

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 112**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2007 E 07840408 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 2046833**

54 Título: **Anticuerpo humanizado**

30 Prioridad:

14.07.2006 EP 06014730

02.10.2006 EP 06020765

11.06.2007 US 943289 P

12.06.2007 US 943499 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.12.2013

73 Titular/es:

AC IMMUNE S.A. (50.0%)

EPFL Innovation Park, Building B

1015 Lausanne, CH y

GENENTECH, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

PFEIFER, ANDREA;

PIHLGREN, MARIA;

MUHS, ANDREAS y

WATTS, RYAN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 436 112 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo humanizado

- 5 La presente invención se refiere a anticuerpos y composiciones para el tratamiento de la amiloidosis, un grupo de trastornos y anomalías asociadas a la proteína amiloide, tales como la enfermedad de Alzheimer.

10 La amiloidosis no es una única entidad patológica, sino un grupo diverso de procesos patológicos progresivos caracterizados por depósitos de tejido extracelular de una proteína cerosa, similar al almidón, denominada amiloide, que se acumula en uno o más órganos o aparatos del cuerpo. A medida que se acumulan los depósitos de amiloide, comienzan a interferir con la función normal del órgano o aparato del cuerpo. Hay al menos 15 tipos diferentes de amiloidosis. Las formas principales son la amiloidosis primaria sin antecedentes conocidos, la amiloidosis secundaria tras alguna otra afección, y la amiloidosis hereditaria.

- 15 La amiloidosis secundaria se da durante una infección crónica o enfermedad inflamatoria, tal como tuberculosis, una infección bacteriana denominada fiebre mediterránea familiar, infecciones óseas (osteomielitis), artritis reumatoide, inflamación del intestino delgado (ileítis granulomatosa), enfermedad de Hodgkin, y lepra.

20 Los depósitos de amiloide incluyen el componente amiloide P (pentagonal) (AP), una glicoproteína relacionada con el amiloide P sérico (SAP) normal, y los glicosaminoglicanos (GAG) sulfatados, carbohidratos complejos del tejido conectivo. Las fibrillas de proteína amiloide, que representan alrededor del 90% del material amiloide, comprenden uno de varios tipos diferentes de proteínas. Estas proteínas son capaces de plegarse en las denominadas fibrillas de láminas "plegadas beta", una configuración proteica única que exhibe sitios de unión para el rojo Congo que da como resultado las propiedades de tinción únicas de la proteína amiloide.

25 Muchas enfermedades asociadas al envejecimiento se basan o están asociadas a proteínas similares al amiloide y se caracterizan, en parte, por la acumulación de depósitos extracelulares de amiloide o material similar al amiloide que contribuyen a la patogénesis, así como a la progresión de la enfermedad. Estas enfermedades incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tales como la Enfermedad de Alzheimer (EA), demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch); el complejo Parkinson-Demencia de Guam. Otras enfermedades que se basan o están asociadas a proteínas similares a amiloide son la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del adulto; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, lo que incluye la degeneración macular.

35 Aunque la patogénesis de estas enfermedades puede ser diversa, sus depósitos característicos contienen a menudo muchos constituyentes moleculares compartidos. Hasta un grado significativo, esto puede ser atribuible a la activación local de rutas pro-inflamatorias, que conducen así al depósito concurrente de componentes del complemento activados, reactivos de fase aguda, moduladores inmunitarios, y otros mediadores inflamatorios (McGeer et al., 1994).

45 La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurológico que se cree que está provocado principalmente por placas de amiloide, una acumulación de un depósito anormal de proteínas en el cerebro. El tipo más frecuente de amiloide hallado en el cerebro de los individuos afectados está compuesto principalmente de fibrillas de A β . Las pruebas científicas demuestran que un incremento de la producción y acumulación de la proteína beta-amiloide en placas conduce a la muerte de las neuronas, lo que contribuye al desarrollo y la progresión de EA. La pérdida de neuronas en áreas estratégicas del cerebro, a su vez, provoca la reducción de los neurotransmisores y el deterioro de la memoria. Las proteínas principalmente responsables de la acumulación de la placa incluyen la proteína precursora de amiloide (APP) y dos presenilinas (presenilina I y presenilina II). La escisión secuencial de la proteína precursora de amiloide (APP), que se expresa de manera constitutiva y se cataboliza en la mayoría de las células, por las enzimas β y γ secretasa conduce a la liberación de un péptido A β de 39 a 43 aminoácidos. La degradación de APPs incrementa probablemente su propensión a agregarse en placas. El fragmento A β (1-42) es el que tiene especialmente una propensión elevada a construir agregados debido a dos residuos de aminoácidos muy hidrófobos en su extremo C-terminal. Se cree, por lo tanto, que el fragmento A β (1-42) está implicado y es responsable principalmente del inicio de la formación de placas neuríticas en EA y tiene, por lo tanto, un potencial patológico elevado. Por lo tanto, existe la necesidad de agentes para prevenir la formación de placas de amiloide y para difundir las placas existentes en EA.

60 Los síntomas de EA se manifiestan lentamente, y el primer síntoma puede ser solamente una falta de memoria leve. En esta etapa, los individuos pueden olvidar sucesos recientes, actividades, los nombres de personas o cosas familiares y pueden no ser capaces de resolver problemas matemáticos simples. A medida que la enfermedad progresa, los síntomas se notan más fácilmente y pasan a ser lo suficientemente graves como para provocar que las personas con EA o los miembros de sus familias busquen ayuda médica. Los síntomas de la fase intermedia de EA incluyen el olvidar cómo hacer tareas simples tales como el aseo personal, y se desarrollan problemas con el habla, la comprensión, la lectura, o la escritura. Los pacientes de EA en la fase avanzada pueden volverse nerviosos o agresivos, pueden deambular lejos de su domicilio, y finalmente necesitan asistencia completa.

En la actualidad, la única manera definitiva de diagnosticar la EA es identificar las placas y ovillos en el tejido cerebral en una autopsia tras la muerte del individuo. Por lo tanto, los médicos solamente pueden hacer un diagnóstico de EA "posible" o "probable" mientras la persona todavía está viva. Mediante el uso de los métodos actuales, los médicos pueden diagnosticar la EA correctamente hasta en un 90 por ciento de las veces mediante el uso de varias herramientas para diagnosticar una EA "probable". Los médicos hacen preguntas sobre la salud general de la persona, los problemas médicos pasados, y el historial de cualquier dificultad que la persona tenga al llevar a cabo sus actividades diarias. Los ensayos conductuales de memoria, resolución de problemas, atención, cálculo, y lenguaje proporcionan información sobre la degeneración cognitiva, y los ensayos médicos tales como análisis de sangre, orina, o líquido cefalorraquídeo, y los escáneres cerebrales pueden proporcionar cierta información adicional.

El tratamiento de EA consiste en tratamientos basados en medicación y no basados en medicación. Los tratamientos dirigidos a cambiar el desarrollo subyacente de la enfermedad (retrasar o invertir la progresión) hasta ahora han sido infructuosos en gran medida. Se ha demostrado que los medicamentos que restablecen el déficit (defecto), o mal funcionamiento, de los mensajeros químicos de las neuronas (neurotransmisores), en particular los inhibidores de colinesterasa (ChEIs), tales como tacrina y rivastigmina, mejoran los síntomas. Los ChEIs impiden la degradación enzimática de los neurotransmisores, por lo que se incrementa la cantidad de mensajeros químicos disponibles para transmitir las señales nerviosas en el cerebro.

Para algunas personas en las fases temprana e intermedia de la enfermedad, los fármacos tacrina (COGNEX®, Morris Plains, NJ), donepezilo (ARICEPT®, Tokio, JP), rivastigmina (EXELON®, East Hanover, NJ), o galantamina (REMINYL®, New Brunswick, NJ) pueden ayudar a prevenir que algunos síntomas empeoren durante un tiempo limitado. Otro fármaco, memantina (NAMENDA®, Nueva York, NY), se ha aprobado para el tratamiento de EA moderada a grave. También hay disponibles medicaciones para abordar las manifestaciones psiquiátricas de EA. Además, algunos medicamentos pueden ayudar a controlar los síntomas conductuales de EA, tales como insomnio, inquietud, deambulación, ansiedad, y depresión. El tratamiento de estos síntomas a menudo hace que los pacientes estén más cómodos, y hace que su cuidado sea más sencillo para los cuidadores. Desafortunadamente, a pesar de los avances significativos en el tratamiento que demuestran que esta clase de agentes es sistemáticamente mejor que un placebo, la enfermedad continúa progresando, y el efecto medio sobre la función mental ha sido solamente modesto. Muchos de los fármacos usados en la medicación de EA tales como, por ejemplo, ChEIs, tienen además efectos secundarios que incluyen disfunción gastrointestinal, toxicidad hepática y pérdida de peso.

Otra enfermedad que se basa o está asociada a la acumulación y depósito de una proteína similar a amiloide es la degeneración macular.

La degeneración macular es una enfermedad ocular común que provoca el deterioro de la mácula, que es el área central de la retina (un tejido muy fino en el fondo del ojo en el que las células sensibles a la luz envían las señales visuales al cerebro). La visión aguda, clara, "al frente" es procesada por la mácula. La alteración de la mácula da como resultado el desarrollo de escotomas y visión borrosa o distorsionada. La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es una causa importante de deterioro visual en los Estados Unidos, y para las personas mayores de 65 años es la causa principal de ceguera legal en la población de raza blanca. Aproximadamente 1,8 millones de norteamericanos de 40 años de edad y mayores tienen AMD avanzada, y otros 7,3 millones de personas con AMD intermedia tienen un riesgo considerable de pérdida de visión. El gobierno calcula que en 2020 habrá 2,9 millones de personas con AMD avanzada. Las víctimas de AMD a menudo se ven sorprendidas y frustradas al descubrir lo poco que se conoce sobre las causas y el tratamiento de esta afección que provoca ceguera.

Existen dos formas de degeneración macular: degeneración macular seca y degeneración macular húmeda. La forma seca, en la que las células de la mácula comienzan lentamente a degradarse, se diagnostica en el 85 por ciento de los casos de degeneración macular. Normalmente se ven afectados los dos ojos por la AMD seca, aunque un ojo puede perder visión mientras el otro ojo permanece sin afectación. Las drusas, que son depósitos amarillos bajo la retina, son signos tempranos habituales de la AMD seca. El riesgo de desarrollar AMD seca o AMD húmeda avanzadas se incrementa a medida que se incrementa el número o el tamaño de las drusas. Es posible que la AMD seca avance y provoque la pérdida de visión sin transformarse en la forma húmeda de la enfermedad; sin embargo, también es posible que la AMD seca en una etapa temprana cambie repentinamente a la forma húmeda.

La forma húmeda, aunque solamente supone el 15 por ciento de los casos, da como resultado el 90 por ciento de la ceguera, y se considera AMD avanzada (no existe una fase temprana o intermedia de AMD húmeda). La AMD húmeda siempre va precedida por la forma seca de la enfermedad. A medida que la forma seca empeora, algunas personas comienzan a tener vasos sanguíneos anormales creciendo detrás de la mácula. Estos vasos son muy frágiles, y perderán fluido y sangre (de ahí la degeneración macular "húmeda"), lo que provocará la alteración rápida de la mácula.

La forma seca de AMD a menudo provocará inicialmente una visión ligeramente borrosa. El centro de la visión, en particular, se puede volver borroso, y esta región crece a medida que progresa la enfermedad. Pueden no observarse síntomas si solamente está afectado un ojo. En la AMD húmeda, las líneas rectas pueden parecer

onduladas, y la pérdida de la visión central se puede dar rápidamente.

El diagnóstico de la degeneración macular implica en general un examen ocular con dilatación pupilar, una prueba de agudeza visual, y la observación del fondo del ojo mediante el uso de un procedimiento denominado oftalmoscopia para ayudar a diagnosticar la AMD, y, si se sospecha de AMD húmeda, también se puede llevar a cabo una angiografía con fluoresceína. Si la AMD seca alcanza la fase avanzada, no existe actualmente un tratamiento para prevenir la pérdida de visión. Sin embargo, una fórmula de dosis elevada específica de antioxidantes y zinc puede retrasar o prevenir que la AMD intermedia progrese a la fase avanzada. Macugen® (inyección de pegaptanib sodio), la fotocoagulación láser y la terapia fotodinámica pueden controlar el crecimiento anormal de los vasos sanguíneos y el sangrado en la mácula, lo cual es eficaz para algunas personas que tienen AMD húmeda; sin embargo, la visión que ya se ha perdido no se restablecerá con estas técnicas. Si ya se ha perdido visión, existen ayudas para baja visión que pueden ayudar a mejorar la calidad de vida.

Uno de los signos más tempranos de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es la acumulación de depósitos extracelulares conocidos como drusas entre la lámina basal del epitelio pigmentario retiniano (ERP) y la membrana de Bruch (MB). Los estudios recientes llevados a cabo por Anderson et al. han confirmado que las drusas contienen amiloide beta. (Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256).

La investigación en curso continúa con estudios que exploran los factores ambientales, genéticos y alimentarios que pueden contribuir a la AMD. También se están explorando nuevas estrategias de tratamiento, que incluyen trasplantes de células retinianas, fármacos que prevendrán o frenarán el progreso de la enfermedad, radioterapia, terapias genéticas, un chip informático implantado en la retina que puede ayudar a estimular la visión, y agentes que prevendrán el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos bajo la mácula.

