

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 259 270**

21 Número de solicitud: 200500550

51 Int. Cl.:
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C12N 5/18 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **09.03.2005**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.2006**

Fecha de la concesión: **25.09.2007**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **01.11.2007**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

73 Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Méndez, Enrique**

74 Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

54 Título: **Método de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer mediante un anticuerpo monoclonal.**

57 Resumen:

Método de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer mediante un anticuerpo monoclonal. Dicho anticuerpo es capaz de unirse al menos a los aminoácidos 12-16 del péptido β -amiloide, detectando específicamente las placas neuríticas, características de la enfermedad de Alzheimer, sin detectar placas difusas, que no son definitorias de la enfermedad. Dentro de las placas neuríticas, el anticuerpo monoclonal permite detectar un subgrupo que se diferencia en la composición de las diferentes isoformas de péptido β -amiloide depositadas, lo que se asocia con el estadio de progresión de la enfermedad. Por ello, el anticuerpo monoclonal de la invención, su método de obtención y las composiciones que lo contienen son de utilidad en el diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer y en la determinación del estadio de progresión de la enfermedad en un paciente.

ES 2 259 270 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Método de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer mediante un anticuerpo monoclonal.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al diagnóstico de trastornos neurológicos, especialmente al diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer mediante un anticuerpo capaz de interactuar con péptidos específicos asociados con dicha enfermedad.

10 **Antecedentes de la invención**

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurológico que provoca la muerte de las células nerviosas del cerebro. Por lo general, progresa paulatinamente, comenzando después de los 50 años, y sus primeros síntomas pueden atribuirse a la vejez o al olvido común. A medida que avanza la enfermedad, se van deteriorando las capacidades cognitivas, entre ellas, la capacidad para tomar decisiones y llevar a cabo las tareas cotidianas, y pueden surgir modificaciones de la personalidad, así como conductas problemáticas. En sus etapas avanzadas, la EA conduce a la demencia y finalmente a la muerte. La enfermedad es actualmente incurable y constituye una causa importante de mortalidad.

En la actualidad, el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer se realiza normalmente a través del cuadro clínico, pues el diagnóstico definitivo sólo puede llevarse a cabo mediante un estudio histológico de muestras cerebrales (autopsia o biopsia), que revele la presencia en el tejido cerebral de sus rasgos característicos. Debido a la peligrosidad de la práctica de biopsias cerebrales en pacientes vivos, este procedimiento se utiliza muy raramente, por lo que se estima que la tasa de errores en el diagnóstico *in vivo* de esta enfermedad ronda el 20%-30%.

Los cerebros de los individuos que padecen enfermedad de Alzheimer muestran dos marcadores patológicos principales: degeneración neurofibrilar (que se identifica por la presencia de ovillos neurofibrilares, neuritas distróficas y hebras del neuropilo) y depósitos de sustancia amiloide (es decir, depósitos del denominado péptido β -amiloide, abreviado generalmente como $A\beta$), tanto en forma de placas (placas difusas y placas neuríticas, formas estas últimas características de la enfermedad, que se denominan así por aparecer entre y dentro de las neuronas), como en forma de depósitos vasculares (que aparecen en las paredes de los vasos sanguíneos cerebrales). Tanto la degeneración neurofibrilar como la deposición amiloide representan procesos degenerativos asociados también al envejecimiento normal del cerebro. En los sujetos de avanzada edad que no padecen demencia, el péptido $A\beta$ se deposita principalmente en forma de placas difusas. Este tipo de depósito es especialmente intenso en algunos sujetos con capacidades cognitivas normales, y para algunos autores representa un proceso de "envejecimiento patológico", que se considera que está a medio camino entre el envejecimiento normal del cerebro y la EA [1]. Un desarrollo particularmente intenso y prematuro de placas difusas años antes de que aparezcan las placas neuríticas tiene lugar también en el síndrome de Down (SD), debido a una trisomía del cromosoma 21 que conduce a una sobreexpresión de la proteína precursora amiloide (β -APP). Aunque se puede observar un pequeño número de placas neuríticas en cerebros de sujetos con capacidades cognitivas normales, tanto los cerebros afectados por EA como los afectados por SD en edades avanzadas se caracterizan por el desarrollo de una gran cantidad de placas neuríticas maduras [2, 3]. En contraste con las placas difusas, que contienen una forma no fibrilar de $A\beta$ (denomina "preamiloide") [4], tanto los depósitos amiloides vasculares como las placas neuríticas contienen péptido $A\beta$ en forma fibrilar y reaccionan con tinciones de sustancia amiloide tales como el Rojo Congo y la Tioflavina T.

El declive cognitivo en la EA se correlaciona de forma lineal con la progresión de los cambios neurofibrilares y la pérdida de sinapsis corticales [5]. No se ha observado pérdida local de sinapsis asociada a las placas difusas [6]. En contraste, las placas neuríticas están asociadas con pérdida de densidad sináptica, cambio neurofibrilar y activación de la microglía [7]. Tanto el cambio neurofibrilar puro como la deposición de $A\beta$ siguen en la EA patrones secuenciales de progresión bien establecidos [8, 9]. Sin embargo, aunque el grado de declive cognitivo se correlaciona mejor con una sucesión de etapas basadas en el cambio neurofibrilar [5], el diagnóstico neuropatológico definitivo de la EA se basa todavía en la demostración histológica de una densidad significativamente mayor de placas neuríticas en las regiones neocorticales asociativas, con respecto a lo esperado según el grupo de edad del paciente, dentro de un cuadro clínico de demencia (criterios de consenso del CERAD: *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*) [10]. La formación de placas neuríticas representa el proceso patogénico central en la EA, y la composición molecular de estos depósitos β -amiloides y las diferencias con las placas difusas en lo que a dicha composición se refiere es, en consecuencia, uno de los principales campos de interés en la investigación actual sobre la EA.

El conocimiento que se posee sobre la composición molecular de los depósitos β -amiloides en el tejido cerebral de pacientes con enfermedad de Alzheimer ha cambiado radicalmente a lo largo de los últimos años. Varios estudios que empleaban métodos bioquímicos o inmunohistoquímicos con el fin de identificar diferentes formas del péptido $A\beta$ han aportado una imagen bastante consistente que permite una interpretación molecular de los hallazgos morfológicos clásicos. Estos estudios son los que han proporcionado las bases de la teoría patogénica unitaria de la enfermedad denominada hipótesis amiloide [11], aunque la hipótesis original se ha reformulado recientemente con el fin de incluir el papel emergente de los oligómeros $A\beta$ solubles como los principales agentes patógenos [12]. La suposición de un papel patógeno central y primario de los péptidos $A\beta$ en la EA está dando lugar en la actualidad a nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a la prevención o eliminación de estos depósitos.

La distribución topográfica y secuencia temporal de la deposición de péptidos $A\beta$ conocidos en cerebros afectados por EA se ha dilucidado con la ayuda de anticuerpos dirigidos al extremo carboxilo, al extremo amino o a segmentos internos de la molécula $A\beta$, junto con el aislamiento y purificación de isoformas de $A\beta$ por medio de métodos bioquímicos. La distribución tisular de péptidos caracterizados por los rasgos de sus extremos carboxilo muestra un patrón bastante regular y bien definido. Mientras que $A\beta_{x-40}$ es la forma predominante en los depósitos vasculares y es la forma principal que se encuentra en el LCR (líquido cefalorraquídeo), $A\beta_{x-42}$ es la forma principal detectada en los depósitos de tejido cerebral (placas difusas y neuríticas) [13]. En la EA, el síndrome de Down (SD) [13, 14] y el envejecimiento normal [1] $A\beta_{x-42}$ es el único componente de las placas difusas y el componente principal de las placas neuríticas. Estas últimas también pueden contener $A\beta_{x-40}$, predominantemente en la región de su núcleo central. También se ha establecido que $A\beta_{x-42}$ es la forma que se deposita en las fases iniciales.

Aunque inicialmente se creía que $A\beta_{x-40}$ y $A\beta_{x-42}$ comenzaban casi en su totalidad en el aminoácido Asp1, está bien establecido inmunohistoquímicamente y bioquímicamente que una amplia variedad de isoformas heterogéneas del péptido $A\beta$, modificadas y truncadas en el extremo amino, participan en la composición de las placas tanto difusas como neuríticas [15]. Estas isoformas tienden a mostrar también un patrón regular de distribución entre las placas difusas y neuríticas, de forma que finalmente ha comenzado a surgir una imagen completa de la distribución topográfica de los diferentes péptidos $A\beta$. Sin embargo, existen todavía algunas discrepancias entre los estudios, particularmente con respecto a las características del extremo amino de los péptidos que componen las placas difusas, y la cantidad relativa de carga amiloide que representa cada uno de ellos.

Estas discrepancias implican particularmente al péptido p3 ($A\beta_{17-42}$). Mientras que algunos estudios sugieren que $A\beta_{17-42}$ puede ser el principal componente de las placas difusas [16], otros han encontrado una cantidad relativamente mayor de formas más largas (que comienzan en Asp1, o truncadas en el extremo amino u otras isoformas modificadas) a este nivel [15]. Puesto que $A\beta_{17-42}$ se genera mediante la escisión de β -APP por la α -secretasa (la denominada ruta no amiloidogénica) y muestra propiedades físico-químicas bastante diferentes de las isoformas más largas de $A\beta$ (estas últimas generadas mediante la escisión de β -APP por la γ -secretasa), su presencia selectiva en placas difusas puede tener un significado patogénico crucial en la evolución de las placas.

