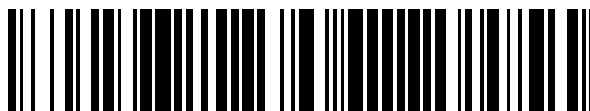


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 627**

51 Int. Cl.:
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05723280 .3**
96 Fecha de presentación: **17.02.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1720909**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.11.2006**

54 Título: **ANTICUERPOS ANTI-ABETA.**

30 Prioridad:
23.02.2004 US 546764 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.03.2012

73 Titular/es:
**ELI LILLY AND COMPANY
LILLY CORPORATE CENTER
INDIANAPOLIS, IN 46285, US**

72 Inventor/es:
**DEMATOS, Ronald, Bradley;
KUCHIBHOTLA, Uma;
YANG, Hsiu-Chiung y
MCCLURE, Don, B.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 375 627 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-Abeta

Campo de la invención

5 Esta invención está en el campo de la medicina. Más en particular, la invención está dirigida a un procedimiento para preparar un anticuerpo anti-A β exento del péptido A β o con cantidades aceptablemente bajas del mismo.

Antecedentes de la invención

10 Un componente principal de placas de amiloide es el péptido A β de los aminoácidos 39 a 43. Este péptido deriva proteolíticamente de una proteína de membrana íntegra de tipo I, la proteína precursora de amiloide (APP). Las formas predominantes secretadas en medios de cultivo de células son péptido A β (1-39/40 o X-39/40), mientras que las formas más largas, péptido A β (1-42/43 o X-42/43) que son menos solubles y con mayor tendencia a agregarse, constituyen las semillas nucleantes para el depósito de amiloides. Los depósitos de amiloides que comprenden péptido A β , (1-42/43) están asociados con afecciones y enfermedades tales como enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, angiopatía amiloide cerebral, demencias vasculares, empeoramiento cognoscitivo suave y similares.

15 Se han enfocado diversos tratamientos terapéuticos para afecciones y enfermedades relacionadas con depósitos anormales que contienen el péptido A β . en cuanto a impedir la producción de péptido y/o su agregación a plaquetas así como en cuanto a reducir o eliminar la producción de placas de amiloide. Otro enfoque de tratamiento implica la inducción de una respuesta inmunogénica al péptido A β por administración del péptido mediante, por ejemplo, inmunización activa (documento WO 99/27944). Sin embargo, un reciente estudio en Fase 2A utilizando un enfoque de inmunización con A β 1-42 sintético humano se suspendió tan pronto como cuatro pacientes tuvieron signos clínicos coherentes con inflamación del sistema nervioso central (SNC). Desde la suspensión, once pacientes más presentaron inflamación asociada del SNC (Orgogozo y otros, *Neurology*, 61:46-54 (2003), Schenk y otros, *Curr. Opin. Immun.*, 16:599-606 (2004). Así, la administración de péptido A β para tratar la enfermedad de Alzheimer ha causado acontecimientos adversos y generado reservas sobre su seguridad para el paciente.

20 Un medio inmunológico alternativo para seleccionar el péptido A β es por la administración de anticuerpos específicos para el péptido mediante, por ejemplo, inmunización pasiva. Si bien la inmunización pasiva no establece memoria en células T y B de la manera que lo hace la inmunización activa, el enfoque pasivo no ha generado los recelos en cuanto a la seguridad que acompañan a la inmunización activa.

El documento WO 02/46237 se refiere a anticuerpos humanizados que reconocen el péptido A β amiloide.

30 Previamente varias líneas de células, tales como K562, M17, HEK 293, CHO y HUVEC, demostraron producir péptido A β (Shoji y otros, *Science*, 258:126-129 (1002); Haass y otros, *Nature*, 359:322-325 (1992). Consecuentemente, muchas líneas de células que se pueden usar para expresar anticuerpos humanos o humanizados para uso clínico, tales como CHO y HEK 293, contienen endógenamente holoproteína de APP así como las γ - y β -secretasas necesarias para escindir APP y por ello expresar naturalmente péptido A β .

35 Sorprendentemente, durante la preparación de anticuerpos anti-A β se descubrió que el péptido A β produce endógenamente en la mayoría de mamíferos líneas de células comúnmente usadas para expresar anticuerpos recombinantemente, se une al anticuerpo anti-A β a bajos niveles y se obtiene mediante el cultivo de células y procedimiento de purificación. Junto con la contaminación del péptido A β del material anticuerpo anti-A β producido recombinantemente, hay posibilidad de una respuesta inmunogénica incrementada en un paciente, siendo de una importancia clave la prevención, eliminación o reducción del péptido A β . Además, cuando el péptido A β producido endógenamente, no es humano, como con la línea de células CHO, las implicaciones de inmunogenia para el péptido A β no humano unido al anticuerpo anti-A β expresado pueden causar para la seguridad del paciente una preocupación incluso mayor y, por ello, hacer que sean vitalmente importantes la prevención, eliminación o reducción del péptido A β .

Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención se proporciona un procedimiento para preparar un anticuerpo de A β que comprende las etapas de:

a – expresar el anticuerpo en células que expresan endógenamente péptido A β ,

b – añadir un inhibidor beta o gamma secretasa al medio usado para crecimiento de las células,

50 c – purificar el anticuerpo del medio de crecimiento, teniendo el que el anticuerpo purificado una concentración indetectable o niveles aceptablemente bajos de péptido A β producido endógenamente.