Un factor importante a considerar cuando se desarrollan fármacos nuevos es la facilidad de uso para los pacientes de interés. La administración oral de fármacos, específicamente comprimidos, cápsulas y cápsulas blandas, representa el 70% de todas las formas farmacéuticas consumidas debido a la comodidad del paciente. Los desarrolladores de fármacos están de acuerdo en que los pacientes prefieren la administración oral en vez de someterse a inyecciones u otras formas más invasivas de administración de medicamentos. También son preferibles las formulaciones que dan como resultado intervalos de dosificación bajos (es decir, una vez al día o liberación sostenida). La facilidad de administración de antibióticos en formas farmacéuticas orales da como resultado un incremento del cumplimiento de los pacientes durante el tratamiento.

Lo que se necesita son métodos y composiciones eficaces para prevenir o abordar las complicaciones asociadas a la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados a la formación de placas de amiloide que incluyen la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tales como la Enfermedad de Alzheimer (EA), demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch); el complejo Parkinson-Demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan o están asociadas a proteínas similares a amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del adulto; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos, y otros, lo que incluye la degeneración macular. En particular, lo que se necesita son agentes capaces de contrarrestar las manifestaciones fisiológicas de la enfermedad, tales como la formación de placas asociadas a la agregación de fibras del péptido amiloide o similar a amiloide.

Se informó que los anticuerpos anti-amiloide generados mediante la inoculación de $A\beta_{1-42}$ mezclado con adyuvante completo o incompleto de Freund reducen la carga de amiloide en ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer humana (Schenk et al., 1999). La inoculación intraperitoneal de $A\beta_{1-16}$ tetrapalmitoilado reconstituido en liposomas a ratones transgénicos NORBA generó títulos significativos de anticuerpos anti-amiloide, que se informó que solubilizaron fibras y placas de amiloide *in vitro* e *in vivo*. (Nicolau et al., 2002).

Liu et al., (2004) Biochemistry, 43(22):6959-6967 describe que un anticuerpo de fragmento variable de cadena sencilla anti- β -amiloide dirigido contra la región 17-28 inhibe la agregación *in vitro* de β -amiloide y la citotoxicidad de β -amiloide.

El documento WO 00/72880 A2 describe un anticuerpo anti- β -amiloide (el anticuerpo 266), que reconoce el epítipo 13-28 de β -amiloide, que reduce los niveles de β -amiloide total en el cerebelo de ratones.

El documento WO 01/62801 A2 describe un anticuerpo humanizado anti- β -amiloide del anticuerpo 266 y sugiere que los anticuerpos que se unen a β -amiloide entre las posiciones 13 y 28 (p.ej., 266 y 4G8) son capaces de aislar las formas solubles de β -amiloide de sus formas unidas, circulantes en la sangre sin unirse con gran afinidad al β -amiloide agregado.

El documento WO 2006/066171 A1 describe un anticuerpo anti- β -amiloide (15C11) que se une a la región central de β -amiloide (es decir, los aminoácidos 17-24), y se une a especies de β -amiloide oligoméricas, pero no parece unirse a monómeros de β -amiloide.

Ninguna de estas referencias describe un anticuerpo anti- β -amiloide que tenga las propiedades estructurales y físicas particulares del anticuerpo de la invención reivindicada, es decir, un anticuerpo anti- β -amiloide que tiene una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID N°: 15 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID N°: 12, que se puede unir tanto a fibras de β -amiloide como a monómeros solubles, y es capaz de inhibir la agregación de β -amiloide y disgregar fibras/agregados de amiloide.

Un posible mecanismo mediante el cual se daba la disolución de las placas y fibras de amiloide fue sugerido en primer lugar por Bard et al., (2000), el cual llegó a la conclusión de que los anticuerpos opsonizaban las placas, que eran destruidas posteriormente por los macrófagos de la microglia. De Mattos et al., (2001) indicó que un mAb dirigido contra el dominio central de β -amiloide fue capaz de unirse y aislar completamente el amiloide plasmático. Argumentaron que la presencia de estos mAbs en la circulación desplazó el equilibrio de $A\beta$ entre el cerebro y el plasma, por lo que se favoreció la eliminación periférica y el catabolismo en vez del depósito en el cerebro.

La terapia humana prolongada con anticuerpos de roedor puede dar como resultado una respuesta de antiglobulinas que es detectable aproximadamente a los 8-12 días tras la administración, y alcanza un máximo aproximadamente a los 20-30 días. Si se da tal respuesta de antiglobulinas, el tratamiento se debe interrumpir después de no más de aproximadamente 10 días, y normalmente se excluye la vuelta al tratamiento en una fecha posterior porque conducirá al inicio rápido de una respuesta de antiglobulinas secundarias. Aunque los anticuerpos de roedor comparten un grado considerable de conservación de la secuencia con la de los anticuerpos humanos, existen muchas diferencias de secuencia entre los anticuerpos de roedor y los humanos, suficientes para que los anticuerpos de roedor sean inmunógenos en los seres humanos.

Este problema se puede superar generando anticuerpos directamente en seres humanos o mediante la creación de anticuerpos "humanizados" (es decir, "remodelados"). Los anticuerpos humanizados tienen una secuencia de aminoácidos de la región variable que contiene las CDRs derivadas de roedor intercaladas en secuencias estructurales humanas o similares a las humanas. Debido a que la especificidad del anticuerpo humanizado está proporcionada por las CDRs derivadas de roedor, sus residuos se van a usar básicamente sin cambios, y solamente son permisibles las modificaciones menores, que no interfieren de manera significativa con la afinidad y especificidad del anticuerpo hacia su antígeno objetivo. Los residuos estructurales pueden derivar de cualquier primate o, en particular, de cualquier región variable humana, o pueden ser una combinación de las mismas, y la región variable diseñada resultante se consideraría remodelada.

Para maximizar la probabilidad de que se conservará la afinidad en el anticuerpo remodelado, es importante hacer una selección adecuada de la región estructural. Se sabe que las secuencias estructurales sirven para mantener las CDRs en su orientación espacial correcta para la interacción con el antígeno, y que los residuos estructurales a veces pueden incluso participar en la unión al antígeno. Para mantener la afinidad del anticuerpo hacia su antígeno, es ventajoso seleccionar las secuencias estructurales humanas que sean las más similares a las secuencias estructurales de roedor. Entonces puede ser todavía necesario sustituir uno o más aminoácidos de la secuencia estructural humana con el residuo correspondiente de la secuencia estructural de roedor para evitar pérdidas de afinidad. Esa sustitución se puede realizar con la ayuda de la modelización por ordenador.

La presente invención proporciona anticuerpos y composiciones nuevas que comprenden anticuerpos muy específicos y muy eficaces, concretamente anticuerpos humanizados que incluyen fragmentos de los mismos, que tienen la capacidad de reconocer y unirse de manera específica a epítomos específicos de una variedad de antígenos de β -amiloide, que se pueden presentar al anticuerpo en una forma monomérica, dimérica, trimérica, etc., polimérica, en forma de un agregado, fibras, filamentos o en la forma condensada de una placa. Los anticuerpos proporcionados por las enseñanzas de la presente invención son especialmente útiles para el tratamiento de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados a la formación de placas de amiloide que incluyen la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tales como la Enfermedad de Alzheimer (EA), demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch); el complejo Parkinson-Demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan o están asociadas a proteínas similares a amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo Dutch, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del adulto; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, lo que incluye la degeneración macular, por nombrar solo algunas.

Sorprendentemente, los anticuerpos de la invención se unen a β -amiloide en diversas formas de β -amiloide, que incluyen monómeros solubles, oligómeros y fibrillas, con afinidad elevada, e inhiben la agregación de monómeros hasta oligómeros/fibrillas e inducen la desagregación de oligómeros/fibrillas.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a la materia tal como se indica en las reivindicaciones. De manera específica, la

invención se refiere a un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que reconoce y se une a la proteína β -amiloide, en el que dicho anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprende una Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 15, y una Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 12.

De manera más específica, dicho anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 16 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 13. Preferiblemente, en dicho anticuerpo humanizado o fragmento del mismo, se ha eliminado la Lys C-terminal de la región constante de la cadena pesada.

La invención se refiere además a moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias nucleotídicas que codifican el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de la invención, y a vectores de expresión que comprenden dichas secuencias nucleotídicas. También se incluyen las células que comprenden dichos vectores de expresión.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humanizado o el fragmento del mismo de la invención, y opcionalmente que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la invención se refiere al uso del anticuerpo humanizado o el fragmento del mismo y/o la composición farmacéutica para la preparación de un medicamento para prevenir, tratar o aliviar los efectos de la amiloidosis, tal como amiloidosis secundaria, amiloidosis relacionada con la edad, trastornos neurológicos tales como la Enfermedad de Alzheimer (EA), demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch); el complejo Parkinson-Demencia de Guam; enfermedades basadas o asociadas a proteínas similares a amiloide, tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del adulto; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y degeneración macular.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica de la invención, para el uso en un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de la amiloidosis, tal como amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, tales como enfermedades que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tales como la Enfermedad de Alzheimer (EA), demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch), el complejo Parkinson-Demencia de Guam, enfermedades que se basan o están asociadas a proteínas similares a amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, y esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del adulto, amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y degeneración macular, opcionalmente en la que el tratamiento del animal, tal como el mamífero o ser humano, conduce a un incremento de la capacidad de la memoria cognitiva, la retención de la capacidad de la memoria cognitiva, y/o una inversión de la capacidad de la memoria cognitiva y un restablecimiento completo de la capacidad de la memoria cognitiva.

La invención se refiere además a un método para determinar el grado de carga de placa amiloidogénica en una muestra de tejido y/o muestra de fluido corporal, que comprende ensayar una muestra de tejido o muestra de fluido corporal en busca de la presencia de proteína amiloide con el anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo según la invención; determinar la cantidad de anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido a la proteína; y calcular la carga de placa en la muestra de tejido o en la muestra de fluido corporal.

La invención también abarca un equipo para la detección y el diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas a amiloide que comprende, en uno o más recipientes, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo según la invención, un reactivo de detección, e instrucciones para el uso de los anticuerpos.

La invención se refiere además al anticuerpo humanizado o fragmento del mismo según la invención para el uso en la desagregación de fibras hasta formas poliméricas y monoméricas solubles.

Además, la invención abarca el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo según la invención, cuyo anticuerpo o fragmento del mismo es para el uso en la protección de neuronas de la degradación inducida por A β .

La invención también se refiere al uso del anticuerpo humanizado o fragmento del mismo según la invención para la preparación de un medicamento para prevenir la degeneración de las neuronas tras la exposición al oligómero de A β .

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos un sitio de unión diferente, en particular a al menos dos sitios de unión diferentes, y más en particular a al menos tres sitios de unión diferentes de la proteína β -amiloide, en el que dicho uno, dichos al menos dos y dichos al menos tres sitios de unión comprenden cada uno al menos uno o dos residuos de aminoácidos consecutivos implicados de manera predominante en la unión del anticuerpo.

En particular, el anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención se une a al menos dos, en particular a al menos tres sitios de unión diferentes de la proteína β -amiloide, en el que al menos dos de los tres

sitios de unión diferentes comprenden al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos implicados de manera predominante en la unión del anticuerpo, y al menos uno de los tres sitios de unión diferentes comprenden al menos un residuo de aminoácido.

5 Los al menos dos sitios de unión diferentes que comprenden al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos implicados de manera predominante en la unión del anticuerpo están localizados en estrecha proximidad entre sí en el antígeno, separados y/o flanqueados por al menos un residuo de aminoácido que no está implicado en la unión del anticuerpo o en un grado significativamente menor en comparación con dichos al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, por lo que se forma un epítipo discontinuo conformacional.

10 Los al menos tres sitios de unión diferentes que comprenden al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos y al menos un residuo de aminoácido, respectivamente, que están implicados de manera predominante en la unión del anticuerpo están localizados en estrecha proximidad entre sí en el epítipo, separados y/o flanqueados por al menos un residuo de aminoácido que no está implicado en la unión del anticuerpo o en un grado significativamente menor en comparación con los residuos de aminoácidos que están implicados de manera predominante en la unión del anticuerpo, por lo que se forma un epítipo discontinuo conformacional.

15 En particular, se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos un sitio de unión diferente, en particular a al menos dos sitios de unión diferentes, más en particular a al menos tres sitios de unión diferentes de la proteína β -amiloide, en el que dicho al menos uno o dichos al menos dos sitios de unión diferentes comprenden cada uno al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos implicados de manera predominante en la unión del anticuerpo, en el que los al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos que representan un primer sitio de unión son -Phe-Phe- incrustados dentro de la secuencia central siguiente (SEQ ID N°: 9):

25 Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆, en la que
Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;
Xaa₄ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile;
30 Xaa₅ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp,
Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp, y en la que dichos residuos de aminoácidos Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅ y Xaa₆ no están implicados en la unión del anticuerpo o en un grado significativamente menor en comparación con el sitio de unión -Phe-Phe-.