Gowing *et al.* [17] fueron los primeros en aislar el péptido $A\beta_{17-42}$ como la forma predominante recuperada de cerebros afectados por EA ricos en placas difusas. Este depósito no se encontró, ni en depósitos amiloides vasculares, ni en placas neuríticas. El anticuerpo monoclonal comercial 6E10, que reconoce $A\beta_{1-17}$, no produjo la inmunotinción de placas difusas, ni neocorticales, ni cerebelosas, en una serie de cerebros afectados por EA y SD [18]. Sin embargo, el cuerpo estriado, donde las placas difusas son particularmente abundantes en ausencia de placas neuríticas, mostró algunas placas positivas para el anticuerpo 6E10. Utilizando determinaciones por HPLC e inmunohistoquímica, Lalowski *et al.* [19] demostraron que $A\beta_{17-42}$ representa un 70% del contenido amiloide total en placas difusas del cerebelo, mientras que $A\beta_{1-42}$ representa un 12% y otras formas truncadas de $A\beta_{x-42}$ un 5% o menos. En cerebros de personas de edad avanzada y afectados por SD, Saido *et al.* [20] encontraron una tinción mayor de placas difusas con un anticuerpo específico anti- $A\beta$ N3 (piroGlu) que con un anticuerpo anti- $A\beta$ N(1). Iwatsubo *et al.* [15] estudiaron placas difusas en una serie de cerebros de personas de edad avanzada, afectados por EA y afectados por SD con un panel de anticuerpos dirigidos a reconocer formas de $A\beta$ truncadas y modificadas en el extremo amino. Este estudio es único por el hecho de que el tejido cerebral empleado para el estudio inmunohistoquímico se fijó o en etanol al 70%, o en formaldehído al 4%, de forma que se podía ensayar el efecto sobre la aparición de artefactos de la fijación rutinaria con formaldehído. En todas las muestras de tejido fijadas en etanol al 70%, las placas difusas se tiñeron intensamente por la presencia de $A\beta$ N1 (L-Asp), $A\beta$ N1 (L-isoAsp), $A\beta$ N1 (D-Asp), $A\beta$ N3 (piroGlu), y $A\beta_{x-42}$. Se obtuvo una inmunotinción débil con $A\beta$ N11 (piroGlu) y $A\beta$ N17. Sin embargo, en el material fijado en formaldehído algunas placas difusas se tiñeron con $A\beta$ N1 (L-Asp), y no se obtuvo ninguna tinción con $A\beta$ N1 (L-isoAsp) o $A\beta$ N1 (D-Asp), mientras que el patrón de tinción para el extremo carboxilo permaneció sin cambios. Aunque los autores demostraron que la modificación del extremo amino puede alterar los resultados de la inmunotinción en tejidos fijados en formaldehído, obtuvieron una reactividad débil para el $A\beta$ N17 incluso en material fijado en etanol. Utilizando un anticuerpo monoclonal específico para p3 ($A\beta_{17-42}$) [16], encontraron deposición de este péptido limitada en gran medida a las placas difusas, las neuritas distróficas y las coronas de placas neuríticas en las regiones de las amígdalas, el hipocampo y el parahipocampo. Los autores sugieren un papel específico de p3 en la deposición inicial de sustancia amiloide y en el origen de las placas neuríticas. Tekirian *et al.* [21], en una serie de cerebros afectados por EA y de control, demostraron la presencia en las placas difusas de $A\beta$ N3 (pE) > $A\beta$ N1 (D) > $A\beta$ N17 (L) > $A\beta$ N1 (rD).

En cuanto a la variabilidad en el extremo carboxilo, Parvathy *et al.* [22], en un estudio que empleaba anticuerpos dirigidos contra $A\beta_{x-40}$, $A\beta_{x-42}$ o $A\beta_{x-43}$, encontraron un subgrupo de placas neuríticas reactivas sólo frente al anticuerpo $A\beta$ C40 y un subgrupo mayor de placas reactivas tanto frente a $A\beta$ C40 como frente a $A\beta$ C42.

Los estudios previos han establecido así que las placas difusas muestran un perfil de $A\beta$ altamente específico en el extremo carboxilo y un perfil bastante específico en el extremo amino, este último sometido a alguna heterogeneidad entre los pacientes y entre diferentes regiones del cerebro. La presencia de $A\beta_{17-42}$ parece estar limitada en gran medida a las placas difusas, aunque hay una gran variación entre los estudios con respecto a los contenidos relativos de este péptido más corto en las mismas. En los estudios realizados por Kida *et al.* [18], no se obtuvo ninguna tinción para péptidos $A\beta$ que incluían la secuencia 12-16 en placas difusas de regiones corticales y subcorticales.

Tomándolos en conjunto, los resultados del Estado de la Técnica (ET) sugieren que, como propuso Lamer [23], las formas del péptido $A\beta$ específicas según el extremo amino pueden jugar un papel esencial en la evolución de las placas

difusas para convertirse en placas neuríticas. Por ello, los anticuerpos capaces de detectar específicamente formas con el extremo amino truncado y, con ello, diferenciar claramente entre las placas difusas y las placas neuríticas son de gran utilidad como herramientas en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. De entre ellos, serían de especial utilidad aquellos capaces de diferenciar subgrupos de placas neuríticas según la proporción de las distintas formas de péptido amiloide que se diferencian en el aminoácido en el que acaba el extremo carboxilo, en especial si fueran capaces de permitir definir subconjuntos de placas que constituyeran un marcador específico de la enfermedad. El anticuerpo monoclonal de la invención, dirigido contra la secuencia constituida por los aminoácidos 12-16 del péptido β -amiloide y con una mayor afinidad por la forma A β 42 que por A β 40, cumple ambas características.

Se han descrito otros anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra la zona cercana al extremo amino del péptido β -amiloide, así como su utilización en métodos diagnósticos relacionados con la EA. Así, por ejemplo, en la patente norteamericana US-4.666.829 se describe la obtención de un anticuerpo monoclonal generado frente a una porción del péptido amiloide más cercana al extremo amino. En concreto, se preparó un péptido sintético consistente en los diez primeros residuos de dicho péptido (Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr), representando por SEQ ID NO: 1. El epítipo reconocido por este anticuerpo estará incluido en estos aminoácidos 1 a 10, mientras que el anticuerpo reivindicado en la presente invención reconoce al menos el epítipo que comprende los aminoácidos del 12 al 16. Además de diferir en la secuencia específica que reconoce este anticuerpo monoclonal con respecto al de la presente invención, también es diferente el diseño del método diagnóstico propuesto, pues lo que se determina es exclusivamente la unión de los anticuerpos utilizados a lo que en esa patente se considera el péptido característico de la enfermedad de Alzheimer, el constituido por los aminoácidos 1 a 28 del péptido amiloide, no considerándose la unión a otras formas del péptido de diferentes longitudes y/o con variaciones en los extremos amino y carboxilo.

Por otra parte, en la solicitud de patente PCT WO 90/12871 se describe la preparación del anticuerpo monoclonal denominado SV17-6E10. La generación de este anticuerpo se produce por inmunización con la secuencia peptídica Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Gln-Val-His-His-Gln-Lys-Leu, representada por SEQ ID NO: 2, que podría considerarse equivalente a la de los aminoácidos 1 a 17 del péptido amiloide. Otro anticuerpo monoclonal dirigido contra la zona en la que se incluyen los aminoácidos 1 a 17 es el ya mencionado anticuerpo monoclonal comercial 6E10 que, según figura en la descripción de la hoja técnica correspondiente al producto, http://www.alexis_corp.com/monoclonal:antibodies-SIG-9320/opfa.1.1.SIG-9320.386.4.1.html, específicamente, dentro de los aminoácidos 1 a 17 del péptido β -amiloide, reconoce el epítipo comprendido entre los aminoácidos 3 a 8. Este epítipo corresponde a una zona diferente y más cercana al extremo amino que la del anticuerpo monoclonal EM5 de la invención. Aunque es capaz de producir una tinción diferencial de las placas neuríticas y los depósitos vasculares, sin teñir las placas difusas, este anticuerpo no parece presentar diferencias de afinidad entre los péptidos A β 42 y A β 40.

Por tanto, el anticuerpo monoclonal de la invención, al que se ha denominado EM5, constituye una herramienta novedosa, porque reconoce al menos un epítipo no reconocido por ninguno de los anticuerpos descritos en el estado de la técnica conocido, en la secuencia del péptido β -amiloide. El anticuerpo de la invención, por consiguiente, es útil para su aplicación en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Detecta específicamente placas neuríticas sin detectar placas difusas, que no están asociadas a la enfermedad de forma específica. Dentro de las placas neuríticas, el anticuerpo monoclonal de la invención permite detectar un subgrupo de placas neuríticas que se diferencia en la composición molecular de las mismas con respecto a los depósitos de péptido β -amiloide.

Sumario de la invención

La invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que reconoce en el péptido β -amiloide el epítipo correspondiente a la secuencia:

Val-His-His-Gln-Lys

(SEQ ID NO: 3)

y es capaz de unirse a isoformas del péptido β -amiloide que contengan dicha secuencia, independientemente de que el péptido se encuentre en forma soluble, agregada o desnaturalizada por SDS, aunque mostrando una afinidad mayor por la isoforma A β 42 que por la isoforma A β 40.

La invención se refiere también a fragmentos del citado anticuerpo capaces también de unirse a isoformas del péptido β -amiloide que contengan dicha SEQ ID NO: 3.

La invención se refiere también a una línea celular de hibridoma capaz de producir el anticuerpo monoclonal anteriormente descrito y a un método de producir dicho anticuerpo mediante la obtención de una línea celular de hibridoma y el cultivo de dicha línea celular en condiciones que permitan la producción del anticuerpo monoclonal.

Adicionalmente, la invención se refiere a una composición que contenga el anticuerpo de la invención o al menos un fragmento suyo capaz de unirse a SEQ ID NO: 3 y su uso para detectar isoformas del péptido β -amiloide que contengan SEQ ID NO: 3.

Por último, la invención se refiere a un método de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer basado en la detección de isoformas del péptido β -amiloide mediante el uso del anticuerpo de la invención, o de al menos un fragmento suyo capaz de unirse a SEQ ID NO: 3, estando el anticuerpo o el fragmento suyo acoplados a una sustancia

capaz de permitir su detección. Los anticuerpos policlonales EM2 y EM3, desarrollados también por el grupo de los inventores, pueden utilizarse también como herramienta complementaria en el método de diagnóstico de la invención.

Breve descripción de las figuras

5

La Fig. 1 muestra las curvas de unión de los anticuerpos EM5 (parte superior) y 6E10 (parte inferior) a péptidos A β inmovilizados. Se muestran los resultados correspondientes a distintas concentraciones (abscisas; en concentración nM) de los anticuerpos tanto frente al péptido A β 40 (símbolos rellenos) como frente al péptido A β 42 (símbolos vacíos), en ambos casos agregado (Δ) o sin agregar (\square). Cada punto representa la media de experimentos realizados por triplicado. En ordenadas se representa la densidad óptica (D.O) a 450 nm.

10

La Fig. 2 muestra el resultado de los análisis por inmunotransferencia de los anticuerpos EM2, EM3 y EM5 frente a péptidos sintéticos A β 1-40 y A β 1-42.

15

La Fig. 3 muestra en su parte superior, un diagrama de barras referente a la reactividad de EM5 frente a series de péptidos A β sintéticos mediante ELISA, con los valores de absorbancia (D.O. a 450 nm) correspondientes a 20 μ g/ml de anticuerpo. En la parte inferior se indica la localización del epítipo reconocido por EM5 según los resultados obtenidos en este ELISA. 1-28R = A β ₁₋₂₈ de roedor. Entre paréntesis, diferentes mutaciones.

20

La Fig. 4 muestra la localización del epítipo del péptido A β reconocido por el anticuerpo monoclonal EM5 según se determinó mediante análisis de Espectrometría de Masas del péptido β -amiloide inmunoprecipitado digerido con diferentes enzimas proteolíticas indicadas en la Tabla de la descripción (péptidos 1-5). La secuencia 6 corresponde al péptido β -amiloide sin digerir.