Preferiblemente, al medio se añade un inhibidor gamma secretasa.

Muy preferiblemente, las células son células de mamífero y son células de hamster, humanas o de ratón, seleccionadas ente CHO, HEK 293 y PER.C6.

5 Otra realización consiste en que el anticuerpo se exprese en células en las que la producción de A β se elimina mediante supresión de un gen específico, tal como el que codifica APP, β -secretasa o los genes de γ -secretasa, o mediante expresión intensificada de α -secretasa. Otra realización consiste en que el anticuerpo se produce en un cultivo de células que contiene inhibidor de $\alpha\beta$ - o γ -secretasa.

Descripción detallada de la invención

Se describen ahora los términos siguientes a los fines de la presente invención como se da a conocer y se reivindica.

10 Por "anticuerpo" se entiende un anticuerpo, que incluye sin limitación un anticuerpo quimérico, humanizado, humano, recombinante, transgénico, injertado y de cadena individual, y similares, o cualesquiera proteínas de fusión, conjugadas, fragmentos o derivados de los mismos que contienen uno o varios dominios que unen selectivamente péptido A β . Por tanto, anticuerpo incluye una molécula de inmunoglobulina entera, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano o un fragmento
15 inmunológicamente eficaz de cualquiera de ellos. Por fragmento de anticuerpo se entiende un fragmento Fv, un Fv unido a disulfuro, scFv, Fab, Fab' o F(ab')₂, que son bien conocidos en la técnica. La expresión "anticuerpo anti-A β " significa un anticuerpo que reconoce o un péptido A β .

20 El término "anticuerpo humanizado" significa un anticuerpo que está compuesto parcial o totalmente por secuencias de aminoácidos derivadas de un línea de germen de anticuerpo humano o secuencia reordenada y formada por alteración de la secuencia de un anticuerpo que tiene regiones que determinan una complementariedad no humana (CDR). Las regiones de marco conservado de las regiones variables son sustituidas por las correspondientes regiones de marco humanas dejando las CDR no humanas sustancialmente intactas. Las regiones de marco conservado humanas incluyen regiones de marco conservado genómicas, y también abarcan las que contienen una o varias sustituciones de aminoácido. En particular, tales sustituciones incluyen mutaciones en las que un
25 aminoácido en una posición particular del fragmento humano es sustituido con el aminoácido de la posición correspondiente del marco conservado natural para la CDR no humana. Un anticuerpo en el contexto de anticuerpo no humanizado no está limitado a un anticuerpo de longitud entera y puede incluir fragmentos y formas de cadena individual.

30 El término "péptido A β " o "A β " en esta contexto incluye los péptidos 39, 40, 41, 42 y 43 de aminoácidos derivados de la proteína precursora de amiloide (APP) in vivo por proteólisis, y cualesquier fragmentos de esos péptidos, tales como péptidos acortados N-terminalmente derivados de esos péptidos (por ejemplo, los indicados por x-42, siendo x = 1, 2, 3, etc), péptidos acortados C-terminalmente derivados de péptidos 1-39, 40, 41 y 42, y péptidos acortados en ambos extremos. Véase SEC laaad n^o. 1, péptido A β humano y SEC. ID. n^o. 2, péptido A β de roedor (esto es, ratón hamster) para detalles de cada secuencia de péptidos de aminoácidos de longitud entera.

35 Tal como se usa a aquí, el término " β -secretasa" se refiere a una enzima implicada en el procesamiento de APP que escinde APP para generar el extremo amino del péptido A β . El término " γ -secretasa" se refiere al complejo enzimático implicado en el procesamiento de APP que escinde APP tras la β -secretasa para generar el extremo carboxilo de A β . El término " α -secretasa" se refiere a la enzima implicada en el procesamiento de APP que escinde APP dentro de la secuencia de A β (entre los residuos 16 y 17 de péptido A β) en una vía de paso para APP soluble
40 tal que no se produce péptido A β . Por "inhibidores de β - o γ -secretasa" se entiende moléculas que inhiben (bloquean o reducen) la actividad enzimática de β - o γ -secretasas.

45 Por "niveles aceptablemente bajos de péptido A β " se entiende un nivel de péptido A β contaminante en una preparación de anticuerpo anti-A β que se considerara seguro y por ello aceptable o adecuado para administración a un sujeto humano, en particular en una composición farmacéutica. En particular, serían niveles de péptido A β aceptablemente bajos los que no causan una respuesta inmunogénica y/o respuesta inmunogénica acrecentada en un paciente al que se administra un anticuerpo anti-A β . Los niveles aceptablemente bajos se determinarían por un experto en la técnica siguiendo prácticas que se usan comúnmente y son aceptadas en el desarrollo de composiciones y formulaciones farmacéuticas respecto a seguridad.

50 Por "concentración indetectable" de péptido A β se entiende una concentración de péptido A β que es inferior a los límites de detección de procedimientos comúnmente usados para medir la concentración de péptido A β en una preparación de anticuerpo anti-A β . Entre tales procedimientos figuran, no limitativamente, ELISA, análisis por transferencia en gel de ácido-urea/western (descrito en los Ejemplos 1-3), procedimientos de espectrometría de masas, procedimientos analíticos por cromatografía, u otros procedimientos analíticos muy sensibles. Por ejemplo, el análisis en gel de ácido/western según se describe en los Ejemplos 1-3 tiene una sensibilidad máxima de \approx 1 pg de A β /μg de IgG, mientras que la ELISA usada en el Ejemplo 3 tiene un límite de detección de 0,02 ng/ml. Las
55 concentraciones de A β que son inferiores a esos límites para los respectivos procedimientos serían indetectables.