35 También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en el que

40 Xaa₃ es Val o Leu, pero especialmente Val;
Xaa₄ es Ala o Val, pero especialmente Ala;
Xaa₅ es Glu o Asp, pero especialmente Glu;
Xaa₆ es Glu o Asp, pero especialmente Asp.

45 En particular, se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos un sitio de unión diferente, en particular a al menos dos sitios de unión diferentes, más en particular a al menos tres sitios de unión diferentes de la proteína β -amiloide, en el que dichos sitios de unión diferentes comprenden al menos uno y al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, respectivamente, implicados de manera predominante en la unión del anticuerpo, en el que los al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos que representan un primer sitio de unión son -Phe-Phe- y el al menos un residuo de aminoácido es -His- localizado dentro de la secuencia central siguiente:

50 - Xaa₁ - His - Xaa₃ - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆ - Phe - Phe - Xaa₇ - Xaa₈ - Xaa₉-, en la que
Xaa₁ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Asn, Gln, Lys y Arg
Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln
Xaa₄ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Asn, Gln, Lys y Arg
55 Xaa₅ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile;
Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile
Xaa₇ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu e Ile
Xaa₈ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp,
60 Xaa₉ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp, y en la que dichos residuos de aminoácidos Xaa₁, Xaa₃, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈ y Xaa₉, no están implicados en la unión del anticuerpo o en un grado menor a significativamente menor en comparación con el sitio de unión -His- y -Phe-Phe-, respectivamente.

65 También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en el que

- Xaa₃ es Gln o Asn, pero especialmente Gln;
Xaa₄ es Lys
Xaa₅ es Leu
5 Xaa₆ es Val o Leu, pero especialmente Val;
Xaa₇ es Ala o Val, pero especialmente Ala;
Xaa₈ es Glu o Asp, pero especialmente Glu; y
Xaa₉ es Asp o Glu, pero especialmente Asp.
- 10 También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos un sitio de unión diferente, en particular a al menos dos sitios de unión diferentes, más en particular a al menos tres sitios de unión diferentes de la proteína β -amiloide, en el que dicho al menos uno o dichos al menos dos sitios de unión diferentes comprenden cada uno al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos implicados de manera predominante en la unión del anticuerpo, en el que los al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos que representan un segundo sitio de unión son -Lys-Leu-incrustados dentro de la secuencia central siguiente (SEQ ID N°: 10):
- 15 Xaa₁ - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ en la que
Xaa₁ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Asn, Gln, Lys, y Arg;
20 Xaa₂ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln;
Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile; y en la que dichos residuos de aminoácido Xaa₂, Xaa₃, no están implicados en la unión del anticuerpo o en un grado menor a significativamente menor en comparación con el sitio de unión -Lys-Leu-.
- 25 También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos un sitio de unión diferente, en particular a al menos dos sitios de unión diferentes, más en particular a al menos tres sitios de unión diferentes de la proteína β -amiloide, en el que dichos sitios de unión diferentes comprenden al menos uno y al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, respectivamente, implicados de manera predominante en la unión del anticuerpo, en el que el al menos uno y los al menos dos aminoácidos consecutivos, que están separados por al menos un residuo de aminoácido que no está implicado en la unión del anticuerpo o en un grado significativamente menor en comparación con los residuos de aminoácidos implicados de manera predominante en la unión del anticuerpo, son -His- y -Lys-Leu-, respectivamente, incrustados dentro de la secuencia central siguiente:
- 30 His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃- Xaa₄- Xaa₅-Xaa₆- Xaa₇ - Xaa₈ - en la que
Xaa₂ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln;
Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;
35 Xaa₄ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile
Xaa₅ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile
40 Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile;
Xaa₇ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp,
45 Xaa₈ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp
y en la que dichos residuos de aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, no están implicados en la unión del anticuerpo o en un grado menor a significativamente menor en comparación con el sitio de unión -His- y -Lys-Leu-, respectivamente.
- 50 También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en el que
- 55 Xaa₂ es Gln o Asn, pero especialmente Gln;
Xaa₃ es Val o Leu, pero especialmente Val;
Xaa₄ es Phe
Xaa₅ es Phe
Xaa₆ es Ala o Val, pero especialmente Ala;
Xaa₇ es Glu o Asp, pero especialmente Glu; y
60 Xaa₈ es Asp o Glu, pero especialmente Asp.
- También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos dos sitios de unión diferentes de la proteína β -amiloide, en el que dichos al menos dos sitios de unión diferentes comprenden cada uno al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos implicados de manera predominante en la unión del anticuerpo, en el que los al menos dos aminoácidos consecutivos están separados mediante al menos un residuo de aminoácido que no está implicado en la unión del anticuerpo o en un grado significativamente menor que dichos residuos de aminoácidos consecutivos,
- 65

que son -Phe-Phe- y -Lys-Leu-, respectivamente, que representan un primer y segundo sitios de unión incrustados dentro de la secuencia central siguiente:

Xaa₁ - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆, en la que

Xaa₁ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Asn, Gln, Lys, y Arg;

Xaa₂ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln;

Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;

Xaa₄ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile;

Xaa₅ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp,

Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp, y en la que dichos residuos de aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅ y Xaa₆ no están implicados en la unión del anticuerpo o en un grado menor a significativamente menor en comparación con el sitio de unión -Lys-Leu- y -Phe-Phe-, respectivamente.

También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos un sitio de unión diferente, en particular a al menos dos sitios de unión diferentes, más en particular a al menos tres sitios de unión diferentes de la proteína β -amiloide, en el que dichos sitios de unión diferentes comprenden al menos uno y al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, respectivamente, implicados de manera predominante en la unión del anticuerpo, en el que el al menos uno y los al menos dos aminoácidos consecutivos están separados por al menos un residuo de aminoácido que no está implicado en la unión del anticuerpo o en un grado significativamente menor en comparación con los residuos de aminoácidos, que están implicados de manera predominante en la unión del anticuerpo, y en el que dichos residuos de aminoácidos son -His- y -Phe-Phe- y -Lys-Leu-, respectivamente, incrustados dentro de la secuencia central siguiente:

His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆, en la que

Xaa₂ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln;

Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;

Xaa₄ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile;

Xaa₅ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp,

Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp, y en la que dichos residuos de aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, no están implicados en la unión del anticuerpo o en un grado menor a significativamente menor en comparación con el sitio de unión -His-, -Lys-Leu- y -Phe-Phe-, respectivamente.

También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en el que

Xaa₂ es Gln o Asn, pero especialmente Gln;

Xaa₃ es Val o Leu, pero especialmente Val;

Xaa₄ es Ala o Val, pero especialmente Ala;

Xaa₅ es Glu o Asp, pero especialmente Glu; y

Xaa₆ es Asp o Glu, pero especialmente Asp.

También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos dos sitios de unión diferentes de la proteína β -amiloide, en el que dichos al menos dos sitios de unión diferentes comprenden cada uno al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos implicados de manera predominante en la unión del anticuerpo, en el que los al menos dos aminoácidos consecutivos están separados mediante al menos un residuo de aminoácido que no está implicado en la unión del anticuerpo o en un grado significativamente menor que dichos residuos de aminoácidos consecutivos, que son -Phe-Phe- y -Lys-Leu-, respectivamente, que representan un primer y segundo sitios de unión incrustados dentro de la secuencia central siguiente:

Xaa₁ - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆, en la que

Xaa₁ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Asn, Gln, Lys y Arg;

Xaa₂ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln;

Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Val, Ala, Leu, Met, Phe, norleucina e Ile

Xaa₄ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu e Ile;

Xaa₅ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp,

Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp, y en la que dichos residuos de aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, no están implicados en la unión del anticuerpo o en un grado menor a significativamente menor en comparación con el sitio de unión -Lys-Leu- y -Phe-Phe-, respectivamente.

También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en el que

- 5 Xaa₁ es His o Arg, pero especialmente His;
 Xaa₂ es Gln o Asn, pero especialmente Gln;
 Xaa₃ es Val o Leu, pero especialmente Val;
 Xaa₄ es Ala o Val, pero especialmente Ala;
 Xaa₅ es Glu o Asp, pero especialmente Glu; y
 10 Xaa₆ es Asp o Glu, pero especialmente Asp.

También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos dos sitios de unión diferentes de la proteína β -amiloide, en el que dichos al menos dos sitios de unión diferentes comprenden cada uno al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos implicados de manera predominante en la unión del anticuerpo, que son - Phe - Phe - Ala - Glu -, en particular - Phe - Phe - Ala -, pero especialmente - Phe - Phe - y - Lys - Leu -, respectivamente, y en el que dichos al menos dos sitios de unión diferentes exhiben la secuencia de aminoácidos -Val - Phe - Phe - Ala - Glu - Asp - mostrada en SEQ ID N°: 7 y la secuencia de aminoácidos His - Gln - Lys - Leu - Val - mostrada en SEQ ID N°: 8, respectivamente.

También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos un sitio de unión diferente, en particular a al menos dos sitios de unión diferentes, más en particular a al menos tres sitios de unión diferentes de la proteína β -amiloide, en el que dicho al menos uno o dichos al menos dos sitios de unión diferentes comprenden al menos uno y al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, respectivamente, implicados de manera predominante en la unión del anticuerpo, que son - Phe - Phe - y - Lys - Leu -, e -His-, respectivamente, en el que dichos sitios de unión diferentes están incrustados en la secuencia de aminoácidos -Val - Phe - Phe - Ala - Glu-, y la secuencia de aminoácidos -His - Gln - Lys - Leu - Val -, respectivamente.

En otro aspecto, el anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo comprende un sitio de reconocimiento y de unión al antígeno que reconoce y se une a al menos dos sitios de unión diferentes de la proteína β -amiloide, en el que dichos al menos dos sitios de unión diferentes comprenden cada uno al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos dentro de la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEQ ID N°s: 7 y 8, respectivamente, en el que dichos residuos de aminoácidos consecutivos, en particular -Phe-Phe- y -Lys-Leu-, están implicados de manera predominante en la unión de la proteína β -amiloide.

También se describe un anticuerpo o un fragmento del mismo, que se une a 4 sitios de unión diferentes de la proteína β -amiloide, en el que dichos 4 sitios de unión diferentes incluyen 2 sitios de unión que comprenden cada uno un residuo de aminoácido y 2 sitios de unión que comprenden cada uno dos residuos de aminoácidos consecutivos, cuyos residuos están implicados de manera predominante en la unión del anticuerpo, en el que dichos 4 sitios de unión diferentes están localizados en estrecha proximidad entre sí en la proteína β -amiloide, y en el que dichos 4 sitios de unión están separados por al menos un residuo de aminoácido que no está implicado en la unión del anticuerpo o que está implicado en la unión, pero en un grado significativamente menor en comparación con dicho residuo de aminoácido y dichos dos residuos de aminoácidos consecutivos de los 4 sitios de unión diferentes, por lo que se forma un epítipo discontinuo conformacional.

En particular, los primeros de los dos residuos de aminoácidos consecutivos implicados de manera predominante en la unión del anticuerpo son -Lys-Leu-, y los segundos de los al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos son -Phe-Phe-, el primero de los residuos de aminoácidos simples es -His- y el segundo de los residuos de aminoácidos simples es -Asp- incrustados dentro de la secuencia central siguiente:

- Xaa₁- His - Xaa₂ - Lys - Leu -Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄- Xaa₅- Asp - Xaa₆ en la que
 Xaa₁ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Asn, Gln, Lys y Arg, pero especialmente His;
 Xaa₂ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln, pero especialmente Gln;
 Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile, especialmente Val;
 Xaa₄ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile, especialmente Ala;
 Xaa₅ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp, especialmente Glu;
 Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile, especialmente Val; y en la que dichos residuos de aminoácidos Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, no están implicados en la unión del anticuerpo o están implicados en la unión, pero en un grado significativamente menor en comparación con el sitio de unión -His-, -Asp-, -Lys-Leu, y -Phe-Phe-.

También se describe un anticuerpo o un fragmento del mismo, que se une a 4 sitios de unión diferentes de la

proteína β -amiloide, en el que dichos 4 sitios de unión diferentes incluyen dos sitios de unión que comprenden cada uno un residuo de aminoácido y dos sitios de unión que comprenden cada uno dos residuos de aminoácidos consecutivos, en el que los primeros de los dos residuos de aminoácidos consecutivos implicados de manera predominante en la unión del anticuerpo son -Lys-Leu-, y los segundos de los al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos son -Phe-Phe-, el primero de los residuos de aminoácidos simples es -His-, y el segundo de los residuos de aminoácidos simples es -Asp- incrustados dentro de la secuencia central siguiente:

- Xaa₁ - His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Asp - Xaa₆ en la que

Xaa₁ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Asn, Gln, Lys y Arg, pero especialmente His;

Xaa₂ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln, pero especialmente Gln;

Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile, especialmente Val;

Xaa₄ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile, especialmente Ala;

Xaa₅ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp, especialmente Glu;

Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile, especialmente Val; y en la que dichos residuos de aminoácidos Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, no están implicados en la unión del anticuerpo o están implicados en la unión, pero en un grado significativamente menor en comparación con el sitio de unión -His-, -Asp-, -Lys-Leu, y -Phe-Phe-.

