Domicilio: Canadá

Lugar de Constitución: Canadá

Teléfono: Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. NIT

C.E. Otro

Cual

Número

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No 34-03 Bogotá D.C.

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. X NIT

C.E. Otro

Cual

Número 79782747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: Neil R. CASHMAN

Dirección: 3793 West King Edward Ave, Vancouver, British Columbia V6S
1M8 Canadá

Nacionalidad o Domicilio: Canadiense

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/CA2011/00023

Fecha Marzo 03, 2011

Publicación Internacional No. WO2011/106885

Fecha Septiembre 09, 2011

6

Título (54) COMPOSICIONES DEL PéPTIDO A-BETA Y MÉTODOS

Clasificación Internacional (51) C07K 14/47, A61K 39/00, A61K 39/395, A61P 25/28,
A61P 37/04, C07K 16/18, C12N 15/13, G01N 33/53.

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Marzo 03, 2010

(31) Número de
Solicitud

61/310,167

9

Comprobante de pago No. 15-

Fecha



ANEXOS



Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones. Declaración bajo la regla 4.17 (ii) del PCT.



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.



De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional



FIGURA CARACTERÍSTICA:



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: _____
C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

Power of Attorney

The undersigned,

THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA

domiciled in

**103 – 6190 Agronomy Road, Vancouver,
Brithis Columbia V6T 1Z3 Canada**

Poder

El suscrito,

domiciliado en

International Application No. PCT/CA2011/000238, filed March 3, 2011

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or Juan Guillermo Moure** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's **Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right, also to file Unfair competition actions and request injunctions** in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications, collect refunds, desist, settle, conciliate or negotiate. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o Juan Guillermo Moure** poder amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las **Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual y también para presentar acciones de competencia desleal y pedir medidas cautelares a nombre** de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir, transigir, y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

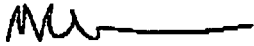
Signature/Firma:

Date/Fecha: Dec 17, 2012 **MARIO A. KASAPI**

City/Country/Ciudad,País:

Associate Director
University - Industry Liaison Office

VIII-4-1	Declaration: Inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America) Declaration of Inventorship (Rules 4.17(iv) and 51bis.1(a)(iv)) for the purposes of the designation of the United States of America:	I hereby declare that I believe I am the original, first and sole (if only one inventor is listed below) or joint (if more than one inventor is listed below) inventor of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought. This declaration is directed to international application PCT/CA2011/000238 (if furnishing declaration pursuant to Rule 26ter). I hereby declare that my residence, mailing address, and citizenship are as stated next to my name. I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above-identified international application, including the claims of said application. I have identified in the request of said application, in compliance with PCT Rule 4.10, any claim to foreign priority, and I have identified below, under the heading "Prior Applications", by application number, country or Member of the World Trade Organization, day, month, and year of filing, any application for a patent or inventor's certificate filed in a country other than the United States of America, including any PCT international application designating at least one country other than the United States of America, having a filing date before that of the application on which foreign priority is claimed.
VIII-4-1-1	Prior applications:	

		I hereby acknowledge the duty to disclose information that is known by me to be material to patentability as defined by 37 C.F.R. § 1.56, including for continuation-in-part applications, material information which became available between the filing date of the prior application and the PCT international filing date of the continuation-in-part application. I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.
VIII-4-1-1-1	Name (LAST, First)	CASEMAN, Neil R.
VIII-4-1-1-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	Vancouver, Canada
VIII-4-1-1-3	Mailing address:	3793 West King Edward Ave Vancouver, British Columbia V6S 1M8 Canada
VIII-4-1-1-4	Citizenship:	CA
VIII-4-1-1-5	Inventor's Signature: (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)	 June 1 2011
VIII-4-1-1-6	Date:	



(51) International Patent Classification:

C07K 14/47 (2006.01) *A61P 37/04* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/CA2011/000238

(22) International Filing Date:

3 March 2011 (03.03.2011)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/310,167 3 March 2010 (03.03.2010) US

(71) Applicant (for all designated States except US): THE

UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA [CA/CA];
103 - 6190 Agronomy Road, Vancouver, British
Columbia V6T 1Z3 (CA).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): CASHMAN, Neil R.
[CA/CA]; 3793 West King Edward Ave, Vancouver,
British Columbia V6S 1M8 (CA).

(74) Agents: PISKO, J. Erin et al.; Borden Ladner Gervais
LLP, 1200 Waterfront Centre, 200 Burrard Street, P.O.
Box 48600, Vancouver, British Columbia V7X 1T2
(CA).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,

[Continued on next page]

(54) Title: OLIGOMER-SPECIFIC AMYLOID BETA EPIOTOPE AND ANTIBODIES

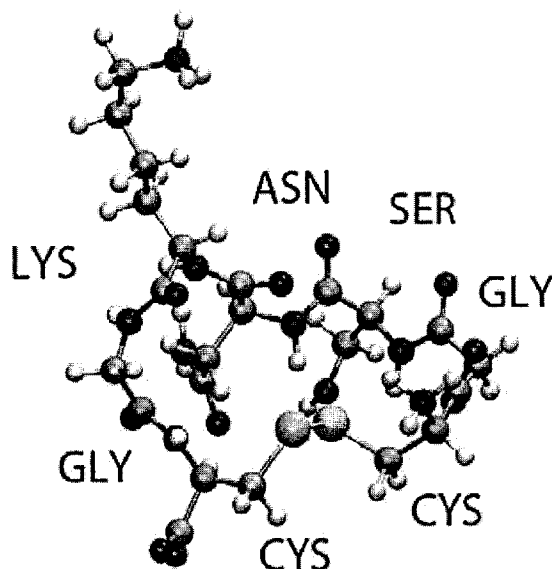


Fig. 4

(57) Abstract: A novel constrained peptide epitope derived from A β , wherein the epitope comprises the amino acid sequence SNK, related antibody compositions and methods of use. An isolated antibody that specifically binds to a cyclic peptide comprising the conformational epitope which comprises the amino acid sequence SNK and corresponding to a solvent-exposed, antibody accessible knuckle region of oligomeric A β is described. An antigenic peptide comprising an epitope having a constrained cyclic configuration, which comprises the amino acid sequence SNK and corresponding to a solvent-exposed, antibody accessible knuckle region of oligomeric A β is also described. Methods of treating, preventing and diagnosing Alzheimer's disease are also described.



GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— *of inventorship (Rule 4.17(iv))*

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

OLIGOMER-SPECIFIC AMYLOID BETA EPITOPE AND ANTIBODIES

CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[0001] This application claims the benefit of priority of U.S. Provisional Patent
5 Application No. 61/310,167 filed March 3, 2010, which is incorporated herein by reference
in its entirety.

FIELD

[0002] The present invention relates to novel conformational epitopes in Abeta
10 oligomers, related antibody compositions and methods of use.

BACKGROUND

[0003] Alzheimer's disease (AD) is a common dementing (disordered memory
and cognition) neurodegenerative disease associated with brain accumulation of
15 extracellular plaques composed predominantly of the Abeta (1–40), A β (1–42) and A β (1–
43) peptides (also referred to as amyloid β or A β), all of which are proteolytic products of
amyloid precursor protein (APP). In addition, neurofibrillary tangles, composed
principally of abnormally phosphorylated tau protein (a neuronal microtubule-associated
protein), accumulate intracellularly in dying neurons. The A β (1–42) is the dominant
20 species in the amyloid plaques of AD patients.

[0004] Familial forms of AD can be caused by mutations in the APP gene, or in
the presenilin 1 or 2 genes, the protein products of which are implicated in the processing
of APP to A β . Apolipoprotein E allelic variants also influence the age at onset of both
sporadic and familial forms of AD. More recently, it has been found that a particular
25 molecular species of A β , in which the peptide is oligomerized, mediates the major
component of neurotoxicity observed in AD and mouse models of the disease (Walsh et
al. 2002). A β oligomer toxicity can be manifested by dysfunction of neuronal insulin
receptors (Zhao et al. 2008), and by interference with normal synaptic function,
particularly in the hippocampus, by ectopic activation of glutamatergic receptors (De
30 Felice et al. 2007; Nimmrich et al. 2008). A nanomolar affinity binding interaction was
reported between A β oligomers and the normal cellular isoform of the prion protein PrPC
(Lauren et al. 2009). Further, interaction between PrPC and various toxic signaling
pathways (Solforosi et al. 2004; Lefebvre-Roque et al. 2007), including glutamate
receptor subunits (Khosravani et al. 2008), may lead to a unifying mechanism for the
35 toxicity of A β oligomers.

[0005] It is well recognized that immune recognition of A β can lead to improvement in both the pathology and behavior of transgenic mice expressing human mutant amyloid precursor protein. However, there are dangers inherent in treating human beings with "non-selective" A β immunotherapies. For example, autoimmune meningoencephalitis occurred in approximately 10% of patients receiving an Alzheimer's vaccine containing a non-selective A β immunogen (Gelinas et al. 2004; Robinson et al. 2004; Brodytman and Malter 2004; Mathews and Nixon 2003). Although the resulting meningoencephalitis was likely due to cellular immune activation to A β , it was also shown that passively infused A β monoclonal antibodies (mAbs), divorced from a cellular immune response, were associated with brain microhemorrhages (Goni and Sigurdsson 2005). Another risk of non-selective immunization with A β is immune recognition of the parent protein APP, which is exposed at the surface of brain neurons and circulating monocytes (Jung et al. 1996; Jung et al. 1990). Such recognition of a cell surface membrane molecule may trigger lysis or interference with functioning of the extracellular domain of the APP protein, which may include trophic activity (Morimoto et al. 1998; Mileusnic et al. 2005; Mileusnic et al. 2000).

[0006] Another problem with "non-specific" recognition of A β peptide is that A β peptide is only a precursor to the toxic A β molecular species, the A β oligomers. A β oligomers have been shown to kill cell lines and neurons in culture (Lambert et al. 2007; Lacor et al. 2007; Ronicke et al. 2008) and block a critical synaptic activity subserving memory, referred to as long term potentiation (LTP), in slice cultures and living animals (Balducci et al. 2010; Shankar et al. 2008; Selkoe 2008; Klyubin et al. 2005; Walsh et al. 2002; Wang et al. 2002). Specific A β oligomers have been identified which correlate to the onset of memory defects in mice, and which when purified and infused in normal young rats reproduces negative behavioral defects found in the mice (Lesne et al. 2006). Similar research has demonstrated that PrPC may serve as a receptor for A β oligomers, and may transduce its toxic effects in synaptic LTP disruption (Lauren et al. 2009).

[0007] Although A β vaccines and monoclonal antibodies have been raised in the past against A β peptides, none have to date been proven to produce the desired therapeutic effect without also causing serious side effects in animals and/or humans. There is a therapeutic need for the development of biologics that arrest or slow down the progression of the disease without inducing negative and potentially lethal effects on the human body. The need is particularly evident in view of the increasing longevity of the general population and, with this increase, an associated rise in the number of patents annually diagnosed with Alzheimer's disease. It would be desirable to identify

immunological epitopes that are disease-specific epitopes (DSE) and develop immunotherapies that specifically target the toxic A β oligomeric molecular species. It is also desirable to develop immunotherapies to target toxic A β oligomeric molecular species and avoid autoimmune recognition of APP at the cell surface. Such DSE epitopes would be targets for immunotherapies and prophylactic vaccines, which specifically neutralize the toxicity of target proteins. It is also desirable to develop diagnostic tools to provide an indication of populations at risk for developing AD, for differential diagnosis to distinguish AD from other dementing syndromes, and for monitoring biomarker response to AD therapy.

- 10 [0008] It is, therefore, desirable to provide a disease specific epitope that is unique to toxic A β oligomeric molecular species.

SUMMARY

- 15 [0009] It is an object of the present disclosure to obviate or mitigate at least one disadvantage of previous epitopes, antibodies, compositions and methods for diagnosis, treatment and prevention of Alzheimer's disease.

[0010] In a first aspect, the present disclosure is based, in part, on the surprising discovery of a novel structural epitope in A β with advantageous properties for selective antibody binding.

- 20 [0011] In one embodiment, there is provided a cyclic peptide derived from A β , having an amino acid the sequence of at least SNK corresponding to a solvent-exposed, antibody accessible "knuckle region" of oligomeric A β .

- [0012] In another embodiment, there is provided an antigenic peptide comprising an epitope having a constrained cyclic configuration, the epitope having an amino acid sequence of at least SNK corresponding to a solvent-exposed, antibody accessible knuckle region of oligomeric A β .

- [0013] In another embodiment, there is provided an antigenic peptide comprising an epitope having a constrained cyclic configuration, the epitope having an amino acid sequence corresponding to SEQ ID NO: 1 corresponding to a solvent-exposed, antibody accessible knuckle region of oligomeric A β .

[0014] In one aspect, the epitope of the antigenic peptide corresponds to residues 25 to 29 of oligomeric A β (1-40) or oligomeric A β (1-42).

[0015] In another embodiment, there is provided an isolated antibody that specifically binds to a cyclic peptide derived from A β , the cyclic peptide comprising a

conformational epitope having an amino acid sequence of at least SNK corresponding to a solvent-exposed, antibody accessible knuckle region of oligomeric A β .

[0016] In another embodiment, there is provided an isolated antibody that specifically binds to a cyclic peptide derived from A β , the cyclic peptide comprising a conformational epitope having an amino acid sequence corresponding to SEQ ID NO: 1
5 corresponding to a solvent-exposed, antibody accessible knuckle region of oligomeric A β .

[0017] In one aspect, the isolated antibody specifically binds with greater affinity to an oligomeric form of A β than to a non-oligomeric form of A β .

[0018] In another aspect, the isolated antibody is monoclonal.

10 **[0019]** In another aspect, the isolated antibody is humanized.

[0020] In another embodiment, there is provided an immunoconjugate comprising an isolated antibody that specifically binds to a cyclic peptide derived from A β , the cyclic peptide comprising a conformational epitope having an amino acid sequence of at least SNK corresponding to a solvent-exposed, antibody accessible knuckle region of
15 oligomeric A β , conjugated with a detectable label.

[0021] In another aspect, there is provided a nucleic acid encoding the isolated antibody.

[0022] In another embodiment, there is provided a composition comprising a therapeutically effective amount of an isolated antibody that specifically binds to a cyclic
20 peptide derived from A β , the cyclic peptide comprising a conformational epitope having an amino acid sequence of at least SNK corresponding to a solvent-exposed, antibody accessible knuckle region of oligomeric A β ; and a pharmaceutically acceptable adjuvant.

[0023] In another embodiment, there is provided an anti-oligomeric vaccine composition comprising an antigenic peptide comprising an epitope having a constrained
25 cyclic configuration, the epitope having an amino acid sequence of at least SNK corresponding to a solvent-exposed, antibody accessible knuckle region of oligomeric A β ; and a pharmaceutically acceptable adjuvant.

[0024] In another aspect, there is provided a method of treating or preventing Alzheimer's Disease in a patient in need of said treatment comprising administering a
30 pharmaceutically effective amount of the isolated antibody or immunconjugate.

[0025] In another aspect, there is provided a method of treating or preventing Alzheimer's Disease in a patient in need of said treatment comprising administering the vaccine.

[0026] In another aspect, there is provided a method of diagnosing Alzheimer's
35 Disease in a patient suspected of having Alzheimer's Disease comprising the steps of: a)

isolating a biological sample from the patient; b) contacting the biological sample with the isolated antibody for a time and under conditions sufficient to allow for formation of antigen/antibody complexes in the sample; and c) detecting the presence of the antigen/antibody complexes in the sample, wherein presence of the complexes indicates a diagnosis of Alzheimer's Disease in the patient.

[0027] In another embodiment, there is provided a kit for comprising: the isolated antibody and a conjugate comprising an antigen attached to a signal-generating compound.

[0028] In a further aspect, the kit comprises one or more detection agents.

[0029] In another embodiment, there is provided an article of manufacture comprising: the isolated antibody; a conjugate comprising an antigen attached to a signal-generating compound; and instructions for use in diagnosing Alzheimer's Disease.

[0030] In another aspect, there is provided use of the antibody or immunoconjugate for the treatment or prevention of Alzheimer's disease.

[0031] In another aspect, there is provided use of the vaccine for the treatment or prevention of Alzheimer's disease.

[0032] In another embodiment, there is provided isolated antibodies that are capable of binding to a cyclic peptide derived from A β and having an amino acid sequence of SNK corresponding to a solvent-exposed knuckle region of oligomeric A β .

In one aspect, such antibodies bind oligomeric forms of A β with greater affinity than non-oligomeric forms of A β .

[0033] In another embodiment, there is provided a method of treatment of a subject having or suspected of having Alzheimer's disease, the method comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody that is capable of binding to a cyclic peptide derived from A β having an amino acid composition comprising the sequence SNK. In one aspect, the antibody binds oligomeric forms of A β with greater affinity than non-oligomeric forms of A β .

[0034] In another embodiment, there is provided a method of preventing the development or progression of AD in a subject, the method comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antigenic peptide comprising an epitope having a constrained cyclic configuration having an amino acid sequence of SNK corresponding to a knuckle region oligomeric A β . On administration, the antigenic peptide produces an immune response against oligomeric A β . Antibodies produced are capable of specifically binding to oligomeric A β . In certain embodiments, the antibody binds oligomeric forms of A β with greater affinity than non-oligomeric forms of A β .

[0035] Other aspects and features of the present disclosure will become apparent to those ordinarily skilled in the art upon review of the following description of specific embodiments in conjunction with the accompanying figures.

5 BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0036] Embodiments of the present disclosure will now be described, by way of example only, with reference to the attached Figures.

[0037] Fig. 1 graphically illustrates the results of dynamic light scattering which show the dynamic properties of monomeric A β ;

10 [0038] Fig. 2 graphically illustrates the results of dynamic light scattering which show the dynamic properties of oligomeric A β ;

[0039] Fig. 3 graphically illustrates the results of dynamic light scattering show the dynamic properties of oligomeric A β ;

15 [0040] Fig. 4 is a three-dimensional model of the disulfide-cyclized peptide comprising the SNK epitope;

[0041] Fig. 5 graphically illustrates the Biacore™ results of a representative analytical cycle for screening of anti-SNK monoclonal antibody binding to a conformational peptide comprising SNK.

20 [0042] Fig. 6 graphically illustrates the results of Biacore™ sensorgram overlays which shows the binding of BSA-conjugated linear or cyclic peptides comprising the SNK epitope to linear (3F5, 3G2), cyclic (5E3, 5D8) and intermediate-specific (4D11, 4D12) monoclonal antibodies, and reactivity of these antibodies to synthetic A β 1-42 oligomers;

25 [0043] Fig. 7 graphically illustrates the results of Biacore™ sensorgram overlays which shows the binding of BSA-conjugated linear or cyclic peptides comprising the SNK epitope to linear (3F5, 3G2), cyclic (5E3, 5D8) and intermediate-specific (4D11, 4D12) monoclonal antibodies, and reactivity of these antibodies to synthetic A β 1-42 oligomers;

[0044] Fig. 8 graphically illustrates the results of Biacore™ analysis which shows the binding to synthetic A β 1-42 oligomers to cyclic monoclonal antibody 5E3 at varying concentrations;

30 [0045] Fig. 9 is a flow cytometry trace which shows the comparison of cells binding labelled 6E10 antibody and a negative control to the APP located at the cell surface;

35 [0046] Fig. 10 is a flow cytometry trace which shows the comparison of cells binding labelled 5E3 antibody and a negative control to the APP located at the cell surface;

[0047] Fig. 11 graphically illustrates the results of a neuronal toxicity analysis which shows the degree of cell survival for cells incubated with a mock control, soluble monomeric and oligomeric A β 1-40 in the presence and absence of 5E3 antibody at different concentrations;

5 **[0048]** Fig. 12 illustrates the results of an immunoblot which shows brain tissue homogenized in TBS, fractioned in Tris-Tricine gels, and immunoblotted with pan-A β 6E10 antibody;

[0049] Fig. 13 illustrates the results of an immunoblot which shows brain tissue homogenized in TBS, fractioned in Tris-Tricine gels, and immunoblotted with 5E3
10 antibody;

[0050] Fig. 14 depicts results of static light scatter experiments to test A β polymerization in the presence ("5E3") or absence ("C") of antibody 5E3; and

[0051] Fig. 15 illustrates nucleotide sequences for the heavy and light chain, both 5' and 3' reads, of antibody 5E3.

15

DETAILED DESCRIPTION

[0052] Generally, the present disclosure provides a novel constrained peptide epitope derived from A β , from herein referred to as the "novel epitope" or "novel conformational epitope" and related antibody compositions. Antibodies capable of
20 binding to the novel conformational epitope are useful as both diagnostics and therapeutic agents in the treatment of Alzheimer's disease. The novel constrained peptide epitope derived from A β is useful in vaccines for the prevention of AD and related dementias. Antibodies capable of binding to the novel conformational epitope are also useful in the diagnosis, treatment, and prevention of Alzheimer's related dementias.

25 **[0053]** Any terms not directly defined herein shall be understood to have the meanings commonly associated with them as understood within the art of the invention.

[0054] As used herein, the term "isolated antibody" is used herein to refer to antibodies capable of binding to the novel conformational epitope, which are essentially pure and free from extraneous cellular material including other antibodies and antibody
30 fragments having different antigenic specificities. An isolated antibody that specifically binds the novel conformational epitope may, however, have cross-reactivity to other antigens. A skilled person would readily appreciate that experimental conditions may have to be optimized for any given antibody to maximize specific binding. The term antibody is intended to include fragments thereof which also specifically react with the
35 novel conformational epitope according to the invention. Antibodies can be fragmented

using conventional techniques and the fragments screened for utility in the same manner as described above. For example, fragments can be generated by treating an antibody with pepsin. The resulting fragment can be further treated to reduce disulfide bridges.

[0055] As used herein, the term "subject" refers to an animal, such as a bird or a mammal. Specific animals include rat, mouse, dog, cat, cow, sheep, horse, pig or primate. A subject may further be a human, alternatively referred to as a patient. A subject may further be a transgenic animal. A subject may further be a rodent, such as a mouse or a rat.

[0056] As used herein, the term "epitope" refers to a region within a molecule, which can be recognized by a specific antibody, or which induces the formation of specific antibodies.

[0057] As used herein, the term "conformational epitope" refers to an epitope where the amino acid sequence has a particular three-dimensional structure. Antibodies which specifically bind a conformation-specific epitope recognize the spatial arrangement of the amino acids of that conformation-specific epitope.

[0058] As used herein, the term 'A β ' may alternately be referred to as 'amyloid beta', 'amyloid β ', or 'A β '. Amyloid beta is a peptide of 39–43 amino acids that appears to be the main constituent of amyloid plaques in the brains of Alzheimer's disease patients. A β oligomerization has been shown to be a key part of neurotoxicity in Alzheimer's disease, as described elsewhere in this application.