25

La Fig. 5 muestra fotografías de inmunotinciones de tejido cerebral afectado por la enfermedad de Alzheimer, utilizando EM2, EM3, EM5 y combinaciones de EM5 con cada uno de los anteriores. Las estructuras teñidas se señalan como V (vasos), DP (placas difusas) y NP (placas neuríticas). Las fotografías corresponden a:

30

- (A) y (B): Secciones seriadas consecutivas de la misma zona del córtex occipital inmunoteñidas con EM5 (A) y EM 3 (B) como anticuerpo primario, utilizando azul de nitro-tetrazolio (NBT) como cromógeno.

- (C): Micrografía con alto grado de magnificación de una técnica de inmunotinción doble utilizando EM3 (cromógeno: NBT) y EM5 (cromógeno: DAB) como anticuerpos primarios.

35

- (D) y (E): Secciones seriadas consecutivas de la misma área del córtex occipital inmunoteñidas o con EM5 (D) o con EM2 (E).

- (F): Microfotografía con alto grado de magnificación de una técnica de inmunotinción doble empleando EM2 (cromógeno: azul de nitro-tetrazolio, NBT) y EM5 (cromógeno: diaminobencidina, DAB).

40

Descripción detallada de la invención

Como se ha comentado anteriormente, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal, EM5, que reconoce en el péptido β -amiloide el epítipo correspondiente a la secuencia:

45

Val-His-His-Gln-Lys

(SEQ ID NO: 3)

Esta secuencia se corresponde con la de los residuos 12-16 del péptido β -amiloide humano. En consecuencia, sería esperable que el citado anticuerpo fuera capaz de unirse a isoformas del péptido β -amiloide que contuvieran dicha secuencia, no reconociendo aquellas que carecieran de ella como, por ejemplo, el denominado péptido p3 (A β ₁₇₋₄₂) y otras formas con el extremo amino truncado (A β _{17-x}). En la caracterización del anticuerpo monoclonal que se describe detalladamente en los ejemplos posteriores se demuestra que EM5 se une a cualquier péptido que contenga los residuos 12 a 16 de la secuencia del A β humano, aún presentando modificaciones fuera de esta región, y no reconoce péptidos que estén desprovistos de dicha región. Si la región se modifica, como es el caso del péptido A β ₁₋₂₈ (roedor), que presenta un cambio de aminoácido en la posición 13, además de en las posiciones 5 y 10, el péptido deja de ser reconocido por EM5.

55

Además, los estudios muestran que el anticuerpo es capaz de unirse a isoformas del péptido A β que contienen los residuos 12 a 16 independientemente de si las mismas se encuentran en forma soluble, agregada o desnaturalizada (en SDS). Por ello, otro de los aspectos de la invención se refiere a una composición que contenga el anticuerpo de la invención, o al menos un fragmento suyo capaz de unirse a SEQ ID NO: 3, acoplados a alguna sustancia que permita su detección, y a su uso en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer mediante la detección del anticuerpo o de su fragmento unido a isoformas del péptido β -amiloide que contengan la secuencia específica reconocida por el anticuerpo de la invención.

60

En una realización preferida de la invención, la sustancia a la que se acopla el anticuerpo, o un fragmento suyo capaz de unirse a SEQ ID NO: 3, es un segundo anticuerpo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal de la invención, estando el segundo anticuerpo unido a una enzima capaz de catalizar la transformación de una determinada sustancia

65

en otra que posea unas características que hagan fácil la detección de su presencia. En la realización que más se prefiere de la invención, el segundo anticuerpo unido a una enzima es parte del sistema Envision, de Laboratorios Dako, siendo la sustancia cuya transformación es catalizada por la enzima un cromógeno y siendo la enzima que cataliza la reacción o bien fosfatasa alcalina (utilizándose entonces como cromógeno azul de nitro-tetrazolio) o peroxidasa de rábano (utilizándose entonces como cromógeno diaminobencidina).

El diagnóstico se realiza sobre tejido cerebral, en el que se pone de manifiesto selectivamente la presencia de depósitos en los que predominen isoformas del péptido amiloide que contengan la secuencia reconocida por el anticuerpo monoclonal de la invención (placas neuríticas y depósitos vasculares, depósitos característicos del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer) revelando la existencia de unión a dichos depósitos del anticuerpo monoclonal de la invención, o de un fragmento suyo capaz de unirse a la secuencia específica reconocida por dicho anticuerpo, a diferencia de lo que sucedería con los depósitos en los que las isoformas predominantes fueran aquellas que carecen de la secuencia reconocida por el anticuerpo monoclonal de la invención (placas difusas), las isoformas $A\beta_{17-42}$, que no presentarían unión del anticuerpo monoclonal o de fragmentos del mismo. La unión del anticuerpo a placas neuríticas y depósitos vasculares se pone de manifiesto mediante la composición preferida de la invención anteriormente descrita. En la realización que más se prefiere de la invención, el método de diagnóstico se complementa mediante la utilización adicional de los anticuerpos policlonales EM2 y EM3, que reconocen o $A\beta_{1-42}$ (EM3) o $A\beta_{1-40}$ (EM2), ambos anticuerpos también desarrollados previamente por el grupo de los autores de la invención [24].

Otro de los aspectos de la invención es una línea celular de hibridoma capaz de producir el anticuerpo monoclonal de la invención. En una realización preferida de la invención, dicha línea celular se obtiene mediante la fusión con la línea de mieloma de ratón P3/X63-Ag.653 de células de bazo de ratones BALB/c inmunizados con péptido $A\beta_{1-40}$ acoplado a KLH (hemocianina de lapa californiana).

Por último, un aspecto más de la invención es un método de producción y purificación del anticuerpo monoclonal de la invención a partir de células de hibridoma. En la realización preferida de la invención, el método consiste en la producción de una línea celular de hibridoma como la anteriormente descrita y su crecimiento como fluido ascítico en ratones BALB/c previamente tratados con Pristane. El anticuerpo monoclonal se purifica de ese fluido ascítico mediante cromatografía de afinidad en una columna de proteína A-Sefarosa (Pharmacia).

La invención y sus realizaciones preferidas se describen ahora con más detalle mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Producción de anticuerpos

La producción de los anticuerpos policlonales EM2 y EM5 empleados en este estudio se llevó a cabo tal como se ha publicado previamente [24].

Para la producción del anticuerpo monoclonal EM5 se llevaron a cabo los siguientes pasos:

Obtención de hibridomas

Se inyectaron de forma subcutánea a ratones BALB/c 40 μg de péptido $A\beta_{1-40}$ acoplado a KLH (hemocianina de lapa californiana) y disuelto en tampón fosfato salino (PBS) y emulsionado con un volumen igual de coadyuvante de Freund completo. Los ratones recibieron tres inyecciones repetitivas cada dos semanas en coadyuvante de Freund incompleto. Tres días antes de la fusión, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de 25 μg de $A\beta_{1-40}$ -KLH en PBS. El día de la fusión, se fusionó células de bazo de los animales inmunizados con la línea de mieloma de ratón P3/X63-Ag.653 utilizando polietilenglicol 1400 (Sigma), siguiendo procedimientos establecidos [25]. Las células fusionadas se distribuyeron en placas estériles de 96 pocillos a una densidad de 105 células por pocillo y se seleccionaron en medios que contenían hipoxantina, timidina y aminopterina. Los hibridomas productores de anticuerpos se identificaron mediante el ELISA descrito más adelante.

Cribado de hibridomas

Se recubrieron durante toda la noche a 4°C placas de microtitulación de poliestireno (Maxisorb, Nunc) con $A\beta_{1-40}$, a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6 (tampón de recubrimiento). Las placas se lavaron con Tween 20 al 0,05% en PBS (PBS-T) y se bloquearon los sitios de unión no específicos con albúmina de suero bovino (BSA) al 2% en PBS-T (solución de bloqueo) durante 1 hora a 37°C. Después de lavar, se incubó las placas durante 1 hora con sobrenadante de cultivo de tejidos diluido dos veces en solución de bloqueo. Las placas se lavaron de nuevo y se incubaron con IgG de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano (Sigma) una hora a 37°C. Después de lavar, se añadió la solución con el sustrato (o-fenilendiamina al 0,05% y peróxido de hidrógeno al 0,015% en tampón citrato 100 mM, pH 5,0). La reacción se paró 10 minutos más tarde con ácido sulfúrico 2,5 M y se determinó la absorbancia a 492 nm en un lector de microplacas. Se seleccionaron los hibridomas cuyos sobrenadantes produjeron un valor de absorbancia al menos dos veces superior al obtenido con el sobrenadante de hibridomas no relacionados (anticuerpos anti-gliadinas).

ES 2 259 270 B1

Los hibridomas que producían anticuerpos específicos se donaron repetidamente mediante dilución limitante, y los isotipos de los anticuerpos monoclonales se determinaron en sobrenadante de cultivo de células concentrado mediante inmunoprecipitación en gel utilizando un antisuero específico (Sigma). Los hibridomas seleccionados se hicieron crecer como fluido ascítico en ratones BALB/c previamente tratados con Pristane.

5

Purificación de anticuerpos monoclonales

El anticuerpo monoclonal EM5 se purificó del fluido ascítico mediante cromatografía de afinidad en una columna de proteína A-Sefarosa (Pharmacia). Los anticuerpos purificados se dializaron profusamente en PBS y se almacenaron a -85°C hasta el momento de su uso.

10

Ejemplo 2

Cálculo de la constante aparente de disociación: afinidad por los péptidos $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$

15

Se estudió mediante ELISA la afinidad de los anticuerpo monoclonales EM5 y 6E10 utilizando los péptidos inmovilizados recién disueltos $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$, péptidos que habían sido sintetizados en la instalación WM Keck de la Universidad de Yale utilizando la metodología del N-t-butiloxicarbonilo.

20

Se revistieron placas de microtitulación de poliestireno (Immulon 2, Dynex. Technology Inc., Chantilly, VA) durante 16 horas a 4°C con $0,5\ \mu\text{g}$ de péptido $A\beta_{1-40}$ o $A\beta_{1-42}$ recién disuelto o agregado en tampón carbonato/bicarbonato pH 9,6. Después de bloquear con Superblock (Pierce Chemical Co.) se añadieron a los pocillos recubiertos con $A\beta$ concentraciones crecientes de EM5 purificado (0-0,5 nM en TBS-T, 100 microlitros por pocillo) y se incubaron durante 3 horas a 37°C . El EM5 unido se detectó con el fragmento F(ab')₂ de IgG de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano (1:3000, Amersham). La reacción se desarrolló durante 15 minutos con 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (BioRad, Hercules, CA.), se paró con ácido sulfúrico 2 M y se cuantificó en un lector de microplacas (Cambridge Technology, Watertown, MA) a 450 nm. La afinidad del anticuerpo comercialmente disponibles 6E10 (Senetek, PLC) se estudió siguiendo un protocolo similar utilizando preparaciones de anticuerpos IgG purificados. El análisis de regresión no lineal, la estimación de las constantes aparentes de disociación y la comparación de los datos de unión de proteínas para averiguar la significación estadística mediante el cálculo de los ratios F se evaluaron empleando el software Prism de GraphPad (GraphPad, San Diego, CA).