Las composiciones consideradas aquí pueden prepararse por cualquiera de los diferentes procedimientos conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos tienen la finalidad de ilustrar la invención, no de limitarla.

5 En general, la producción de anticuerpo recombinante se realiza usando procedimientos que se pueden agrupar en tres etapas principales: generación de la línea de células, cultivo de células y purificación. Así, después de haberse
 10 generado una línea de células, generalmente se prepara un anticuerpo anti-A β de la presente invención por un procedimiento que incluye expresar el anticuerpo en una línea de células y o purificar el anticuerpo. Los cambios hechos en cualquiera de estas etapas pueden afectar a la expresión o las características del anticuerpo generado. Diferentes variables pueden afectar a la expresión del anticuerpo en la etapa de generación de la línea de células, incluidas las construcciones de vector y las secuencias líder contenidas en ellas usadas para transformar le línea de
 15 células permitiendo la expresión del anticuerpo, la elección del tipo de célula, la selección de células transfectadas, la amplificación de gen y la exploración de la línea de células. La expresión de anticuerpo de la línea de células seleccionadas se basa en el uso de medio de cultivo de células. Modificaciones del medio tales como cambios de la temperatura, nutrientes y oxígeno disuelto pueden afectar a la expresión y calidad del producto. Tras la expresión del anticuerpo en cultivos de células, técnicas de purificación tales como varias técnicas cromatográficas, filtración e intercambio de tampón pueden afectar a las propiedades del producto deseado, así como la transparencia y la naturaleza de los contaminantes. A la vista de estas etapas generales de la producción de anticuerpo recombinante, la presente invención se puede realizar con éxito usando técnicas particulares o haciendo modificaciones específicas en cada una de estas etapas.

20 Los procedimientos para preparar las composiciones dadas a conocer aquí implican fuentes particulares de la línea de células así como modificaciones de la línea de células. Como se ha mencionado previamente, la línea de células afecta a la expresión de anticuerpo. Los procedimientos para preparar las composiciones descritas aquí incluyen el uso de células mamíferas para expresar anticuerpo anti-A β . Preferiblemente, la línea de célula mamífera es un hamster, un ser humano o una línea de célula de ratón. Más preferiblemente, la línea de célula de mamífero es CHO, HEK 293 o PER C6. Muy preferiblemente, la línea de células de mamífero es CHO.

25 Las líneas de células de mamífero que carecen de APP o una de las secretasas (β - o γ -secretasa) se pueden usar para expresar anticuerpos recombinantes. Se puede conseguir una línea que carece o que tiene niveles reducidos de APP, β - o γ -secretasa mediante diferentes manipulaciones o modificaciones de líneas de células. Las líneas de células en las que el (los) gen(es) que codifica(n) APP, β - o γ -proteasa están noqueadas se pueden generar por
 30 procedimientos bien conocidos en la técnica. Alternativamente, modificaciones de la línea de células pueden producir este efecto de carecer de un gen. Un ejemplo de una modificación útil de una línea de células implica reducir significativamente la cantidad de péptido A β expresado por degradación del transcrito de ARN para la proteína no deseada (por ejemplo, APP o β - o γ -secretasa) mediante un procedimiento conocido como interferencia de ARN. Para posibilitar la transferencia de ARN, las células se pueden transfectar estable o transitoriamente, o infectar, con una secuencia de ADN para que resulte una expresión mediada por plásmido o viralmente de
 35 estructuras de ARN de horquillas pequeñas que se unen específicamente al transcrito de interés para iniciar la escisión o degradación de ese transcrito de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica (Banan y Puri, Curr. Pharm. Biotechnol. 5:441-50 (2004); Nesterova y Cho.Chung, Curr. Drug Targets, 5:683-9 (2004); Medema, Biochem. J., 380:593-603 (2004). Como alternativa al cultivo de células de mamífero para expresión de proteínas se han usado plantas o cultivos de células transgénicas (Hellwig y otros, 2004, Nature Biotechnology, 22:1415 (2004)),
 40 y puede haber otra fuente para producir anticuerpos que carecen de A β . Análogamente, comúnmente se usan diversas especies de levaduras como alternativa al cultivo de células mamíferas y podrían ser aplicables para expresión de anticuerpos que carecen de A β . El uso de de estos procedimientos reduce o evita la producción de péptido A β .

45 Los procedimientos para preparar las composiciones dadas a conocer aquí implican modificaciones en el cultivo de células. Estos procedimientos incluyen la incorporación de inhibidores de β - o γ -secretasa en el cultivo de células para producir anticuerpo anti-A β con niveles aceptablemente bajos de péptido A β . Son conocidos varios inhibidores de β - o γ -secretasa (por ejemplo, patente U.S. n $^{\circ}$. 6.486.350, U.S. n $^{\circ}$. 6.627.739, Dovey y otros, J. Neurochem. 76:173-181 (2001), Yue-Ming y otros, Nature, 405:689-694 (2000) y se pueden usar para estos procedimientos.