[0059] As used herein, the term "greater affinity" herein refers to the degree of antibody binding where an antibody X binds to target Y more strongly and with a smaller dissociation constant than to target Z, and in this context antibody X has a greater affinity for target Y than for Z. Likewise, the term "lesser affinity" herein refers to a degree of antibody binding where an antibody X binds to target Y less strongly and with a larger dissociation constant than to target Z, and in this context antibody X has a lesser affinity for target Y than for Z.

[0060] As used herein, the term "A β monomer" herein refers to the isolated linear form of the A β (X-Y) peptide, preferably, a form of the A β (X-Y) peptide which is not engaged in essentially non-covalent interactions with other A β peptides.

[0061] As used herein, the term "A β oligomer" herein refers to an isolated form of the A β peptide where the precursor A β monomer is non-covalently aggregated in an ordered three-dimensional structure of less than about 50 monomers.

[0062] As used herein, the term "A β fibril" herein refers to a molecular structure that comprises assemblies of non-covalently associated, individual A β (X-Y) peptides

which show fibrillary structure under an electron microscope. The fibrillary structure is typically a "cross beta" structure; there is no theoretical upper limit on the size of multimers, and fibrils may comprise thousands of monomers.

[0063] As used herein, the term "antigen" herein refers to a molecule, such as a protein, polypeptide, or fragment thereof, containing one or more epitopes, that will stimulate a host's immune-system to make a humoral and/or cellular antigen-specific response. The term is used interchangeably with the term "immunogen." Antibodies such as anti-idiotypic antibodies, or fragments thereof, and synthetic peptide mimotopes, which can mimic an antigen or antigenic determinant, are also captured under the definition of antigen as used herein. Similarly, an oligonucleotide or polynucleotide which expresses an antigen or antigenic determinant in vivo, such as in DNA immunization applications, is also included in the definition of antigen herein.

[0064] Nomenclature used to describe the peptides of the present invention follows the conventional practice where the amino group is presented to the left and the carboxy group to the right of each amino acid residue. In the sequences representing selected specific embodiments of the present invention, the amino- and carboxy-terminal groups, although not specifically shown, will be understood to be in the form they would assume at physiologic pH values, unless otherwise specified.

[0065] In the description, for purposes of explanation, numerous details are set forth in order to provide a thorough understanding of the embodiments. However, it will be apparent to one skilled in the art that these specific details are not required.

[0066] The structure of A β oligomers at the atomic level has not been conclusively solved at the atomic level due to limitations of crystallography and NMR in solution and solid-state paradigms. Biochemical, biophysical and immunochemical data suggest a fibril/oligomer model in which A β monomers are packed in broad β hairpin steric zipper structures (Luhers et al. 2005; Sawaya et al. 2007; Rauk 2009). The naturally occurring monomeric A β peptides undergo a conformation change upon aggregation involving folding and the formation of the hairpin steric zipper oligomeric A β structure results. A β (1–42) has a greater propensity for β -sheet aggregation. The detailed structure of oligomeric A β is unknown; however, structures of A β oligomers have been characterized using a combination of molecular dynamics simulation, atomic force microscopy, and amide hydrogen-exchange measurements. The structure of the A β (1–42) and A β (1–40) oligomer has been analyzed using the above-noted methods. The orientation of the β strands of the A β oligomers is known by persons skilled in the art to include an intermolecular salt bridge between residues D23 and K28. In this

configuration, the K28 residue is oriented substantially internally to form this salt bridge between D23 and K28 and stabilize the hairpin turn. (Lurs et al. 2005) and Rauk 2008).

[0067] An examination of proposed A β oligomer structures known in the art was conducted to identify regions against which an immune response may be specifically directed, and to which A β oligomer-specific antibodies may be developed. Inspection of the A β oligomer models illustrated three regions having solvent-exposed, potentially antibody-accessible residues available for binding: the A β oligomer N-terminus recognized by the mAb 6E10 (residues 4-9) of the A β peptide (FRHDSG identified as SEQ ID NO: 2); a mixed polar-hydrophobic domain in the N-terminal third of A β oligomer peptide (LVFFAEDV identified as SEQ ID NO. 3) recognized by the mAb 4G8 (residues 17-24); and a constrained turn domain of A β oligomer peptide comprised of the residues 25-29 (GSNKG). The discovery of the constrained turn domain epitope comprising SNK residues 26-28 is conformationally constrained and would not be present on linear A β or APP. Antibodies directed against this conformationally constrained epitope would not be expected bind linear A β or APP, and would be A β oligomer-specific antibodies.

[0068] Image capture of molecular dynamics modeling of a disulfide-linked cyclic peptide comprising residues 25-29 (CGSNKGC) was conducted; non-native cysteines were added for disulfide linkage. This modeling reveals that the side chain of lysine 28 is oriented externally as shown in Figure 4, in contrast to the internally oriented lysine 28 side chain predicted in reference Lurs et al. (2005) and Rauk (2008). The surprising discovery of the outward orientation of the lysine 28 residue is consistent with the high immunogenicity of this cyclic peptide comprising residues 25-29 (CGSNKGC), the side of lysine being solvent exposed, large and charged via an ϵ -amino group. Antibodies directed to a conformational cycle epitope comprising at least the SNK residues have been shown in the examples below to effectively neutralize the toxicity of A β oligomers, see for example Figure 11. The surprising discovery of the outward orientation of the lysine 28 residue is also consistent with authentic A β oligomers also displaying a similar lysine sidechain orientation into solvent in an antibody-accessible fashion. The serine 26, asparagine 27 and lysine 28 residues, SNK, located in the knuckle region of A β oligomers are all charged or polar, and have greater immunogenicity than small non-polar amino acids. The cyclic conformation of the SNK residues, located in the knuckle region of A β oligomers, form a novel conformational epitope that is solvent exposed and available for antibody binding. The following examples described below confirm the discovery of the availability of the conformationally constrained SNK epitope of A β oligomers for binding.

The discovery of this novel structurally constrained epitope at the surface of A β oligomers has advantageous properties for selective antibody binding.

[0069] The novel conformational epitope may further include a native glycine located at either end of the SNK epitope sequence. The novel conformational epitope may further include native glycine residues at both ends of the epitope sequence. In one aspect, the native glycine residues have limited or no contribution to the immunogenicity of the novel conformational epitope however, the glycine residues may relieve some steric tension inherent in the cyclization of the peptide. In the amino acid structure formulae, each residue may be generally represented by a one-letter or three-letter designation, corresponding to the trivial name of the amino acid, in accordance with the following Table 1.

[0070] Table 1: Nomenclature and abbreviations of the 20 standard L-amino acids commonly found in naturally occurring peptides.

Full Amino Acid name	Three-letter abbreviation	One-letter abbreviation
Alanine	Ala	A
Cysteine	Cys	C
Aspartic acid	Asp	D
Glutamic acid	Glu	E
Phenylalanine	Phe	F
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Lysine	Lys	K
Leucine	Leu	L
Methionine	Met	M
Asparagine	Asp	N
Proline	Pro	P
Glutamine	Gln	Q
Arginine	Arg	R
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Valine	Val	V
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	T

[0071] The epitope is comprised of strongly polar/charged residues that are solvent-exposed and structurally constrained at the surface of A β oligomers. The epitope is comprised of at least residues 26-28, SNK, in a cyclic constrained configuration. In another aspect, the epitope is comprised of residues 25 – 28, GSNK, in a cyclic constrained configuration. In a further aspect, the epitope is comprised of residue 26-29, SNKG, in a cyclic constrained configuration. In another aspect, the epitope is comprising of residues 25-29, GSNKG (SEQ ID NO:1) in a cyclic constrained configuration.

[0072] In one aspect, the structure of the novel conformation-specific epitope is dependent on a relatively-rigid spatial arrangement of the amino acid residues.

[0073] In contrast to the known epitopes identified as SEQ ID NO: 2 and SEQ ID NO: 3, which bind known antibodies 6E10 and 4G8 respectively, that are expressed on the solvent-exposed surface of A β oligomers and at the surface of cells supporting the expression of the parent protein APP (both neurons and monocytes), the novel conformational epitope having a constrained cyclic configuration is not present on the molecular surface of APP thus limiting the autoimmune recognition of APP. The GSNKG motif of APP that is located at the cell surface of neurons and monocytes is largely unstructured. Conformation-specific antibodies binding to the novel conformational epitope having a constrained cyclic configuration have limited or no recognition of the unstructured GSNKG motif on cell surface APP as is shown in the Examples below.

Antibodies recognizing the novel conformational epitope show little or no reaction with monomeric A β . In another aspect, antibodies recognizing the novel conformational epitope show little or no reaction with fibril A β , due to steric crowding of the epitope and/or other unfavourable aspects.

[0074] Antibodies to the novel conformational epitope are provided in another aspect of the present disclosure. Analysis indicates that antibodies binding to the to the novel conformational epitope having a constrained cyclic configuration recognize the non-linear epitope structure in between the subunits in the region of amino acids 25-29 of A β oligomers. The specificity of the antibodies to the novel conformational epitope enables the antibodies to specifically target the oligomeric form of A β and as such, avoid targeting monomeric A β and APP that are known to impact on neuronal and immune function and increase the availability of the antibody for binding as monomeric A β is present in much larger quantities than oligomeric A β .

[0075] Antibodies capable of binding to the novel conformational epitope are useful as both diagnostics, therapeutic agents in the treatment of Alzheimer's disease,

and vaccines for the prevention of AD are provided in another aspect of the present invention.

[0076] Antibodies that specifically bind to the cyclic peptide, comprising novel conformational epitope, derived from A β as described herein include antibodies synthesized from the disulfide cyclic peptide comprising the novel conformational epitope.

[0077] For use as a therapeutic, an antibody that specifically binds a cyclic peptide derived from A β , where the cyclic peptide comprises an conformational epitope having an amino acid sequence of at least SNK corresponding to a knuckle region of oligomeric A β , may be made using standard, well-established methods of antibody manufacturing. A therapeutic composition comprises an antibody that specifically binds a cyclic peptide derived from A β , where the cyclic peptide comprises an epitope having an amino acid sequence of at least SNK corresponding to a knuckle region of oligomeric A β in combination with a pharmaceutically acceptable adjuvant. Such a therapeutic may be administered to a patient in need of treating or preventing Alzheimer's disease. In one aspect, such a therapeutic may delay the onset of Alzheimer's disease.

[0078] The expression "pharmaceutically acceptable" means acceptable for use in the pharmaceutical and veterinary arts, i.e. not being unacceptably toxic or otherwise unsuitable. Examples of pharmaceutically acceptable adjuvants are those used conventionally with peptide-based drugs, such as diluents, excipients and the like.

Reference may be made to "Remington's: The Science and Practice of Pharmacy", 21st Ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005, for guidance on drug formulations generally. The selection of adjuvant depends on the intended mode of administration of the composition. In one embodiment of the invention, the compounds are formulated for administration by infusion, or by injection either subcutaneously, intramuscularly or intravenously, and are accordingly utilized as aqueous solutions in sterile and pyrogen-free form and optionally buffered or made isotonic. Thus, the compounds may be administered in distilled water or, more desirably, in saline, phosphate-buffered saline or 5% dextrose solution.

Compositions for oral administration via tablet, capsule or suspension are prepared using adjuvants including sugars, such as lactose, glucose and sucrose; starches such as corn starch and potato starch; cellulose and derivatives thereof, including sodium carboxymethylcellulose, ethylcellulose and cellulose acetates; powdered tragacanth; malt; gelatin; talc; stearic acids; magnesium stearate; calcium sulfate; vegetable oils, such as peanut oils, cotton seed oil, sesame oil, olive oil and corn oil; polyols such as propylene glycol, glycerine, sorbitol, mannitol and polyethylene glycol; agar; alginic acids; water; isotonic saline and phosphate buffer solutions. Wetting agents, lubricants such as

sodium lauryl sulfate, stabilizers, tableting agents, anti-oxidants, preservatives, colouring agents and flavouring agents may also be present. Creams, lotions and ointments may be prepared for topical application using an appropriate base such as a triglyceride base. Such creams, lotions and ointments may also contain a surface active agent. Aerosol formulations, for example, for nasal delivery, may also be prepared in which suitable propellant adjuvants are used. Other adjuvants may also be added to the composition regardless of how it is to be administered, for example, anti-microbial agents may be added to the composition to prevent microbial growth over prolonged storage periods. Therapeutic compositions typically must be sterile and stable under conditions of manufacture and storage.

[0079] For use as a vaccine, an antigenic peptide comprising a conformationally constrained epitope having an amino acid sequence of at least SNK corresponding to a knuckle region of oligomeric A β in combination with a pharmaceutically acceptable adjuvant, when administered generates antibodies that specifically target the oligomeric A β . These antibodies that specifically bind an epitope having an amino acid sequence of at least SNK corresponding to a knuckle region of oligomeric A β . A vaccine comprises an antigenic peptide comprising a conformationally constrained epitope having an amino acid sequence of at least SNK corresponding to a knuckle region of oligomeric A β in combination with a pharmaceutically acceptable adjuvant. The vaccine blocks the development of brain amyloidosis through neutralizing the oligomeric A β and acts to prevent the development of AD. Where oligomeric A β is blocked, their associated toxicity is blocked. Such toxicity may include for example, synaptic dysfunction and neuronal cell death. In another aspect, the antibodies generated on administration of a vaccine described above delays the propagation of oligomeric A β , as such the antibodies delay the monomer A β aggregation into the toxic oligomer A β form. In a further aspect, the antibodies generated on administration of a vaccine described above block the propagation of oligomeric A β , as such the antibodies block the monomer A β aggregation into the toxic oligomer A β form.

[0080] Examples of pharmaceutically acceptable adjuvants may include aluminum hydroxide, alum, Alhydrogel™ (aluminum trihydrate) or other aluminum-comprising salts, virosomes, nucleic acids comprising CpG motifs, squalene, oils, MF59, QS21, various saponins, virus-like particles, monophosphoryl- lipidA/trehalose dicorynomycolate, toll-like receptor agonists, copolymers such as polyoxypropylene and polyoxyethylene, or the like.

[0081] The vaccine may be administered to a patient population at risk for developing Alzheimer's disease, for example an advanced age population, a known population of "at risk" individuals harboring a known AD-promoting mutation.

[0082] In one embodiment, for treatment with a vaccine, subjects are immunized on a schedule that can vary from once a day, to once a week, to once a month, to once a year, to once a decade. A typical regimen includes an immunization followed by booster injections at 6 weekly intervals. Another regimen consists of immunization followed by booster injections 1, 2 and 12 months later. Alternatively, booster injections will vary depending on the immune response and the physiological condition of the subject. For immunization, the anti-oligomeric vaccine can be administered in a dose that ranges from about 0.0001 microgram to 10 grams, about 0.01 microgram to about 1 gram, about 1 microgram to about 1 mg, and about 100 to 250 micrograms per treatment. In one embodiment the timing of administering treatment is at one or more of the following: 0 months, 2 months, 6 months, 9 months, and/or 12 months. In one regimen, the dosing is at 2, 6, 9, and 12 months following the first immunization. In another regimen, the dosing is at 2 and 4 weeks following the first immunization, and then monthly afterwards. In an alternative regimen, the dosing varies depending on the physiological condition of the subject and/or the response to the subject to prior immunizations. The route of administration optionally includes, but is not limited to, intramuscular and intraperitoneal injections. In one embodiment the composition is injected into the deltoid muscle.

[0083] For use as a diagnostic or treatment-responsive biomarker, a suitable biological sample is isolated from a patient; the sample is contacted with an antibody that specifically bind a cyclic peptide derived from A β , where the cyclic peptide comprises an epitope having an amino acid sequence of at least SNK corresponding to a knuckle region of oligomeric A β for a period of time under conditions that are suitable to allow for the formation of antigen/antibody complexes; and the presence of the complexes is detected. Where complexes are detected there is an indication of a diagnosis of AD in the patient. A suitable biological sample for this purpose includes tissues, cells, and biofluids including for example cerebrospinal fluid (CSF) and blood.

[0084] In use, antibodies that bind the novel conformational epitope are of great diagnostic value in AD. To assist with the identification of subjects who are candidates for treatment with the antibody or vaccine compositions of the invention, the present invention further provides for the detection of an epitope by *in vitro* or *in vivo* diagnostic methods.

[0085] To detect the presence of oligomeric A β in any given sample, the present invention provides a detection method in which a sample suspected to contain oligomeric A β is treated with an antibody or binding fragment that binds selectively to the novel conformational epitope presented uniquely by the oligomeric A β relative to monomeric A β and APP; and determining whether an antigen:antibody complex has formed, the formation thereof being indicative of the presence in the sample of a oligomeric A β . The presence of the antigen:antibody complexes further indicates a diagnosis of AD in the patient.

[0086] When applied in vitro, the detection method entails analysis of a biological sample of body fluid or tissue or organ sample from a subject, usually a subject suspected of having AD. A tissue or organ sample, such as that obtained from a solid or semi-solid tissue or organ, may be digested, extracted or otherwise rendered to a liquid form. A biological sample or samples may be taken from a subject at any appropriate time, including before the subject is diagnosed with, or suspected of having AD or a related dementia, during a therapeutic regimen for the treatment or amelioration of symptoms of that disease or disorder, after death of the subject (regardless of the cause, or suspected cause). Alternately, a biological sample may include donated body fluid or tissue, such as blood, plasma or platelets when in care of a centralized blood supply organization or institution.

[0087] The presence of oligomeric A β in the sample is confirmed if the antibody forms a detectable antigen:antibody complex. The formation of such complex can be determined using a wide variety of protocols that include ELISA, RIA, flow cytometry, Western blots, immunohistochemistry and the like. To reveal the complex and hence the presence of the novel conformational epitope in the sample, the antibody desirably is provided as a labeled antibody by conjugation or coupling to an agent that is detectable either visually or with the aid of instrumentation. The agent, or label, is capable of producing, either directly or indirectly, a detectable signal. For example, the label may be radio-opaque or a radioisotope, such as ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I ; a fluorescent (fluorophore) or chemiluminescent (chromophore) compound, such as fluorescein isothiocyanate, rhodamine or luciferin; an enzyme, such as alkaline phosphatase, beta-galactosidase or horseradish peroxidase; an imaging agent; or a metal ion. Alternatively, the novel conformational epitope can be revealed using a labeled secondary reagent that binds to the epitope antibody, such as a labeled antibody that binds the epitope antibody, to reveal presence of the epitope indirectly. The presence of an antibody:antigen complex may be detected by indirect

means that do not require the two agents to be in solution. For instance, the complex is detectable indirectly using flow cytometry, where the antibody binds to, and forms an antibody:antigen complex with, the epitope presented on the surface of an intact cell. It will also be appreciated that the antigen:antibody complex can also be identified by non-antibody based methods, that include those which sort proteins based on size, charge and mobility, such as electrophoresis, chromatography, mass spectroscopy and the like.

[0088] In a related embodiment, the labeled antibodies of the invention, or labeled form of a binding fragment thereof, can be used in vivo to image the presence of the oligomeric A β to which the antibody binds. To this end, the present invention provides an antibody or fragment in a form coupled to an agent useful for in vivo imaging, such as isotopes of technetium, gadolinium, and the like.

[0089] In another aspect, an article of manufacture (also referred to as a commercial package) is provided comprising packaging material and a pharmaceutical composition. The composition comprises a pharmaceutically acceptable adjuvant and a therapeutically effective amount of a conformationally-sensitive antibody that specifically binds a cyclic peptide derived from A β , where the cyclic peptide comprises an epitope having an amino acid sequence of at least SNK corresponding to a knuckle region of oligomeric A β . The packaging material may be labelled to indicate that the composition is useful to treat Alzheimer's disease. The packaging material may be any suitable material generally used to package pharmaceutical agents including, for example, glass, plastic, foil and cardboard.

[0090] In another aspect, an article of manufacture is provided comprising packaging material and a pharmaceutical composition. The composition comprising a peptide comprising a conformationally constrained epitope having an amino acid sequence of at least SNK corresponding to a knuckle region of oligomeric A β in combination with a pharmaceutically acceptable adjuvant, as provided herein. The composition may include a physiologically or pharmaceutically acceptable excipient, and the packaging material may include a label which indicates the active ingredients of the composition (e.g. the peptide). The label may further include an intended use of the composition, for example as a therapeutic or prophylactic reagent, or as a composition to induce an immune response in a subject for the purpose of producing antisera or antibodies specific to oligomeric A β , to be used with kits as set out herein.

[0091] In a further embodiment, there is provided a kit comprising a composition comprising a peptide as provided herein, along with instructions for use of the compound or composition for the production or screening of conformationally-sensitive antibodies for

identification of oligomeric A β . The kit may be useful for production and/or identification of oligomeric A β specific antibodies or antisera, and the instructions may include, for example, dose concentrations, dose intervals, preferred administration methods, methods for immunological screening or testing, or the like.

5 **[0092]** In another embodiment, a kit for the preparation of a medicament, comprising a composition comprising one or more peptides as provided herein, along with instructions for its use is provided. The instructions may comprise a series of steps for the preparation of the medicament, the medicament being useful for inducing a therapeutic or prophylactic immune response in a subject to whom it is administered. The kit may further
10 comprise instructions for use of the medicament in treatment, for treatment, prevention or amelioration of one or more symptoms of AD or related dementias, and include, for example, dose concentrations, dose intervals, preferred administration methods or the like.

15 **[0093]** In another embodiment, a kit for diagnosing a AD or related dementias is provided. The kit comprises one or more conformationally-sensitive and selective antibodies or antisera as described herein, along with instructions for its use. The antibody may further be coupled to a detection reagent. Examples of detection reagents include secondary antibodies, such as an anti-mouse antibody, an anti-rabbit antibody or the like. Such secondary antibodies may be coupled with an enzyme that, when provided
20 with a suitable substrate, provides a detectable colorimetric or chemiluminescent reaction. The kit may further comprise reagents for performing the detection reaction, including enzymes such as proteinase K, blocking buffers, homogenization buffers, extraction buffers, dilution buffers or the like.

25 **[0094]** In another embodiment, a kit for detecting the presence of oligomeric A β in a biological sample is provided. The kit comprises one or more conformationally-sensitive antibodies or antisera that specifically bind the oligomeric A β , along with instructions for its use. The antibody may further be coupled to a detection reagent. Examples of detection reagents include secondary antibodies, such as an anti-mouse antibody, an anti-rabbit antibody or the like. Such secondary antibodies may be coupled with an
30 enzyme that, when provided with a suitable substrate, provides a detectable colorimetric or chemiluminescent reaction. The kit may further comprise reagents for performing the detection reaction, including enzymes such as proteinase K, blocking buffers, homogenization buffers, extraction buffers, dilution buffers or the like.