En un aspecto específico, los sitios de reconocimiento y de unión como se definieron anteriormente en la presente memoria están formando un epítipo discontinuo conformacional localizado en una región de la proteína β -amiloide entre el residuo de aminoácido 12 a 24, en particular entre los residuos 14 a 23, más en particular entre los residuos de aminoácidos 14 y 20, en los que los al menos dos sitios de reconocimiento y unión diferentes que comprenden cada uno al menos 2 residuos de aminoácidos, están localizados en la posición 16 y 17 y en la posición 19 y 20, respectivamente, y en el que el al menos un sitio de reconocimiento y unión diferentes que comprenden al menos 1 residuo de aminoácido está localizado en la posición 14, cuyos residuos están implicados de manera predominante en la unión de la proteína β -amiloide, y en el que dichos sitios de reconocimiento y unión diferentes están flanqueados al menos en un lado por residuos de aminoácidos, en particular los residuos 21 y 22, y separados por un residuo de aminoácido localizado en la posición 15 y 18, cuyos residuos de aminoácidos no están implicados directamente en la unión del antígeno o, al menos, en un grado sustancialmente menor.

Todavía en otro aspecto, dichos al menos tres sitios de reconocimiento y unión diferentes están flanqueados a ambos lados por residuos de aminoácidos, en particular los residuos 12 y 13, y los residuos 21 y 22, y están separados por un residuo de aminoácido localizado en la posición 15 y 18, cuyos residuos de aminoácidos no están implicados directamente en la unión del antígeno o, al menos, en un grado sustancialmente menor.

En un aspecto específico, dichos residuos de aminoácidos consecutivos, en particular -Lys-Leu- en la posición 16 y 17 y -Phe-Phe- en la posición 19 y 20, que están implicados de manera predominante en la unión de la proteína β -amiloide, están incrustados en la región central siguiente:

Val-	His-	His-	Gln-	Lys-	Leu-	Val-	Phe-	Phe-	Ala-	Glu-	Asp
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23

En otro aspecto específico, dichos residuos de aminoácidos, en particular -Lys-Leu- en la posición 16 y 17 y -Phe-Phe- en la posición 19 y 20, e -His- en la posición 14, que están implicados de manera predominante en la unión de la proteína β -amiloide, están incrustados en la región central siguiente:

Val-	His-	His-	Gln-	Lys-	Leu-	Val-	Phe-	Phe-	Ala-	Glu-	Asp-	Val-	Gly-
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25

En otro aspecto, se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende en la región variable de la cadena ligera y de la cadena pesada, respectivamente, al menos una CDR de origen no humano, en particular dos CDRs de origen no humano, más en particular tres CDR de origen no humano, incrustadas en una o más regiones estructurales derivadas de ser humano o de primate y, opcionalmente, una región constante derivada de un anticuerpo de procedencia humana o de primate, cuyo anticuerpo humanizado o fragmento del mismo es capaz de reconocer y unirse de manera específica a la proteína β -amiloide, en particular un péptido monomérico de β -amiloide, más en particular un péptido polimérico de β -amiloide, aún más en particular fibras, fibrillas o filamentos de β -amiloide aisladas o como parte de una placa de β -amiloide, en un epítipo que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente (SEQ ID N°: 11):

Xaa₁ - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆, en la que

Xaa₁ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Asn, Gln, pero especialmente His;

Xaa₂ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln, pero especialmente Gln;

y
Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Val, Leu, e Ile, pero especialmente Val;

Xaa₄ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala y Val, pero especialmente Ala;

Xaa₅ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp, pero especialmente Glu;

Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp, pero especialmente Asp.

Todavía en otro aspecto, se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende en la región variable de la cadena ligera y de la cadena pesada, respectivamente, al menos una CDR de origen no humano, en particular dos CDRs de origen no humano, más en particular tres CDR de origen no humano, incrustadas en una o más regiones estructurales derivadas de ser humano o de primate y, opcionalmente, una región constante derivada de un anticuerpo de procedencia humana o de primate, cuyo anticuerpo humanizado o fragmento del mismo es capaz de reconocer y unirse de manera específica a la proteína β -amiloide, en particular un péptido monomérico de β -amiloide, más en particular un péptido polimérico de β -amiloide, aún más en particular fibras, fibrillas o filamentos de β -amiloide, aisladas o como parte de una placa de β -amiloide, en un epítipo que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆, en la que

Xaa₂ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln, pero especialmente Gln;

y
Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Val, Leu, e Ile, pero especialmente Val;

Xaa₄ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala y Val, pero especialmente Ala;

Xaa₅ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp, pero especialmente Glu;

Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp, pero especialmente Glu;

y en la que dichos residuos de aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, no están implicados en la unión del anticuerpo o en un grado menor en comparación con el sitio de unión -His- y -Lys-Leu- y -Phe-Phe-.

En un aspecto específico, la CDR de origen no humano se obtiene de un anticuerpo donante, pero en particular de un anticuerpo donante murino, generado contra un fragmento antigénico que no contiene dicho sitio de unión diferente. Este cambio en la región epitópica puede haber sido provocado al menos parcialmente por el uso de una construcción antigénica supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del péptido β -amiloide, en particular del péptido β -amiloide A β ₁₋₁₆, modificado con un resto hidrófilo tal como, por ejemplo, polietilén glicol (PEG), en el que dicho resto hidrófilo está unido de manera covalente a cada uno de los extremos del péptido antigénico por medio de al menos uno, en particular uno o dos aminoácidos tales como, por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisteína o cualquier otro aminoácido adecuado o análogo de aminoácido capaz de servir como un dispositivo de conexión para acoplar el resto hidrófilo al fragmento peptídico, como se describe más adelante en la presente memoria en el proceso de inmunización. Cuando se usa un PEG como resto hidrófilo, los extremos de PEG libres se unen de manera covalente a fosfatidiletanolamina o cualquier otro compuesto adecuado para funcionar como elemento de anclaje, por ejemplo, para incrustar la construcción antigénica en la bicapa de un liposoma, como se describe en la presente memoria.

En particular, la CDR de origen no humano se obtiene de un anticuerpo donante murino que exhibe las propiedades características de ACI-01-Ab7C2 (también denominado "mC2" a lo largo de la solicitud) depositado el 01 de diciembre de 2005 en la "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest con el n° de acceso DSM ACC2750).

En una realización de la invención, la CDR de origen no humano se obtiene a partir del anticuerpo donante murino ACI-01-Ab7C2 (también denominado "mC2" a lo largo de la solicitud) depositado el 01 de diciembre de 2005 en la "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest con el n° de acceso DSM ACC2750).

Además, el uso de lípido A como parte del protocolo de inmunización puede haber contribuido a un cambio en la región epitópica.

También se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende integrado en las regiones estructurales derivadas de ser humano o de primate al menos un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en SEQ ID N°: 2 que representa la CDR2 y SEQ ID N°: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) y SEQ ID N°: 4 que representa la CDR1 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR).

También se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en el que dicho anticuerpo humanizado comprende integrado en las regiones estructurales de la cadena pesada derivadas de ser humano o de primate al menos un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en SEQ

ID N°: 2 que representa la CDR2 y SEQ ID N°: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR).

5 También se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en el que dicho anticuerpo humanizado comprende integrado en las regiones estructurales de la cadena ligera derivadas de ser humano o de primate un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 4 que representa la CDR1 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR).

10 También se describe una Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) que comprende integrado en las regiones estructurales derivadas de ser humano o de primate al menos un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 4 que representa la CDR1 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR).

15 También se describe una Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) que comprende integrado en las regiones estructurales derivadas de ser humano o de primate al menos un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en SEQ ID N°: 2 que representa la CDR2 y SEQ ID N°: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR).

20 También se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende integrado en las regiones estructurales derivadas de ser humano o de primate al menos dos péptidos, cuyos péptidos son diferentes y exhiben una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en SEQ ID N°:1 que representa la CDR1, SEQ ID N°: 2 que representa la CDR2 y SEQ ID N°: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) y SEQ ID N°: 4 que representa la CDR1, SEQ ID N°: 5 que representa la CDR2 y SEQ ID N°: 6 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) en la que la misma CDR no puede estar presente dos veces en el anticuerpo. En particular, si las al menos dos CDRs presentes son ambas CDRs de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR), al menos una de dichas CDRs debe ser la CDR1 representada por SEQ ID N°: 4.

30 También se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende integrado en las regiones estructurales de la cadena pesada derivadas de ser humano o de primate al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en SEQ ID N°: 1 que representa la CDR1, SEQ ID N°: 2 que representa la CDR2 y SEQ ID N°: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR), pero en particular un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo en el que la misma CDR no puede estar presente dos veces en el anticuerpo.

35 También se describe una Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) que comprende integrado en las regiones estructurales de la cadena pesada derivadas de ser humano o de primate al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en SEQ ID N°: 1 que representa la CDR1, SEQ ID N°: 2 que representa la CDR2 y SEQ ID N°: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR).

40 También se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende integrado en las regiones estructurales de la cadena ligera derivadas de ser humano o de primate al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en SEQ ID N°: 4 que representa la CDR1, SEQ ID N°: 5 que representa la CDR2 y SEQ ID N°: 6 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR).

50 También se describe una Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR), que tiene integrado en las regiones estructurales de la cadena ligera derivadas de ser humano o de primate al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en SEQ ID N°: 4 que representa la CDR1, SEQ ID N°: 5 que representa la CDR2 y SEQ ID N°: 6 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR), en la que la misma CDR no puede estar presente dos veces en el anticuerpo y, en particular, al menos una de dichas CDRs debe ser la CDR1 representada por SEQ ID N°: 4.

55 También se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende integrado en las regiones estructurales de la cadena pesada derivadas de ser humano o de primate péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 que representa la CDR1, SEQ ID N°: 2 que representa la CDR2 y SEQ ID N°: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR), en particular en el orden indicado anteriormente.

60 También se describe una Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) que comprende integrado en las regiones estructurales de la cadena pesada derivadas de ser humano o de primate péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 que representa la CDR1, SEQ ID N°: 2 que representa la CDR2 y SEQ ID N°: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR), en particular en el orden indicado anteriormente.

65 También se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende integrado en las

regiones estructurales de la cadena ligera derivadas de ser humano o de primate péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 4 que representa la CDR1, SEQ ID N°: 5 que representa la CDR2 y SEQ ID N°: 6 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR), en particular en el orden indicado anteriormente.

5 También se describe una Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) que comprende integrado en las regiones estructurales de la cadena ligera derivadas de ser humano o de primate péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 4 que representa la CDR1, SEQ ID N°: 5 que representa la CDR2 y SEQ ID N°: 6 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR), en particular en el orden indicado anteriormente.

10 También se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende integrado en las regiones estructurales derivadas de ser humano o de primate al menos tres péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en SEQ ID N°: 1 que representa la CDR1, SEQ ID N°: 2 que representa la CDR2 y SEQ ID N°: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) y SEQ ID N°: 4 que representa la CDR1, SEQ ID N°: 5 que representa la CDR2 y SEQ ID N°: 6 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR), pero en particular un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo en el que la misma CDR no puede estar presente dos veces en el anticuerpo.

20 También se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, cuyo anticuerpo comprende integrado en las regiones estructurales derivadas de ser humano o de primate al menos cuatro péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en SEQ ID N°: 1 que representa la CDR1, SEQ ID N°: 2 que representa la CDR2 y SEQ ID N°: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) y SEQ ID N°: 4 que representa la CDR1, SEQ ID N°: 5 que representa la CDR2 y SEQ ID N°: 6 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR), pero en particular un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo en el que la misma CDR no puede estar presente dos veces en el anticuerpo.

25 También se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende integrado en las regiones estructurales derivadas de ser humano o de primate al menos cinco péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en SEQ ID N°: 1 que representa la CDR1, SEQ ID N°: 2 que representa la CDR2 y SEQ ID N°: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) y SEQ ID N°: 4 que representa la CDR1, SEQ ID N°: 5 que representa la CDR2 y SEQ ID N°: 6 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR), pero en particular un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo en el que la misma CDR no puede estar presente dos veces en el anticuerpo.

30 También se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende integrado en las regiones estructurales derivadas de ser humano o de primate péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 que representa la CDR1, SEQ ID N°: 2 que representa la CDR2 y SEQ ID N°: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) y SEQ ID N°: 4 que representa la CDR1, SEQ ID N°: 5 que representa la CDR2 y SEQ ID N°: 6 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR).

40 También se describe un anticuerpo humanizado, una Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR), o un fragmento del mismo, en el que dicho anticuerpo humanizado, Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) o fragmento del mismo comprende integrado en las regiones estructurales de la cadena pesada derivadas de ser humano o de primate al menos un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 2 que representa la CDR2 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR).

45 También se describe un anticuerpo humanizado, una Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) o un fragmento del mismo, en el que dicho anticuerpo humanizado, Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) o fragmento del mismo comprende integrado en las regiones estructurales de la cadena pesada derivadas de ser humano o de primate al menos un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR).

50 También se describe un anticuerpo humanizado, Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) o un fragmento del mismo, cuyo anticuerpo, Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) o fragmento del mismo comprende integrado en las regiones estructurales de la cadena pesada derivadas de ser humano o de primate al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 que representa la CDR1 y SEQ ID N°: 2 que representa la CDR2 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR).