50 Procedimientos adicionales para preparar las composiciones descritas aquí aumentan la producción de APP soluble reduciendo así la cantidad de péptido A β producido. La producción de APP soluble se puede incrementar mediante una actividad de α -secretasa intensificada en la línea de células. Se puede generar una línea de células con actividad de α -secretasa intensificada por procedimientos conocidos en la técnica. Alternativamente, la producción de APP soluble se aumenta con la adición de cobre a células CHO (Borchardt y otros, Biochem. J., 344, 431-467 (1999). La adición de cobre también reduce mucho los niveles de péptido A β en células parenterales CHO-K1 y en
 55 células de CHO-CUR3 resistentes al cobre.

Los procedimientos para preparar composiciones dadas a conocer aquí implican también diversas técnicas de purificación. Estas técnicas incluyen la captura de proteína A de anticuerpo de cultivo de células. La subsiguiente purificación puede incluir el uso de agentes para disociar el anticuerpo anti-A β seguido por separación del

anticuerpo del antígeno basándose en diferencias cromatográficas entre estas dos entidades. Entre los agentes disociativos preferidos figuran ácido, urea, tiocianato y detergente. Después de que se haya realizado la disociación del anticuerpo y el antígeno se usan técnicas cromatográficas capaces de separar el anticuerpo anti-A β del péptido A β para eliminar el antígeno del anticuerpo o del complejo anticuerpo-antígeno. Estas técnicas cromatográficas preferiblemente son cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en fase inversa y cromatografía de interacción hidrófoba. Además, como otra técnica para separar el antígeno del anticuerpo se usa filtración en flujo tangencial. En un procedimiento preferente de purificación, las composiciones descritas aquí se purifican por etapas que incluyen captura de proteína A, neutralización, dilución, acidificación del anticuerpo, cromatografía de exclusión por tamaños y neutralización (véase Ejemplo 2).

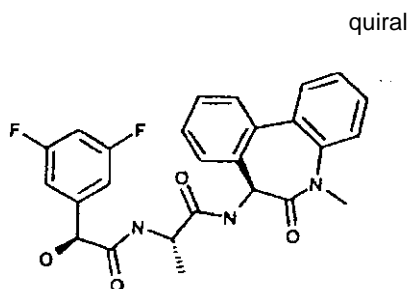
Otros procedimientos cromatográficos usan un anticuerpo inmovilizado a otro epítipo de péptido A β o un anticuerpo con mayor afinidad a A β para aislar y eliminar el complejo anticuerpo-antígeno o el antígeno.

Las composiciones consideradas aquí se pueden usar para tratar pacientes humanos con afecciones y enfermedades tales como enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, angiopatía cerebral amiloide, demencias vasculares, discapacidad cognoscitiva suave, y similares. Todo péptido A β puede originar riesgos de inmunogenia potencial para el paciente incluso con mayores reservas en cuanto a la salud si el péptido A β es no humano. Por ello, la prevención, la eliminación o la reducción del péptido A β es clave.

Las composiciones dadas a conocer aquí son adecuadas para administración a un sujeto humano como una composición farmacéutica que incluye un anticuerpo anti-A β y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Entre los ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables figuran tampones, tensioactivos, agentes solubilizantes, agentes isotónicos, agentes estabilizadores y similares diseñados como apropiados para el modo de administración seleccionados. Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton PA, proporciona un compendio de técnicas de formulación conocidas generalmente por quienes las practican.

Los ejemplos siguientes se presentan a fines ilustrativos y no son limitativos de la invención.

Ejemplo 1. Expresión de péptido anti-A β en un cultivo de células que contiene un inhibidor de γ -secretasa



Se añade un inhibidor de γ -secretasa (WO 98/28268) al cultivo de células HEK 293 en el que se expresa un anticuerpo anti-A β para reducir la cantidad de péptido A β expresado naturalmente por las células. Las muestras del cultivo de células para este ejemplo incluyen un cultivo de control sin inhibidor añadido, un cultivo en el que se añade inhibidor 1 nM al tiempo $t = 0$ y cada 24 horas después durante 5 días (para una transfección de 5 días) y un cultivo en el que se añade inhibidor 1 nM en el tiempo $t = 0$. Estas muestras se purifican usando una columna de proteína A así como cromatografía de exclusión por tamaños. Las muestras se analizan en cuanto al contenido de A β por separación en gel de ácido-urea y posterior análisis por transferencia western como se detalla más adelante. Los resultados de anti-A β producido y analizado de esta manera se presentan en la siguiente Tabla 1.

El protocolo siguiente describe una técnica para desnaturalización del ácido fórmico de muestras y posterior electroforesis a través de una matriz de poliacrilamida ácido-urea.

Día 1

Montaje del aparato

1. Se limpian y montan placas de gel de acrilamida para colar. Por ejemplo, placas de Hoeffer en un estante de colada (placas de 16 cm x 14 cm con espaciadores de 1,5 mm). Se enjuagan a fondo con detergente en agua destilada (H₂O_d) las placas limpias, se enjuagan con acetona y finalmente con alcohol del 100%.