35 **[0095]** Conventional methods can be used to prepare the conformationally-sensitive antibodies including polyclonal antisera or monoclonal antibodies. To produce

polyclonal antibodies, a mammal, (e.g. a mouse, hamster, or rabbit) can be immunized with an immunogenic form of the novel conformational epitope which elicits an antibody response in the mammal. For example, a disulfide-linked cyclized peptide comprising the novel conformational epitope sequence may be constrained in a loop conformation using a disulfide linkage between cysteines at the N- and C-termini of this peptide. The disulfide-linked cyclized peptide may be synthesized using conventional techniques and introduced into a mammal.

[0096] Techniques for conferring immunogenicity on a peptide are well known in the art and include, for example, conjugation to carriers. The peptide can be administered in the presence of adjuvant. The progress of immunization can be monitored by detection of antibody titers in plasma or serum. Standard ELISA or other immunoassay procedures can be used with the immunogen as antigen to assess antibody levels. Following immunization, antisera can be obtained and, if desired, polyclonal antibodies isolated from the sera.

[0097] To produce monoclonal antibodies, antibody-producing cells (B-lymphocytes) are harvested from an immunized animal and fused with myeloma cells by standard somatic cell fusion procedures to form immortal hybridoma cells. Such techniques are well known in the art, (e.g., the hybridoma technique originally developed by Kohler and Milstein (Nature 256, 495-497(1975)) as well as other techniques such as the human B-cell hybridoma technique (Kozbor et al., Immunol. Today 4, 72 (1983)), the EBV-hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies (Cole et al., Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy (1985) Allen R. Bliss, Inc., pages 77-96), and screening of combinatorial antibody libraries (Huse et al., Science 246, 1275 (1989)). Hybridoma cells can be screened immunochemically for production of antibodies specifically reactive with a selected novel conformational epitope and the monoclonal antibodies can be isolated.

[0098] A typical antibody is composed of two immunoglobulin (Ig) "heavy chains" and two Ig "light chains" and may be thought of as adopting a general Y-shaped configuration. Several different types of heavy chain exist that define the class or isotype of an antibody. There are five types of mammalian immunoglobulin heavy chain: γ , δ , α , μ and ϵ , and these define classes of immunoglobulins: IgG, IgD, IgA, IgM and IgE, respectively. There are two types of light chain in mammals: kappa (κ) chain, and lambda (λ) chain.

[0099] Each heavy chain has two regions: a constant region, which is the same for all immunoglobulins of the same class but differs between classes (heavy chains γ , α

and δ have a constant region composed of three tandem immunoglobulin domains (CH1, CH2, CH3) but also have a hinge region for added flexibility; heavy chains μ and ϵ have a constant region composed of four domains); and a variable region (VH) that differs between different B cells, but is the same for all immunoglobulins produced by the same B cell or B cell clone. The variable domain of any heavy chain is composed of a single immunoglobulin domain. These domains are about 110 amino acids long.

[00100] Each light chain is composed of two tandem immunoglobulin domains: one constant (CL) domain; and one variable domain (VL) that is important for binding antigen.

[00101] Some parts of an antibody have unique functions. The arms of the "Y", for example, contain the sites that can bind two antigens (in general identical) and, therefore, recognize specific foreign objects. This region of the antibody is called the "Fab" (fragment, antigen binding) region. It is composed of one constant and one variable domain from each heavy and light chain of the antibody. The "paratope" is shaped at the amino terminal end of the antibody monomer by the variable domains from the heavy and light chains. The variable domain is also referred to as the FV region and is the most important region for binding to antigens. More specifically, variable loops of β -strands, three each on the light (VL) and heavy (VH) chains are responsible for binding to the antigen. These loops are referred to as the complementarity determining regions ("CDRs").

[00102] Complementarity determining regions ("CDRs") are regions within antibodies where these proteins complement an antigen's shape. Thus, CDRs determine the protein's affinity and specificity for specific antigens. The CDRs are the most variable part of the molecule, and contribute to the diversity of these molecules, allowing the antibody to recognize a vast repertoire of antigens.

[00103] In the amino acid sequence of a variable domain of an antigen receptor there are three CDRs (CDR1, CDR2 and CDR3), arranged non-consecutively. Since the antigen receptors are typically composed of two variable domains (on two different polypeptide chains, heavy and light chain), there are six CDRs for each antigen receptor that can collectively come into contact with the antigen. A single antibody molecule has two antigen receptors, therefore it contains twelve CDRs.

[00104] The base of the general "Y" shape of an antibody plays a role in modulating immune cell activity. This region is called the Fc (Fragment, crystallizable) region, and is composed of two heavy chains that contribute two or three constant domains depending on the class of the antibody. The Fc region ensures that each antibody generates an appropriate immune response for a given antigen, by binding to a

specific class of Fc receptors, and other immune molecules, such as complement proteins. By doing this, it mediates different physiological effects including recognition of opsonized particles, lysis of cells, or degranulation of mast cells, basophils or eosinophils.

[00105] There are number of ways to designated CDRs in an amino acid

5 sequence. The "Kabat" definition is based on sequence variability and is most commonly used. The "Chothia" definition is based on location of structural loop regions. The "AbM" definition is a compromise between the two used by Oxford Molecular's AbM antibody modelling software. The "contact" definition is based on an analysis of available complex crystal structures.

10 **[00106]** A skilled person could readily identify CDR's in any given sequence comprising CDR's, using known patterns and sequence alignment methods. In another aspect, modeling or other methods known to the skilled person may also be used for CDR identification. There are well known guidelines, for example those set out in the following website (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>), in the art to assist the skilled person in
15 identifying the CDRs in an antibody sequence.

[00107] The heavy and light chains of the 5E3 antibody were sequenced. The heavy chain sequence and light chain sequence corresponds to the sequences identified in Figure 15. A skilled person would appreciate that portions of the above sequence which are determinants of antigen binding could be transferred to another antibody
20 framework, for example, to generate a "chimeric" or "humanized" antibody.

[00108] A skilled person could readily align the 5' and 3' sequence reads illustrated in Figure 15 to generate a consensus sequence (for example, using available software packages such as GCG or Sequencher), and could examine sequence traces where required to resolve discrepancies. Any remaining discrepancies could be resolved by
25 resequencing. Discrepancies, for example, a middle stop codon located in a nucleotide sequence would be known to a person skilled in the art as an obvious nucleotide misread. It is well known in the art that when sequences amino acids and nucleotides that sequencing errors or miscalls may occur when a sequencing method calls one or more bases incorrectly, leading to an inaccurate read. Due to the vagaries of molecular
30 biology, no laboratory-based DNA sequencing methods are perfectly precise; they are all known to miscall bases occasionally in the machines. Such miscalls become evident when the sequence read is aligned against other reads or against a reference.

[00109] "Chimeric" antibodies are also contemplated within the scope of the invention. Chimeric antibodies may comprise sequences from two different antibodies.
35 They may comprise sequences from antibodies from two different species. Chimeric

antibody molecules can include, for example, the antigen binding domain from an antibody of a mouse, rat, or other species with a constant human peptide region. Conventional methods may be used to make chimeric antibodies containing the immunoglobulin variable region which recognizes the novel conformational epitope of the invention (See, for example, Morrison et al., Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 81,6851 (1985); Takeda et al., Nature 314, 452(1985), Cabilly et al., U.S. Pat. No. 4,816,567; Boss et al., U.S. Pat. No. 4,816,397; Tanaguchi et al., European Patent Publication EP171496; European Patent Publication 0173494, United Kingdom patent GB 2177096B).

[00110] "Humanized antibodies" comprise antibody sequences from non-human species whose protein sequences have been modified to increase their similarity to antibody variants produced naturally in humans. These may be considered as a specific subset of chimeric antibodies, in some instances. However, "humanization" is usually seen as distinct from the creation of a simple chimera. Having said that, the humanization process may include the creation of a mouse-human chimera in an initial step (for example, a mouse Fab may be spliced to human Fc). Thereafter the chimera might be further humanized by the selective alteration of the sequence of amino acids in the Fab portion of the molecule. The process is usually "selective" to retain the specificity for which the antibody was originally developed. For example, aside from the CDR segments, the portions of the Fab sequence that differ from those in humans can be mutated by exchanging the appropriate individual amino acids. This is accomplished at the DNA level using mutagenesis. It is possible to produce a humanized antibody without creating a chimeric intermediate. "Direct" creation of a humanized antibody can be accomplished by inserting the appropriate CDR coding segments (responsible for the desired binding properties) into a human antibody "scaffold". As discussed above, this is achieved through recombinant DNA methods using an appropriate vector and expression in mammalian cells. That is, after an antibody is developed in mouse (for example) which exhibits the desired properties, the DNA coding for that antibody can be isolated, cloned into a vector and sequenced. The DNA sequence corresponding to the antibody CDRs can then be determined. Once the precise sequence of the desired CDRs are known, a strategy can be devised for inserting these sequences appropriately into a construct containing the DNA for a human antibody variant. The strategy may also employ synthesis of linear DNA fragments based on the reading of CDR sequences. Diversity libraries may be generated using synthetic diversity-containing oligonucleotide primers. The resulting pool of clones may be further screened to identify optimized humanized antibody clones using known methods.

[00111] In some embodiments, monoclonal or chimeric antibodies specifically reactive with the novel conformational epitope of the invention as described herein can be further humanized by producing human constant region chimeras, in which parts of the variable regions, particularly the conserved framework regions of the antigen-binding domain, are of human origin and only the hypervariable regions are of non-human origin. Such immunoglobulin molecules may be made by techniques known in the art, (e.g., Teng et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 7308-7312 (1983); Kozbor et al., Immunology Today, 4, 7279 (1983); Olsson et al., Meth. Enzymol., 92, 3-16 (1982)), and PCT Publication WO92/06193 or EP 0239400). Humanized antibodies can also be commercially produced (Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Great Britain).

[00112] In one aspect, there is provided a chimeric or humanized antibody comprising the heavy and/or light chains sequences of 5E3, or a portion or portions thereof. The portions may be the determinants of antigen binding. In some embodiments, determinants may comprise the CDR sequences of 5E3. Such antibodies bind the same epitope as 5E3. They may also bind an epitope which at least partially overlaps that bound by 5E3.

[00113] In some embodiments, the chimeric or humanized antibody may comprise CDR sequences substantially identical to the CDR sequences of 5E3. In some embodiments, the antibody may have conservative sequence changes compared to the sequences of 5E3.

[00114] Among the common amino acids a "conservative amino acid substitution" is exemplified by a substitution among amino acids within each of the following groups: (1) glycine, alanine, valine, leucine, and isoleucine, (2) phenylalanine, tyrosine, and tryptophan, (3) serine and threonine, (4) aspartate and glutamate, (5) glutamine and asparagine, and (6) lysine, arginine and histidine.

[00115] The BLOSUM62 table, which is well-known in the art, is an amino acid substitution matrix derived from about 2,000 local multiple alignments of protein sequence segments, representing highly conserved regions of more than 500 groups of related proteins (Henikoff and Henikoff, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:10915 (1992)). Accordingly, the BLOSUM62 substitution frequencies can be used to define conservative amino acid substitutions that may be introduced into the amino acid sequences of the present invention. Although it is possible to design amino acid substitutions based solely upon chemical properties (as discussed above), the language "conservative amino acid substitution" preferably refers to a substitution represented by a BLOSUM62 value of

greater than -1. For example, an amino acid substitution is conservative if the substitution is characterized by a BLOSUM62 value of 0, 1, 2, or 3. According to this system, preferred conservative amino acid substitutions are characterized by a BLOSUM62 value of at least 1 (e.g., 1, 2 or 3), while more preferred conservative amino acid substitutions are characterized by a BLOSUM62 value of at least 2 (e.g., 2 or 3).

[00116] In some embodiments, the antibody may comprise CDR sequences which are at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85% or at least 90% identical to the CDR sequences of 5E3. They may also be at least 91%, at least 92%, at least 93%, at least 94%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, at least 99% or greater than 99% identical to the CDR sequences of 5E3.

[00117] Standard recombinant DNA and molecular cloning techniques used in the making of antibodies are well known in the art and are described more fully in Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989 (hereinafter "Sambrook").

[00118] The term "recombinant" refers to an artificial combination of two otherwise separated segments of sequence, e.g., by chemical synthesis or by the manipulation of isolated segments of nucleic acids by genetic engineering techniques.

[00119] The dosage of the compositions or compounds of some embodiments of the invention may vary depending on the route of administration (oral, intravenous, inhalation, or the like) and the form in which the composition or compound is administered (solution, controlled release or the like). Determination of appropriate dosages is within the ability of one of skill in the art.

[00120] A "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like that are physiologically compatible. Examples of pharmaceutically acceptable carriers include one or more of water, saline, phosphate buffered saline, dextrose, glycerol, ethanol and the like, as well as combinations thereof. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as mannitol, sorbitol, or sodium chloride in the composition.

Pharmaceutically acceptable carriers may further comprise minor amounts of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, preservatives or buffers, which enhance the shelf life or effectiveness of the antibody or antibody portion.

[00121] The pharmaceutical compositions of the invention may include an "effective amount", "therapeutically effective amount" or a "prophylactically effective amount" of an antibody or antibody portion of the invention A "therapeutically effective

amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired therapeutic result. A therapeutically effective amount of the antibody or antibody portion may be determined by a person skilled in the art and may vary according to factors such as the disease state, age, sex, and weight of the individual, and the ability of the antibody or antibody portion to elicit a desired response in the individual. A therapeutically effective amount is also one in which any toxic or detrimental effects of the antibody or antibody portion are outweighed by the therapeutically beneficial effects. A "prophylactically effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired prophylactic result. Typically, since a prophylactic dose is used in subjects prior to or at an earlier stage of disease, the prophylactically effective amount will be less than the therapeutically effective amount. The effective amount may be calculated on a mass/mass basis (e.g. micrograms or milligrams per kilogram of subject), or may be calculated on a mass/volume basis (e.g. concentration, micrograms or milligrams per milliliter). Using a mass/volume unit, an antibody may be present at an amount from about 0.1 µg/ml to about 20 mg/ml, or any amount therebetween, for example 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 µg/ml, or any amount therebetween; or from about 1 µg/ml to about 2000 µg/ml, or any amount therebetween, for example 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 or any amount therebetween; or from about 10ug/ml to about 1000ug/ml or any amount therebetween, for example 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, or any amount therebetween; or from about 30ug/ml to about 1000ug/ml or any amount therebetween, for example 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.

[00122] Quantities and/or concentrations may be calculated on a mass/mass basis (e.g. micrograms or milligrams per kilogram of subject), or may be calculated on a mass/volume basis (e.g. concentration, micrograms or milligrams per milliliter). Using a mass/volume unit, an antibody or peptide may be present at an amount from about 0.1 µg/ml to about 20 mg/ml, or any amount therebetween, for example 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 µg/ml, or any amount therebetween; or from about 1 µg/ml to about 2000 µg/ml, or any amount therebetween, for example 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 or any amount therebetween; or from about 10ug/ml to about 1000ug/ml or any amount therebetween, for example 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, or any amount therebetween; or from about 30ug/ml to
5 about 1000ug/ml or any amount therebetween, for example 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.

[00123] The antibodies of the invention may be incorporated into a pharmaceutical composition suitable for, for example, parenteral administration. Preferably, the antibody or will be prepared as an injectable solution containing an effective amount of antibody.

10 The injectable solution can be composed of either a liquid or lyophilized dosage form in a flint or amber vial, ampule or pre-filled syringe. Any suitable buffer may be used in the preparation of the pharmaceutical compositions. Examples of such buffers include but are not limited to, sodium succinate, sodium citrate, sodium phosphate or potassium phosphate. Cryoprotectants and bulking agents may be included for a lyophilized dosage
15 form. Stabilizers may be used in both liquid and lyophilized dosage forms.

[00124] Compositions according to various embodiments of the invention, including therapeutic compositions, may be administered as a dose comprising an effective amount of an antibody or peptide. The dose may comprise from about 0.1 µg/kg to about 20mg/kg (based on the mass of the subject), for example 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35,
20 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160 180, 200, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 5000, 10000, 20000 µg/kg, or any amount therebetween; or from about 1ug/kg to about 2000ug/kg or any amount therebetween, for example 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/kg, or any amount therebetween; or from about 10ug/kg to about
25 1000ug/kg or any amount therebetween, for example 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, or any amount therebetween; or from about 30ug/kg to about 1000ug/kg or any amount therebetween, for example 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.

30 **[00125]** One of skill in the art will be readily able to interconvert the units as necessary, given the mass of the subject, the concentration of the pharmaceutical composition, individual components or combinations thereof, or volume of the pharmaceutical composition, individual components or combinations thereof, into a format suitable for the desired application.

[00126] The pharmaceutical compositions of the present invention may be in a variety of forms. These include, for example, liquid, semi-solid and solid dosage forms, such as liquid solutions (e.g., injectable and infusible solutions), dispersions or suspensions, tablets, pills, powders, liposomes and suppositories. The preferred form depends on the intended mode of administration and therapeutic application. Typical preferred compositions are in the form of injectable or infusible solutions, such as compositions similar to those used for passive immunization of humans with other antibodies. The preferred mode of administration is parenteral (e.g., intravenous, subcutaneous, intraperitoneal, intramuscular). In a preferred embodiment, the antibody is administered by intravenous infusion or injection. In another preferred embodiment, the antibody is administered by intramuscular or subcutaneous injection.

[00127] The antibodies of the present invention can be administered by a variety of methods known in the art, although for many therapeutic applications, the preferred route/mode of administration is subcutaneous injection, intravenous injection or infusion.

As will be appreciated by the skilled artisan, the route and/or mode of administration will vary depending upon the desired results. In certain embodiments, the active compound may be prepared with a carrier that will protect the compound against rapid release, such as a controlled release formulation, including implants, transdermal patches, and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Many methods for the preparation of such formulations are patented or generally known to those skilled in the art. See, e.g., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

[00128] In certain embodiments, an antibody of the invention may be orally administered, for example, with an inert diluent or an assimilable edible carrier. The compound (and other ingredients, if desired) may also be enclosed in a hard or soft shell gelatin capsule, compressed into tablets, or incorporated directly into the subject's diet. For oral therapeutic administration, the compounds may be incorporated with excipients and used in the form of ingestible tablets, buccal tablets, troches, capsules, elixirs, suspensions, syrups, wafers, and the like. To administer a compound of the invention by other than parenteral administration, it may be necessary to coat the compound with, or co-administer the compound with, a material to prevent its inactivation.

[00129] Supplementary active compounds may also be incorporated into the pharmaceutical compositions. In certain embodiments, an antibody of the invention is co-

formulated with and/or co-administered with one or more additional therapeutic agents that are useful for treating AD or related dementias. For example, one of the antibodies of the subject invention or antibody portion thereof may be co-formulated and/or co-administered with one or more additional antibodies that bind other targets.

5 **[00130]** In certain embodiments, an antibody of the present invention or fragment thereof may be linked to a half-life extending vehicle known in the art. Such vehicles include, but are not limited to, the Fc domain, polyethylene glycol (PEG), and dextran. Such vehicles are described, e.g., in U.S. application Ser. No. 09/428,082 and published PCT Application No. WO 99/25044, which are hereby incorporated by reference for any
10 purpose.

[00131] In one embodiment of the invention, there is provided an antigenic peptide comprising an epitope having a constrained cyclic configuration, the epitope comprising an amino acid sequence of at least SNK, the epitope corresponding to a solvent exposed, antibody accessible knuckle region of oligomeric A β .

15 **[00132]** In another embodiment of the invention, there is provided an antigenic peptide comprising an epitope having a constrained cyclic configuration, the epitope having an amino acid sequence corresponding to SEQ ID NO: 1, the epitope corresponding to a solvent exposed, antibody accessible knuckle region of oligomeric A β

[00133] In another embodiment of the invention, there is provided antibodies that
20 are capable of binding a cyclic peptide derived from A β , the cyclic peptide comprising a conformational epitope having an amino acid sequence of at least SNK, and corresponding to a solvent exposed, antibody accessible knuckle region of oligomeric A β .

[00134] In a further embodiment of the invention, there is provided antibodies that
25 are capable of binding a cyclic peptide derived from A β , the cyclic peptide comprising a conformational epitope having an amino acid sequence corresponding to SEQ ID NO: 1, and corresponding to a solvent exposed, antibody accessible knuckle region of oligomeric A β .

[00135] In certain embodiments, such antibodies may bind oligomeric forms of A β with greater affinity than non-oligomeric forms of A β .

30 **[00136]** In another embodiment, there is provided a method of treatment of a subject having or suspected of having Alzheimer's disease, the method comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody that is capable of binding to a cyclic peptide derived from A β , where the cyclic peptide comprises a conformational epitope having an amino acid sequence of at least SNK
35 corresponding to a solvent exposed, antibody accessible knuckle region of oligomeric A β .

In certain embodiments, the antibody may bind oligomeric forms of A β with greater affinity than non-oligomeric forms of A β .

[00137] In another embodiment, there is provided a method of preventing the development or progression of AD in a subject, the method comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody that is capable of binding to a peptide that specifically bind a cyclic peptide derived from A β , where the cyclic peptide comprises a conformational epitope having an amino acid sequence of at least SNK corresponding to a solvent exposed, antibody accessible knuckle region of oligomeric A β . In certain embodiments, the antibody may bind oligomeric forms of A β with greater affinity than non-oligomeric forms of A β .

[00138] Further aspects of the invention will become apparent from consideration of the ensuing description of preferred embodiments of the invention. A person skilled in the art will realize that other embodiments of the invention are possible and that the details of the invention can be modified in a number of respects, all without departing from the inventive concept. Thus, the drawings, descriptions and examples are to be regarded as illustrative in nature and not restrictive.

[00139] EXAMPLES

Example 1: A β Purification and Aggregation and Oligomer Characterization

Transformation, Expression and Purification

[00140] E. coli BL21 (DE3) pLysS cells and E. coli DH5 α cells were transformed with a construct encoding A β 1-40. E.coli cells from 1 L culture were resuspended in 25 mL lysis buffer (50 mM TrisHCl pH 8.0 + 1 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)) to obtain a homogenized suspension (no protease inhibitors were added). The suspension was transferred to a 40mL centrifugation tube (JA-20), put on ice and subjected to sonication for a period of 3 min at intensity 6 (i.e. the maximum setting for a small sonicator tip) and 50 HZ intermittence, followed by a centrifugation step of 10 min at 18000 g at 4°C. This sonication process was repeated 3 times. The soluble fractions were recovered each time and analyzed via SDS-PAGE (TCA precipitation was not necessary in this case). Finally, the pellet was resuspended in 12.5 mL buffer containing 8M urea, 10 mM TrisHCl pH 8.0, 1 mM EDTA, followed by one additional sonication step and a centrifugation step (18000 rpm for a period of 10 min). Subsequently, this solution was diluted 4 times (addition of 37.5 mL) with 10 mM Tris pH 8.0 + 1 mM EDTA. This protein solution was then incubated with DEAE-cellulose (D52 from Whatman; this was first regenerated with 0.5 N NaOH for a period of 15 min, followed by a water wash and

0.5 M HCl, followed by several water washes and finally a concentrated buffer solution (50 mM Tris pH 8.0 + 1 mM EDTA)) that was finally equilibrated with the actual buffer for purification (25 mM Tris pH 8.0 + 1mM EDTA). The peptide was allowed to bind to the resin in batch under gentle shaking conditions(i.e. in a falcon tube with a magnet inside, placed on magnetic stirring plate) for a periods of 20 min. The unbound proteins was collected in the flow through, after centrifugation for a period of 1 min at 1200 rpm to sediment the beads. These beads were removed with a pipette.