25

30

La Figura 1 muestra las curvas de saturación correspondientes a la unión en el ELISA de los anticuerpos monoclonales EM5 y 6E10 a péptidos $A\beta$ recién disueltos y agregados. En todos los casos, se observó una elevada afinidad con constantes aparentes de disociación en el rango picomolar. Ninguno de estos anticuerpos mostró una afinidad diferencial por las formas de $A\beta$ recién preparadas o agregadas. De forma interesante, mientras que 6E10 mostró una afinidad equivalente por $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$, EM5 mostró una afinidad mayor por $A\beta_{42}$ que por $A\beta_{40}$ ($p < 0,01$) (13,7 pM y 15,5 pM por $A\beta_{42}$ recién preparado y agregado, respectivamente; y 37,5 pM y 37,0 pM por $A\beta_{40}$ recién preparado y agregado, respectivamente).

35

40

Ejemplo 3

Análisis por inmunotransferencia

45

Se estudió y comparó el reconocimiento específico de $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ por parte de EM5 con los anticuerpos policlonales EM2 y EM3 mediante análisis por inmunotransferencia. Para ello, se sometieron péptidos $A\beta$ ($0,5\ \mu\text{g}/\text{calle}$) a electroforesis PAGE en acrilamida al 16%, tris-tricina-SDS. Los péptidos se transfirieron electroforéticamente durante 1 hora a 400 mA y 4°C a membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (Immobilon-P, Millipore) utilizando ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfónico, pH 11, que contenía metanol al 10%. Las membranas se bloquearon durante 16 h a 4°C con TBS-T que contenía leche descremada en polvo al 5% y se incubaron luego durante 1 hora a temperatura ambiente con $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de las IgG EM2, EM3 o EM5. Como segundo anticuerpo se empleó una IgG de cabra anti-conejo (EM2 y EM3) o anti-ratón (EM5) acoplada a peroxidasa de rábano (Amersham) y diluida 1:2.000. Las inmunotransferencias se visualizaron mediante quimioluminiscencia (Amersham) siguiendo las especificaciones del fabricante.

50

55

Los resultados se muestran en la Figura 2. En ella puede apreciarse que, en los experimentos de inmunotransferencia, EM5 mostró inmunoreactividad frente a los péptidos tanto $A\beta_{1-40}$ como $A\beta_{1-42}$ (corroborando los resultados obtenidos por ELISA), mientras que los anticuerpos EM2 y EM3 fueron capaces de reconocer sólo los péptidos $A\beta_{1-40}$ o $A\beta_{1-42}$, respectivamente, como se ha descrito anteriormente [24]. Estos resultados apoyan la idea de que el anticuerpo monoclonal EM5 se une a un epítipo lineal específico común a ambos péptidos, que se conserva en las muestras tratadas con SDS. En conjunto, nuestros resultados indican que EM5 es capaz de reconocer péptidos $A\beta$ en las formas soluble, agregada y desnaturalizada (en SDS), con una unión ligeramente preferencial con $A\beta_{42}$, probablemente como resultado del incremento de la hidrofobicidad del péptido.

60

65

Ejemplo 4

Localización del epítipo

5 Con el fin de localizar con precisión el epítipo exacto reconocido por el anticuerpo EM5, se analizó la unión del anticuerpo a una serie de péptidos $A\beta$ sintéticos. De ellos, los péptidos $A\beta_{1-16}$, $A\beta_{1-28}$ Y $A\beta_{25-35}$ se adquirieron a Sigma (San Luis, MO); los péptidos $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{1-42}$ (E22Q), $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-40}$ (E22G), $A\beta_{1-40}$ (E22Q), $A\beta_{1-28}$ (roedor), $A\beta_{1-28}$ (E22Q), $A\beta_{17-40}$, $A\beta_{16-42}$ y $A\beta_{25-35}$ se sintetizaron en la instalación WM Keck de la Universidad de Yale utilizando la metodología del N-t-butiloxycarbonilo; $A\beta_{21-28}$, $A\beta_{21-28}$ (E22Q), $A\beta_{37-41}$ y $A\beta_{37-40}$ se sintetizaron en la Unidad de Síntesis de Péptidos (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid) utilizando la metodología normal del Fmoc. El diseño de los péptidos $A\beta_{37-42}$ y $A\beta_{37-49}$ incluía una cola en el extremo amino con un residuo de cisteína para el acoplamiento que tenía la secuencia CSGGSGGG (SEQ ID NO: 4). Todos los péptidos se purificaron mediante cromatografía líquida de alta eficacia en el modo de fase inversa y su pureza se evaluó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

15 a) *ELISA de captura de anticuerpos*

Para realizar el ensayo, se recubrieron placas de microtitulación de poliestireno de fondo plano (Immulon 2, Dynex Technology Inc., Chantilly, VA) durante 16 horas a 4°C con 1 μ g/pocillo del correspondiente péptido $A\beta$ en tampón carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,6. Después de bloquear con NaCl 150 mM, Tris 20 mM, Tween-20 al 0,05%, pH 7,4 (TBST) que contenía BSA al 2%, se incubaron diluciones seriadas del anticuerpo EM5 (de 20 a 0,02 mg/ml de la fracción de las IgG) durante 1 hora a 37°C. Se aplicó entonces una IgG anti-ratón acoplada a peroxidasa (Sigma, San Luis, MO) y diluida 1:2000 durante 30 minutos a 37°C. La reacción se desarrolló con TMB (BioRad, CA), se paró con ácido sulfúrico 2M y se cuantificó a 450 nm. La unión inespecífica se determinó omitiendo los primeros anticuerpos.

Los resultado se muestran en la Figura 3, en cuya parte superior aparece un diagrama de barras correspondiente a los valores de absorbancia obtenidos correspondientes a la incubación de 20 μ g/ml del anticuerpo con cada uno de los péptidos. EM5 demostró unirse a cualquier péptido que contuviera los residuos 12 a 16 de la secuencia del $A\beta$ humano y no logró reconocer péptidos desprovistos de esta región. Es más, variantes mutantes con modificaciones fuera de esta región ($A\beta_{1-42}$ (E22Q), $A\beta_{1-40}$ (A21G), $A\beta_{1-40}$ (E22G), $A\beta_{1-40}$ (E22Q)) mostraron una unión similar al compararlas con el péptido de tipo silvestre, mientras que el péptido $A\beta_{1-28}$ (roedor), que muestra tres cambios de aminoácidos en las posiciones 5, 10 y 13, no fue reconocido por EM5.

35 b) *Análisis por espectrometría de masas del péptido β -amiloide digerido e inmunoprecipitado*

Para confirmar los resultados, se realizó un estudio complementario en el que un juego de péptidos derivados de $A\beta_{1-42}$, generados por digestión con tripsina o α -quimotripsina, se pusieron en contacto con partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo EM5. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

40 Para digerir el péptido, a una alícuota de 10 μ l de péptido β -amiloide en bicarbonato amónico 50 mM que contenía 1 μ g de péptido se le añadieron 0,5 μ l de tripsina o α -quimotripsina que contenían 0,025 μ g de la enzima. La incubación se llevó a cabo durante 2 horas a 37°C. En la Tabla I se muestran esquemáticamente las digestiones llevadas a cabo.

45 Para realizar la inmovilización del anticuerpo monoclonal EM5 sobre partículas magnéticas, se incubó una alícuota de 5 μ l (1,1 mg/ml) de EM5 con 50 μ l de Dynabeads M450 recubiertas con IgG de cabra anti-ratón a temperatura ambiente durante 2 horas. El complejo se lavó 4 veces con PBS con mezcla bidireccional (en un rotor).

50 Para efectuar la inmunoprecipitación, se incubó una alícuota de 10 μ l del péptido β -amiloide digerido con tripsina (o α -quimotripsina) con 50 μ l de EM5 inmovilizado sobre partículas magnéticas en un rotor durante 1 hora a 37°C. El complejo magnético-inmunoprecipitado se lavó 4 veces con PBS en el mismo rotor y se aspiraron y descartaron los sobrenadantes.

55 Para llevar a cabo el análisis de espectrometría de masas del péptido β -amiloide inmunoprecipitado digerido los péptidos inmunoprecipitados contenidos en los complejos magnéticos se liberaron con 20 μ l de acetonitrilo al 50%/ácido trifluoroacético al 0,3%. Se mezclaron 5 μ l de esta solución con 5 μ l de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico saturado en ácido trifluoroacético al 0,1%/acetonitrilo (2:1). Un volumen de 0,5 μ l de esta solución se depositó después en una sonda de acero inoxidable en forma de punta y se dejó que se secase a temperatura ambiente. Las muestras se midieron en un espectrómetro de masas para MALDI-TOF Reflex II de Bruker equipado con una fuente de iones con óptica de visualización y un láser de N_2 (337 nm). Los espectros de masas se recogieron en el modo positivo lineal a un voltaje de aceleración de 28,5 kV y 1,5 kV en el detector lineal, acumulando 200 espectros de disparos únicos de láser por debajo del umbral de irradiancia. Sólo se consideraron las señales de masas bien resueltas, de elevada intensidad, surgidas de 3-5 puntos de incidencia seleccionados. Todos los espectros MALDI se calibraron externamente utilizando una mezcla de péptidos normalizada [angiotensina II (1047,2), fragmento 18-39 de la hormona adrenocorticotrópica (2466,7) e insulina (5734,6); Sigma].

ES 2 259 270 B1

Las características de los péptidos analizados, así como los datos obtenidos, se resumen en la Tabla I siguiente:

TABLA I

5 *Datos de espectrometría de masas MALDI-TOF obtenidos para fragmentos obtenidos por digestión del péptido β -amiloidé*

Fragmento N°	Aminoácidos comprendidos	Enzima utilizada	Masa Experimental (m/z)	Valor Esperado (m/z)
1	1-16	Tripsina	1956,57	1955,0
15 2	1-17	α -Quimotripsina	2067,37	2068,2
3	5-17	α -Quimotripsina	1606,62	1605,7
4	6-16	Tripsina	1337,12	1336,4
20 5	11-17	α -Quimotripsina	888,66	890,0

25 Las secuencias de cada uno de estos péptidos (1-5) y del péptido sin digerir (6) se muestran en la Figura 4, en la que se ha sombreado la zona que parece corresponder al epítipo reconocido por el anticuerpo EM5 según los resultados de espectroscopia de masas MALDI-TOF del material inmunoprecipitado.

30 Como puede apreciarse en dicha Figura 4, el análisis por espectroscopia de masas MALDI-TOF del material inmunoprecipitado demuestra que EM5 fue capaz de extraer de la mezcla de digestión cada fragmento de péptido que contenía los residuos 11-16 (regiones sombreadas). No se recuperaron de la solución fragmentos de péptido fuera de esta región. Estos resultados confirman los datos obtenidos mediante ELISA y análisis por inmunotransferencia.