2. Se marcan las placas a 10 cm (22% de gel separador) y 11,75 cm (10% de gel de etapa).

Preparación del gel y concentraciones de gel

(1). Solución de acrilamida (solución al 40%, tal como Bio-Rad/cat n°. 61-0148)

(2). Componentes del gel

	4% de acumulador	10%	22%
5 Urea	5,76 g	2,88 g	11,56 g
Acrilamida al 40%	1,6 ml	2 ml	17,6 ml
GAA	1,6 ml	800 µl	3,2 ml
TEMED (2,5%)	450 µl	200 µl	600 µl
APi (10%)	100 µl	100 µl	100 µl
10 H ₂ O _d	hasta 16 ml	hasta 8 ml	hasta 32 ml

Se añade urea, acrilamida, ácido acético glacial (GAA) y H₂O_d a tubos cónicos de 50 ml. Se agita con vortex y se incubaba en baño de agua a 55°C. Se agita con vortex cada unos pocos minutos hasta que la urea esté completamente en solución. Se desgasean las soluciones al 22% y 10% y las soluciones se ponen sobre hielo, dejando el resolvente a 4% en el baño de agua.

Vertido del gel (a temperatura ambiente)

(1). Se añade N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) a la solución al 22% y se agita suavemente varias veces para mezclar. Seguidamente se añade el APS (persulfato amónico) al 10% y se invierte varias veces. Usando una pipeta de 25 ml se vierte lentamente la solución entre las placas hasta que alcanza la marca de 10 cm.

(2). Se añade cuidadosamente un revestimiento de 750 µl de GAA al 5%. Se usa una pipeta P1000 para llevar lentamente el GAA al 5% abajo de un lado de las placas de vidrio sobre el gel resolventa

(3) Se deja que polimerice a temperatura ambiente durante al menos 1 hora.

(4) Se añade TEMED y la solución de acrilamida al 10% de la misma manera que la solución al 22%. Se elimina el revestimiento y se añade la solución hasta que se alcanza la segunda marca a 11,75 cm. Nuevamente se vierte con cuidado un revestimiento de 750 µl de GAA al 5% como antes. Se deja que polimerice el gel durante 30 minutos.

(5) Antes de añadir la solución de acumulador al 4%, se pone el estante de gel en una incubadora a 37°C durante 15 minutos para calentar los geles. Esto ayuda a que la polimerización en los pocillos se haga correctamente. Se desgasifica la solución de acumulador al 4% y se mantiene a 55°C. Se elimina el revestimiento. Se añade TEMED, se invierte varias veces y luego se añade el APS al 10%. Se vierte rápidamente esta solución y se inserta un peine de 12 pocillos limpio-seco (o un peine de 15 pocillos). Después de verter el acumulador, se vuelve a poner el estante en la incubadora durante 25 minutos, luego se quita. Se deja que polimerice en la parte de arriba del banco. El acumulador tardará en polimerizar completamente al menos 1,5 horas.

NOTA: Durante las etapas de polimerización, aparecerán bolsas de aire en el gel resolvente. Estas bolsas es forman debido al cambio de temperatura del gel durante y después de la polimerización. Estos espacios no afectan al comportamiento de la técnica.

Preparación de muestras

En los análisis por encima de 3 mg de proteína en un solo carril se lograrán resultados razonables de bandas. Las condiciones para analizar la proteína son como sigue:

Muestra:

30 µl de 100 mg/ml de proteína (concentración máxima de proteína)

80 µl de ácido fórmico (98%) (ICN cat nº 15162-90)

20 µl de tampón con carga de ácido (80% de ácido fórmico, 60% de sacarosa, 0,02 verde de metilo. El tampón se prepara disolviendo 6 g de sacarosa en aprox. 8 ml de ácido fórmico al aprox. 99%. Se caliente y agita la mezcla. Después de haberse disuelto la sacarosa se ajusta el volumen de la solución a 10 ml con ácido fórmico aprox. al 90%. Se añaden 2 µl de solución de verde de metilo).

1µl de mercaptoetanol.

ES 2 375 627 T3

Nota. Es necesario ajustar los volúmenes. Sin embargo, se ha de asegurar que la concentración final de ácido fórmico de sea siempre de entre 70% y 90%.

Escaleras

- 5 Marcadores de peso molecular de Pharmacia. Intervalo del P.M. 2.512-16.949 (cat. nº. 1129-83). Se reconstituye la proteína en 1 ml de PBS. Se congelan partes alícuotas de 10 µl a -20°C. Se descongela 1 alícuota para cada escalera necesitada y se añaden 90 µl de ácido fórmico (98%) , 20 µl de tampón de carga de ácido y 1 µl de β-mercaptoetanol.

Muestras de BSA

- 10 En los dos carriles exteriores de cada tanda de gel se produce distorsión. Para coadyuvar a minimizar los efectos negativos que crea esta distorsión, se cargan muestras de BSA en estos carriles exteriores de cada lado del gel. Muestras de BSA = 1 µl de BSA al 5%, 90 µl de ácido fórmico (98%), 20 µl de tampón de carga de ácido y 1 µl de β-mercaptoetanol.

Desarrollo del gel

- 15 Acción previa: Se monta el aparato en una habitación fría. Se llena la cámara del fondo (tres cuartos de su volumen) con el tampón de acción del gel de ácido preenfriado. Se añade una cantidad apropiada de tampón al depósito de arriba. Se hace preactuar el ánodo al cátodo de gel a 250 volts durante 30 minutos.

* Se eliminan todas las burbujas de aire del fondo del gel y se verifica que no ha habido escapes de tampón del depósito de arriba.