55 También se describe un anticuerpo humanizado, una Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) o un fragmento del mismo, cuyo anticuerpo, Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) o fragmento del mismo comprende integrado en las regiones estructurales de la cadena pesada derivadas de ser humano o de primate al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 que representa la CDR1 y SEQ ID N°: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR).

60 También se describe un anticuerpo humanizado, una Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) o un fragmento del mismo, cuyo anticuerpo, Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) o fragmento del mismo comprende

integrado en las regiones estructurales de la cadena pesada derivadas de ser humano o de primate al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 2 que representa la CDR2 y SEQ ID N°: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR).

También se describe un anticuerpo humanizado, una Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) o un fragmento del mismo, cuyo anticuerpo, Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) o fragmento del mismo comprende integrado en las regiones estructurales de la cadena pesada derivadas de ser humano o de primate al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 4 que representa la CDR1 y SEQ ID N°: 5 que representa la CDR2 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR).

También se describe un anticuerpo humanizado, una Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) o un fragmento del mismo, cuyo anticuerpo, Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) o fragmento del mismo comprende integrado en las regiones estructurales de la cadena pesada derivadas de ser humano o de primate al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 4 que representa la CDR1 y SEQ ID N°: 6 que representa la CDR3 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR).

También se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en el que tanto la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) como la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) del anticuerpo C2 de ratón contribuye cada una con al menos una de sus regiones CDR a las al menos dos regiones CDR del anticuerpo humanizado. El anticuerpo humanizado resultante o un fragmento del mismo puede comprender así

- al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 que representa la CDR1 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 4 que representa la CDR1 (LCVR);
- al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 2 que representa la CDR2 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 4 que representa la CDR1 (LCVR);
- al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 3 que representa la CDR3 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 4 que representa la CDR1 (LCVR);
- al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 que representa la CDR1 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 5 que representa la CDR2 (LCVR);
- al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 2 que representa la CDR2 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 5 que representa la CDR2 (LCVR);
- al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 2 que representa la CDR2 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 6 que representa la CDR3 (LCVR);
- al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 que representa la CDR1 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 6 que representa la CDR3 (LCVR);
- al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 3 que representa la CDR3 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 5 que representa la CDR2 (LCVR);
- al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 3 que representa la CDR3 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 6 que representa la CDR3 (LCVR).

También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describió anteriormente en la presente memoria, cuyo anticuerpo comprende una región constante de la cadena ligera y/o de la cadena pesada de origen humano o de primate.

También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en el que al menos uno, en particular al menos uno pero no más de 5, más en particular al menos uno pero no más de 4, aún más en particular al menos uno pero no más de 3, pero especialmente al menos uno pero no más de 2, de los aminoácidos representativos de las regiones CDR de la cadena ligera y/o de la cadena pesada tal como se proporcionan en SEQ ID N°s: 1 - 6 está cambiado por medio de una sustitución conservativa de forma que el anticuerpo mantiene su funcionalidad completa.

También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en el que en la CDR2 de la región variable de la cadena ligera (LCVR) como se proporciona en SEQ ID N°: 5, la Lys de la posición de Kabat 50 está sustituida por un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gln y Glu, en particular por Arg.

También se describe una región variable de la cadena ligera (LCVR) en la que en la CDR2 como se proporciona en SEQ ID N°: 5, la Lys de la posición de Kabat 50 está sustituida por un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gln y Glu, en particular por Arg.

También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en el que en la CDR2 de la región variable de la cadena ligera (LCVR) como se proporciona en SEQ ID N°: 5, la Ser de la posición de Kabat 53 está sustituida por un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn o Thr, pero en particular por Asn.

También se describe una región variable de la cadena ligera (LCVR) en la que en la CDR2 como se proporciona en

SEQ ID N°: 5, la Ser de la posición de Kabat 53 está sustituida por un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn o Thr, pero en particular por Asn.

- 5 También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o se proporciona un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en el que la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es un 90%, en particular un 95%, más en particular un 98% idéntica a la secuencia proporcionada en SEQ ID N°: 15 y 16, respectivamente.
- 10 También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o se proporciona un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en el que la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es un 90%, en particular un 95%, más en particular un 98% idéntica a la secuencia proporcionada en SEQ ID N°: 12 y 13, respectivamente.
- 15 También se describe un anticuerpo humanizado o se proporciona un fragmento del mismo, en el que al menos dos, pero especialmente tres, de las regiones CDR de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) tienen una secuencia de aminoácidos que es un 90%, en particular un 95%, más en particular un 98% idéntica a la región CDR correspondiente tal como se proporcionan en SEQ ID N°: 1 - 3.
- 20 También se describe un anticuerpo humanizado o se proporciona un fragmento del mismo, en el que al menos dos, pero especialmente tres, de las regiones CDR de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) tienen una secuencia de aminoácidos que es un 90%, en particular un 95%, más en particular un 98% idéntica a la región CDR correspondiente tal como se proporcionan en SEQ ID N°: 4 - 6.
- 25 También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describió anteriormente en la presente memoria en el que la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia proporcionada en SEQ ID N°: 15 y 16, respectivamente.
- 30 También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describió anteriormente en la presente memoria en el que la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia proporcionada en SEQ ID N°: 12 y 13, respectivamente.
- 35 También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describió anteriormente en la presente memoria, en el que al menos una, en particular al menos dos, pero especialmente tres, de las regiones CDR de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) tienen una secuencia de aminoácidos que es un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la región CDR correspondiente tal como se proporcionan en SEQ ID N°: 1 - 3.
- 40 También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describió anteriormente en la presente memoria, en el que al menos una, en particular al menos dos, pero especialmente tres, de las regiones CDR de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) tienen una secuencia de aminoácidos que es un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la región CDR correspondiente tal como se proporcionan en SEQ ID N°: 4 - 6.
- 45 También se describe un anticuerpo humanizado como se describió anteriormente en la presente memoria, en el que al menos uno de los aminoácidos representativos de las secuencias estructuralesceptoras obtenidas de las secuencias de V_H y V_K de la línea germinal humana, se cambia respectivamente por medio de una sustitución hasta un aminoácido de la región correspondiente del anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2 o una sustitución conservativa de él.
- 50 También se describe una Región Variable de la Cadena Pesada y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Pesada, respectivamente, en el que el Trp de la posición de Kabat 47 de la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias de V_H de la línea germinal humana del subgrupo de KABAT V_{HIII} de la Región Variable de la Cadena Pesada está sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, norleucina, Ile, Val, Met, Ala, y Phe, en particular Leu e Ile, pero especialmente Leu, tal como se muestra en SEQ ID N°: 15.
- 55 También se describe una Región Variable de la Cadena Pesada y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Pesada, respectivamente, en el que la Arg de la posición de Kabat 94 de la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias de V_H de la línea germinal humana del subgrupo de KABAT V_{HIII} de la Región Variable de la Cadena Pesada está sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Thr, pero especialmente por Ser, tal como se muestra en SEQ ID N°: 15.
- 60 También se describe una Región Variable de la Cadena Pesada y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Pesada, respectivamente, en el que el Trp de la posición de Kabat 47 de la secuencia
- 65

estructural aceptora obtenida de secuencias de V_H de la línea germinal humana del subgrupo de KABAT V_{HIII} de la Región Variable de la Cadena Pesada está sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, norleucina, Ile, Val, Met, Ala, y Phe, en particular Leu e Ile, pero especialmente Leu, y la Arg de la posición de Kabat 94 está sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Thr, pero especialmente por Ser, tal como se muestra en SEQ ID N°: 15.

También se describe una Región Variable de la Cadena Ligera y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Ligera, respectivamente, en la que la Gln de la posición de Kabat 45 de la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias de V_K de la línea germinal humana del subgrupo de KABAT V_{KII} de la Región Variable de la Cadena Ligera está sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg, Gln, y Asn, en particular por Lys y Arg, pero especialmente por Lys.

También se describe una Región Variable de la Cadena Ligera y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Ligera, respectivamente, en la que la Tyr de la posición de Kabat 87 de la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias de V_K de la línea germinal humana del subgrupo de KABAT V_{KII} de la Región Variable de la Cadena Ligera está sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Phe, Leu, Val, Ile, y Ala, en particular por Leu y Phe, pero especialmente por Phe.

También se describe una Región Variable de la Cadena Ligera y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Ligera, respectivamente, en la que la Lys de la posición de Kabat 50 de la región CDR2 obtenida de un anticuerpo monoclonal de ratón, en particular el anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2, tal como se muestra en SEQ ID N°: 12 está sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gln, His, y Asn, pero especialmente por Arg.

También se describe una Región Variable de la Cadena Ligera y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Ligera, respectivamente, en el que la Asn de la posición de Kabat 53 de la región CDR2 obtenida de un anticuerpo monoclonal de ratón, en particular el anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2, tal como se muestra en SEQ ID N°: 12 está sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile; pero especialmente Ser.

También se describe un anticuerpo humanizado, en el que el Trp de la posición de Kabat 47 de la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias de V_H de la línea germinal humana del subgrupo de KABAT V_{HIII} de la Región Variable de la Cadena Pesada está sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, norleucina, Ile, Val, Met, Ala, y Phe, en particular Leu e Ile, pero especialmente Leu, y la Arg de la posición de Kabat 94 de la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias de V_H de la línea germinal humana del subgrupo de KABAT V_{HIII} de la Región Variable de la Cadena Pesada está sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Thr, pero especialmente por Ser como se muestra en SEQ ID N°: 15, y la Tyr de la posición de Kabat 87 de la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias de V_K de la línea germinal humana del subgrupo de KABAT V_{KII} de la Región Variable de la Cadena Ligera está sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Phe, Leu, Val, Ile, y Ala, en particular por Leu y Phe, pero especialmente por Phe.

También se describe una Región Variable de la Cadena Pesada y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Pesada, respectivamente, en el que el Trp de la posición de Kabat 47 de la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias de V_H de la línea germinal humana del subgrupo de KABAT V_{HIII} de la Región Variable de la Cadena Pesada como se muestra en SEQ ID N°: 15 está sustituido por Leu.

También se describe una Región Variable de la Cadena Pesada y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Pesada, respectivamente, en el que la Arg de la posición de Kabat 94 de la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias de V_H de la línea germinal humana del subgrupo de KABAT V_{HIII} de la Región Variable de la Cadena Pesada está sustituida por Ser, tal como se muestra en SEQ ID N°: 15.

También se describe una Región Variable de la Cadena Pesada y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Pesada, respectivamente, en el que el Trp de la posición de Kabat 47 de la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias de V_H de la línea germinal humana del subgrupo de KABAT V_{HIII} de la Región Variable de la Cadena Pesada está sustituido por Leu e Ile, pero especialmente Leu, y la Arg de la posición de Kabat 94 de la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias de V_H de la línea germinal humana del subgrupo de KABAT V_{HIII} de la Región Variable de la Cadena Pesada está sustituida por Ser tal como se muestra en SEQ ID N°: 15.

También se describe una Región Variable de la Cadena Ligera y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Pesada, respectivamente, en el que la Tyr de la posición de Kabat 87 de la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias de V_K de la línea germinal humana del subgrupo de KABAT V_{KII} de la Región Variable de la Cadena Ligera está sustituida por Phe.

También se describe una Región Variable de la Cadena Pesada y un anticuerpo humanizado que comprende esta

- Región Variable de la Cadena Pesada, respectivamente, en el que el Trp de la posición de Kabat 47 de la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias de V_H de la línea germinal humana del subgrupo de KABAT V_{HIII} de la Región Variable de la Cadena Pesada está sustituido por Leu e Ile, pero especialmente Leu, y la Arg de la posición de Kabat 94 de la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias de V_H de la línea germinal humana del subgrupo de KABAT V_{HIII} de la Región Variable de la Cadena Pesada está sustituida por Ser tal como se muestra en SEQ ID N°: 15 y la Tyr de la posición de Kabat 87 de la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias de V_K de la línea germinal humana del subgrupo de KABAT V_{KII} de la Región Variable de la Cadena Ligera está sustituida por Phe.
- También se describe una Región Variable de la Cadena Pesada y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Pesada, respectivamente, en el que el Trp de la posición de Kabat 47 de la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias de V_H de la línea germinal humana del subgrupo de KABAT V_{HIII} de la Región Variable de la Cadena Pesada está sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, norleucina, Ile, Val, Met, Ala, y Phe, en particular Leu e Ile, pero especialmente Leu, y la Arg de la posición de Kabat 94 está sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Thr, pero especialmente por Ser, tal como se muestra en SEQ ID N°: 15 y en la que la Lys de la posición de Kabat 50 de la región CDR2 obtenida de un anticuerpo monoclonal de ratón, en particular el anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2, está sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gln, His, y Asn, pero especialmente por Arg.
- También se describe una Región Variable de la Cadena Pesada y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Pesada, respectivamente, en el que el Trp de la posición de Kabat 47 de la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias de V_H de la línea germinal humana del subgrupo de KABAT V_{HIII} de la Región Variable de la Cadena Pesada está sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, norleucina, Ile, Val, Met, Ala, y Phe, en particular Leu e Ile, pero especialmente Leu, y la Arg de la posición de Kabat 94 está sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Thr, pero especialmente por Ser, tal como se muestra en SEQ ID N°: 15 y en el que la Asn de la posición de Kabat 53 de la región CDR2 obtenida de un anticuerpo monoclonal de ratón, en particular el anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2, está sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile; pero especialmente Ser.
- La invención usa la región variable de la cadena ligera de SEQ ID N°: 12.
- En la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de la cadena ligera de SEQ ID N°: 12.
- En una realización específica, la invención usa la región variable de la cadena ligera que incluye secuencias señal como se muestra en SEQ ID N°: 13.
- En otra realización específica de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de la cadena ligera completa que incluye secuencias señal como se muestra en SEQ ID N°: 13.
- También se describe un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de la cadena ligera de SEQ ID N°: 12 y la región constante de la cadena ligera de SEQ ID N°: 14.
- También se describe un anticuerpo humanizado que comprende la región variable de la cadena ligera completa de SEQ ID N°: 13 y la región constante de la cadena ligera de SEQ ID N°: 14.
- La invención usa la región variable de la cadena pesada de SEQ ID N°: 15.
- En la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de la cadena pesada de SEQ ID N°: 15.
- En una realización específica, la invención usa la región variable de la cadena pesada que incluye secuencias señal como se muestra en SEQ ID N°: 16.
- En otra realización específica de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de la cadena pesada completa que incluye secuencias señal como se muestra en SEQ ID N°: 16.
- También se describe un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 15 y la región constante de la cadena pesada de SEQ ID N°: 17.
- También se describe un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 16 y la región constante de la cadena pesada de SEQ ID N°: 17.
- En un aspecto, el anticuerpo humanizado tras la co-incubación con un péptido monomérico de A β que tiene al menos 30, en particular al menos 35, más en particular al menos 38, aún más en particular al menos 40 residuos de aminoácidos y/o un péptido amiloide soluble polimérico de A β que comprende una diversidad de dichas unidades