[00141] Several washes were carried out, each with a 5 min incubation time and a short centrifugation step (1 min at 1200 rpm) to remove the fractions: 25 mM TrisHCl pH 8.0 + 1 mM EDTA with respectively 0, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 500 mM NaCl were used. The eluted fractions were kept on ice to preserve the monomeric state of the peptides.

[00142] With this approach, 250 uL of the collected fractions were analyzed by SDS-PAGE after TCA precipitation. For TCA precipitation, samples were incubated in 20% trichloroacetic acid (TCA) for at least 30 min on ice, then centrifuged for 15 min at 14,000 rpm. Supernatant was discarded and the pellet was washed with 750 uL ice cold acetone, then centrifuged for a 5 min period at 14,000 rpm. Acetone was removed and the remnants were left to evaporate. The pellet was re-dissolved with protein loading dye and analyzed 8-10 uL on SDS-PAGE.

A β Aggregation Protocol and Oligomerization of A β

[00143] To achieve monomerization of A β , purified A β was dialysed against milliQ water and lyophilized. After lyophilisation, the A β was recovered in one of TCA or formic acid and was then evaporated to form a monomer molecular layer on a glass tube. The monomeric A β was re-suspended in PBS (5mM) at a pH of about 6.8 to maintain A β in the monomeric form.

[00144] To achieve oligomerization of A β , monomeric A β was used as a starting material and was incubated at 200 μ M under sonication for a period of 12hours at 33°C. This procedure leads to the formation of A β oligomers rather A β fibrils.

Characterization of Oligomers

[00145] The size of oligomer was characterized by dynamic light scattering (DLS), a well-known technique which may be used to determine the size distribution profile of particles in suspension. Where the light source is a laser, and is monochromatic and coherent, a time-dependent fluctuation in the scattering intensity is observed. These fluctuations are a result of the small molecules in solution are undergoing Brownian motion and therefore the distance between the scatterers in the solution is constantly

changing with time. When light hits small particles the light scatters in all directions, known as Rayleigh scattering. This scattered light then undergoes either constructive or destructive interference by the surrounding particles and within this intensity fluctuation, information is contained about the time scale of movement of the scatterers. DLS was used to determine the size distribution of the Abeta sample in solution, and to confirm whether Abeta was in a monomeric or oligomeric form.

[00146] **Figure 1** illustrates that the A β sample analyzed using DLS was monomeric A β . Commercially available A β (1-40) (50 μ M) was incubated in 5mM PBS at 10°C. A hydration radius (Rh) of less than 1nm was calculated. These results are consistent with an expected Rh of less than about 1nm for monomeric A β that would be known by a person skilled in the art to be typical of monomeric A β .

[00147] **Figure 2** illustrates that the A β sample analyzed using DLS was oligomeric A β . Commercially available A β (1-40) (80 μ M) was incubated in 150mM PBS at 10°C. The results indicate a quasi monodisperse population. A hydration radius (Rh) of 200nm was calculated. The results are consistent with an expected Rh between about 100nm – 200nm for oligomeric A β that would be known by a person skilled in the art to be typical of oligomeric A β .

[00148] **Figure 3** illustrates that the A β sample analyzed using DLS was oligomeric A β . Commercially available A β (1-40) (50 μ M) was incubated in 150mM PBS at 10°C. The results indicate a quasi monodisperse population. A hydration radius (Rh) of 190nm was calculated. The results are consistent with an Rh typical of oligomeric A β .

Example 2: Production of Cyclic Peptide Comprising a Conformationally Constrained Epitope

[00149] A cyclic peptide comprising the novel conformational epitope was constructed in a constrained loop conformation using a disulfide linkage between cysteines residues located at the N- and C-termini of this peptide. Two non-native cysteines were added to the GSNKG sequence, one at the C-terminus and one at the N-terminus. The two cysteines were oxidized under controlled conditions to form a disulfide bridge.

[00150] The structure of the cyclic peptide was configured to mimic the “knuckle” conformation and orientation of the knuckle region in A β oligomers comprising the novel conformational epitope.

[00151] **Figure 4** illustrates a three-dimensional model of the disulfide-cyclized peptide comprising the novel conformational SNK epitope.

[00152] A person of skill in the art would understand that other methods of forming a constrained epitope are known in the field. For example, a peptide may be cyclized by formation of a bond between two residues of the peptide, providing a closed loop. Cyclic peptides may be described as homodetic (where all bonds are peptide bonds) or
5 heterodetic (where there are both peptide bonds, and other types of bonding, such as ester, ether, amide or disulfide linkages within the cyclic peptide). Peptides may be cyclized using chemical or enzymatic methods. US Patent Publication 2009/0215172 describes recombinant proteins that catalyze the head to tail cyclization of peptides via amide bonds, in a manner independent on the sequence of the peptide. Recognition
10 sequences in a prepeptide surrounding the peptide of interest dictate the cyclization. Bourne et al (Methods in Molecular Biology, 2005 298:151-166) describes combinatorial methods for preparation of an array of cyclic peptides via use of a safety catch linker and a sorted procedure. US Patent publication 2004/0014100 discloses a method for in vivo production of cyclic peptides. US Patent publication 2010/0240865, US Patent
15 Publication 2010/0137559, and US Patent 7,569,541 describe various methods for cyclization of peptides for example, peptides may be cyclized via oxidation of thiol- or mercaptan-containing residues at the N-terminus or C terminus, or internal to the peptide. Examples of thiol-containing residues include cysteine, homocysteine, penicillamine. In some embodiments a first thiol-containing residue is cysteine; in some embodiments both
20 a first and a second thiol-containing residue are cysteine. The two thiol-containing residues within the peptide may be oxidized to form a dimeric amino acid cysteine, linked by a disulphide bond. A variety of oxidative reagents may be used to accomplish such a thiol-disulfide conversion, for example, oxygen (air), dimethyl sulfoxide, oxidized glutathione, potassium ferricyanide, thallium(III) trifluoro acetate, or other oxidative
25 reagents such as may be known to those of skill in the art and used with such methods as are known to those of skill in the art. Examples of such methods are described in PCT Publication WO01/92466, and Andreu et al., 1994. Methods in Molecular Biology 35:91-169.

Example 3: Derivation and Screening A β Oligomer-specific Monoclonal Antibodies

30 [00153] Monoclonal antibodies (mAbs) to the A β oligomer-specific conformational epitope (SEQ ID NO: 1) were generated by producing an antibody directed to an epitope constrained in a loop conformation using disulfide linkage between cysteines at the N- and C-termini of this peptide as described in Example 2.

[00154] BALB/C mice were immunized with the novel constrained loop epitope
35 (CLE), referred to here as the GSNKG-CLE, linked to multiple antigen peptide (MAP) or

Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), which have been used for PrP and SOD1-misfolding specific epitopes (Paramithiotis et al. 2003; Rakhit et al. 2007). Mouse sera were screened on GSNKG-CLE linked to bovine serum albumin (BSA), and spleen fusion and hybridoma screening was performed on those mice with specific and strong interaction with GSNKG-CLE and not unstructured soluble A β . Positive selected IgG-secreting clones were subjected to large-scale production and subsequent characterization by immunological methods with cyclic and linear GSNKG-BSA, synthetic A β oligomers and with A β oligomers derived from AD brain.

[00155] Monoclonal antibodies (mAb) were generated against cyclic GSNKG peptides and pre-screened for binding by peptide ELISA. Some antibodies generated against GSNKG cyclic peptides preferentially recognized cyclic peptides, some linear peptides, and some both cyclic and linear. The ability of antibodies to recognize both linear and cyclic peptide may for example, relate to immune recognition of a cyclic peptide that had been partially or completely linearized by reduction of the cysteine bridge in vivo. Antibodies generated to intermediate-GSNKG peptides represent antibodies that recognize both cyclic and linear peptide. Based on the ELISA results, two cyclic-specific antibodies (5D8, 5E3), two linear-specific (3F5, 3G2), and two intermediate-specific (4D11, 4D12) IgG clones were chosen for further analysis. A Biacore™ platform, a technology that utilizes optical phenomenon of surface plasmon resonance to monitor biomolecular interactions in real time and without the need for labelling, was used for further analysis.

[00156] **Figure 5** depicts exemplary Biacore™ results. Monoclonal antibodies were captured from tissue culture supernatants using a rabbit anti-mouse Fc-specific (RAMFc) antibody which was covalently immobilized on a CM5 sensorchip. Binding of BSA-conjugated GSNKG peptides (linear and cyclic) and oligomeric A β (1-42) was then examined by flowing these analytes over the captured mAb. Binding responses were referenced against a flow cell that contained immobilized RAMfc but no captured mAb, and further blanked with sample diluent that consisted of Hepes Buffered Saline (HBS) containing 1mg/ml carboxymethyl dextran. Additionally, the observed responses were normalized against the amount of mAb captured, to accurately allow for the comparisons across the different mAbs.

[00157] **Figure 6 and Figure 7** depict the resultant Biacore™ sensorgrams, and show that ELISA-selected linear-preferential clones (3F5, 3G2) bound neither linear nor cyclic BSA-coupled peptide on Biacore chips; ELISA-selected intermediate clones (4D11, 4D12) bound to both cyclic and linear peptide on Biacore chips; and the ELISA-selected

cyclic clones (5D8, 5E3) bound primarily to cyclic-coupled BSA on Biacore chips. The cyclic clones 5E3 and 5D8 demonstrated the strongest binding to A β (1-42) oligomers and cyclic peptides, while also demonstrating little to no binding of the linear peptides as compared to the intermediate clones. The data illustrates the 5E3 antibody demonstrates the greatest binding to A β (1-42) oligomers, although both 5E3 and 5D8 bind to the cyclic peptide. These results indicate, in the screening of the antibodies produced using the cyclic peptide of Example 2, a subset of the cyclic-specific antibodies produced preferential antibody recognition of the A β oligomer epitope.

[00158] Figure 8 shows that mAb 5E3, a cyclic-preferential clone, bound to A β (1-42) oligomers in a concentration-dependent manner. This observation demonstrates an accessible and conformationally-constrained epitope in the A β oligomers which is titratable, consistent with an authentic immunologic antigen-antibody interaction. Thus the Biacore analyses demonstrate that cyclic-GSNKG peptide and full length oligomeric A β (1-42) share a common molecular signature, the conformationally-constrained epitope, which is specifically recognized by the conformationally-sensitive mAb 5E3.

[00159] A β (1-42) oligomer--specific mAbs may be further tested for therapeutic purpose in cellular and animal models of AD, and for neutralization activity in neurophysiological assays of synaptic function impaired by A β oligomers.

Example 4: Flow Cytometry Analyses

[00160] A flow cytometry analysis was carried out to determine the degree of antibody binding the APP at the cell surface.

[00161] Healthy adult Black/6 mice were euthanized in a carbon dioxide chamber. Brains were removed immediately and perfused in phosphate buffered saline (PBS) followed by submersion in PBS + 1% fetal bovine serum (FBS). Single cell suspensions were generated by mincing brains with dissecting scissors and serial passage through 100 μ m and 70 μ m sieves. Cells were incubated in PBS +1% FBS as a blocking step for 30 min at room temperature. Cells were then incubated (or not) in 100 μ l PBS + 1% FBS plus either 10 μ g/mL or 1 μ g/mL of 6E10 and 5E3, separately. After 1 h at room temperature cells were washed twice (400xg for 5 min) and resuspended in PBS + 1% FBS and anti-mouse antibodies conjugated to either allophycocyanin (APC) or fluorescein (FITC), both at a 1:1000 dilution. In addition to an unstained control, some cells were incubated with secondary antibody alone to control for nonspecific interaction. Secondary antibodies were incubated with sample for 30 min at room temperature after which cells were washed and either analyzed immediately or fixed over night in 4% paraformaldehyde

at 4°C. A BD LSRII Flow Cytometer was used to collect data and FlowJo was used for data analysis.

[00162] **Figure 9 and Figure 10** depict results of the flow cytometry analysis.

Figure 9 is a flow cytometry trace which shows the comparison of cells binding labelled 6E10 pan-A β antibody and a secondary antibody negative control to the APP located at the cell surface. Figure 10 shows the comparison of cells binding labelled 5E3 antibody and a secondary antibody negative control to the APP located at the cell surface. The

6E10 antibody shown in Figure 9 illustrates a significant proportion of the cells binding FITC labelled 6E10 to APP located at the cell surface. In contrast, the 5E3 antibody

shown in Figure 10 illustrates that there is very little binding of FITC labelled 5E3 to the cells as compared to the control. These results clearly illustrates that FITC labelled 5E3 shows significantly less binding of to APP at the cell surface as compared to FITC

labelled 6E10. The results of these analyses indicate that the structurally constrained oligomer-specific novel conformational epitope is not present at the cell surface of

neurons which is consistent with a linear unstructured nature of the GSNKG motif in native APP. The absence of the structurally constrained novel conformational epitope at the cell surface indicates that an immune response against the cyclic epitope used in treatment of Alzheimer's disease does not target native APP. These results demonstrate that antibodies that specifically bind to the cyclic-GSNKG epitope of oligomeric A β have a preferred safety profile as compared to the known 6E10 antibody.

Example 5: Neuronal Analyses

[00163] A neuronal toxicity analysis was carried out to determine the degree of cell survival for cells incubated with a mock (media alone) control, soluble (linear), and oligomeric A β 1-40 in the presence and absence of 5E3 antibody at different concentrations. The mock control was treated with media alone (no antibody).

[00164] 96 wells containing 10,000 rat primary neurons/well were grown in a poly-L-lysine (ScienCell #0403; 2 micrograms/cm², 1 hr, 37 degree Celsius, washed 3 X with PBS) treated well of a 96-well plate, with 0.2ml neuronal medium (ScienCell #1521) in each well. The culture medium was changed every day for 7 days. Soluble and oligomeric A β (1-40) were incubated 4 hours in the absence or in the presence of the 5E3 antibody at different concentrations (see Figure 11) in neuronal medium at room temperature in a rotating device. 0.2ml of this mixture was added to the neurons after removal of the medium. After a period of 24 hrs, cell survival was measured using a Roche Cell Proliferation kit II (#11465015001) according to the manufacturer's protocol. Optical densities were determined with a plate reader.

[00165] **Figure 11** illustrates the results of neuronal toxicity assays. A β is toxic to neurons in both the linear A β monomer configuration and the oligomeric A β configuration. The antibody 5E3 directed against the conformationally constrained A β epitope was shown to be protective against oligomeric forms of A β . Antibody 5E3 was not shown to be protective for the linear A β . These results demonstrate the conformational specificity of the binding of antibody 5E3.

Example 6: Immunoblot Analyses

[00166] An immunoblot analysis was conducted to determine the relative binding of 6E10 antibody and 5E3 antibody to APP, monomeric A β and oligomeric A β .

Homogenization

[00167] Brain tissue samples were weighed and subsequently submersed in a volume of fresh, ice cold TBS (supplemented with 5mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 5mM EDTA and protease inhibitor cocktail) such that the final concentration of brain tissue was 20%. Tissue was homogenized in this buffer using a mechanical homogenizer as follows: tissue was subjected to homogenizer 3 times for a period of 30 sec each with a period of 30 sec on ice between homogenizations. TBS homogenized samples were then subjected to ultracentrifugation (70,000xg for 90 min). Supernatants were collected and stored at -80°C.

[00168] Protein concentration of TBS homogenates was determined using the BCA protein assay. In some cases, an equal amount of protein was fractionated by SDS-PAGE using Tris-Tricine 4-20% gels after boiling in Tris-Tricine Sample Buffer (Invitrogen) and transferred to 0.2 μ m polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. After transfer, membranes were submersed in PBS and boiled 2 times for a period of 3 min each for epitope heat recovery. Membranes were subjected to immunoblotting using either 6E10 or the oligomer specific antibody 5E3 as the primary antibody. Both were used at a concentration of 1 μ g/ml.

[00169] **Figure 12** illustrates the results of an immunoblot which shows brain tissue homogenized in TBS, fractionated in Tris-Tricine gels, and immunoblotted with pan-A β 6E10 antibody. Reaction with APP and with monomeric forms of A β is evident, as well as minor reactivity to the A β oligomer bands.

[00170] **Figure 13** illustrates the results of an immunoblot for antibody 5E3. Antibody 5E3 specifically recognized oligomer species of about 45-55kDa, apparently SDS stable, indicating strong non-covalent interaction of A β monomers in the oligomer species. No reaction with the monomeric form of A β was observed, although some limited reactivity with APP is evident on this immunoblot that is presumed to be

associated with denaturation and partial native and non-native renaturation on the blot membrane. The pan-A β antibody 6E10 showed limited or no recognition of the oligomer species. The Biacore™ data discussed in Example 3 (based on an empirical Biacore™ formula and assuming the stoichiometry between 5E3 and AB42 is 1) is in agreement with the immunoblot, and indicates that the species of A β (1-42) that binds to 5E3 to be between a decamer and a tridecamer; given a molecular weight of 4.0-4.3 kDa per monomer, the Biacore data predict an oligomer species of ~50 kDa, consistent with the molecular weight of the major bands detected by the 5E3 mAb.

Example 7: Analysis of Inhibition of A β Oligomer Formation

[00171] An analysis of A β inhibition was conducted to determine the ability of the 5E3 antibody to induce a delay in the propagation of A β oligomers.

[00172] Static light scattering (SLS) is a technique in physical chemistry that measures the intensity of the scattered light to obtain the average molecular weight (Mw) of a macromolecule like a polymer or a protein. Measurement of the scattering intensity at many angles allows calculation of the root mean square radius, also called the radius of gyration (Rg). By measuring the scattering intensity for many samples of various concentrations, the second virial coefficient A₂, can be calculated. For static light scattering experiments, a high intensity monochromatic light, usually a laser, is launched in a solution containing the macromolecules. One or many detectors are used to measure the scattering intensity at one or many angles (θ) at a given wavelength (λ).

[00173] In order to measure the weight average molecular weight directly, without calibration, from the light scattering intensity, the laser intensity, the quantum efficiency of the detector and the full scattering volume and solid angle of the detector needs to be known. Since this is impractical, all commercial instruments are calibrated using a strong, known scatterer like toluene since the Rayleigh Ratio of toluene and a few other solvents were measured using an absolute light scattering instrument.

[00174] **Figure 14** illustrates the ability of 5E3 antibody to delay the aggregation of monomer A β into the toxic oligomer A β form. A β oligomer formation was tested in the absence of 5E3 ("C" in Figure 14) or in the presence of 5E3 ("5E3" in Figure 14).

Commercially sourced A β (1-40) (23 μ M) was incubated at 39°C in a reaction volume of 150 μ L with antibody 5E3 (2.0 mM). The shift on the SLS intensity indicated by the arrow correspond to the contribution of 5E3 antibody to the scattered intensity. Figure 14 illustrates that incubation with antibody 5E3 results in a significant delay in A β oligomer formation.

[00175] This inhibitory effect on polymerization is supportive of a therapeutic role for antibody 5E3, humanized and chimeric antibodies related thereto, and for the novel conformation epitope itself, for example in a vaccine composition.

Example 8: Detection of A β Oligomers in Biological Samples

- 5 [00176] It is envisaged that purified 5E3 antibody could be used to detect A β oligomers in biological samples, such as homogenates from tissue, including brain. This detection could be carried out using a variety of detection platforms, including the Biacore™ platform, and could have diagnostic and/or prognostic value.

Example 9: Treatment with 5E3 and Related Antibodies & Vaccines

- 10 [00177] Treatment with 5E3 antibodies could serve to specifically and/or selectively clear toxic A β oligomers, and may be useful in treating and/or preventing onset or progression of diseases related to A β oligomer toxicity, such as Alzheimer's disease. Human or humanized antibodies directed to the same epitope as 5E3 would be useful for treating and/or preventing Alzheimer's disease. In another aspect, an epitope
15 overlapping that epitope recognized by 5E3 would be useful for treating and/or preventing Alzheimer's disease.

[00178] Similarly, the novel conformational epitope described herein would likely be useful in eliciting a specific immune response to A β oligomer, which would be useful for treatment or prevention of, for example, in Alzheimer's disease.

- 20 [00179] The above-described embodiments are intended to be examples only. Alterations, modifications and variations can be effected to the particular embodiments by those of skill in the art without departing from the scope, which is defined solely by the claims appended hereto.

25 **References:**

- Gelinas, D.S., et al., Immunotherapy for Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101 Suppl 2: p. 14657-62.
- Robinson, S.R., et al., Lessons from the AN 1792 Alzheimer vaccine: lest we forget. Neurobiol Aging, 2004. 25(5): p. 609-15.
- 30 Broytman, O. and J.S. Malter, Anti-A β : The good, the bad, and the unforeseen. J Neurosci Res, 2004. 75(3): p. 301-6.
- Mathews, P.M. and R.A. Nixon, Setback for an Alzheimer's disease vaccine: lessons learned. Neurology, 2003. 61(1): p. 7-8.
- Goni, F. and E.M. Sigurdsson, New directions towards safer and effective vaccines for Alzheimer's
35 disease. Curr Opin Mol Ther, 2005. 7(1): p. 17-23.