** Tampón de acción del gel de ácido = 250 ml de ácido acético glacial + 3750 ml de H₂O_d.

- 20 Carga de las muestras

Se enjuagan los pocillos con tampón antes de cargar las muestras para coadyuvar a la eliminación de urea en exceso, Se cargan las muestras, escaleras y muestras de BSA exteriores. Téngase en cuenta que dos escaleras funcionan de manera que antes de la transferencia, un carril que contiene una escalera de péptido se corta y se tiñe con Coomassie Blue.

- 25 Voltaje de etapa. El gel se desarrolla de ánodo a cátodo como sigue

-15 min a 25 volts

-15 min a 50 volts

-15 min a 100 volts

- 18 min a 200 volts

- 30 - 15 horas a 275 volts

** Se desarrolla el gel durante la noche hasta que el frente del colorante esté a aprox. 2 a 2,5 cm del fondo, que generalmente es la mañana siguiente si se inició el gel al final de la tarde.

Día 2

Condiciones de transferencia para el gel de ácido-urea (en ambiente frío a 4°C)

- 35 La noche anterior a la transferencia se prepara el tampón siguiente y se almacena en un ambiente frío.

Tampón de transferencia:

Base Tris 12,36 g

Glicina 57,6 g

Metanol 800 ml

- 40 H₂O_d Hasta 4 litros

Se neutraliza el gel de ácido-urea antes de la transferencia. Se elimina cuidadosamente el gel y se pone en una bandeja de vidrio lavada. Se añaden 200 ml de tampón de transferencia y se mece suavemente durante 15 min. Se repite la etapa de lavado hasta 4 veces en total. Se realiza la transferencia como es normal (2,5 horas a 100 volts).

Tinción con Ponceau S y destinción

- 45 Después de la transferencia, se visualizan las proteínas en el rastreador por tinción con Ponceau S. La nitrocelulosa se tiñe durante 5 min en una solución de Pon-S al 0,1% en ácido acético al 5%. Después de desteñir la membrana

con H₂O_d (tres lavados muy cortos), se rastrea digitalmente y se marcan las escaleras con un lápiz mate. Se archiva.

5 *Nota. Esta escalera se usa sólo para fines de alineamiento. Esta técnica separa péptidos de acuerdo con su peso molecular (tamaño) y carga. Por ejemplo, dos péptidos del mismo peso molecular pero con diferentes cargas probablemente no tienen la misma movilidad. A causa de estas cuestiones, siempre se deben tratar los patrones de péptido A β en al menos un pocillo, lo que permite una identificación precisa del péptido A β .

** Importante. Todas las bandas de la escalera patrón de péptido no se transfieren. Cuando la escalera de azul de Coomassie se alinea con la nitrocelulosa teñida con Ponceau S, se ve que las bandas de 10,7 kDa y 6,2 kDa no se transfieren.

10 Condiciones de transferencia western

La membrana de nitrocelulosa se cuece en PBS durante 5 min, Se actúa en las condiciones usuales de western.

Etapas de bloqueo

Se bloquean las membranas en leche al 5% 1 X en solución salina tamponada con Tris/0,125% de Tween 20® (TBS/T) durante 45 min a un volumen de 50 ml.

15 Anticuerpo principal

Se usa un número seleccionado de anticuerpos anti-A β (por ejemplo 3) uniéndose los epitopos de unión de los anticuerpos seleccionados a diferentes regiones del péptido A β . Se debe asegurar que los anticuerpos seleccionados también permite la visualización estándar de como mínimo 79 pg. La solución de anticuerpo primario está en 0,5% de leche TBS/T con, por ejemplo, una dilución 1:1000 de los anticuerpos seleccionados a un volumen total de 20 ml. Se deja durante la noche anticuerpo primario en un agitador por balanceo.

Día 3

Lavado de membrana

Se lava la membrana 3 X en BSA al 1% en TBS/T durante 10-15 min cada una.

Anticuerpo secundario

25 La solución de anticuerpo secundario es en leche al 1% TBS/T con una dilución 1:6000 de HRP antirratón (catálogo n°, 7076 de Cell Signaling) a un volumen total de 50 ml. Se deja la membrana en el anticuerpo secundario durante 3 horas.

Después del anticuerpo secundario, la membrana se lava 3 X con TBS/T durante 15 min cada una,

Revelado

30 Se pone la membrana en solución quimioluminiscente intensificada (ECL) (Pierce Super Signal West Pico Catalog n°. 34080) durante 5 min antes del revelado.

La sensibilidad máxima de este procedimiento depende de los reactivos usados durante el procedimiento de transferencia western. Para el ejemplo detallado antes, la sensibilidad máxima de este ensayo es de \approx 1 pg/ μ g IgG. Para las muestras, la concentración de IgG (mg/ml) se determina por medida de la absorbancia a 280 nm y dividiendo ese valor por un coeficiente de extinción de 1,4.