35 En conclusión, la reactividad diferencial del anticuerpo frente a una serie de péptidos $A\beta$ indica que EM5 reconoce los residuos 11-16 de los péptidos $A\beta$. De entre ellos, la participación de los residuos 12-16 es fundamental, como lo demuestra el hecho de que la mutación del residuo 12 en el péptido $A\beta_{1-28}$ de roedor (1-28 R) impida su reconocimiento por parte del anticuerpo; por su parte, la implicación del residuo 11 (E) en la conformación del epítipo no puede descartarse aunque los datos obtenidos no la confirman por completo.

40 Ejemplo 5

Inmunohistoquímica: reactividad tisular de los anticuerpos

45 Para demostrar la validez del anticuerpo EM5 para poner de manifiesto depósitos característicos de la enfermedad de Alzheimer (placas neuríticas y depósitos vasculares) frente a las placas difusas, se realizaron inmunotinciones de secciones de tejido cerebral afectado por la enfermedad de Alzheimer utilizando los anticuerpos EM2 (un anticuerpo policlonal dirigido al extremo carboxilo del péptido $A\beta$ 40), EM3 (un anticuerpo policlonal dirigido al extremo carboxilo del péptido $A\beta$ 42) y EM5 (un anticuerpo monoclonal con especificidad demostrada por los residuos 12-16 del péptido $A\beta$). Tanto EM2 como EM3 se han utilizado ya en un estudio anterior [24].

Procesamiento de tejido cerebral y áreas seleccionadas para inmunohistoquímica

55 El tejido cerebral fue proporcionado por el Banco de Tejidos para Investigaciones Neurológicas, Madrid. Se incluyeron en el estudio seis sujetos, 3 varones y 3 hembras, con EA definida. Las edades oscilaban entre 68 y 75 años. En todos los casos se hizo un diagnóstico de EA según las directrices clínico-patológicas del CERAD (*Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*: Consorcio para el Establecimiento de un Registro de la Enfermedad de Alzheimer) [10]. Ninguno de los pacientes presentó otros hallazgos neuropatológicos relevantes, por ejemplo enfermedad de Parkinson o cambios vasculares significativos. Todos los cerebros se procesaron para su estudio histológico siguiendo los protocolos de corte, fijación e inclusión del Brain Bank. Los períodos post-mortem oscilaron entre 10 y 18 horas. Inmediatamente después de la autopsia se fijó una mitad del cerebro (obtenida por medio de una sección medio-sagital de los hemisferios cerebrales, cerebelo y tronco encefálico) en formaldehído tamponado con fosfato al 4%. Después de 3-4 semanas de fijación, se obtuvieron bloques de tejido de todas las áreas corticales y subcorticales implicadas de modo significativo en la EA, y se incluyeron en parafina después de una deshidratación progresiva en etanol y aclarado del tejido con xilol. En todos los casos se obtuvieron de los bloques de parafina originales para su estudio inmunohistoquímico secciones de tejido de 5 μ m que correspondían al córtex parieto-occipital lateral, córtex temporal lateral (estas dos últimas áreas según lo recomendado por las directrices del CERAD [10]), hipocampo, caudado - putamen (a nivel de la cabeza del núcleo caudado), y córtex del hemisferio cerebeloso. Como control de tinción

amiloide inespecífica, se llevó a cabo una tinción con metenamina - plata modificada en secciones consecutivas a las procesadas para la inmunohistoquímica amiloide.

Anticuerpos y protocolos de inmunotinción

Los anticuerpos primarios empleados fueron EM2, EM3, y EM5. Tanto EM2 como EM3 se han utilizado en un estudio anterior [24]. Las secciones se incubaron con anticuerpos primarios a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los anticuerpos policlonales se revelaron con el sistema Envision (Laboratorios Dako) con fosfatasa alcalina (FA) utilizando azul de nitro-tetrazolio (NBT) como cromógeno, y el EM5 se reveló o con el sistema anterior o con el sistema Envision (Dako Laboratories) con peroxidasa de rábano (HRP) utilizando diaminobencidina (DAB) como cromógeno. En el caso de las técnicas de colocalización los anticuerpos policlonales se revelaron siempre con el sistema Envision con FA (utilizando NBT como cromógeno), mientras que el EM5 se reveló con el sistema Envision con HRP (utilizando DAB como cromógeno).

Inmunotinción doble y simple

Se utilizaron técnicas de inmunotinción doble utilizando EM5 como primer anticuerpo primario y EM2 o EM3 como segundo anticuerpo primario, como trabajo preliminar con el fin de establecer el grado de colocalización de cada par de anticuerpos, junto con la dilución óptima de trabajo de cada uno de ellos. Durante esta fase del estudio, que se restringió a secciones de tejido del córtex parieto-occipital de dos de los casos, se estableció que el uso de EM5 como primer anticuerpo primario descartaba un efecto enmascarador de los otros dos anticuerpos, cuando se empleaban como primer anticuerpo durante la técnica de inmunotinción doble. En secciones seriadas de ambos bloques de parafina seleccionados se colocalizaron diluciones crecientes (1:50, 1:100, 1:500, 1: 1000 y 1:2000) de EM5 con diluciones decrecientes (1:2000, 1:1000, 1:500, 1:100 y 1:50) de EM2 o de EM3. Como se encontró así que el anticuerpo EM2 se colocalizaba en alto grado con EM5, el resto del estudio se dirigió a mostrar el patrón diferencial de reactividad mostrado por EM5 y EM3. Con este propósito, la posterior inmunotinción doble en secciones de todas las áreas seleccionadas en todos los casos se limitó al uso de EM5 (a una dilución 1:1000) como primer anticuerpo primario y EM3 (a una dilución 1:1000) como segundo anticuerpo primario. De forma adicional, con el fin de visualizar con más precisión el patrón de reactividad mostrado por cada anticuerpo en el mismo tejido, se llevó a cabo una inmunotinción simple en secciones seriadas de cada bloque utilizando EM5, EM2 o EM3 como anticuerpo primario. Como el objetivo principal de esta parte del estudio es comparar cualitativamente diferentes patrones de inmunorreactividad, más que diferencias cuantitativas entre anticuerpos, los resultados de las tinciones no se cuantificaron.

Resultados

Los resultados de uno de los casos pueden apreciarse en la Figura 5, presentados con la distribución que se mencionó anteriormente, es decir:

- (A) y (B): Secciones seriadas consecutivas de la misma zona del córtex occipital inmunoteñidas con EM5 (A) y EM 3 (B) como anticuerpo primario, utilizando NBT como cromógeno. Se han marcado los vasos (V) para facilitar la localización de las placas. Mientras que EM3 (B) pone de manifiesto tanto placas difusas (DP) como neuríticas (NP), así como depósitos en los vasos sanguíneos (V), EM5 (A) tiñe con más intensidad tanto vasos sanguíneos como algunas placas neuríticas, aunque no placas difusas.

- (C) Micrografía con alto grado de magnificación de una técnica de inmunotinción doble utilizando EM3 (utilizando NBT -color azul- como cromógeno) y EM5 (utilizando DAB -color marrón- como cromógeno) como anticuerpos primarios. Se observa una doble inmunotinción de las placas neuríticas y la pared de los vasos.

- (D) y (E): Secciones seriadas consecutivas de la misma área del córtex occipital inmunoteñidas o con EM5 (D) o con EM2 (E). De nuevo, se han marcado los vasos (V) para ayudar en la identificación de las placas. Se observa que tanto los vasos como las placas neuríticas reaccionan con ambos anticuerpos. Se tiñen menos placas neuríticas con EM2 que con EM5, y ninguna placa difusa reacciona con ninguno de ellos.

- (F) Microfotografía con alto grado de magnificación de una técnica de inmunotinción doble empleando EM2 (utilizando NBT -color azul- como cromógeno) y EM5 (utilizando DAB -color marrón- como cromógeno) como anticuerpos primarios en la misma sección de tejido del córtex occipital. Se observa una precisa colocalización de la reactividad de ambos anticuerpos en la pared del vaso y las placas neuríticas.

Todos los casos salvo uno mostraron depósitos amiloides vasculares prominentes leptomeníngeos e intracorticales que reaccionaban con todos los anticuerpos ensayados. En todos los casos positivos la inmunorreactividad de los depósitos amiloides vasculares fue más marcada (más extensa e intensa) tanto con EM2 (Fig. (5E)) como con EM5 (Fig. (5A) y (5D)) que con EM3 (Fig. (5B)). EM2 y EM5 se colocalizan exquisitamente a este nivel (Fig. (5F)). Como se esperaba, las áreas neocorticales y el hipocampo mostraron una alta densidad de placas difusas y neuríticas, mientras que el córtex del cerebelo y el cuerpo estriado mostraron sólo depósitos amiloides difusos. Las secciones incubadas con el anticuerpo EM3 mostraron reactividad con placas tanto difusas como neuríticas (Fig. (5B)). Cuando se compararon con secciones sucesivas teñidas con el método de metenamina - plata modificado, se demostró que EM3 teñía todas las placas presentes en cada sección. Adicionalmente, el anticuerpo EM3 teñía algunos cuerpos neuronales. Tanto EM2 como EM5 tiñeron placas neuríticas inmaduras (sin núcleo) y maduras (con núcleo), de nuevo con un alto grado de

colocalización (Fig. (5F)). EM2 no reaccionó con ninguna placa difusa ni en la región cortical ni en la subcortical (Fig. (3E)). La inmunotinción doble con EM5 y EM3 revela la colocalización de ambos anticuerpos en algunas placas neuríticas, pero no en placas difusas (Fig. (5C)), aunque se encontró algo de colocalización a este nivel cuando se incubó EM5 a una dilución muy baja (1:50). Sólo en un caso que mostraba abundantes placas difusas positivas para EM3 en secciones del cuerpo estriado sí que tiñó EM5 algunas de ellas muy ligeramente a la dilución de trabajo (1:500). Este mismo caso no mostró ninguna reactividad de las placas difusas como EM5 en el córtex del cerebelo. En todos los demás casos las secciones del cuerpo estriado y del cerebelo mostraron una cantidad variable de placas difusas, ninguna de ellas reactiva frente al anticuerpo EM5. Ni EM2 ni EM5 parecieron teñir todas las placas neuríticas presentes (véanse las Fig. (5A, D)). Sin embargo, como se había observado en el caso de la inmunorreactividad de los depósitos amiloides vasculares, las placas neuríticas reactivas frente a EM2 o EM5 se tiñeron más intensamente que con EM3. Salvo por la negatividad de los vasos frente a todos los anticuerpos en un único caso y la ligera positividad de algunas placas difusas del cuerpo estriado en ese mismo cerebro, se puede considerar que todos los casos muestran patrones de tinción similares para cada anticuerpo ensayado.