- Jung, S.S., J. Nalbantoglu, and N.R. Cashman, Alzheimer's beta-amyloid precursor protein is expressed on the surface of immediately ex vivo brain cells: a flow cytometric study. *J Neurosci Res*, 1996. 46(3): p. 336-48.
- Jung, S.S., S. Gauthier, and N.R. Cashman, Beta-amyloid precursor protein is detectable on monocytes and is increased in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 1999. 20(3): p. 249-57.
- 5 Morimoto, T., et al., Involvement of amyloid precursor protein in functional synapse formation in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res*, 1998. 51(2): p. 185-95.
- Mileusnic, R., C.L. Lancashire, and S.P. Rose, Amyloid precursor protein: from synaptic plasticity to Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. 1048: p. 149-65.
- 10 Mileusnic, R., et al., APP is required during an early phase of memory formation. *Eur J Neurosci*, 2000. 12(12): p. 4487-95.
- Lambert, M.P., et al., Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of Abeta. *J Neurochem*, 2007. 100(1): p. 23-35.
- Lacor, P.N., et al., Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 2007. 27(4): p. 796-807.
- 15 Ronicke, R., et al., Abeta mediated diminution of MTT reduction--an artefact of single cell culture? *PLoS One*, 2008. 3(9): p. e3236.
- Balducci, C., et al., Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010, 107(5): p. 2295-300.
- 20 Shankar, G.M., et al., Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*, 2008. 14(8): p. 837-42.
- Selkoe, D.J., Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res*, 2008. 192(1): p. 106-13.
- 25 Klyubin, I., et al., Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. *Nat Med*, 2005. 11(5): p. 556-61.
- Walsh, D.M., et al., Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 2002. 416(6880): p. 535-9.
- Wang, H.W., et al., Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res*, 2002. 924(2): p. 133-40.
- 30 Lesne, S., et al., A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*, 2006. 440(7082): p. 352-7.
- Lauren, J., et al., Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloidbeta oligomers. *Nature*, 2009. 457(7233): p. 1128-32.
- 35 Luhrs, T., et al., 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(48): p. 17342-7.
- Rauk, A., Why is the amyloid beta peptide of Alzheimer's disease neurotoxic? *Dalton Trans*, 2008(10): p. 1273-82.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated antibody that specifically binds to a cyclic peptide derived from A β , wherein the cyclic peptide comprises a conformational epitope having an amino acid
5 sequence of at least SNK corresponding to a solvent-exposed, antibody accessible knuckle region of oligomeric A β .
2. An isolated antibody that specifically binds to a cyclic peptide derived from A β , wherein the cyclic peptide comprises a conformational epitope having an amino acid
10 sequence corresponding to SEQ ID NO: 1 corresponding to a solvent-exposed, antibody accessible knuckle region of oligomeric A β .
3. The isolated antibody of claim 1 or claim 2, wherein the antibody specifically binds with greater affinity to an oligomeric form of A β than to a non-oligomeric form of A β .
15
4. The isolated antibody of any of claims 1 to 3, wherein the antibody is monoclonal.
5. The isolated antibody of any of claims 1 to 4, wherein the antibody is humanized.
- 20 6. An antigenic peptide comprising an epitope having a constrained cyclic configuration, wherein the epitope having an amino acid sequence of at least SNK corresponding to a solvent-exposed, antibody accessible knuckle region of oligomeric A β .
7. An antigenic peptide comprising an epitope having a constrained cyclic
25 configuration, wherein the epitope having an amino acid sequence corresponding to SEQ ID NO: 1 corresponding to a solvent-exposed, antibody accessible knuckle region of oligomeric A β .
8. The antigenic peptide of claim 8 or claim 9, wherein the solvent-exposed, antibody
30 accessible knuckle region of oligomeric A β corresponds to residues 25 to 29 of oligomeric A β (1-40) or oligomeric A β (1-42).
9. An immunoconjugate comprising an antibody of any one of claims 1 to 5 conjugated with a detectable label.

10. A composition comprising a therapeutically effective amount of the isolated antibody of any of claims 1 to 5 and a pharmaceutically acceptable adjuvant.

11. An anti-oligomeric vaccine composition comprising the antigenic peptide of any of claims 8 to 10 and a pharmaceutically acceptable adjuvant.

12. A method of treating or preventing Alzheimer's Disease in a patient in need of said treatment comprising administering a pharmaceutically effective amount of the isolated antibody of any of claim 1 to 5 or the or immunconjugate of claim 9.

10

13. A method of treating or preventing Alzheimer's Disease in a patient in need of said treatment comprising administering said vaccine of claim 12.

14. A method of diagnosing Alzheimer's Disease in a patient suspected of having Alzheimer's Disease comprising the steps of:

15

a) isolating a biological sample from the patient;

b) contacting the biological sample with the isolated antibody of any of claims 1 to 5 for a time and under conditions sufficient to allow for formation of antigen/antibody complexes in the sample; and

c) detecting the presence of the antigen/antibody complexes in the sample, wherein presence of the complexes indicates a diagnosis of Alzheimer's Disease in the patient.

20

15. A kit for comprising:

the isolated antibody of any of claims 1 to 5; and

a conjugate comprising an antigen attached to a signal-generating compound.

25

16. The kit of claim 16 comprising one or more detection agents.

17. A commercial package comprising:

30

the isolated antibody of any of claims 1 to 5;

a conjugate comprising an antigen attached to a signal-generating compound; and instructions for use in diagnosing Alzheimer's Disease.

35

18. Use of an antibody of any one of claims 1 to 5 or the immunoconjugate of claim 9 for the treatment or prevention of Alzheimer's disease.

35

19. Use of a vaccine according to claim 13 for the treatment or prevention of Alzheimer's disease.
- 5 20. A nucleic acid encoding the isolated antibody of any one of claims 1 to 5.