Los análisis de las muestras generadas de acuerdo con este ejemplo dieron los resultados siguientes:

Tabla 1. Análisis de gel de ácido-urea de anticuerpo purificado de células con o sin un inhibidor de γ -secretasa

Muestra	FL ¹ (pg/ μ g IgG)	T1 ² (pg/ μ g IgG)	T2 ³ (pg/ μ g IgG)	Total de hA β 40 (pg/ μ g IgG)
Sin inhibidor	70	38	70	178
Inhibidor cada 24 h durante 5 días	4	0	3	7
Inhibidor a T = 0	56	27	52	135

¹ hA β de longitud entera

40 ² hA β 40 truncada N-terminal, n°. 1

³ hA β 40 truncada N-terminal, n°. 2

Ejemplo 2Purificación de anticuerpo anti-A β por disociación de anticuerpo y péptido A β

Se expresa un anticuerpo anti-A β en células HEK crecidas en cultivo de células. El anticuerpo se purifica aplicando un medio de cultivo a una columna de proteína A-agarosa y se eluye con tampón de glicina 100 mM, pH 3,1. El conjunto de fracciones eluido de proteína A se ajusta a un pH de aprox. 7,4 añadiendo un volumen pequeño de tampón Tris 1M, pH 8,0. Este agrupamiento de fracciones eluidas se ajusta luego a un pH de aprox. 2 diluyendo 1:1 en glicina 1M, pH 2. Después de aproximadamente 10 de incubación a temperatura ambiente, el agrupamiento de extractos acidificado se somete a cromatografía de exclusión por tamaño en una columna 26/60 Superdex 200 (Amersham) usando una fase móvil de glicina 50 mM, NaCl 150 mM, pH 2, a un caudal de 30 cm/h. El anticuerpo eluido de la columna de exclusión por tamaño se neutraliza añadiendo tampón Tris y se dializa frente a PBS a pH 7,4.

Los análisis de gel de poliacrilamida desnaturalizantes con gradiente de ácido/urea (véase Ejemplo 1 para más descripción de esta técnica) proporcionan estimaciones de la masa del péptido A β en unidades de pg por μ g de IgG para muestras generadas de acuerdo con este procedimiento de purificación por disociación con ácido. Se obtuvieron los siguientes resultados siguiendo la purificación de anticuerpos anti-A β usando este procedimiento de purificación por disociación con ácido.

Tabla 2. Análisis de gel de urea con ácido de anticuerpo purificado de células HEK 293 sólo por cromatografía de exclusión por tamaños (sin acidificación) o por acidificación y cromatografía de exclusión por tamaños.

Muestra	FL ¹ (pg/ μ g IgG)	T1 ² (pg/ μ g IgG)	T2 ³ (pg/ μ g IgG)	Total de hA β 40 (pg/ μ g IgG)
HEK 293, sin ácido, exclusión por tamaños	39	0	0	39
HEK 293, con ácido y exclusión por tamaños	11	0	0	11

¹ hA β 40 de longitud entera

² hA β 40 truncada N-terminal, n^o. 1

³ hA β 40 truncada N-terminal, n^o. 2

Ejemplo 3Expresión de anticuerpo anti-A β en células NS0

Se expresa un anticuerpo Anti-A β de células NS0 crecidas en cultivo de células. El anticuerpo se purifica aplicando el medio de cultivo a una columna de proteína A-agarosa y se eluye con tampón de glicina 100 mM, pH 3,1. Se ajusta el agrupamiento de fracciones eluidas de proteína A a aproximadamente pH 7,4 añadiendo tampón Tris 1M, pH 8,0. Esta agrupamiento de fracciones eluidas se diluye luego 1:1 con PBS y se somete a cromatografía de exclusión por tamaños en una columna 26/60 Superdex 200 (Amersham) usando una fase móvil de PBS, NaCl 150 mM, pH 7,4, a un caudal de 30 cm/h. El anticuerpo eluido del péptido de exclusión por tamaño se dializa frente a PBS a pH 7,4. Usando análisis de poliacrilamida con gradiente de ácido/urea desnaturalizante no se detectó péptido A β alguno en anticuerpos anti-A β producidos por este procedimiento.

Se usó análisis ELISA para cuantificar la concentración de péptido A β . Se revisten pocillos de placas ELISA de 96 pocillos (Nunc MaxiSorp^{MC} F96 o C90 con anticuerpos anti-A β (por ejemplo, 2 o más) - que reconocerán la región de unión de epitopos fuera del péptido A β central (por ejemplo 17-25) - a una concentración de, por ejemplo, 7,5 μ g/ml, de cada anticuerpo en un tampón de revestimiento durante la noche a temperaturas refrigeradas. Después de aspirar la solución de revestimiento de las placas, se bloquean los pocillos con 300 μ l/pocillo de HBST/Blotto (leche seca no grasa al 0,25% p/v en solución salina tamponada con HEPES (10 mM y 150 mM respectivamente)) con EDTA (3 mM) y Tween al 20% 0,5% p/v) durante 1 a 2 horas a temperatura ambiente y luego se lavan 1 X con tampón de lavado (1 X PBS con 0,1% v/v de Tween 20[®]) y se aspiran. Las muestras que contienen el anticuerpo se diluyen apropiadamente en HBST /Blotto y se aplican a placas ELISA (100 μ l/pocillo). A diluciones equivalentes se incorpora péptido A β 1-40 sintético de roedor de 0,4 ng/ml para asegurar una cuantificación precisa en la matriz de muestra diluida. Como patrón se usa el péptido A β 1-40 de roedor sintético junto con anticuerpo anti-A β purificado (con < 1 ppm en total de péptido A β de roedor). También se ensayan muestras de control que contienen anticuerpo (para control de péptido A β total) y péptido A β de roedor sintético 1-42 incorporado en el anticuerpo (para control