Por tanto, en contraste con el patrón de tinción más bien uniforme observado en las placas difusas, el panel de anticuerpos detectó heterogeneidad dentro de las placas neuríticas, lo que resulta relevante para indicar etapas concretas en el proceso de evolución de las placas difusas para convertirse en placas neuríticas. El anticuerpo EM5 tiñó intensamente todas las estructuras (placas neuríticas y paredes de los vasos) teñidas por EM2 y teñidas de forma variable por EM3. Un subconjunto de placas neuríticas demostró tener un patrón de tinción idéntico al amiloide vascular, con una elevada colocalización de reactividad frente a EM2 y EM5. La invención muestra que EM5 debería reaccionar con todas las estructuras que contienen o $A\beta_{<11-40}$ o $A\beta_{<11-42}$. De hecho, los resultados de los ELISA aquí presentados muestran que el anticuerpo EM5 reconoce formas tanto de reciente disolución como agregadas del péptido $A\beta$. Sin embargo, en secciones de tejidos encontramos una variabilidad mayor en la tinción entre las placas neuríticas con EM5 que con los anticuerpos policlonales, junto con una elevada colocalización de intensa reactividad frente a EM5 con EM2 ($A\beta$ C40). Una tinción relativamente más intensa en estas placas positivas puede revelar un subgrupo de placas neuríticas o bien con un contenido particularmente elevado de péptidos $A\beta$ largos, o selectivamente alto de $A\beta$ C40, o incluso una accesibilidad particular del epítipo reconocido por EM5 en estructuras (vasos o placas) que muestran codeposición de $A\beta_{<11-40}$ y $A\beta_{<11-42}$. El anticuerpo de la invención parece detectar el mismo subconjunto de placas neuríticas $A\beta$ C40 (+) detectado anteriormente por Parvathy *et al.* [22]. Este subconjunto de placas neuríticas con contenidos particularmente altos de péptidos $A\beta$ largos pueden ser hitos relevantes en la progresión de las lesiones amiloides en la EA que el anticuerpo monoclonal de la invención permite poner de manifiesto. Por ello, el uso de EM5 puede permitir definir subconjuntos de placas que constituyan un marcador específico del estadio de progresión de la enfermedad.

Referencias bibliográficas

1. Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, Yen S. y Aronson MK. Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging* 13: 1-11 (1992).
2. Iwatsubo T, Mann DAM, Odaka A, Suzuki N e Ihara Y. Amyloid β protein ($A\beta$) deposition: $A\beta$ 42(43) precedes $A\beta$ 40 in Down's syndrome. *Ann Neurol* 37: 294-299 (1995).
3. Fukumoto H, Asami-Okada A, Suzuki N, Shimada H, Ihara Y e Iwatsubo T. Amyloid β protein deposition in normal aging has the same characteristics as that in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 148: 259-265 (1996).
4. Giaccone G, Tagliavini F, Linoli G, Bouras C, Frigerior L, Frangione B y Bugiani O. Down syndrome patients: extracellular preamyloid deposits precede neuritic degeneration and senile plaques. *Neurosci Lett* 97: 232-238 (1989).
5. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, De Teresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30: 572-580 (1991).
6. Masliah E, Terry RD, Mallory M, Alford M y Hansen LA. Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer Disease. *Am J Path* 137: 1293-97 (1990).
7. Dickson DW. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 321-339 (1997).
8. Braak H y Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica* (Berl) 82: 239-259 (1991).
9. Thal DR, Rüb U, Schultz Ch, Sassin I, Ghebremedhin S, Del Tredici K, Braak E y Braak H. Sequence of $A\beta$ -protein deposition in the human medial temporal lobe. *J Neuropathol Exp Neurol* 59 (8): 733-748 (2000).
10. Mirra, SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughes JP, van Belle G y Berg L. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41: 479-486 (1991).

ES 2 259 270 B1

11. **Selkoe DJ.** Alzheimer's disease: genotypes, phenotype and treatments. *Science* 275(5300):630-1 (1997).
12. **Hardy J, y Selkoe DJ.** The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353-356 (2002).
- 5 13. **Vigo-Pelfrey C, Lee D, Keim P, Lieberberg I y Schenk DB.** Characterization of β -amyloid peptide from human cerebrospinal fluid. *J. Neurochem* 61: 1965-1968 (1993).
14. **Iwatsubo T, Mann DAM, Odaka A, Suzuki N e Ihara Y.** Amyloid β protein ($A\beta$) deposition: $A\beta_{42}(43)$ precedes $A\beta_{40}$ in Down's syndrome. *Ann. Neurol* 37: 294-299 (1995).
- 10 15. **Iwatsubo T, Saido TC, Mann DMA, Lee V M-Y y Trojanowski JQ.** Full-length amyloid- $\beta(1-42(43))$ and amino-terminally modified and truncated amyloid- $\beta_{42}(43)$ deposit in diffuse plaques. *Am J Pathol* 149: 1823-1830 (1996).
- 15 16. **Higgins L, Murphy Jr GM, Forno LS, Catalano R y Cordell B.** p3 β -amyloid peptide has a unique and potentially pathogenic immunohistochemical profile in Alzheimer's disease brain. *Am J Path* 149: 585-596 (1996).
17. **Gowing E, Roher AE, Woods AS, Cotter RJ, Chaney M, Little SP y Ball MJ.** Chemical characterization of $A\beta$ 17-42 peptide, a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 269: 10987-10990 (1994).
- 20 18. **Kida E, Wisniewski KE y Wisniewski HM.** Early amyloid- β deposits show different immunoreactivity to the amino- and carboxy-terminal regions of β -peptide in Alzheimer's disease and Down's syndrome brain. *Neurosci Lett* 193: 105-108 (1995).
- 25 19. **Lalowski M, Golabek A, Lemere A, Selkoe DJ, Wisniewski HM, Beavis RC, Frangione B y Wisniewski T.** The "nonamyloidogenic" p3 fragment (amyloid β_{17-42}) is a major constituent of Down's syndrome cerebellar preamyloid. *J Biol Chem* 271: 33623-33631 (1994).
- 30 20. **Saido TC, Iwatsubo T, Mann DMA, Shimada H, Ihara Y y Kawashima S.** Dominant and differential deposition of distinct β -amyloid peptide species, $A\beta_{N3}(pE)$ in senile plaques. *Neuron*, 14: 457-466 (1995).
21. **Tekirian TL, Saido TC, Markesberry WR, Russell MJ, Wekstein DR, Patel E y Geddes JW.** N-terminal heterogeneity of parenchymal and cerebrovascular $A\beta$ deposits. *J Neuropathol Exp Neurol* 57: 76-94 (1998).
- 35 22. **Parvathy S, Davis P, Haroutunian V, Purohit DP, Davis KL, Mohs RC, Park H, Moran TM, Chan JY y Buxbaum JD.** Correlation between $A\beta_{x-40-}$, $A\beta_{x-42-}$, and $A\beta_{x-43-}$ containing amyloid plaques and cognitive decline. *Arch Neurol* 58: 2025-2032 (2001).
- 40 23. **Lamer AJ.** Hypothesis: amyloid β -peptides truncated at the N-terminus contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 20: 65-69 (1999).
24. **Jimenez-Huete A, Alfonso P, Soto C, Alvar JP, Rábano A, Ghiso J, Frangione B y Mendez E.** Antibodies directed to the carboxyl terminus of amyloid β -peptide recognize sequence epitopes and distinct immunoreactive deposits in Alzheimer's disease brain. *Alzheimer's Reports* 1: 41-48 (1998).
- 45 25. **Campbell A.** Monoclonal antibody technology En: "*Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*" (Eds: Burdon RH, Knippenberg PH) *Elsevier*, Amsterdam, p. 120-134 (1984).
- 50
- 55
- 60
- 65

ES 2 259 270 B1

REIVINDICACIONES

5 1. Un anticuerpo monoclonal que reconoce en el péptido β -amiloide al menos el epítipo correspondiente a la secuencia:

Val-His-His-Gln-Lys

(SEQ ID NO: 3)

y es capaz de unirse a isoformas del péptido β -amiloide humano que contengan dicha secuencia.

10 2. Un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, capaz de unirse a depósitos de péptido β -amiloide humano en tejido cerebral de individuos afectados por la enfermedad de Alzheimer.

15 3. Un fragmento de anticuerpo monoclonal que reconoce en el péptido β -amiloide al menos el epítipo correspondiente a la secuencia:

Val-His-His-Gln-Lys

(SEQ ID NO: 3)

y es capaz de unirse a isoformas del péptido β -amiloide que contengan dicha secuencia.

20 4. Un fragmento de anticuerpo monoclonal según la reivindicación 3, capaz de unirse a depósitos de péptido β -amiloide humano en tejido cerebral de individuos afectados por la enfermedad de Alzheimer.

25 5. Una línea celular de hibridoma capaz de producir el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, o un fragmento del mismo según la reivindicación 3.

6. Una línea celular de hibridoma según la reivindicación 5, obtenida mediante la fusión con la línea de mieloma de ratón P3/X63-Ag.653 de células de bazo de ratones BALB/c inmunizados con al menos un péptido que contenga la secuencia Val-His-His-Gln-Lys (SEQ ID NO: 3).

30 7. Una línea celular de hibridoma según la reivindicación 6, obtenida mediante la fusión con la línea de mieloma de ratón P3/X63-Ag.653 de células de bazo de ratones BALB/c inmunizados con el péptido $A\beta_{1-40}$.

35 8. Una línea celular de hibridoma según la reivindicación 7, obtenida mediante la fusión con la línea de mieloma de ratón P3/X63-Ag.653 de células de bazo de ratones BALB/c inmunizados con el péptido $A\beta_{1-40}$ acoplado a KLH.

40 9. Uso del anticuerpo monoclonal de las reivindicaciones 1 ó 2 o de al menos un fragmento de dicho anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 3 ó 4 en el diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer a partir de una muestra de tejido cerebral tomada de un individuo aquejado de dicha enfermedad.

45 10. Uso del anticuerpo monoclonal de las reivindicaciones 1 ó 2 o de al menos un fragmento de dicho anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 3 ó 4, en combinación con al menos otro anticuerpo específico para al menos una zona de secuencia diferente del péptido β -amiloide, en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer a partir de una muestra de tejido cerebral tomada de un individuo aquejado de dicha enfermedad.

50 11. Uso según la reivindicación 10 del anticuerpo monoclonal de las reivindicaciones 1 ó 2, o de al menos un fragmento de dicho anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 3 ó 4, en combinación con el anticuerpo EM2 y/o con el anticuerpo EM3.

55 12. Una composición que comprende un anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 o al menos un fragmento del mismo según la reivindicación 3 ó 4, acoplado a una sustancia que permite la detección de dicho anticuerpo o fragmento del mismo.

60 13. Una composición según la reivindicación 12, en la que la sustancia a la que se acopla el anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo es un segundo anticuerpo capaz de unirse a dicho primer anticuerpo o fragmento de anticuerpo, estando unido este segundo anticuerpo a una enzima capaz de catalizar la transformación de una determinada sustancia en otra que pueda ser detectada.