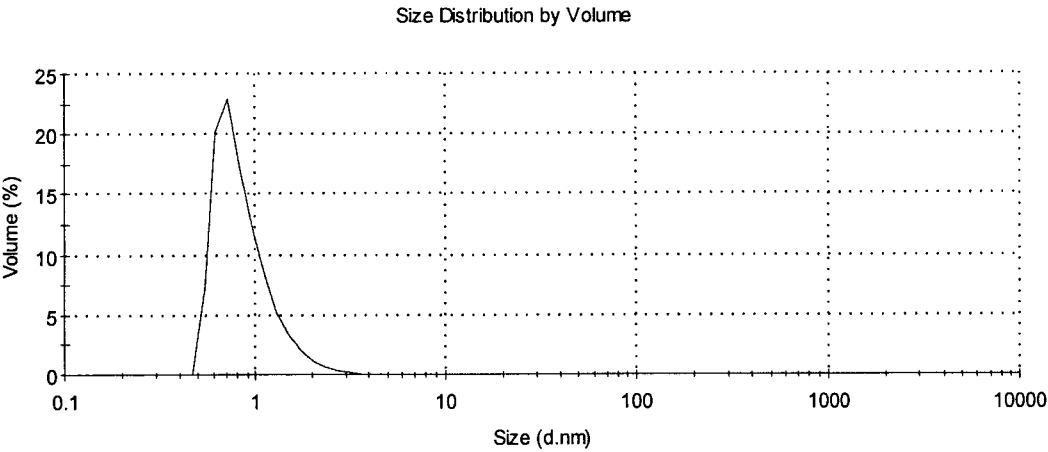


Fig. 1

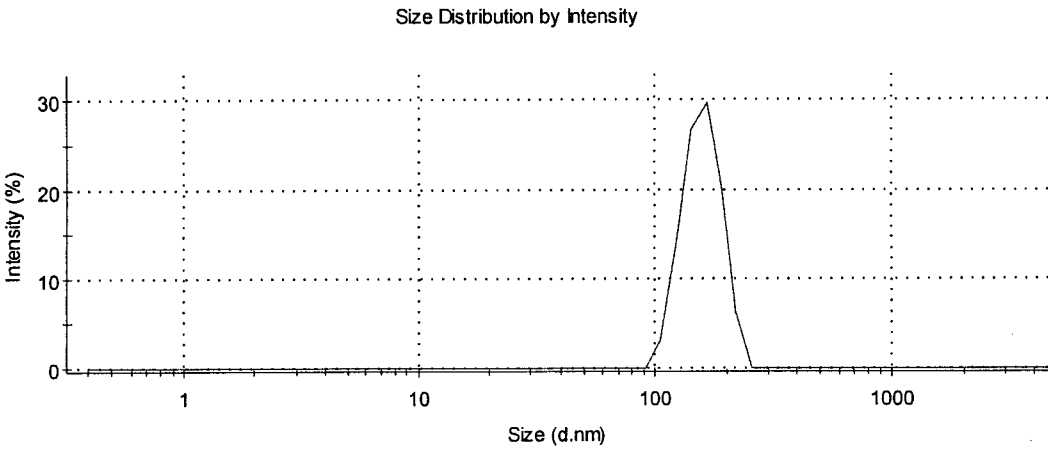


Fig. 2

2/13

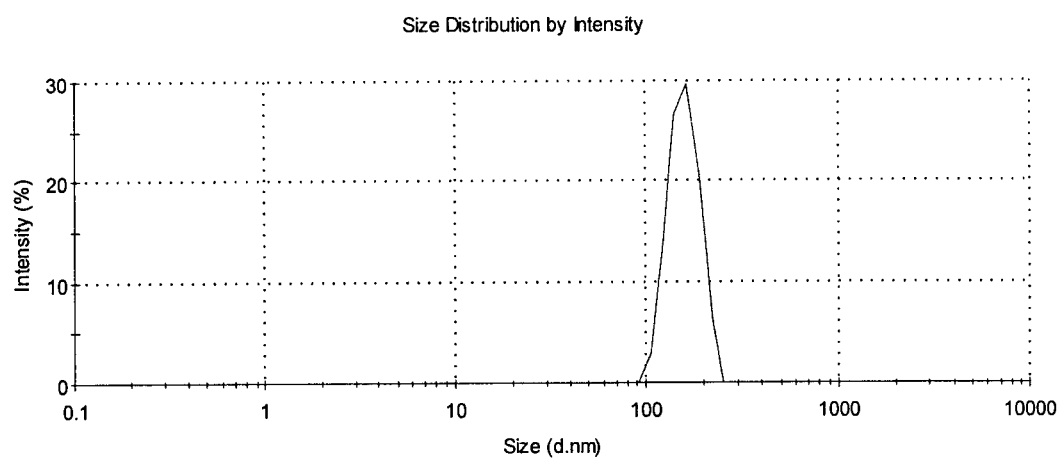


Fig. 3

3/13

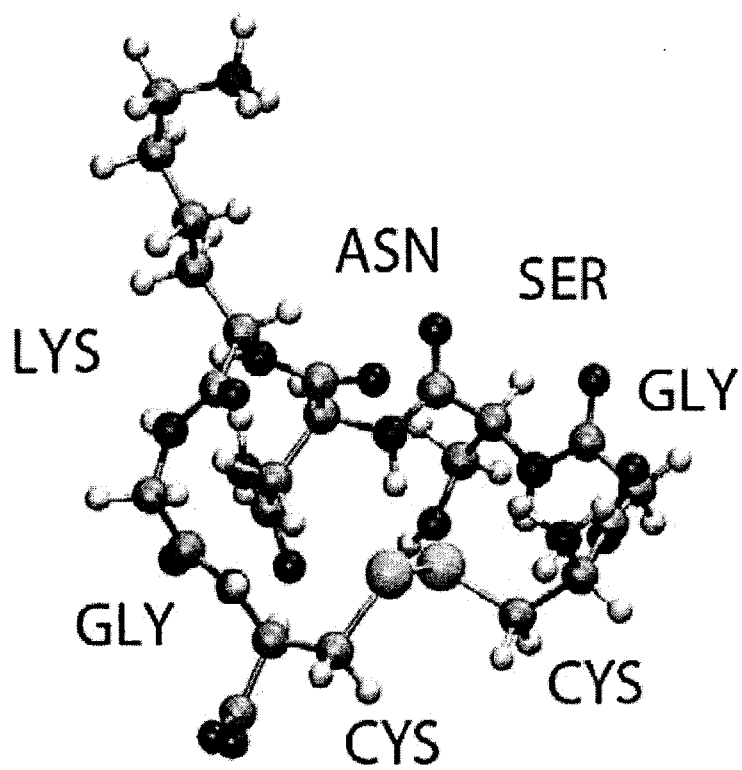


Fig. 4

4/13

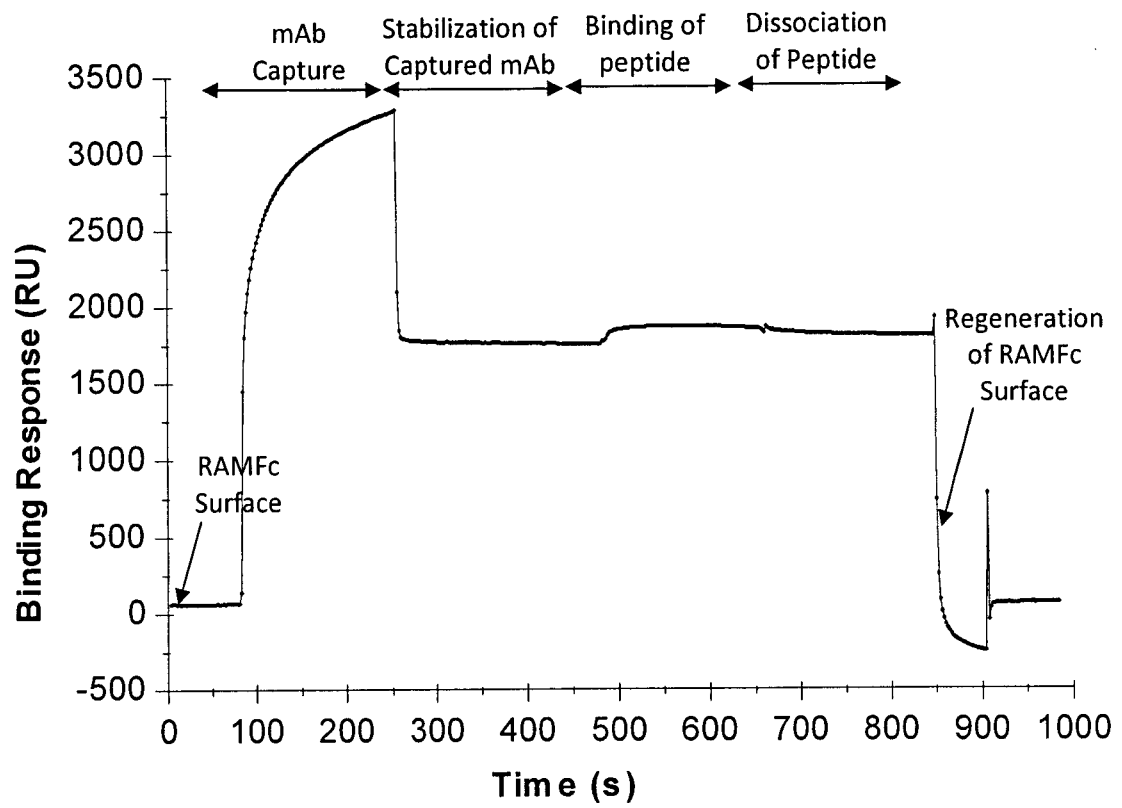


Fig.5

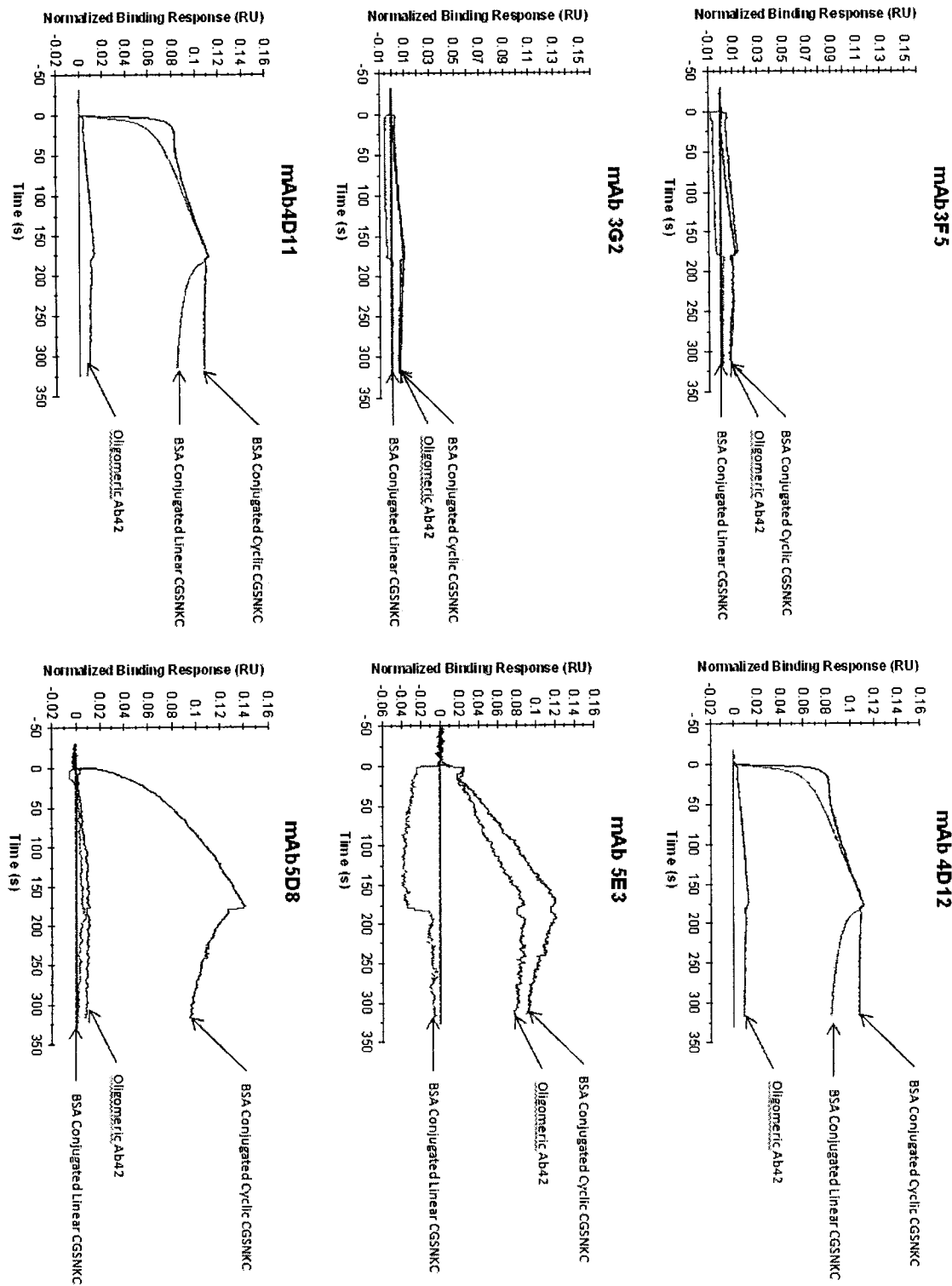


Fig. 6

6/13

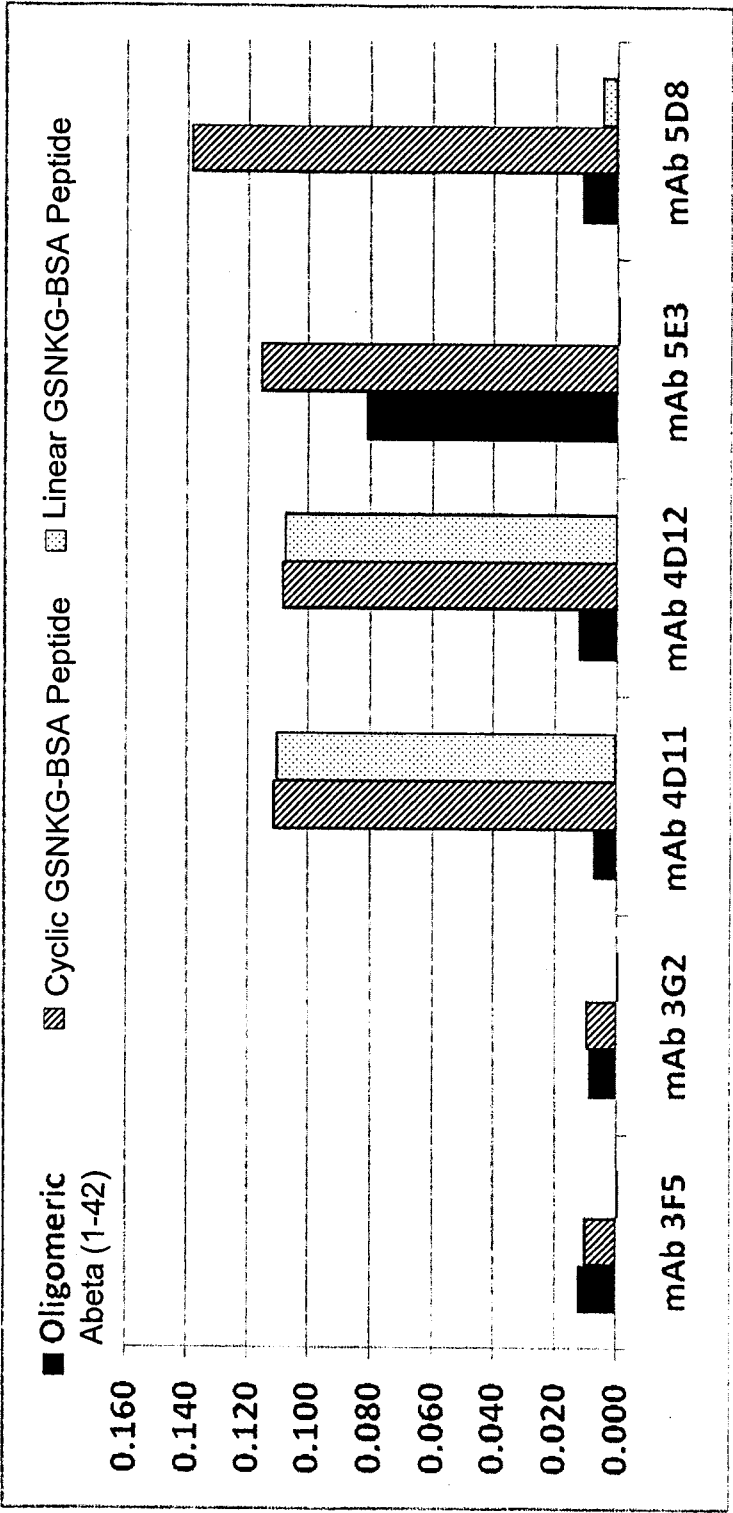


Fig. 7

7/13

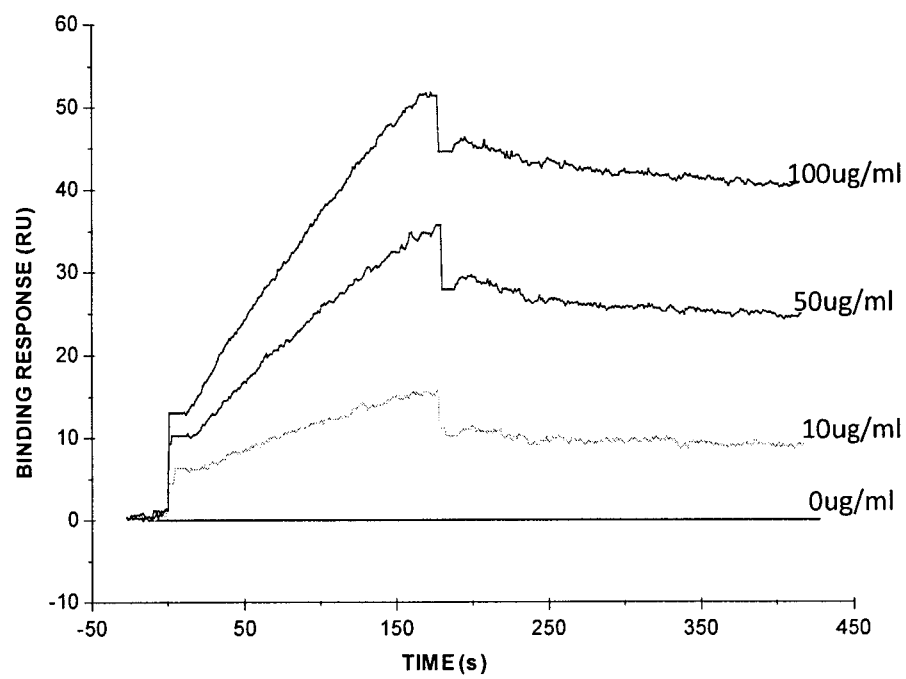
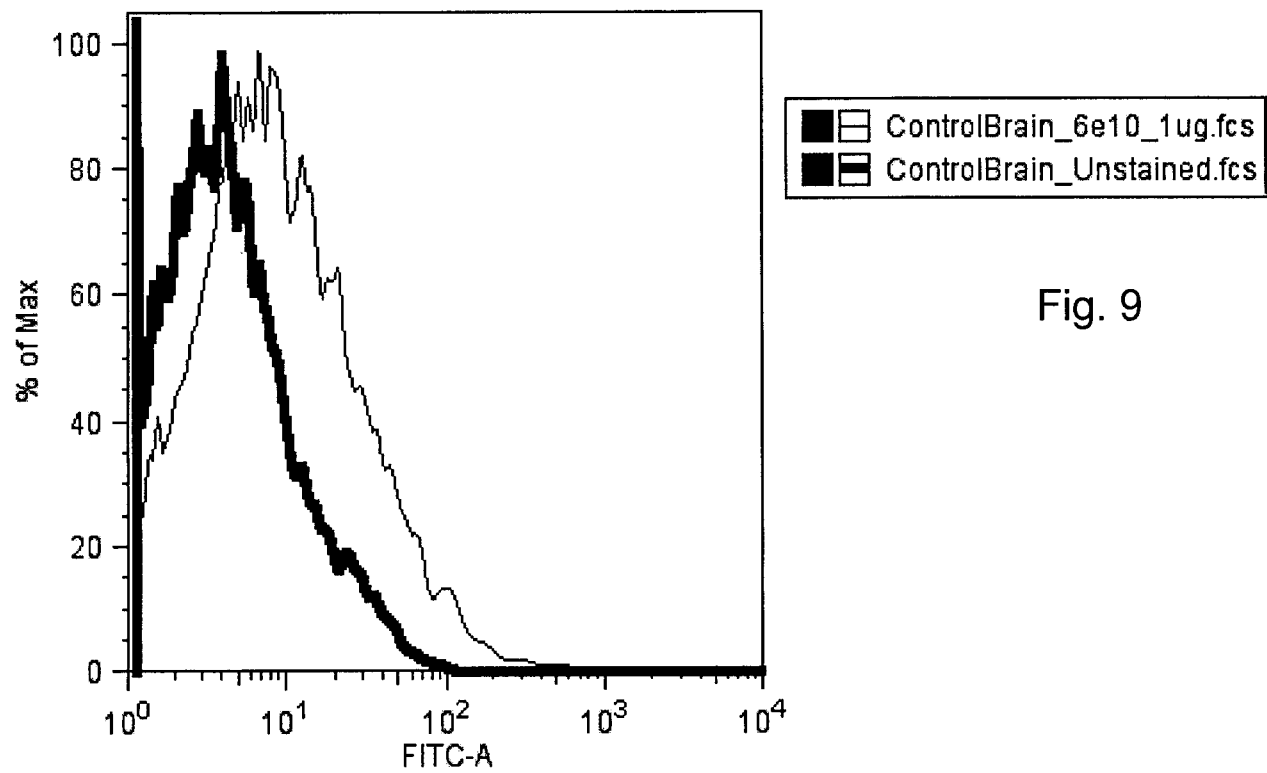
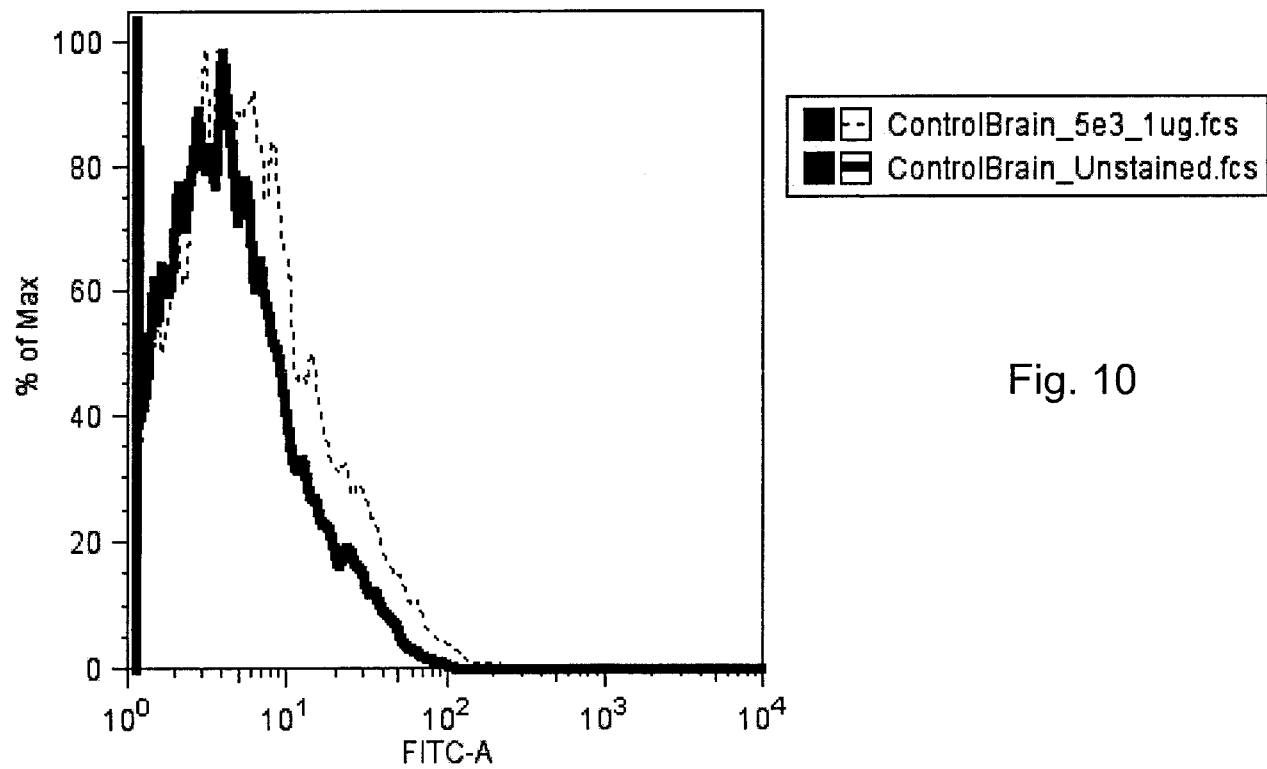


Fig. 8



live



live

9/13

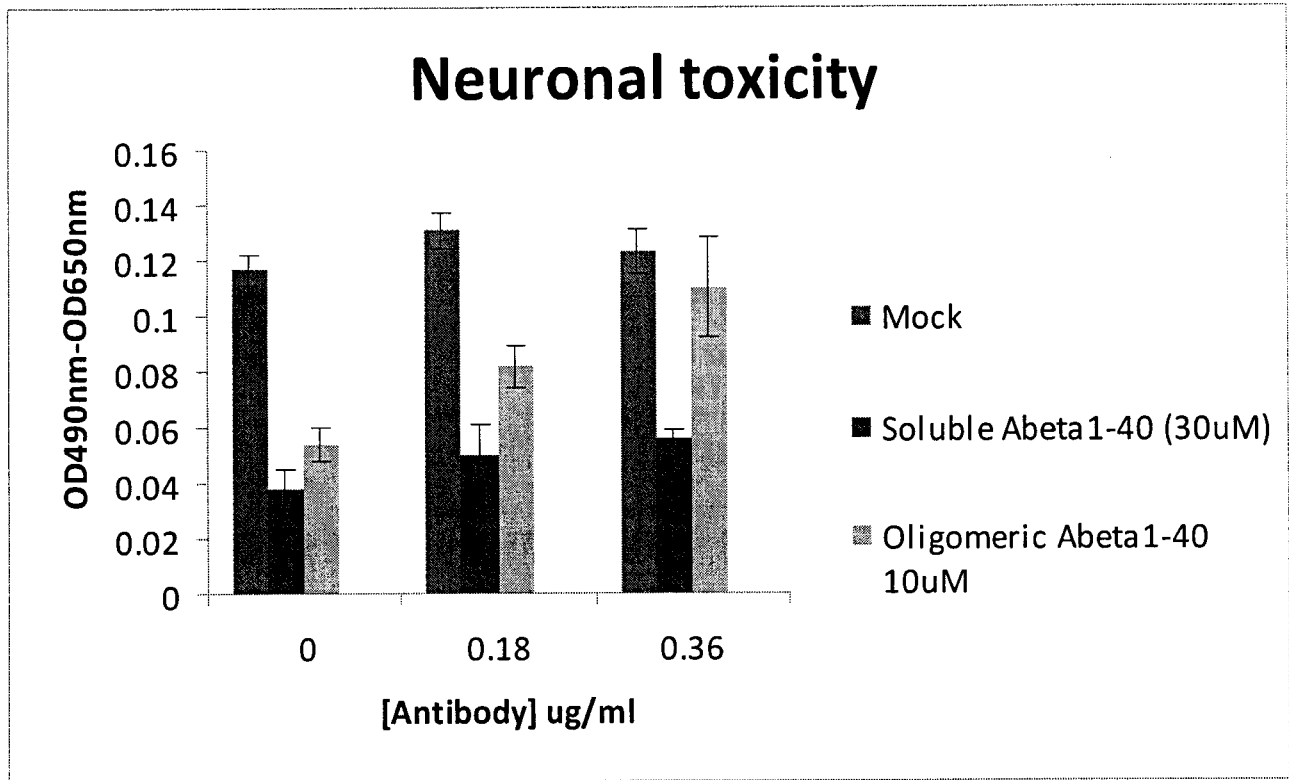


Fig. 11

10/13

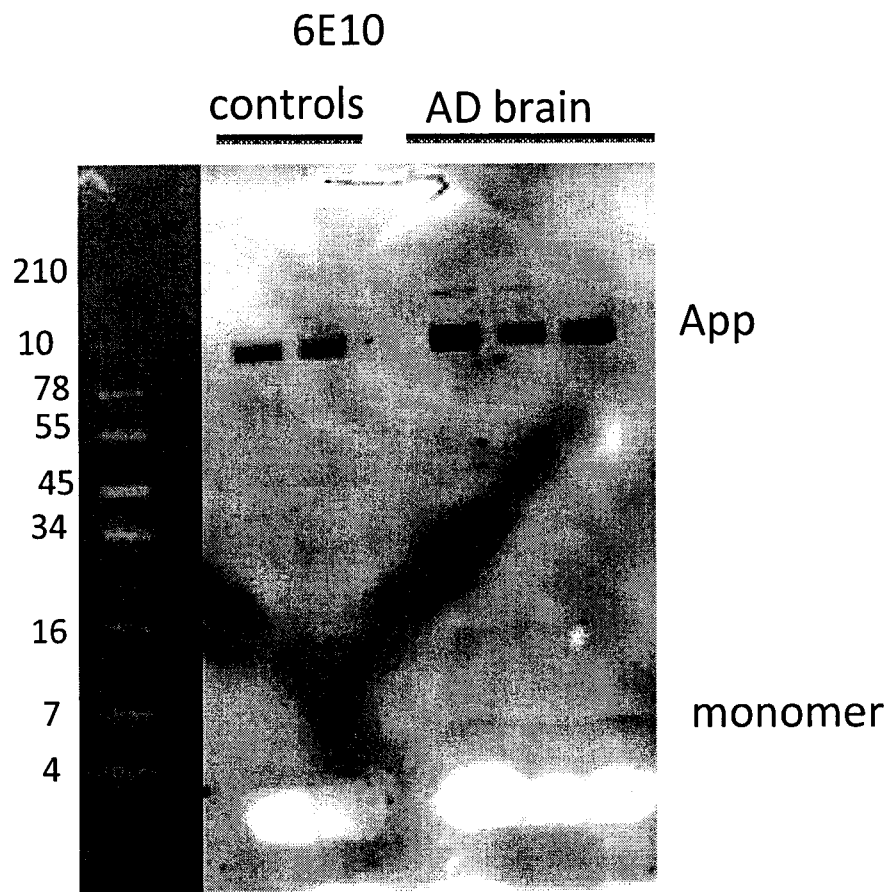


Fig. 12

11/13

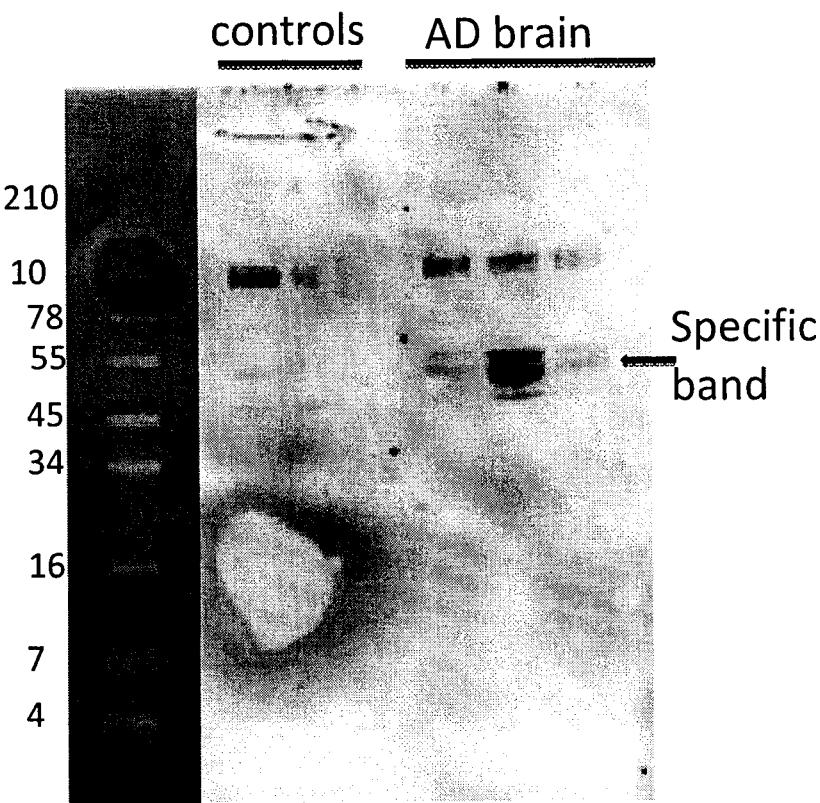


Fig. 13

12/13

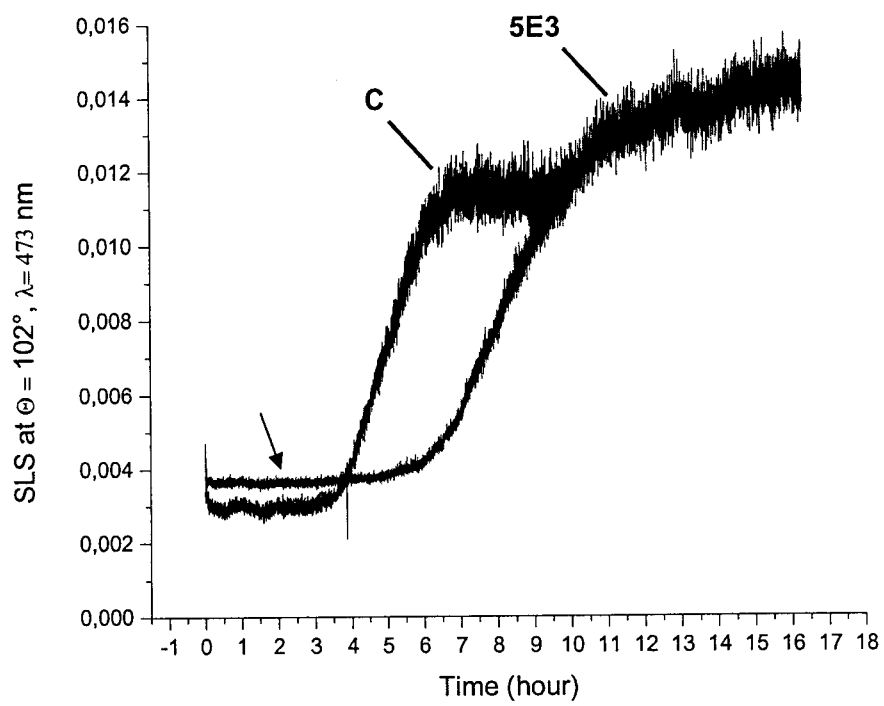


Fig. 14

13/13

SEQ ID NO: 4

H-IgH1st3prime 489 48 426 0.05

NNNNNNNNNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNANNATAGCCCTTGNNNNGCATCCCAGGGTCACCAT
GGAGTTAGTTTGGGCAGCAGATCCAGGGGCCAGTGGATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGCTGAGGA
GACTGTGAGAGTGGTGCCTTGGCCCCAGTAGTGAGCCTCGTAATCCATCCTTGACAGAAATAGACCGCA
GAGTCCTCAGAGGTCAATCTGCTGAGCTGCATGTAGGCTGTGCTGGAGGATTTGTCTGCAGTCAGTGTGG
CCTTGCCCTTGAACCTTCTCATTGTACTTAGTATTAACATTTCCAGGATAAATCCATCCAATCCACTCAAGTCC
CTGTCCAGGCCCTGTGTATCACCCACTGTATATAGTAGCTTGTGAATATGTAGCCAGAAGCCTTGCAGGATA
TCCTCACTGAAGCCCCAGGCTTCACCAGCTCAGGTCCAGACTCCTGCAGCTGCACCTCNNAATTNNNNNN
N

SEQ ID NO: 5

H-IgH1st5prime 486 16 450 0.05

NNNNNNNNNTGGNGANCCTGGGGCTTCNGTGAGGANATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACATATTCACAAGC
TACTATATACAGTGGGTGATACACAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTATCCTGGAA
ATGTTAATACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCAC
AGCCTACATGCAGCTCAGCAGATTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGGATGGATTACG
AGGCTCACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTAT
CCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCCAAATACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTT
CCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTNNNNAACCTTNNN

SEQ ID NO: 6

3prime Kappa

NNNNNNNNNNNGTTTNNATTNNNGCTTGGTGCCTCCTCCGAACGTCCGAGGATAATTATGATATTGTAGA
CAGTTGTTGTCTGCACAATCTTCTCACTCAAGGGTGCTGATGGGGAGAGAATAATCTGACACCCACCTACT
GCCACTGAGCCTTTTTGGGACACCTCAATCTTGAGTGGATGCGGCGTAAATCANGCGTTTAATAGTTCGGT
CTGGTTTCTGCTGAAGCCAGGTTAAGTAACCACTAATTTCTGACTTGCCCGACGAGTGAGACTGACTCTTT
CTCCCTCAGAGGCAGATAANGAGGATGGANACTGGGTCTGATCTGGATGTCACATCTGGTACCTGGNAACC
NGANNCNCAAAAAANCAGCAA

SEQ ID NO: 7

5prime Kappa

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCNGTCNNNTCCTCCTTATCTGCCTCTCTGGGAGAAAAAGTCCGTCTCAC
TTGTCGGGCAAGTCNAGAAATTAGTGCTTACTTAACCTGGCTTCAGCAGAGACCCCATGGAATATTAGAC
GCCCCGATCTAACCCCATCCTCTTTAGATTCTGGTGTCCCAAAAAGGGTCCCTGCCAGGATGTCTGGGTCA
GATTATTCTATCAACATCACCATCCTTGAGTCTGAAGATTATGAAGACGATGCCTGTCTACAATATGGTAAT
TATCCTCGGAAGTTCAGTGGAGGCAACGAGCTAGAAATCTAACAGGCTGATGCTGCAACAACCTGTATCCA
TCTTCCCACCATCACACCATCA

Fig. 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2011/000238

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C07K 14/47</i> (2006.01) , <i>A61K 39/00</i> (2006.01) , <i>A61K 39/395</i> (2006.01) , <i>A61P 25/28</i> (2006.01) , <i>A61P 37/04</i> (2006.01) , <i>C07K 16/18</i> (2006.01) , <i>C12N 15/13</i> (2006.01) , <i>G01N 33/53</i> (2006.01) . According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>C07K 14/47</i> (2006.01) , <i>A61K 39/00</i> (2006.01) , <i>A61K 39/395</i> (2006.01) , <i>A61P 25/28</i> (2006.01) , <i>A61P 37/04</i> (2006.01) , <i>C07K 16/18</i> (2006.01) , <i>C12N 15/13</i> (2006.01) , <i>G01N 33/53</i> (2006.01) . Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Scopus, Pubmed, TotalPatent, Canadian Patent Database, GQPAT, GeneSeq Protein, Uniprot, RefSeq, GenPept, IPI, IGBLAST Protein, PDB protein, ENSEMBL. Keywords: antibody, amyloid beta (Aβ), cyclic, peptide, conformational, eptitope, knuckle region, solvent-exposed, oligomer(ic), SNK, treatment, prevention, diagnosis, Alzheimer's Disease.											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2010/002251 A1 (HOOGERHOUT P. et al.) 7 January 2010 (07-01-2010)</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>POTTER P.E. "Investigational Medications for Treatment of Patients With Alzheimer Disease" J. Am. Osteopath. Assoc. September 2010 (09-2010), 110 (9 Suppl 8):S27-36). * Page S30*</td> <td>1-20</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 2010/002251 A1 (HOOGERHOUT P. et al.) 7 January 2010 (07-01-2010)	1-20	A	POTTER P.E. "Investigational Medications for Treatment of Patients With Alzheimer Disease" J. Am. Osteopath. Assoc. September 2010 (09-2010), 110 (9 Suppl 8):S27-36). * Page S30*	1-20
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	WO 2010/002251 A1 (HOOGERHOUT P. et al.) 7 January 2010 (07-01-2010)	1-20									
A	POTTER P.E. "Investigational Medications for Treatment of Patients With Alzheimer Disease" J. Am. Osteopath. Assoc. September 2010 (09-2010), 110 (9 Suppl 8):S27-36). * Page S30*	1-20									
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.											
<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="vertical-align: top;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family							
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family										
Date of the actual completion of the international search 2 May 2011 (02-05-2011)		Date of mailing of the international search report 19 May 2011 (19-05-2011)									
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476		Authorized officer Mostapha Bayaa (819) 994-6940									

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CA2011/000238**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

☐ on paper

☐ in electronic form

b. (time)

☐ in the international application as filed

☐ together with the international application in electronic form

☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments :

Although no separate "Sequence Listings" were filed, the sequences were disclosed in the description of the application.