monoméricas de A β , pero especialmente con un péptido amiloide monomérico de A β_{1-42} y/o soluble polimérico de A β que comprende una diversidad de dichas unidades monoméricas de A β_{1-42} , en particular a una proporción de concentraciones molares de anticuerpo respecto de A β_{1-42} de hasta 1:1000, en particular de hasta 1:500, más en particular de hasta 1:300, aún más en particular de hasta 1:200, pero especialmente a una proporción de concentraciones molares de entre 1:10 y 1:100, inhibe la agregación de los monómeros de A β hasta fibrillas poliméricas de peso molecular elevado.

En particular, la co-incubación del anticuerpo con péptidos monoméricos de amiloide y/o solubles poliméricos de amiloide se lleva a cabo durante 24 horas a 60 horas, en particular durante 30 horas a 50 horas, más en particular durante 48 horas, pero especialmente 24 horas, a una temperatura de entre 28 °C y 40 °C, en particular de entre 32 °C y 38 °C, más en particular a 37 °C.

En un aspecto específico, la co-incubación con péptidos monoméricos de amiloide y/o solubles poliméricos de amiloide se lleva a cabo durante 24 horas a una temperatura de 37 °C.

En particular, el anticuerpo, en particular el anticuerpo humanizado descrito en la presente memoria, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales de los mismos, se une a un péptido monomérico de A β_{1-42} y/o péptido de amiloide soluble polimérico de A β que comprende una diversidad de dichas unidades monoméricas de A β_{1-42} y, tras la co-incubación con el péptido monomérico de A β_{1-42} y/o péptido de amiloide soluble polimérico de A β que comprende una diversidad de dichas unidades monoméricas de A β_{1-42} , inhibe la agregación de los monómeros y/o polímeros de A β hasta fibrillas poliméricas de peso molecular elevado.

En un aspecto, el anticuerpo, en particular el anticuerpo humanizado descrito en la presente memoria, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, inhibe la agregación de los monómeros de A β y/o polímeros solubles de A β , que comprenden una diversidad de dichas unidades monoméricas de A β , hasta fibrillas poliméricas de peso molecular elevado en al menos un 50%, en particular en al menos un 60%, en particular en al menos un 65%, más en particular en al menos un 75%, aún más en particular en al menos un 80%, pero especialmente en al menos un 85%-90%, o más en comparación con los monómeros de péptido amiloide respectivos incubados en tampón (control), a una proporción de concentraciones molares de anticuerpo respecto de A β_{1-42} de hasta 1:1000, en particular a una proporción de concentraciones molares de entre 1:10 y 1:100, pero especialmente a una proporción de concentraciones molares de 1:10.

En un aspecto específico, el anticuerpo, en particular el anticuerpo humanizado descrito en la presente memoria, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, inhibe la agregación de los monómeros de A β y/o polímeros solubles de A β que comprenden una diversidad de dichas unidades monoméricas de A β hasta fibrillas poliméricas de peso molecular elevado en al menos un 30% a una proporción de concentraciones molares de anticuerpo respecto de A β_{1-42} de 1:100.

En otro aspecto específico, el anticuerpo, en particular el anticuerpo humanizado descrito en la presente memoria, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, inhibe la agregación de los monómeros de A β y/o polímeros solubles de A β que comprenden una diversidad de dichas unidades monoméricas de A β hasta fibrillas poliméricas de peso molecular elevado en al menos un 80% a una proporción de concentraciones molares de anticuerpo respecto de A β_{1-42} de 1:10.

La unión de los anticuerpos descritos en la presente memoria y como se describen en la presente memoria a péptidos amiloidogénicos monoméricos y/o poliméricos pero, en particular, a la forma de amiloide (1-42) conduce a la inhibición de la agregación de los péptidos amiloidogénicos monoméricos y/o poliméricos hasta fibrillas o filamentos de peso molecular elevado. Por medio de la inhibición de la agregación de péptidos amiloidogénicos monoméricos y/o poliméricos, los anticuerpos según la presente invención son capaces de prevenir o frenar la formación de placas de amiloide, en particular la forma de amiloide (1-42), que se sabe que se vuelve insoluble por el cambio de la conformación secundaria y que es la parte principal de las placas de amiloide en cerebros de animales o seres humanos enfermos.

La capacidad de inhibición de la agregación del anticuerpo se puede determinar mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, en particular mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad seguida de un análisis de sedimentación mediante SDS-PAGE en un gradiente preformado y/o mediante un ensayo fluorescente con tioflavina T (Th-T).

En un aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo, en particular un anticuerpo humanizado como se describió en la presente memoria, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo, tras la co-incubación, en particular a una proporción de concentraciones molares de entre 1:5 y 1:1000, en particular de entre 1:10 y 1:500, más en particular a una proporción de 1:10 a 1:300, aún más en particular a una proporción de entre 1:10 y 1:100, con fibrillas o filamentos preformados de amiloide polimérico de peso molecular elevado formados mediante la agregación de péptidos monoméricos de A β que tienen al menos 30, en particular al menos 35, más en particular al menos 38, aún más en particular al menos 40 residuos de aminoácidos y, pero especialmente péptidos monoméricos de A β_{1-42} , es capaz de desagregar las fibrillas o

filamentos poliméricos preformados en al menos un 20%, en particular en al menos un 30%, más en particular en al menos un 35%, aún más en particular en al menos un 40%, pero especialmente en al menos un 50% o más.

5 En un aspecto específico, la inhibición de la agregación y la capacidad de desagregación del anticuerpo, respectivamente, se determinan mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad seguida de un análisis de sedimentación mediante SDS-PAGE en un gradiente preformado.

10 En otro aspecto específico, la inhibición de la agregación y la capacidad de desagregación del anticuerpo, respectivamente, se determinan mediante un ensayo fluorescente con tioflavina T (Th-T).

15 En otro aspecto específico, el anticuerpo se co-incuba con fibrillas o filamentos preformados de amiloide polimérico de peso molecular elevado durante 12 horas a 36 horas, en particular durante 18 horas a 30 horas, más en particular durante 24 horas a una temperatura de entre 28 °C y 40 °C, en particular de entre 32 °C y 38 °C, más en particular a 37 °C.

20 En particular, la co-incubación con fibrillas o filamentos preformados de amiloide polimérico de peso molecular elevado se realiza durante 24 horas a una temperatura de 37 °C.

25 En un aspecto específico, el anticuerpo, en particular el anticuerpo humanizado que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en al menos un 24% a una proporción de concentraciones molares de anticuerpo respecto de A β 1-42 de 1:100.

30 En otro aspecto específico, el anticuerpo, en particular el anticuerpo humanizado descrito en la presente memoria, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en al menos un 32% a una proporción de concentraciones molares de anticuerpo respecto de A β 1-42 de 1:10.

35 Por medio de la desagregación de las fibrillas o filamentos poliméricos amiloidogénicos, los anticuerpos son capaces de prevenir o frenar la formación de placas de amiloide, lo que conduce a la mitigación de los síntomas asociados a la enfermedad y al retraso o la inversión de su progresión.

40 Por lo tanto, un aspecto adicional descrito en la presente memoria es proporcionar un anticuerpo, en particular un anticuerpo humanizado, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describió en la presente memoria, cuyo anticuerpo es capaz de reducir la cantidad total de A β en el cerebro de un animal, en particular un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección que conduce a una concentración incrementada de A β en el cerebro.

45 En otro aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo humanizado como se describió anteriormente en la presente memoria, cuyo anticuerpo es bi-eficaz, ya que exhibe tanto una propiedad de inhibición de la agregación como una propiedad de desagregación, en particular acompañadas por un grado elevado de sensibilidad conformacional.

50 En particular, se describe en la presente memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describió anteriormente en la presente memoria, cuyo anticuerpo, tras la co-incubación con péptidos monoméricos de amiloide y/o solubles poliméricos de amiloide, en particular con péptidos monoméricos de β -amiloide tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos de A β 1-39; 1-40, 1-41, o 1-42, y/o un péptido β -amiloide soluble polimérico que comprende una diversidad de dichas unidades monoméricas de A β , pero especialmente con un péptido amiloide monomérico de A β ₁₋₄₂ y/o soluble polimérico de A β que comprende una diversidad de dichas unidades monoméricas de A β ₁₋₄₂, inhibe la agregación de los monómeros de A β hasta fibrillas o filamentos poliméricos de peso molecular elevado y, además, tras la co-incubación con fibrillas o filamentos preformados de amiloide polimérico de peso molecular elevado formados mediante la agregación de péptidos monoméricos de amiloide, en particular péptidos monoméricos de β -amiloide tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos de A β 1-39; 1-40, 1-41, o 1-42, pero especialmente péptidos monoméricos de A β ₁₋₄₂, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados.

55 En otro aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describió anteriormente en la presente memoria, cuyo anticuerpo es capaz de inducir una transición de la conformación de lámina β hacia una conformación de hélice α y/o cadena aleatoria, pero en particular una conformación de cadena aleatoria, aún más en particular una conformación de cadena aleatoria en una localización determinada de la molécula, especialmente en el entorno de Tyr 10 y Val12 de la proteína A β , que conduce a un incremento de la conformación de cadena aleatoria a costa de la conformación de lámina β y a una solubilización mejorada de las fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de peso molecular elevado preformados. En particular, la disminución de la conformación de lámina β asciende hasta al menos un 30%, en particular hasta al menos un 35%, y más en particular hasta al menos un 40% y más, en comparación con las fibrillas o filamentos poliméricos de amiloide preformados respectivos incubados en tampón (control).

La capacidad del anticuerpo de inducir una transición en la estructura secundaria se determina mediante espectroscopía de ^{13}C -RMN en estado sólido pero, en particular, midiendo las intensidades integrales de las conformaciones de Tyr 10 y Val 12 C β en el péptido A β ₁₋₄₂.

También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describió anteriormente en la presente memoria, que comprende al menos una cadena ligera o un fragmento de la misma o al menos una cadena pesada o un fragmento de la misma, en el que dicho anticuerpo o fragmento se une a un monómero de A β con una afinidad de unión elevada con una K_D en un intervalo de entre al menos alrededor de 1×10^{-7} M a al menos alrededor de 1×10^{-12} M, en particular de al menos alrededor de 1×10^{-8} M a al menos alrededor de 1×10^{-11} M, más en particular de al menos alrededor de 1×10^{-9} M a al menos alrededor de 1×10^{-10} M, aún más en particular de al menos alrededor de 1×10^{-8} M a al menos alrededor de 2×10^{-8} M pero, preferiblemente, no muestra ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora de amiloide (APP).

También se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describió anteriormente en la presente memoria, que comprende al menos una cadena ligera o un fragmento de la misma o al menos una cadena pesada o un fragmento de la misma, en el que dicho anticuerpo o fragmento se une a una fibra, fibrilla o filamento de A β con una afinidad de unión elevada con una K_D en un intervalo de entre al menos alrededor de 1×10^{-7} M a al menos alrededor de 1×10^{-12} M, en particular de al menos alrededor de 1×10^{-8} M a al menos alrededor de 1×10^{-11} M, más en particular de al menos alrededor de 1×10^{-9} M a al menos alrededor de 1×10^{-10} M, aún más en particular de al menos alrededor de 2×10^{-9} M a al menos alrededor de 5×10^{-9} M, pero, preferiblemente, no muestra ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora de amiloide (APP).