del péptido A β 1-42). La placa de ELISA se incuba durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Se lavan los pocillos 4 x con tampón de lavado y se aspiran. Luego se aplican a cada pocillo 100 μ l de conjugado de fosfatasa alcalina – anticuerpo humano IgG de burro diluido (1:10.000) (Jackson Immunoresearch, nº. 709-056-149) en HBST/Blotto. Después de incubar durante 1-2 horas a temperatura ambiente, lavar 4 X con tampón de lavado y aspirar los pocillos, se añadieron a cada pocillo 100 μ g/ml de solución sustrato de pNPP (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc, nº, 50-80-00) en solución 1 X de tampón DEA. La placa ELISA se incuba a temperatura ambiente con sacudida periódica. Se lee la absorbancia a 405 nm usando un lector de microplacas cuando el color se revela suficientemente (usualmente 2,0 a 2,5 unidades de absorbancia) para los patrones. El límite de detección es 0,02 ng/ml. El límite de cuantificación es 0,1 ng/ml. Las determinaciones de concentración de los patrones se efectúan por Análisis AAA. Para las muestras, la concentración de IgG (mg/ml) se determina midiendo la absorbancia a 280 nm y dividiendo ese valor por un coeficiente de extinción de 1,4. Usando el análisis ELISA en anticuerpos expresados en células NS0 como se ha descrito antes, no se detectó péptido A β .

Ejemplo 4

Reducción por intercambio catiónico de péptido A β en una preparación de anticuerpo anti-A β humanizado

Se expresa en células CHO una preparación de anticuerpo anti-A β humanizado. El anticuerpo se purifica aplicando el medio de cultivo a una columna de proteína A-agarosa y se eluye con tampón de glicina 100 mM, pH 3,1. El agrupamiento de fracciones eluidas de proteína A se ajusta a aproximadamente pH 7,4 añadiendo tampón Tris 1 M, pH 8,0. La preparación de anticuerpo contiene 15-20 ppm de péptido A β de hamster, según se determinó por ELISA.

El anticuerpo se purifica más por cromatografía de intercambio catiónico como sigue. El material anticuerpo de partida se diafiltra frente a acetato sódico 50 mM a pH 5,2 (5 volúmenes, usando un ultrafiltro de flujo tangencial PES con corte a 30 k) para rebajar la conductividad de la preparación para cargarla en la columna de intercambio catiónico. La solución de proteína diafiltrada se aplica luego a una columna SP Sepharose de alto rendimiento (GE Healthcare) (0,66 x 15 cm cargada a 15 mg de proteína por ml de volumen de columna) equilibrada en acetato sódico 50 mM a pH 5,2. Todas las operaciones se realizan a temperatura ambiente y un caudal lineal de 115 cm/h. Después de cargarla, la columna se lava con 5 volúmenes de columna de acetato sódico 50 mM a pH 5,2 y el anticuerpo se eluye escalonadamente (5 volúmenes de columna de acetato sódico 50 mM, NaCl 135 mM, pH 5,2) o con un gradiente de volumen de columna lineal 15 de 0 a 150 mM de NaCl en acetato sódico 50 mM, pH 5,2. Se combinan fracciones del pico principal (para conseguir un rendimiento de aproximadamente 90%). Los anticuerpos anti-A β purificados de esta manera dieron por resultado agrupamientos de fracciones con un contenido de péptido A β más bajo que el material de partida (10 ppm para el material eluido escalonadamente y 9 ppm para el material eluido con gradiente).

Ejemplo 5

Reducción de la inmunopurificación de A β en anticuerpos anti-A β

Se expresa un anticuerpo anti-A β que se une en el dominio central de A β humano entre los aminoácidos 13-28 a partir de células HEK293 crecidas en cultivo de células. Se separa péptido A β humano contaminante de este anticuerpo por inmunopurificación usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra el extremo carboxilo de Abeta 40, 2G3, acoplado a perlas de agarosa. La preparación de anticuerpo se hace girar durante la noche con las perlas 2G3 acopladas a una relación 10:1 en volumen. Tras la incubación durante la noche, se sedimentan las perlas de agarosa para eliminar los complejos 2G3-A β . Luego se usa ELISA para determinar la cantidad de péptido A β presente en el anticuerpo anti-A β antes y después de la inmunopurificación.

Las preparaciones de anticuerpos anti-A β inmunopurificados de esta manera y analizados por ELISA se encontró que tenían 10-25 pg de A β / μ g de IgG antes de la purificación y que no tenían A β detectable después de la purificación. La reducción de la contaminación de A β fue confirmada por análisis gel de ácido/western como se ha descrito en el Ejemplo 1.

Listado de Secuencias

<110> Eli Lilly And Company

<120> Anticuerpo ti-Abeta

<130> x 16324

<150> 60/546.764

<151> 23-02-2004

<160> 2

<170> Patentin versión 3.2

<210> 1

<211> 43

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 1

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

<210> 2

<211> 43

<212> PRT

<213> Hamster

<400> 2

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

10

15

20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar un anticuerpo anti-A β , que comprende las etapas de:
 - (a) expresar el anticuerpo en células que expresan endógenamente péptido A β ;
 - (b) añadir un inhibidor de beta o de gamma secretasa al medio usado para el crecimiento de las células y
 - 5 (c) purificar el anticuerpo del medio de crecimiento, teniendo el anticuerpo purificado una concentración indetectable o niveles aceptablemente bajos de péptido A β producido endógenamente.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se añade al medio un inhibidor de gamma secretasa.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que las células son células de mamífero.
4. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que las células son células de hamster, humanas o de ratón.
- 10 5. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que las células se seleccionan entre el grupo constituido por células CHO, HEK 293 y PER C6.