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CA2011/000238**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons :

1. ☒ Claim Nos. : 12-14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :

Claims 12-14 are directed to a method for treatment or diagnosis of the human or animal body by surgery or therapy which the International Search Authority is not required to search. However, this Authority has carried out a search based on the alleged effects or purposes/uses of the product defined in claims 12-14.
2. ☐ Claim Nos. :
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically :
3. ☐ Claim Nos. :
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows :

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos. :
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos. :

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2011/000238

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO2010002251A1	07 January 2010 (07-01-2010)	AU2009266552A1	07 January 2010 (07-01-2010)
		CA2729414A1	07 January 2010 (07-01-2010)
		EP2297196A1	23 March 2011 (23-03-2011)

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.

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.

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.

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

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 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 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-lípidoA/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 epítipos 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™ discutidos en el Ejemplo 3 (con base en una fórmula Biacore™ empírica y asumiendo la estequiometría entre 5E3 y Ab42 es 1) está de acuerdo con el inmunoblot, e indica que la especie de Aβ (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 Aβ

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

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 Aβ en la forma tóxica de oligómero Aβ. La formación de oligómero Aβ se probó en ausencia de 5E3 ("C" en la figura 14) o en la presencia de 5E3 ("5E3" en la Figura 14). Aβ 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 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.

20

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.