En otro aspecto, el anticuerpo como se describió anteriormente en la presente memoria, o un fragmento del mismo, exhibe una afinidad de unión a una fibra, fibrilla o filamento de A β que es al menos 2 veces, en particular al menos 4 veces, en particular al menos 10 veces, en particular al menos 15 veces, más en particular al menos 20 veces, pero especialmente al menos 25 veces mayor que la afinidad de unión a un monómero de A β .

Todavía en otro aspecto, se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo en la presente memoria, cuyo anticuerpo se une sustancialmente a A β agregado, que incluye placas de A β , en el cerebro de un mamífero, en particular de un ser humano pero, preferiblemente, no muestra ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora de amiloide (APP).

En otro aspecto, se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo en la presente memoria, cuyo anticuerpo se une sustancialmente al amiloide polimérico soluble, en particular amiloide β (A β), que incluye monómeros de A β , en el cerebro de un mamífero, en particular de un ser humano, pero, preferiblemente, no muestra ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora de amiloide (APP).

Además, se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describió anteriormente en la presente memoria, cuyo anticuerpo reduce significativamente la carga de placa de A β en el cerebro de un mamífero, en particular de un ser humano. Esto se puede conseguir mediante la unión del anticuerpo a la placa o mediante el desplazamiento del equilibrio entre amiloide, en particular amiloide β (A β), en su estado insoluble y agregado hacia su forma soluble mediante la desagregación de las fibras hasta formas poli- y monoméricas solubles induciendo un desplazamiento de la conformación y uniendo y estabilizando las formas de amiloide desagregadas y solubilizadas, en particular las formas de amiloide β (A β), en el tejido y/o los fluidos corporales, en particular el cerebro. Por medio de la actividad del anticuerpo, se favorece así el catabolismo y la eliminación periférica en vez del depósito dentro del tejido y/o los fluidos corporales, en particular el cerebro. El efecto beneficioso del anticuerpo se puede obtener así sin la unión del anticuerpo a la placa.

Por medio de esta actividad estabilizante, el anticuerpo es capaz de neutralizar los efectos tóxicos de la proteína amiloide polimérica y soluble menos agregada, en particular la proteína amiloide β (A β), en el tejido y/o los fluidos corporales. En un aspecto específico, el anticuerpo descrito en la presente memoria puede así llevar a cabo sus efectos beneficiosos sin unirse necesariamente al amiloide beta agregado en el cerebro.

En un aspecto adicional, se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describió anteriormente en la presente memoria, que comprende al menos una cadena ligera o un fragmento de la misma o al menos una cadena pesada o un fragmento de la misma que incorpora al menos una, en particular dos y más en particular tres regiones CDR obtenidas de un anticuerpo donante de ratón, en particular del anticuerpo de ratón AC1-01-Ab7C2 (denominado "mC2" y hC2 para el anticuerpo C2 humanizado, a lo largo de la solicitud) depositado el 01 de diciembre de 2005 en la "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, con el n° de acceso DSM ACC2750, en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo tiene una afinidad hacia el antígeno A β que es al menos 5 veces, en particular al

menos 8 veces, más en particular al menos 10 veces, pero especialmente al menos 15 veces mayor que la del anticuerpo donante de ratón.

El anticuerpo de esta invención puede ser, en una realización, un anticuerpo completo (p.ej., con dos cadenas ligeras de tamaño completo y dos cadenas pesadas de tamaño completo) de cualquier isotipo y subtipo (p.ej., IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA1 e IgA2); pero especialmente un anticuerpo del isotipo IgG4; de manera alternativa, en otra realización, puede ser un fragmento de unión al antígeno (p.ej., Fab, F(ab')₂, y Fv) de un anticuerpo completo.

La invención, así, también se refiere a los fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos descritos en la presente memoria. En una realización de la invención, el fragmento se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab)₂, y un fragmento F_v, que incluye los productos de una biblioteca de expresión de inmunoglobulinas Fab y los fragmentos de unión al epítipo de cualquiera de los anticuerpos y fragmentos mencionados anteriormente.

En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención está conjugado a polietilen glicol. Aún en otra realización, la región constante del anticuerpo de la invención está modificada para reducir al menos una función efectora biológica mediada por la región constante respecto de un anticuerpo sin modificar. Todavía en otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención comprende una región Fc que tiene una función efectora alterada.

La invención se refiere además a una molécula nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se describió anteriormente en la presente memoria.

En particular, la invención usa una molécula nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un tramo de moléculas de aminoácidos contiguos tal como se proporcionan en SEQ ID N°: 2 y 3, respectivamente, o la secuencia complementaria, que representa las Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDRs) 2 y 3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR).

Más en particular, la invención usa una molécula nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un tramo de moléculas de aminoácidos contiguos tal como se proporciona en SEQ ID N°: 4, o la secuencia complementaria, que representa la Región Determinante de la Complementariedad (CDR) 1 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR).

En otro aspecto, se proporciona una molécula nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica tal como se proporciona en SEQ ID N°: 18 y SEQ ID N°: 19, o la secuencia complementaria, que codifica la secuencia de aminoácidos de CDR 2 y CDR 3, respectivamente, de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR).

En otro aspecto, se proporciona una molécula nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica tal como se proporciona en SEQ ID N°: 20, o la secuencia complementaria, que codifica la secuencia nucleotídica de CDR 1 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR).

En otra realización de la invención, se proporciona una molécula nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica de SEQ ID N°: 21, o la secuencia complementaria, que codifica la región variable de la cadena ligera.

En otra realización de la invención, se proporciona una molécula nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica de SEQ ID N°: 22, o la secuencia complementaria, que codifica la región variable de la cadena ligera completa que incluye las secuencias señal.

En otra realización de la invención se proporciona una molécula nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica que codifica la región variable de la cadena ligera de SEQ ID N°: 22 y la región constante de la cadena ligera de SEQ ID N°: 23. La invención también comprende la cadena complementaria de dicha molécula nucleotídica.

En otra realización de la invención, se proporciona una molécula nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica de SEQ ID N°: 24 que codifica la región variable de la cadena pesada. La invención también comprende la cadena complementaria de dicha molécula nucleotídica.

En otra realización de la invención, se proporciona una molécula nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica de SEQ ID N°: 25 que codifica la región variable de la cadena pesada completa que incluye secuencias señal. La invención también comprende la cadena complementaria de dicha molécula nucleotídica.

En otra realización de la invención se proporciona una molécula nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica que codifica la región variable de la cadena pesada de SEQ ID N°: 25 y la región constante de la cadena pesada de SEQ ID N°: 26. La invención también comprende la cadena complementaria de dicha molécula

nucleotídica.

También se incluye en la presente memoria una secuencia nucleotídica que hibrida con una de las secuencias nucleotídicas que codifican los anticuerpos anteriormente descritos de la invención, en particular con la cadena complementaria de la misma, aisladamente o como parte de una molécula nucleotídica mayor.

En particular, la descripción se refiere a una secuencia nucleotídica que hibrida en condiciones de hibridación convencionales, en particular en condiciones de hibridación rigurosas, con cualquiera de las secuencias nucleotídicas proporcionadas en SEQ ID N°s: 18-26 y 29 - 32, en particular con la cadena complementaria de las mismas.

En otra realización de la invención se proporciona un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico según la invención y como se mencionó anteriormente en la presente memoria.

En otra realización de la invención se proporciona una célula que comprende un vector de expresión que comprende el ácido nucleico según la invención y como se mencionó anteriormente en la presente memoria.

Todavía en otra realización, la invención se refiere a una composición que comprende el anticuerpo según la invención, pero en particular un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se describió anteriormente en la presente memoria, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o cualquier derivado o partes funcionales del mismo, en una cantidad terapéuticamente eficaz, en particular una composición que es una composición farmacéutica que comprende opcionalmente además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización de la invención, dicha composición comprende el anticuerpo en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Además, se describe una mezcla que comprende un anticuerpo, en particular un anticuerpo monoclonal según la invención, pero en particular un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describió anteriormente en la presente memoria, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o cualquier derivado o partes funcionales del mismo, en una cantidad terapéuticamente eficaz y, opcionalmente, una sustancia biológicamente activa adicional y/o un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En particular, la invención se refiere a una mezcla, en la que la sustancia biológicamente activa adicional es un compuesto usado en la medicación de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados a la proteína amiloide o similar a amiloide, tal como la proteína A β implicada en la enfermedad de Alzheimer.

En otra realización de la invención, la otra sustancia o compuesto biológicamente activo puede ser también un agente terapéutico que se puede usar en el tratamiento de la amiloidosis provocada por amiloide β , o se puede usar en la medicación de otros trastornos neurológicos.

La otra sustancia biológicamente activa o compuesto puede ejercer su efecto biológico mediante el mismo mecanismo o un mecanismo similar como el anticuerpo según la invención o mediante un mecanismo de acción no relacionado o mediante una gran diversidad de mecanismos de acción relacionados y/o no relacionados.

En general, el otro compuesto biológicamente activo puede incluir potenciadores de la transmisión de neutrones, fármacos psicoterapéuticos, inhibidores de acetilcolin esterasa, agentes bloqueantes de canales de calcio, aminos biogénicas, tranquilizantes de benzodiazepinas, síntesis de acetilcolina, potenciadores del almacenamiento o la liberación, agonistas de receptores postsinápticos de acetilcolina, inhibidores de monoamina oxidasa-A o -B, antagonistas de receptores de glutamato de N-metil-D-aspartato, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, antioxidantes, y antagonistas de receptores serotoninérgicos.

Más en particular, la invención se refiere a una mezcla que comprende al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos eficaces contra el estrés oxidativo, compuestos anti-apoptóticos, agentes quelantes de metales, inhibidores de la reparación del ADN tales como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de α -secretasa, inhibidores de β - y γ -secretasa, proteínas tau, neurotransmisores, agentes de ruptura de láminas β , agentes atractores para componentes celulares de eliminación / disminución de amiloide beta, inhibidores de amiloide beta truncado en posición N-terminal que incluyen amiloide beta 3-42-pirrolutamat, moléculas anti-inflamatorias, o inhibidores de colinesterasa (ChEIs) tales como tacrina, rivastigmina, donepezilo, y/o galantamina, agonistas M1 y otros fármacos que incluyen cualquier fármaco modificador de amiloide o tau y suplementos nutritivos, y suplementos nutritivos, junto con un anticuerpo según la presente invención y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención se refiere además a una mezcla, en la que el compuesto es un inhibidor de colinesterasa (ChEIs), en

particular una mezcla, en la que el compuesto es uno seleccionado del grupo que consiste en tacrina, rivastigmina, donepezilo, galantamina, niacina y memantina.

En una realización adicional, las mezclas según la invención pueden comprender niacina o memantina junto con un anticuerpo según la presente invención y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Todavía en otra realización de la invención se proporcionan mezclas que comprenden "antipsicóticos atípicos", tales como, por ejemplo, clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina para el tratamiento de síntomas psicóticos positivos y negativos que incluyen alucinaciones, delirios, trastornos del pensamiento (manifestados mediante incoherencia notable, descarrilamiento, tangencialidad), y comportamiento extraño o desorganizado, así como anhedonia, embotamiento afectivo, apatía, y retraimiento social, junto con un anticuerpo, en particular un anticuerpo monoclonal según la invención, pero en particular un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se describió en la presente memoria y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización específica de la invención, las composiciones y mezclas según la invención y como se describieron anteriormente en la presente memoria comprenden el anticuerpo y la sustancia biológicamente activa, respectivamente, en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Otros compuestos que se pueden usar de manera adecuada en las mezclas en combinación con el anticuerpo según la presente invención se describen en el documento WO 2004/058258 (véanse especialmente las páginas 16 y 17), que incluye objetivos farmacológicos terapéuticos (páginas 36-39), ácidos alcanosulfónicos y ácidos alcanosulfúricos (páginas 39-51), inhibidores de colinesterasa (páginas 51-56), antagonistas del receptor de NMDA (páginas 56-58), estrógenos (páginas 58-59), fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (páginas 60-61), antioxidantes (páginas 61-62), agonistas de receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) (páginas 63-67), agentes de reducción de colesterol (páginas 68-75); inhibidores de amiloide (páginas 75-77), inhibidores de la formación de amiloide (páginas 77-78), agentes quelantes de metales (páginas 78-79), anti-psicóticos y antidepresivos (páginas 80-82), suplementos nutricionales (páginas 83-89) y compuestos que incrementan la disponibilidad de sustancias biológicamente activas en el cerebro (véanse las páginas 89-93) y profármacos (páginas 93 y 94).

En otra realización, la invención se refiere a una mezcla que comprende el anticuerpo, en particular un anticuerpo monoclonal según la invención, pero en particular un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se describió anteriormente en la presente memoria, y/o la sustancia biológicamente activa en una cantidad terapéuticamente eficaz.

La invención se refiere además al uso de un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se describió anteriormente en la presente memoria y/o una parte funcional del mismo y/o una composición farmacéutica, o una mezcla que comprende dicho anticuerpo, para la preparación de un medicamento para tratar o aliviar los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados a la formación de placas de amiloide que incluyen la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, tales como enfermedades que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tales como la Enfermedad de Alzheimer (EA), demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch); el complejo Parkinson-Demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan o están asociadas a proteínas similares a amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del adulto; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos, y otros, lo que incluye la degeneración macular.