65 14. Una composición según la reivindicación 13, en la que la sustancia cuya transformación cataliza la enzima es un cromógeno.

15. Una composición según las reivindicaciones 13 y 14, en la que el segundo anticuerpo está unido a fosfatasa alcalina y el cromógeno utilizado es azul de nitro-tetrazolio.

16. Una composición según las reivindicaciones 13 y 14, en la que el segundo anticuerpo está unido a peroxidasa de rábano y el cromógeno utilizado es diaminobencidina.

ES 2 259 270 B1

17. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, que comprende al menos otro anticuerpo específico para al menos una zona de secuencia diferente del péptido β -amiloide.

18. Una composición según la reivindicación 17, que comprende el anticuerpo monoclonal de las reivindicaciones 1 ó 2 o un fragmento de dicho anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 3 ó 4 acoplado a una sustancia que puede ser detectada y otro u otros anticuerpo(s) específico(s) para una o más zonas de secuencia diferentes del péptido β -amiloide, acoplados a sustancias diferentes que también pueden ser detectadas.

19. Una composición según la reivindicación 18, en la que el segundo anticuerpo dirigido a una zona de secuencia diferente del péptido β -amiloide es el anticuerpo EM2.

20. Una composición según la reivindicación 19, en la que el anticuerpo monoclonal de las reivindicaciones 1 ó 2 o el fragmento de dicho anticuerpo según las reivindicaciones 3 ó 4 está acoplado a un segundo anticuerpo unido a peroxidasa de rábano, utilizándose como sustancia a transformar que puede ser detectada el cromógeno diamino-bencidina (DAB), mientras que el anticuerpo EM2 está acoplado a un segundo anticuerpo unido a fosfatasa alcalina, utilizándose como sustancia a transformar que puede ser detectada el cromógeno azul de nitro-tetrazolio.

21. Una composición según la reivindicación 18, en la que el segundo anticuerpo dirigido a una zona de secuencia diferente del péptido β -amiloide es el anticuerpo EM3.

22. Una composición según la reivindicación 21, en la que el anticuerpo monoclonal de las reivindicaciones 1 ó 2 o el fragmento de dicho anticuerpo según las reivindicaciones 3 ó 4 está acoplado a un segundo anticuerpo unido a peroxidasa de rábano, utilizándose como sustancia a transformar que puede ser detectada el cromógeno diamino-bencidina (DAB), mientras que el anticuerpo EM3 está acoplado a un segundo anticuerpo unido a fosfatasa alcalina, utilizándose como sustancia a transformar que puede ser detectada el cromógeno azul de nitro-tetrazolio.

23. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 22 en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer a partir de una muestra de tejido cerebral tomada de un individuo aquejado de ella.

24. Un método de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer a partir de una muestra de tejido cerebral tomada de un individuo aquejado de ella que comprende la detección a partir de dicha muestra de al menos una isoforma del péptido β -amiloide que contenga al menos la secuencia Val-His-His-Gln-Lys (SEQ ID NO: 3) gracias a su unión a un anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 o un fragmento del mismo según las reivindicaciones 3 ó 4.

25. Un método de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer a partir de una muestra de tejido cerebral tomada de un individuo aquejado de ella que comprende la detección a partir de dicha muestra de al menos una isoforma del péptido β -amiloide que contenga al menos la secuencia Val-His-His-Gln-Lys (SEQ ID NO: 3) gracias a su unión a un anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 o un fragmento del mismo según las reivindicaciones 3 ó 4, estando el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprendido en una composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 22.

26. Un método de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer a partir de una muestra de tejido cerebral tomada de un individuo aquejado de ella que comprende la detección a partir de dicha muestra de al menos una isoforma del péptido β -amiloide que contenga al menos la secuencia Val-His-His-Gln-Lys (SEQ ID NO: 3) gracias a su unión a un anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 o un fragmento del mismo según las reivindicaciones 3 ó 4, así como la detección de al menos una segunda forma del péptido β -amiloide gracias a su unión a al menos un segundo anticuerpo dirigido contra una región diferente del péptido β -amiloide, estando ambos anticuerpos o el fragmento del anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 1 ó 2 y el segundo anticuerpo o cualquier otro anticuerpo adicional dirigidos contra una región diferente del péptido amiloide, comprendidos en una composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22.

27. Un método de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, en el que se detecta en tejido cerebral la presencia de depósitos de péptido β -amiloide a los que es capaz de unirse el anticuerpo monoclonal de la invención.

28. Un método de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer según la reivindicación 27, en el que se detecta en tejido cerebral la presencia de depósitos de péptido β -amiloide a los que es capaz de unirse el anticuerpo monoclonal de la invención mediante el uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 23.

29. Un método de diagnóstico de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer según la reivindicación 28, en el que se detecta en tejido cerebral la presencia de depósitos de péptido β -amiloide a los que es capaz de unirse el anticuerpo monoclonal de la invención, así como la presencia adicional de depósitos que contienen al menos una isoforma adicional del péptido β -amiloide a la que es capaz de unirse al menos un segundo anticuerpo dirigido contra una zona diferente de dicho péptido, mediante el uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22.

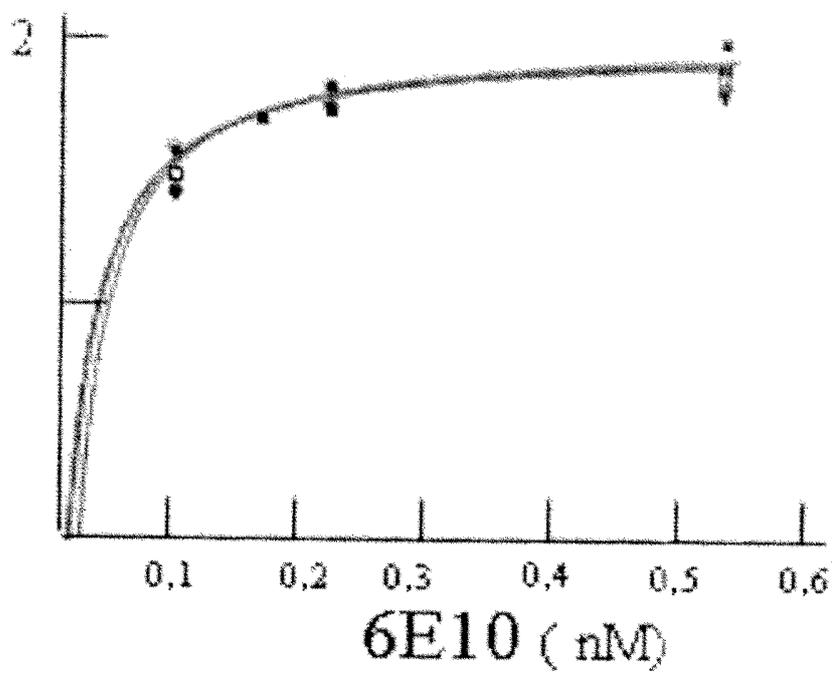
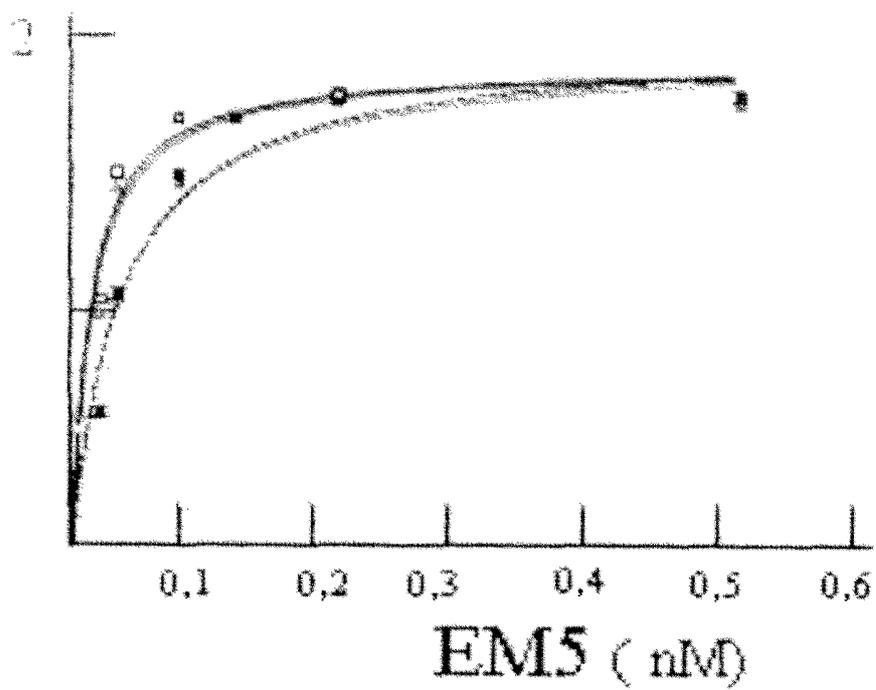