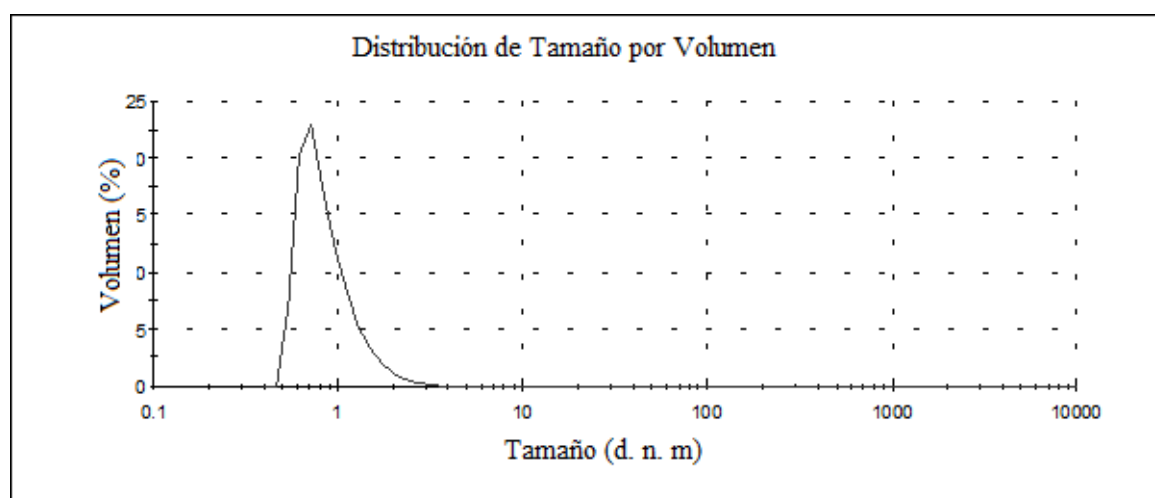


Fig. 1

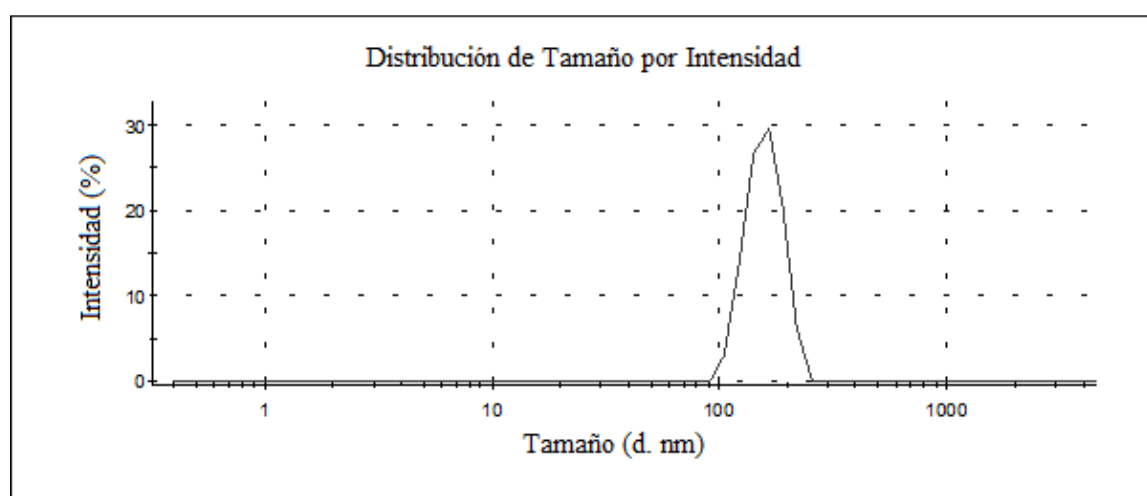


Fig. 2

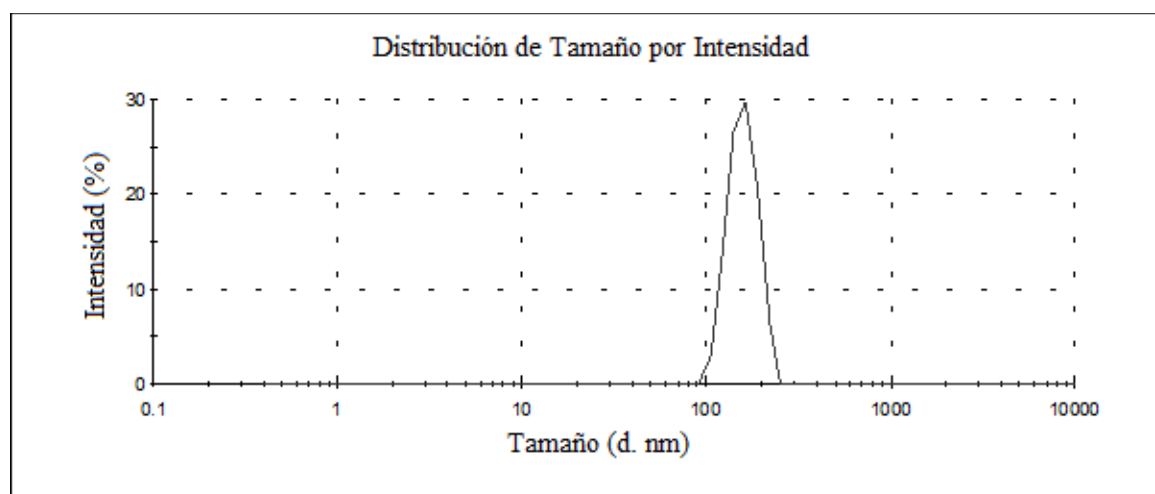


Fig. 3

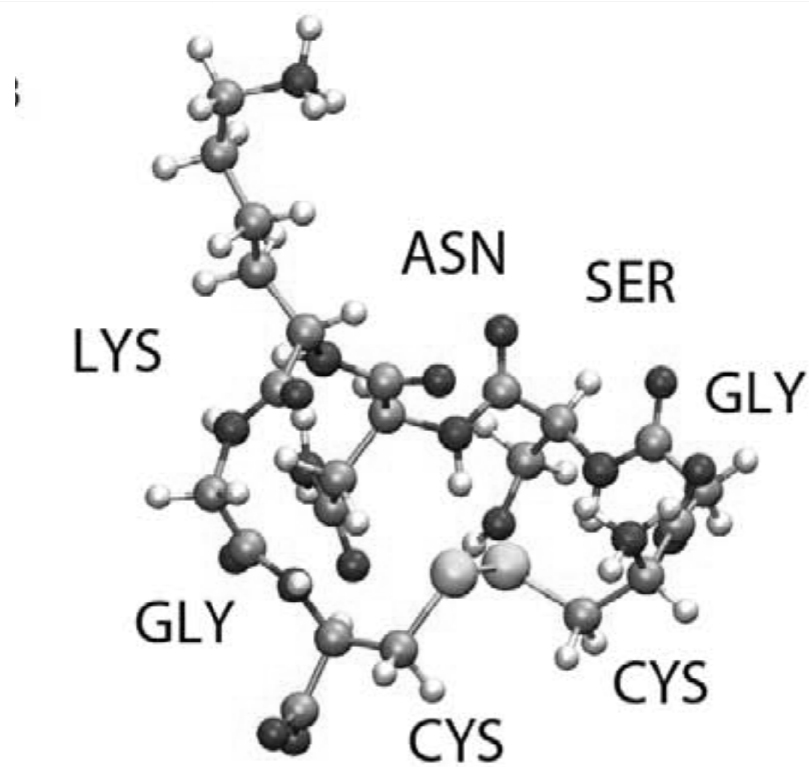


Fig. 4

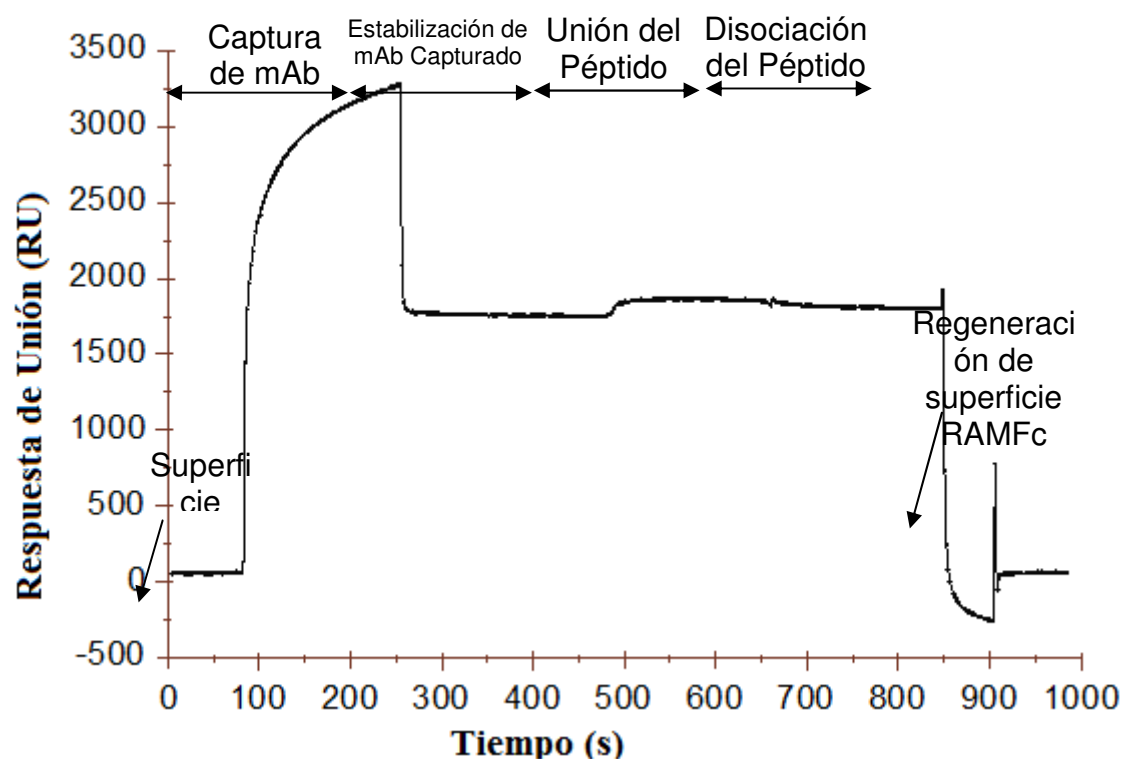


Fig.5

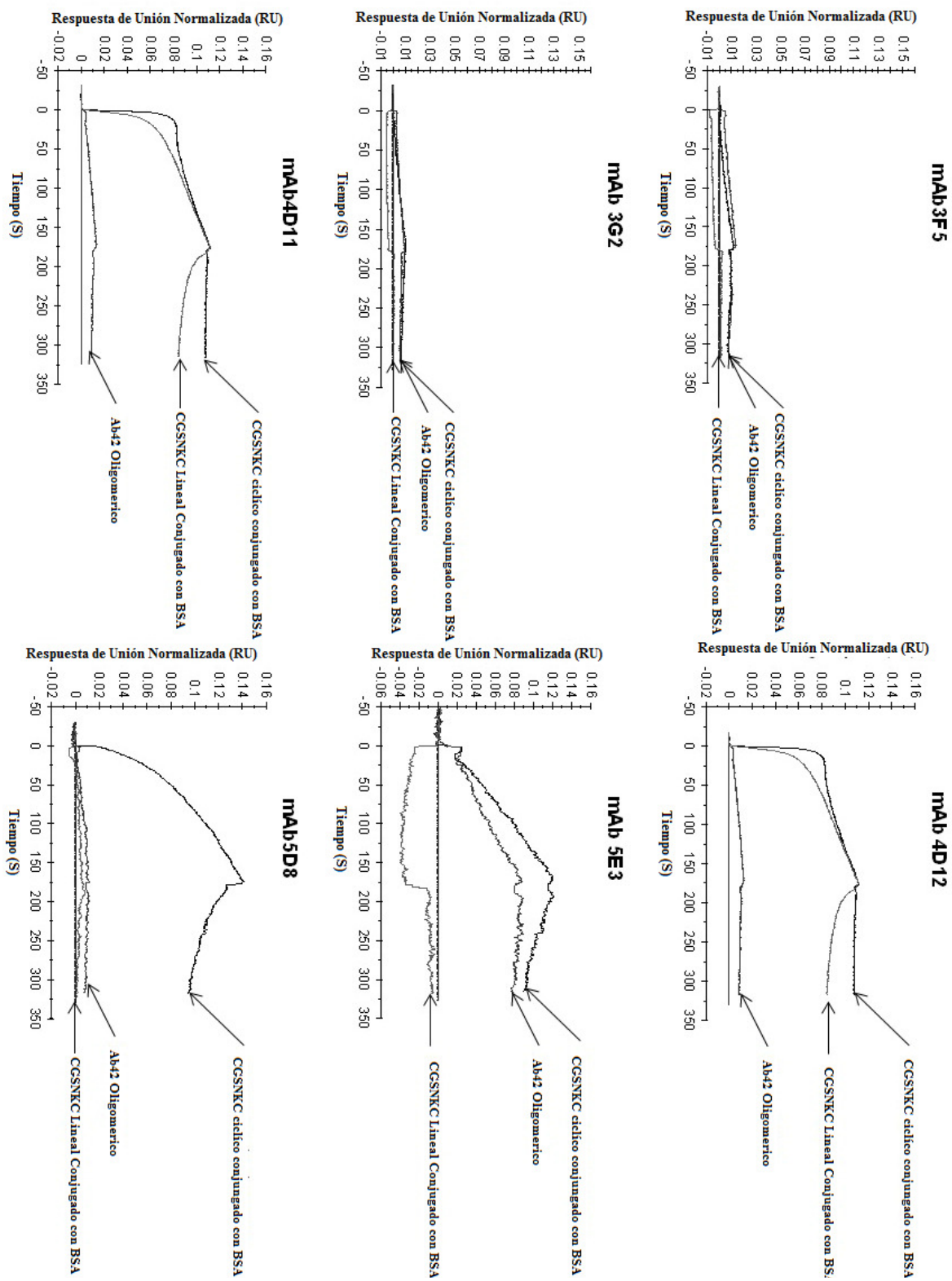


Fig. 6

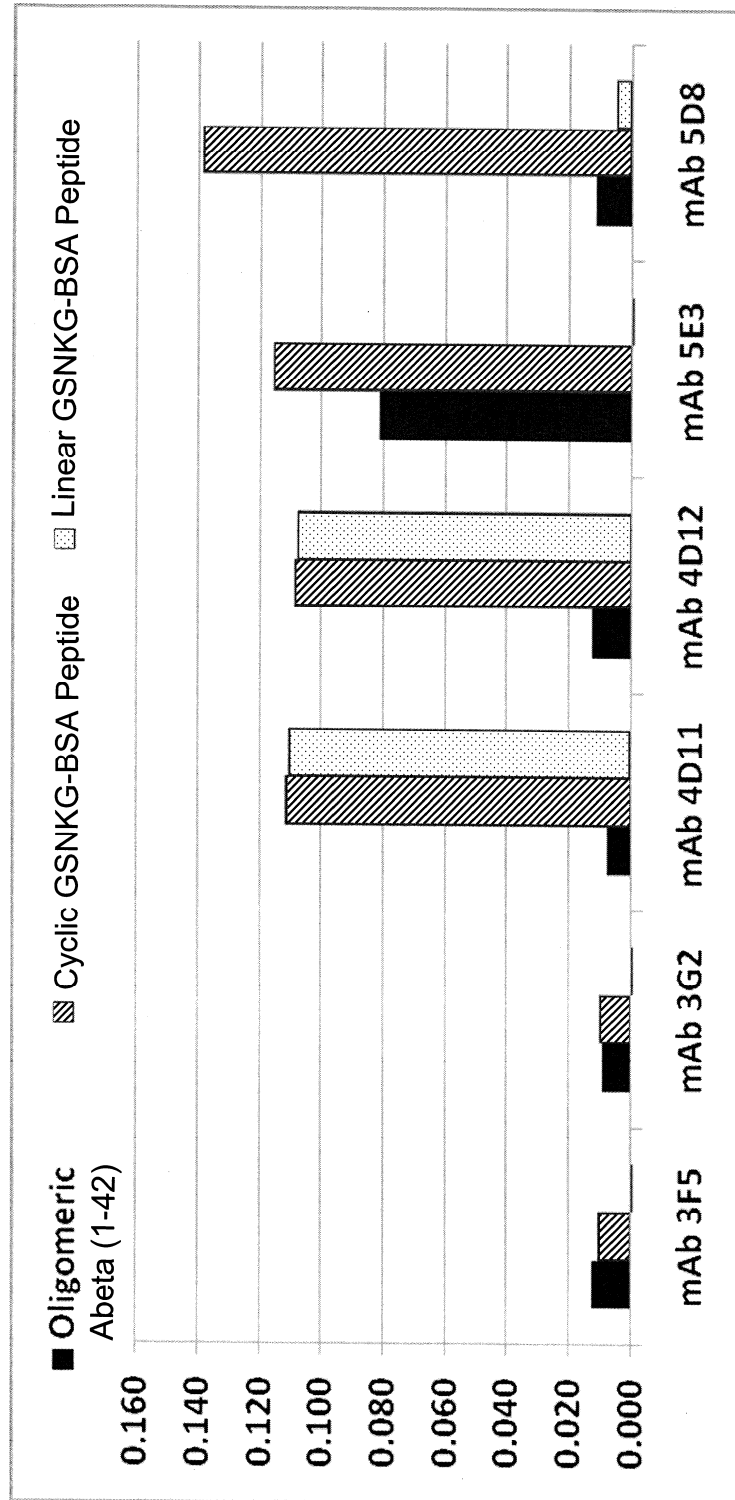


Fig. 7

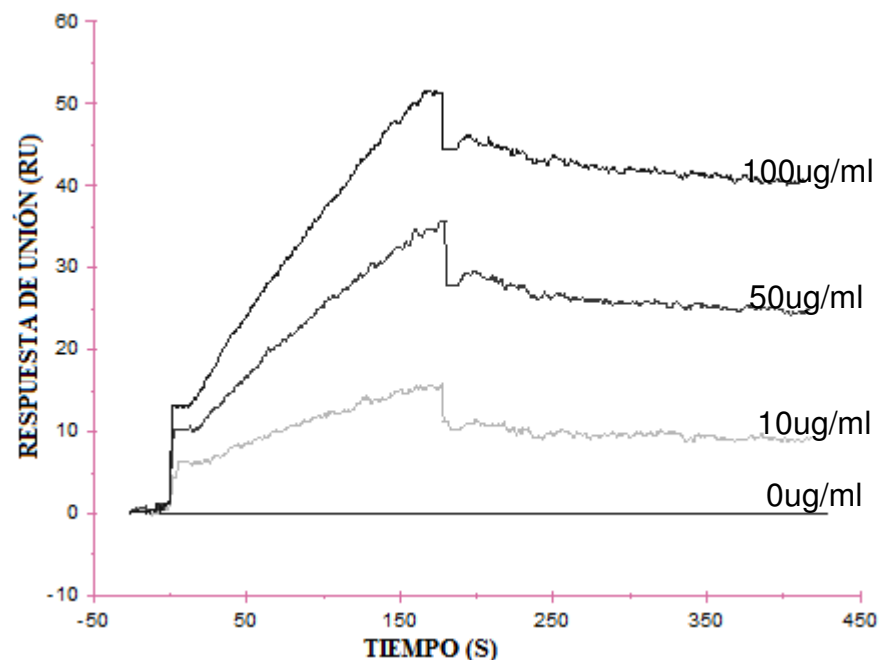
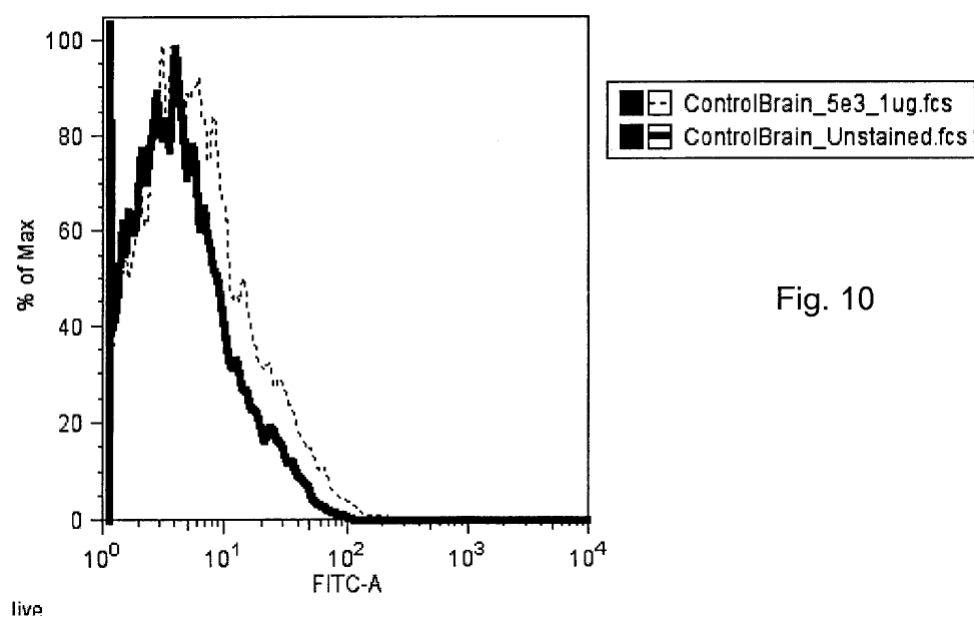
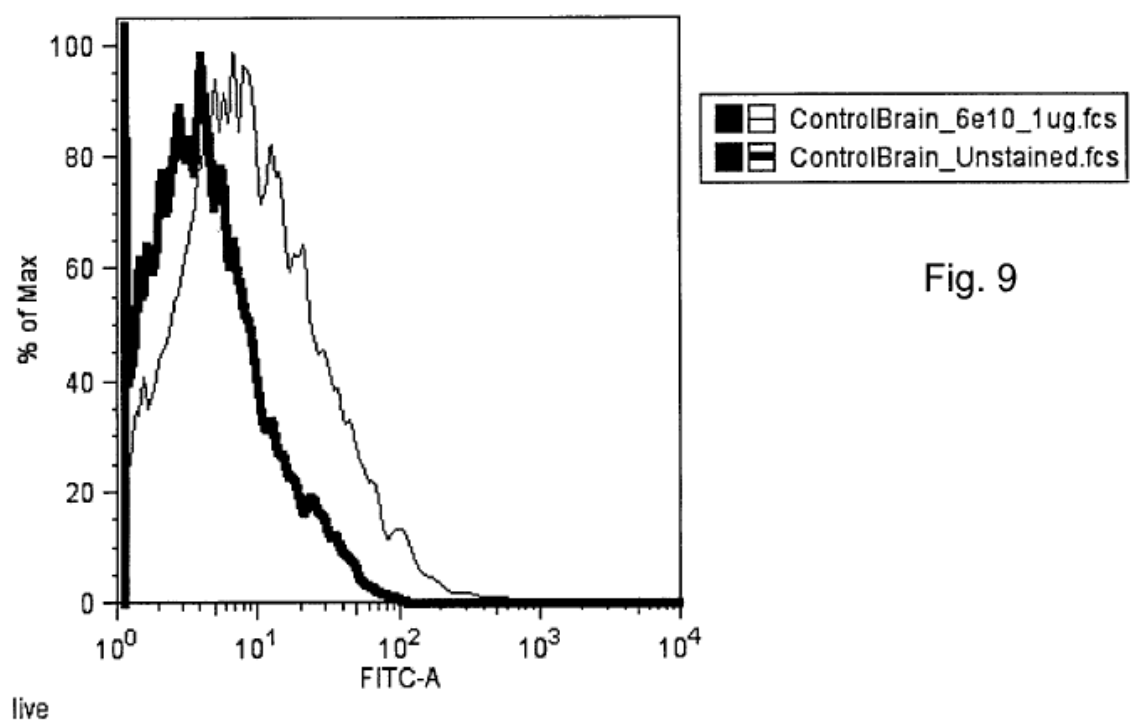


Fig. 8



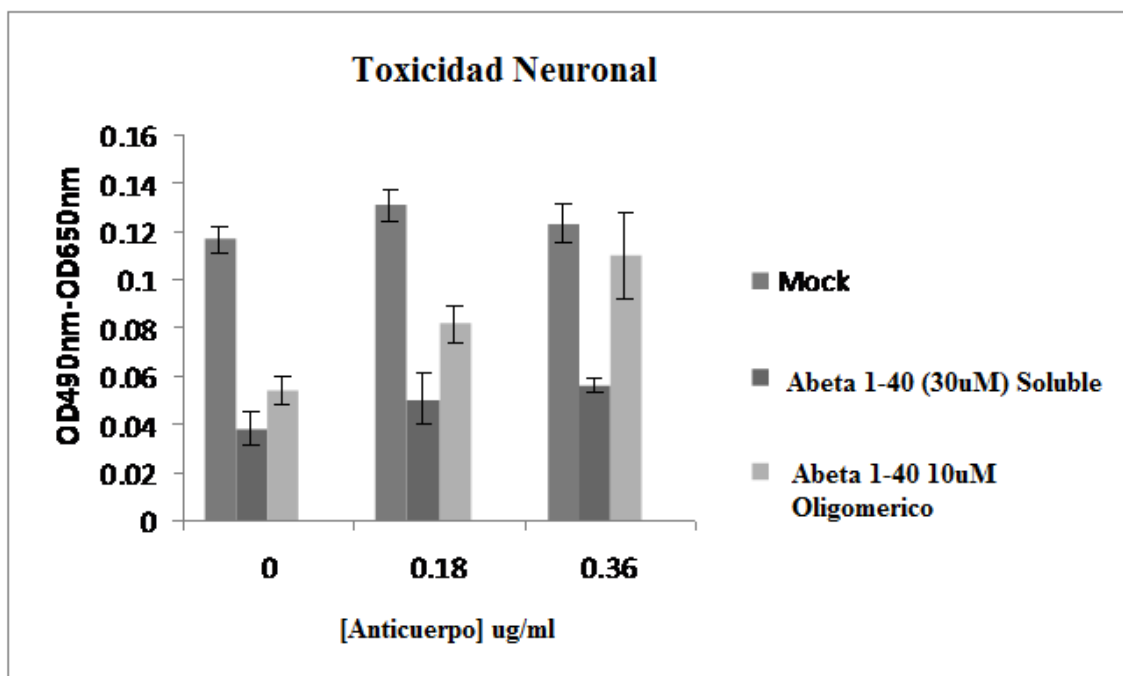


Fig. 11

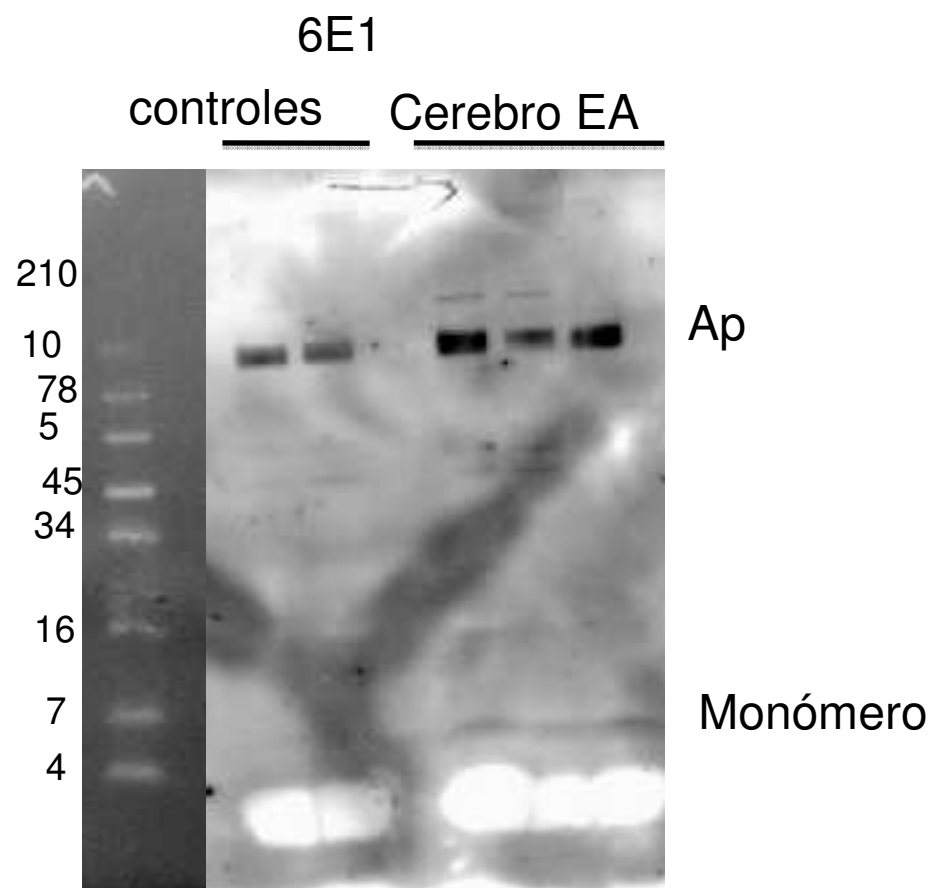


Fig. 12

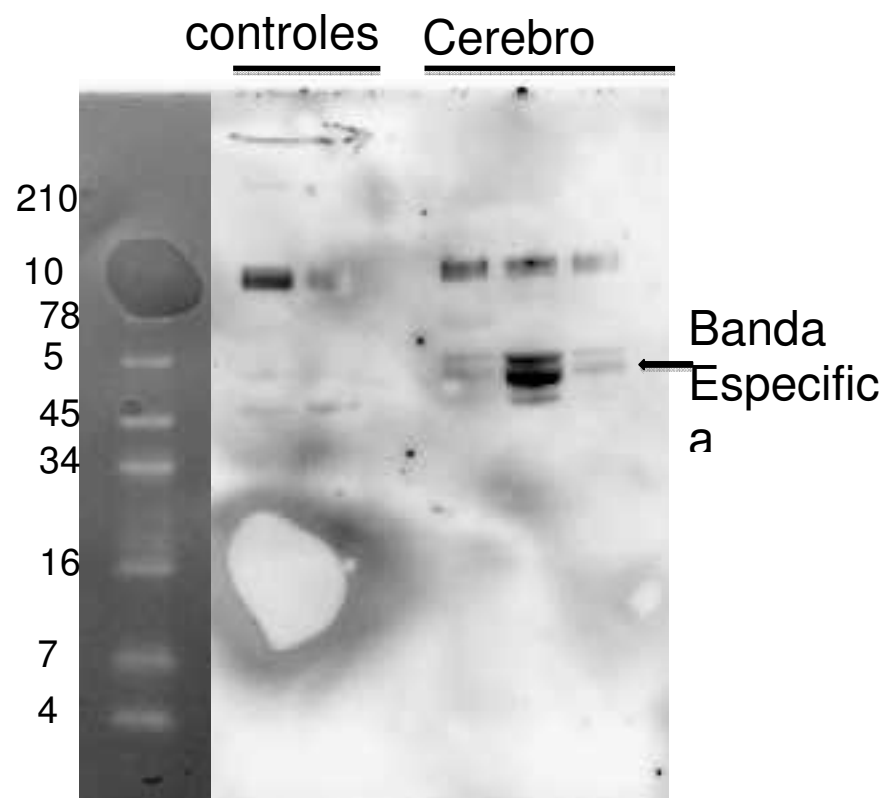


Fig. 13

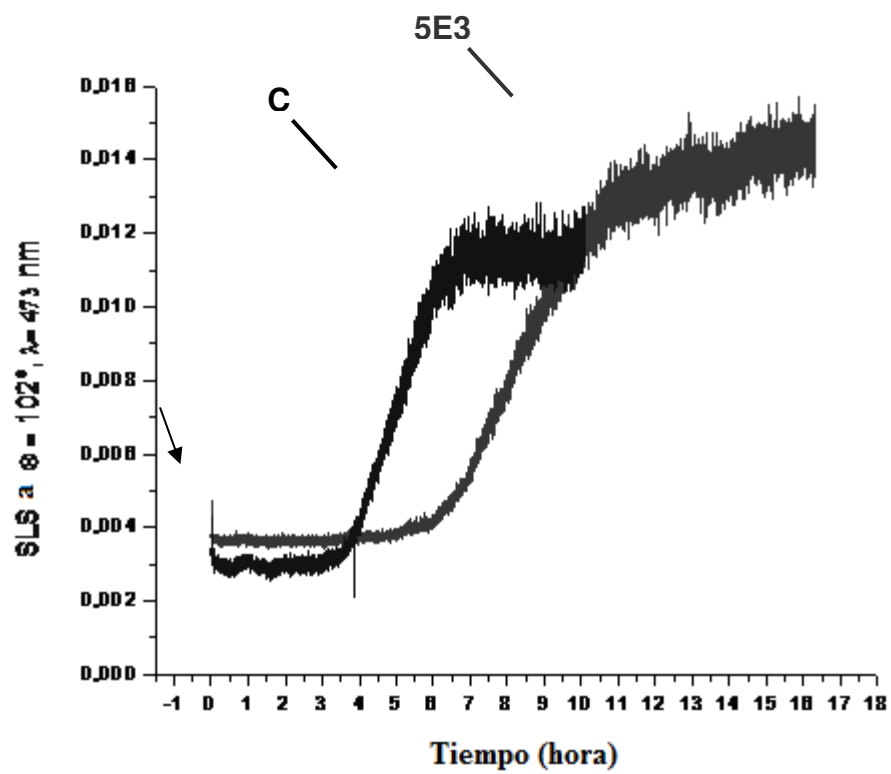


Fig. 14

SEQ ID NO: 4

H-IgH1st3prime 489 48 426 0.05

NNNNNNNNNTNNNNNNNNNNNNNANNATAGCCCTTGNNNNNGCATCCCA
GGGTCACCATGGAGTTAGTTTGGGCAGCAGATCCAGGGGCCAGTGGATAGACAG
ATGGGGGTGTCGTTTTGGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCCTTGGCCCCAGTA
GTGAGCCTCGTAATCCATCCTTGCACAGAAATAGACCGCAGAGTCCTCAGAGGTC
AATCTGCTGAGCTGCATGTAGGCTGTGCTGGAGGATTTGTCTGCAGTCAGTGTGG
CCTTGCCCTTGAACCTTCTCATTGTACTTAGTATTAACATTTCCAGGATAAATCCATC
CAATCCACTCAAGTCCCTGTCCAGGCCTGTGTATCACCCACTGTATATAGTAGCTT
GTGAATATGTAGCCAGAAGCCTTGCAGGATATCCTCACTGAAGCCCCAGGCTTCA
CCAGCTCAGGTCCAGACTCCTGCAGCTGCACCTCNNAATTNNNNNNN

SEQ ID NO: 5

H-IgH1st5prime 486 16 450 0.05

NNNNNNNNNTGGNGANCCTGGGGCTTCNGTGAGGANATCCTGCAAGGCTTCTGGC
TACATATTCACAAGCTACTATATACAGTGGGTGATACACAGGCCTGGACAGGGACT
TGAGTGGAATTGGATGGATTTATCCTGGAAATGTTAATACTAAGTACAATGAGAAGTT
CAAGGGCAAGGCCCACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAG
CTCAGCAGATTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGGATGGATTA
CGAGGCTCACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACG
ACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCCAAATAACTCCAT
GGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACC
TGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTNNNNAACCTTNNN

SEQ ID NO: 6

3prime Kappa

NNNNNNNNNNNGTTTNATTNNNGCTTGGTGCCTCCTCCGAACGTCCGAGGATAAT
TATGATATTGTAGACAGTTGTTGTCTGCACAATCTTCTCACTCAAGGGTGCTGATGG
GGAGAGAATAATCTGACACCCACCTACTGCCACTGAGCCTTTTTGGGACACCTCAA
TCTTGAGTGGAATGCGGCGTAAATCANGCGTTTAATAGTTCCGTCTGGTTTCTGCTG
AAGCCAGGTAAAGTAACCACTAATTTCTGACTTGCCCGACGAGTGAGACTGACTC
TTTCTCCCTCAGAGGCAGATAANGAGGATGGANACTGGGTCATCTGGATGTCACAT
CTGGTACCTGGNAACCNGANN CNCAAAAAANCAGCAA

SEQ ID NO: 7

5prime Kappa

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCNNGTCNNNTCCTCCTTATCTGCCTCTCTGGGAGAAA
AAGTCCGTCTCACTTGTGCGGGCAAGTCNAGAAATTAGTGCTTACTTAACCTGGCTT
CAGCAGAGACCCCATGGAACATTAGACGCCCGATCTAACCCCATCCTCTTTAGA
TTCTGGTGTCCCAAAAAGGGTCCCTGCCAGGATGTCTGGGTCAGATTATTCTATCA
ACATCACCATCCTTGAGTCTGAAGATTATGAAGACGATGCCTGTCTACAATATGGT
AATTATCCTCGGAAGTTCAGTGGAGGCAACGAGCTAGAAATCTAACAGGCTGATGC

TGCAACAACCTGTATCCATCTTCCCACCATCAGACCATCA

Fig. 15

PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL SEARCH REPORT
(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 101373W-90	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below	
International application No. PCT/CA2011/000238	International filing date (<i>day/month/year</i>) 03 March 2011 (03-03-2011)	(Earliest)Priority date (<i>day/month/year</i>) 03 March 2010 (03-03-2010)
Applicant THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA ET AL		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
 - a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).
 - c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I
2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (see Box No. II)
3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III)
4. With regard to the **title**,
 - ☐ the text is approved as submitted by the applicant
 - ☒ the text has been established by this Authority to read as follows :
Oligomer-specific amyloid beta epitope and antibodies.
5. With regard to the **abstract**,
 - ☐ the text is approved as submitted by the applicant
 - ☒ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority
6. With regard to the **drawings**,
 - a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 4
 - ☒ as suggested by the applicant
 - ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
 - ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
 - b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

☐ on paper

☐ in electronic form

b. (time)

☐ in the international application as filed

☐ together with the international application in electronic form

☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments :

Although no separate "Sequence Listings" were filed, the sequences were disclosed in the description of the application.

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons :

1. ☒ Claim Nos. : 12-14

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :

Claims 12-14 are directed to a method for treatment or diagnosis of the human or animal body by surgery or therapy which the International Search Authority is not required to search. However, this Authority has carried out a search based on the alleged effects or purposes/uses of the product defined in claims 12-14.

2. ☐ Claim Nos. :

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically :

3. ☐ Claim Nos. :

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows :

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos. :
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos. :

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Box No. IV

Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

A novel constrained peptide epitope derived from A β , wherein the epitope comprises the amino acid sequence SNK, related antibody compositions and methods of use. An isolated antibody that specifically binds to a cyclic peptide comprising the conformational epitope which comprises the amino acid sequence SNK and corresponding to a solvent-exposed, antibody accessible knuckle region of oligomeric A β is described. An antigenic peptide comprising an epitope having a constrained cyclic configuration, which comprises the amino acid sequence SNK and corresponding to a solvent-exposed, antibody accessible knuckle region of oligomeric A β is also described. Methods of treating, preventing and diagnosing Alzheimer's disease are also described.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2011/000238

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C07K 14/47</i> (2006.01) , <i>A61K 39/00</i> (2006.01) , <i>A61K 39/395</i> (2006.01) , <i>A61P 25/28</i> (2006.01) , <i>A61P 37/04</i> (2006.01) , <i>C07K 16/18</i> (2006.01) , <i>C12N 15/13</i> (2006.01) , <i>G01N 33/53</i> (2006.01) . According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>C07K 14/47</i> (2006.01) , <i>A61K 39/00</i> (2006.01) , <i>A61K 39/395</i> (2006.01) , <i>A61P 25/28</i> (2006.01) , <i>A61P 37/04</i> (2006.01) , <i>C07K 16/18</i> (2006.01) , <i>C12N 15/13</i> (2006.01) , <i>G01N 33/53</i> (2006.01) . Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched														
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Scopus, Pubmed, TotalPatent, Canadian Patent Database, GQPAT, GeneSeq Protein, Uniprot, RefSeq, GenPept, IPI, IGBLAST Protein, PDB protein, ENSEMBL. Keywords: antibody, amyloid beta (Aβ), cyclic, peptide, conformational, epitope, knuckle region, solvent-exposed, oligomer(ic), SNK, treatment, prevention, diagnosis, Alzheimer's Disease.														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2010/002251 A1 (HOOGERHOUT P. et al.) 7 January 2010 (07-01-2010)</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>POTTER P.E. "Investigational Medications for Treatment of Patients With Alzheimer Disease" J. Am. Osteopath. Assoc. September 2010 (09-2010), 110 (9 Suppl 8):S27-36). * Page S30*</td> <td>1-20</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 2010/002251 A1 (HOOGERHOUT P. et al.) 7 January 2010 (07-01-2010)	1-20	A	POTTER P.E. "Investigational Medications for Treatment of Patients With Alzheimer Disease" J. Am. Osteopath. Assoc. September 2010 (09-2010), 110 (9 Suppl 8):S27-36). * Page S30*	1-20			
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	WO 2010/002251 A1 (HOOGERHOUT P. et al.) 7 January 2010 (07-01-2010)	1-20												
A	POTTER P.E. "Investigational Medications for Treatment of Patients With Alzheimer Disease" J. Am. Osteopath. Assoc. September 2010 (09-2010), 110 (9 Suppl 8):S27-36). * Page S30*	1-20												
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.														
<table border="1"> <tr> <td>* Special categories of cited documents :</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents :	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
* Special categories of cited documents :	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention													
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone													
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art													
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family													
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means														
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
Date of the actual completion of the international search 2 May 2011 (02-05-2011)		Date of mailing of the international search report 19 May 2011 (19-05-2011)												
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476		Authorized officer Mostapha Bayaa (819) 994-6940												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2011/000238

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO2010002251A1	07 January 2010 (07-01-2010)	AU2009266552A1 CA2729414A1 EP2297196A1	07 January 2010 (07-01-2010) 07 January 2010 (07-01-2010) 23 March 2011 (23-03-2011)

CAPÍTULO REIVINDICATORIO MODIFICADO

-Solicitud Divisional A-

1. Un péptido antigénico cíclico que comprende un epítopo que tiene una configuración cíclica, en donde el epítopo comprende una secuencia de aminoácidos de al menos SNK, en donde la K (lisina) está expuesta a disolvente, en donde el epítopo que tiene SNK contiene como máximo 7 residuos de aminoácidos, y en donde el epítopo corresponde a una región expuesta a disolvente, “región de nudillo” de acceso a anticuerpos del A β oligomérico.
2. El péptido antigénico de la Reivindicación 1 que comprende un epítopo que tiene una configuración cíclica, en donde el epítopo 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 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 epítopo que tiene una configuración cíclica 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 epítopo que tiene una configuración cíclica 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 .
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 3 a 6, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
12. Un kit que comprende al anticuerpo aislado de cualquiera de las Reivindicaciones 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.