Figura 1

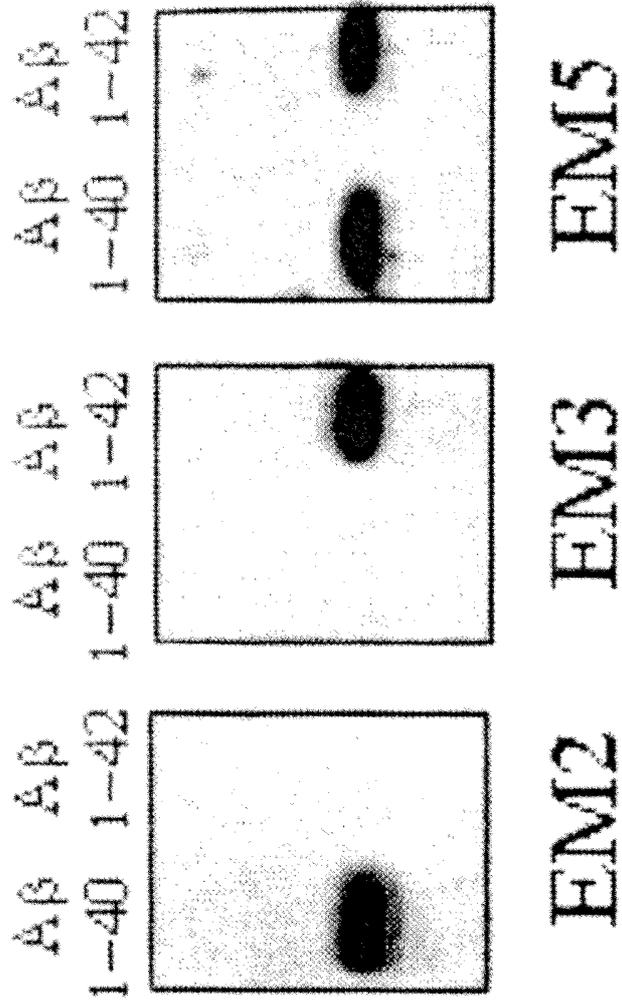


Figura 2

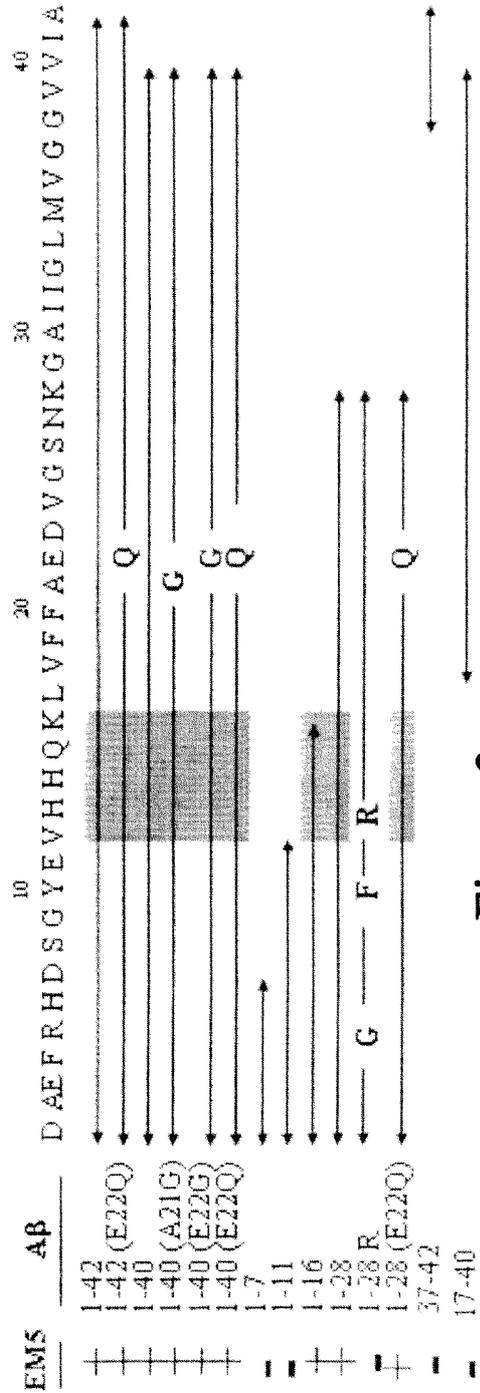
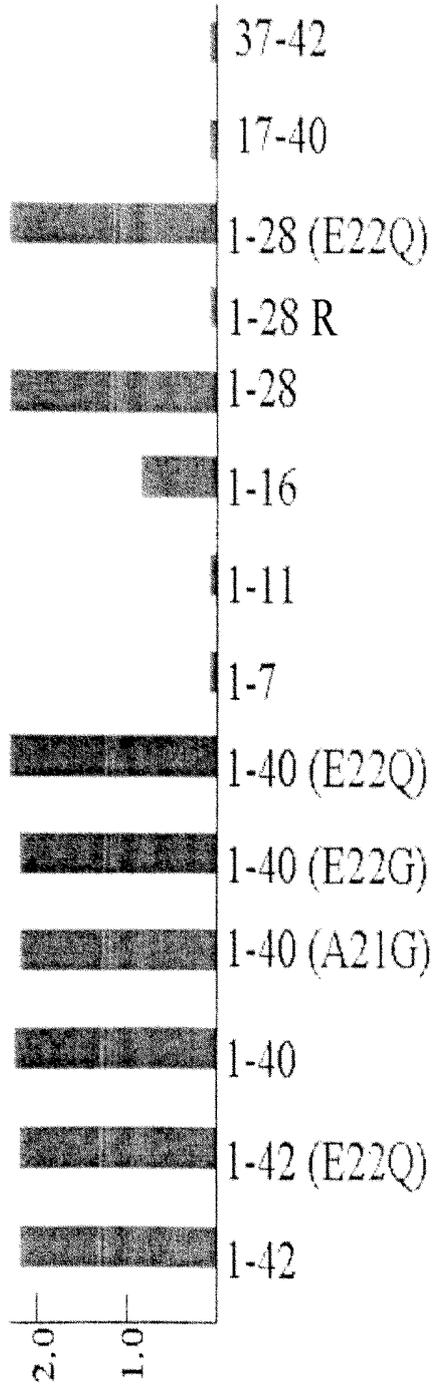


Figura 3

1 DAEFRHDSGYEVHHQK
2 DAEFRHDSGYEVHHQKL
3 RHD SGYEVHHQKL
4 HD SGYEVHHQK
5 EVHHQKL
6 DAEFRHDSGYEVHHQKL VFFAEDVGSNKGAIIIGL M VGGV V I A
10 20 30 40

Figura 4

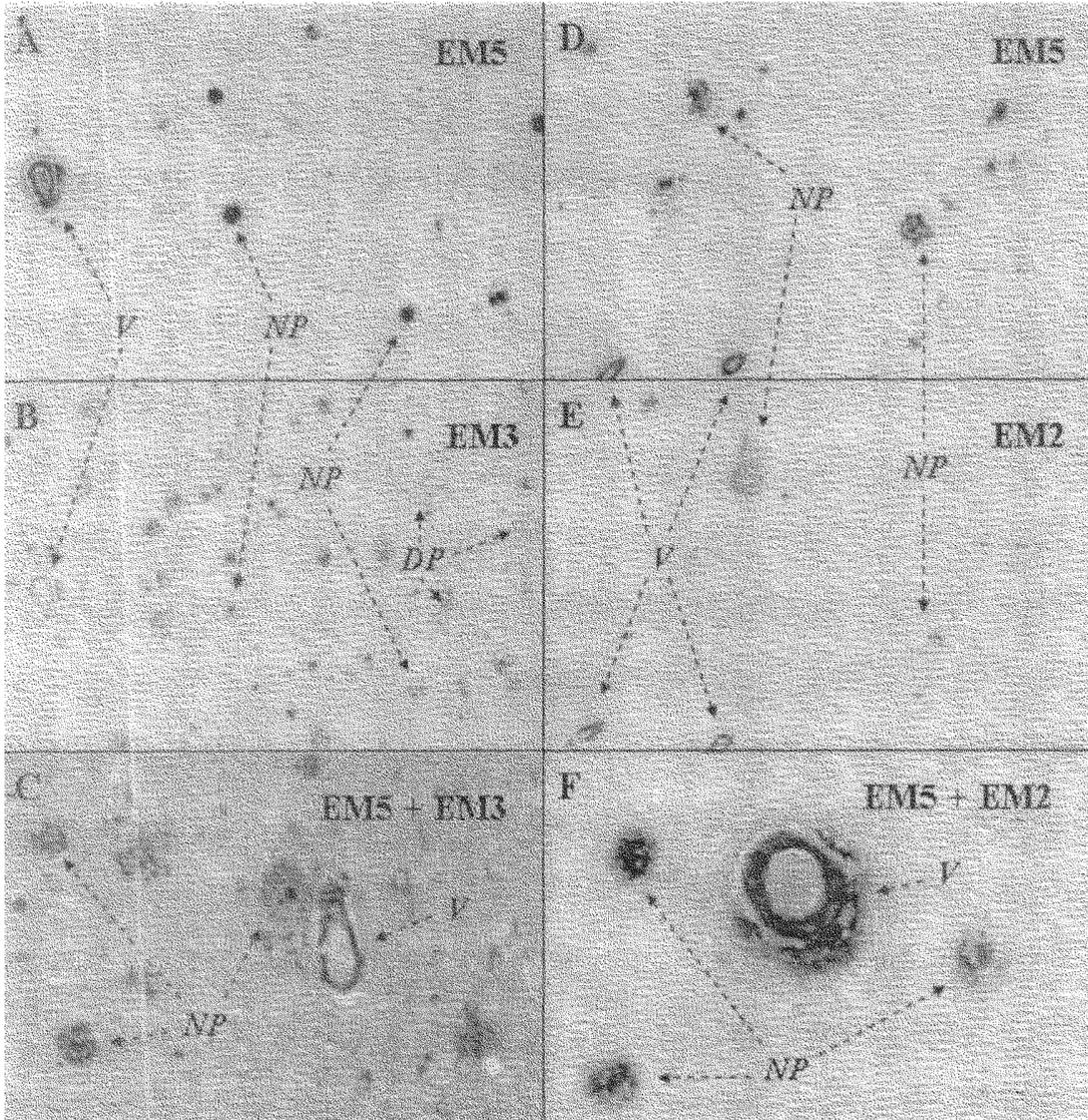


Figura 5

ES 2 259 270 B1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110>
- 5 <120> MÉTODO DE DIAGNÓSTICO *IN VITRO* DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER MEDIANTE UN ANTICUERPO MONOCLONAL.
- <130>
- <160> 4
- 10 <210> 1
- <211> 10
- <212> péptido
- <213> artificial
- 15 <310> US4666829
- <311> 15.05.85
- <312> 19.05.87
- 20 <400>
- Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr
- <210> 2
- 25 <211> 17
- <212> péptido
- <213> artificial
- <220>
- 30 <222> 1-17
- <223> Péptido β -amiloide
- <223> 6E10, SV17-6E10
- 35 <310> WO90/12871
- <311> 13.04.90
- <312> 01.11.90
- <400>
- 40 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Gln Val His His Gln Lys Leu
- <210> 3
- <211> 5
- 45 <212> péptido
- <213> humano
- <220>
- 50 <222> 12-16
- <223> Secuencia reconocida por EM5 en el péptido β -amiloide
- <400>
- Val His His Gln Lys
- 55 <210> 4
- <211> 8
- <212> péptido
- 60 <213> artificial
- <220>
- <223> Cola de acoplamiento para el diseño del extremo amino terminal de $A\beta_{37-42}$ y $A\beta_{37-49}$
- 65 <400>
- Cys Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 259 270

⑫ Nº de solicitud: 200500550

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 09.03.2005

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 5958883 A (SNOW) 28.09.1999, columna 15, línea 20 - columna 16, línea 10; seq. id. nº 3.	1-52
Y	EP 0683234 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES) 04.08.1994, página 4, línea 15 - página 8, línea 13.	1-52
A	US 4666829 A (GLENNER et al.) 19.05.1987, columna 1, línea 60 - columna 4, línea 17.	1-52
A	WO 9012871 A1 (RESEARCH FOUNDATION FOR MENTAL HYGIENE, INC) 01.11.1990, ejemplo 2.	1-52
A	US 5688651 A (SOLOMON) 18.11.1997, todo el documento.	1-52
A	WO 9721728 A1 (KAROLINSKA INNOVATIONS) 19.06.1997, página 3, línea 13 - página 10, línea 25.	1-52

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
24.05.2006

Examinador
A. Collados Martín Posadillo

Página
1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C12N 5/18 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)