También se describe en la presente memoria un método para la preparación de un anticuerpo, en particular un anticuerpo monoclonal, pero en particular un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describió anteriormente en la presente memoria y/o una parte funcional del mismo y/o una composición farmacéutica, o una mezcla que comprende dicho anticuerpo y/o una parte funcional del mismo, en particular en una cantidad terapéuticamente eficaz, para el uso en un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados a la formación de placas de amiloide que incluyen la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, tales como las enfermedades que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tales como la Enfermedad de Alzheimer (EA), demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch); el complejo Parkinson-Demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan o están asociadas a proteínas similares a amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del adulto; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos, y otros, lo que incluye la degeneración macular, que comprende formular un anticuerpo, en particular un anticuerpo monoclonal según la invención, pero en particular un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención en una forma farmacéuticamente aceptable.

Además se proporciona un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados a la formación de placas de amiloide que incluyen la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, tales como enfermedades que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tales como la Enfermedad de Alzheimer (EA), demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch); el complejo Parkinson-Demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan o están asociadas a proteínas similares a amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del adulto; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, que incluyen degeneración macular, mediante la administración de un anticuerpo y/o una parte funcional del mismo, pero en particular un anticuerpo humanizado y/o una parte funcional del mismo, o una composición o mezcla que comprende tal anticuerpo y/o una parte funcional del mismo, a un animal o un ser humano afectado por tal trastorno, que comprende administrar el anticuerpo en una cantidad terapéuticamente eficaz.

También es un objetivo proporcionar un método para el tratamiento de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados a la formación de placas de amiloide que incluyen la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tales como la Enfermedad de Alzheimer (EA), en particular una enfermedad o afección caracterizada por una pérdida de capacidad de la memoria cognitiva, mediante la administración a un animal, en particular un mamífero o un ser humano, de un anticuerpo, en particular una composición farmacéutica según la invención y como se describió en la presente memoria.

En una realización específica, la invención proporciona un método para retener o incrementar la capacidad de la memoria cognitiva pero, en particular, para restablecer la capacidad de la memoria cognitiva de un animal, en particular un mamífero o un ser humano, que padece un deterioro de la memoria mediante la administración a un animal, en particular un mamífero o un ser humano, de un anticuerpo, en particular una composición farmacéutica según la invención y como se describió anteriormente en la presente memoria.

Un objetivo adicional es proporcionar una composición terapéutica y un método para producir tal composición, así como un método para el tratamiento de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados a la formación de placas de amiloide que incluyen la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tales como la Enfermedad de Alzheimer (EA), en particular una enfermedad o afección caracterizada por una pérdida de la capacidad de la memoria cognitiva, mediante el uso de un anticuerpo según la invención y como se describió anteriormente en la presente memoria.

En particular, la invención se refiere al uso en un método para el tratamiento de un animal, en particular un mamífero o un ser humano, que padece una afección asociada a amiloide caracterizada por una pérdida de la capacidad de la memoria cognitiva que conduce a la retención de la capacidad de la memoria cognitiva.

También se describe un método de diagnóstico de una enfermedad o afección asociada a amiloide en un paciente, que comprende detectar la unión inmuno-específica de un anticuerpo o un fragmento activo del mismo a un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ*, que incluye las etapas de

(a) poner la muestra o una parte o área específica del cuerpo que se sospecha que contiene la proteína amiloide en contacto con un anticuerpo, en particular un anticuerpo monoclonal según la invención, pero en particular un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se describió anteriormente en la presente memoria, y/o una parte funcional del mismo, cuyo anticuerpo se une a un epítipo de la proteína amiloide;

(b) permitir que el anticuerpo y/o una parte funcional del mismo se una a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;

(c) detectar la formación del complejo inmunológico; y

(d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína amiloide en la muestra o parte o área específica del cuerpo.

La invención también se refiere a un método para determinar el grado de la carga de placa amiloidogénica en un tejido y/o fluidos corporales, que comprende

(a) ensayar una muestra de tejido y/o fluido corporal en busca de la presencia de la proteína amiloide con el anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención;

(b) determinar la cantidad de anticuerpo unido a la proteína; y

(c) calcular la carga de placa en la muestra de tejido o de fluido corporal.

En particular, la formación del complejo inmunológico en la etapa b) se determina de forma que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlaciona con la presencia o ausencia de la proteína amiloide.

En otra realización de la invención, se proporciona un equipo de ensayo para la detección y el diagnóstico de las enfermedades y afecciones asociadas a amiloide, que comprende el anticuerpo humanizado o un fragmento del

mismo según la invención.

En particular, el equipo de ensayo comprende un recipiente que alberga uno o más anticuerpos según la presente invención, e instrucciones para el uso de los anticuerpos con el propósito de unirse a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico y detectar la formación del complejo inmunológico, de forma que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlaciona con la presencia o ausencia de la proteína amiloide.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo que comprende una región variable como se muestra en SEQ ID N°: 27, o una variante de la misma. En un aspecto, una línea celular que expresa el anticuerpo.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un gen de anticuerpo que comprende una región variable como se muestra en SEQ ID N°: 29, o una variante de la misma. En un aspecto, una línea celular expresa el anticuerpo.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un método para desagregar fibras de beta-amiloide preformadas, que comprende hacer interaccionar un anticuerpo hC2 con las fibras de beta-amiloide preformadas.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo protege a las neuronas de la degradación inducida por Abeta.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un método para prevenir la degradación de neuronas inducida por Abeta, que comprende tratar las neuronas con una cantidad eficaz de un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la descripción de la presente memoria.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria el uso de un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la descripción de la presente memoria para la preparación de un medicamento para prevenir la degeneración de neuronas tras la exposición a un oligómero Abeta.

Descripción breve de las figuras y secuencias

Figura 1 (Ejemplo 2): Casete de Expresión de la región variable de la cadena ligera de ratón del Anticuerpo Quimérico

Figura 2 (Ejemplo 2): Casete de Expresión de la región variable de la cadena pesada de ratón del Anticuerpo Quimérico

Figura 3 (Ejemplo 5.2): Comparación de la región variable de la cadena pesada de ratón con la secuencia de la línea germinal murina más cercana

Figura 4 (Ejemplo 8): Actividad de los anticuerpos C2 humanizados purificados

Figura 5 (Ejemplo 9): Actividad de unión de anticuerpos producidos mediante la expresión transitoria de construcciones de CDRL2 modificada de C2 junto con la cadena pesada química de C2, en comparación con el anticuerpo quimérico C2ChVHAF/ChVK, producido mediante la transfección transitoria y purificado.

Figura 6 (Ejemplo 11): Resultados del Ensayo de Unión Inmunohistoquímica con el anticuerpo quimérico AF y el anticuerpo humanizado H4K1.

Figura 7 (Ejemplo 12): Funcionalidad de mC2 sobre las fibras de Amiloide

Figura 8 (Ejemplo 12): Afinidad de Unión de C2 humanizado en ELISA.

Figura 9 (Ejemplo 14): Unión específica de la conformación de mC2 a diferentes clases de proteína amiloide. La preparación del sedimento en la leyenda de esta figura se refiere a las fibras de A β ₁₋₄₂, la preparación del sobrenadante se refiere a los monómeros de amiloide.

Figura 10: Secuencias de VK de C2 humanizado comparadas con la secuencia murina y las secuencias aceptoras humanas DPK15 y J κ 1

Figura 11: Secuencias de VH de C2 humanizado comparadas con la secuencia murina y las secuencias aceptoras humanas DP54 y J μ 6

Figura 12: Secuencia completa de ADN y de proteína de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo C2 humanizado, C2HuVK1

Figura 13: Secuencia completa de ADN y de proteína de la región constante de la cadena ligera (C Kappa humana) del anticuerpo C2 humanizado

Figura 14: Secuencias completas de ADN y de proteína de la región constante de la cadena pesada (IgG4 humana ser228-pro) del anticuerpo C2 humanizado

5 Figura 15A-C (Ejemplo 15): Resultados de los experimentos de Cartografía de Epítomos

Figura 16 (Ejemplo 13): Resultados de los experimentos de ensayo de la agregación

Figura 17 (Ejemplo 13): Resultados de los experimentos de ensayo de la desagregación

10 Figura 18: (Ejemplo 16): Resultados de los experimentos de neuroprotección con anticuerpo humanizado C2.

SEQ ID Nº: 1	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada humanizada (CDR1) de C2 HuVH AF 4
15 SEQ ID Nº: 2	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada humanizada (CDR2) de C2 HuVH AF 4
SEQ ID Nº: 3	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada humanizada (CDR3) de C2 HuVH AF 4
20 SEQ ID Nº: 4	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera humanizada (CDR1) de C2 HuVK 1
SEQ ID Nº: 5	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera humanizada (CDR2) de C2 HuVK 1
SEQ ID Nº: 6	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera humanizada (CDR3) de C2 HuVK 1
25 SEQ ID Nº: 7	Secuencia de aminoácidos de la región 2 del epítipo de A β
SEQ ID Nº: 8	Secuencia de aminoácidos de la región 1 del epítipo de A β
SEQ ID Nº: 9	Secuencia de aminoácidos de la región 2 del epítipo de A β modificada
SEQ ID Nº: 10	Secuencia de aminoácidos de la región 1 del epítipo de A β modificada
SEQ ID Nº: 11	Secuencia de aminoácidos de la región del Epítipo modificada completa
30 SEQ ID Nº: 12	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera humanizada de C2 HuVK 1
SEQ ID Nº: 13	Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera humanizada de C2
SEQ ID Nº: 14	Secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera de C2 humanizada
SEQ ID Nº: 15	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada humanizada de C2 HuVH AF 4
35 SEQ ID Nº: 16	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada de C2
SEQ ID Nº: 17:	Secuencia de aminoácidos de la región C de la cadena IG Gamma-4 modificada
SEQ ID Nº: 18:	Secuencia de nucleótidos de CDR2 de la región variable de la cadena pesada humanizada de C2 HuVH AF 4
SEQ ID Nº: 19:	Secuencia de nucleótidos de CDR3 de la región variable de la cadena pesada humanizada de C2 HuVH AF 4
40 SEQ ID Nº: 20:	Secuencia de nucleótidos de CDR1 de la región variable de la cadena ligera humanizada de C2 HuVK 1
SEQ ID Nº: 21:	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera humanizada de C2 HuVK 1
SEQ ID Nº: 22:	Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera humanizada de C2
45 SEQ ID Nº: 23:	Secuencia de nucleótidos de la región constante de la cadena ligera humanizada de C2
SEQ ID Nº: 24:	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada humanizada de C2 HuVH AF 4
SEQ ID Nº: 25:	Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada humanizada de C2
SEQ ID Nº: 26:	Secuencia de nucleótidos de la región constante de la cadena pesada humanizada de C2
50 SEQ ID Nº: 27:	Secuencia de aminoácidos de la Región Variable de la Cadena Ligera de C2 de Ratón
SEQ ID Nº: 28:	Secuencia de aminoácidos de la Región Variable de la Cadena Pesada de C2 de Ratón
SEQ ID Nº: 29:	Secuencia de nucleótidos de la Región Variable de la Cadena Ligera de C2 de Ratón
SEQ ID Nº: 30:	Secuencia de nucleótidos de la Cadena Ligera de C2 de Ratón
SEQ ID Nº: 31:	Secuencia de nucleótidos de la Región Variable de la Cadena Pesada de C2 de Ratón
55 SEQ ID Nº: 32:	Secuencia de nucleótidos de la Cadena Pesada de C2 de Ratón

Definiciones

60 Los términos "polipéptido", "péptido", y "proteína", tal como se usan en la presente memoria, son intercambiables y se definen como una biomolécula compuesta de aminoácidos unidos mediante un enlace peptídico.

Los términos "un/una", "uno/una" y "el/la", tal como se usan en la presente memoria, se definen como "uno/una o más", e incluyen los plurales a menos que el contexto sea inadecuado.

65 La frase "enfermedades y trastornos que están provocados por o asociados a amiloide o proteínas similares a amiloide" incluye, pero sin limitación, las enfermedades y los trastornos provocados por la presencia o actividad de

proteínas similares a amiloide en estado monomérico, de fibrillas, o polimérico, o cualquier combinación de las tres. Tales enfermedades y trastornos incluyen, pero sin limitación, amiloidosis, tumores endocrinos, y degeneración macular.

El término "amiloidosis" se refiere a un grupo de enfermedades y trastornos asociados a la formación de placas de amiloide que incluyen, pero sin limitación, amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, tales como enfermedades que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tales como la Enfermedad de Alzheimer (EA), que incluye enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch); el complejo Parkinson-Demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan o están asociadas a proteínas similares a amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; Enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis con cuerpos de inclusión (MCI), diabetes del adulto, y amiloidosis cardíaca senil; y diversas enfermedades oculares, que incluyen degeneración macular, neuropatía óptica relacionada con las drusas, y cataratas debida al depósito de beta-amiloide.

Los términos "detectar" o "detectado", tal como se usan en la presente memoria, significan el uso de técnicas conocidas para la detección de moléculas biológicas, tales como métodos inmunoquímicos o histológicos, y se refieren a la determinación cualitativa o cuantitativa de la presencia o concentración de la biomolécula bajo investigación.

"Amiloide soluble polimérico" se refiere a múltiples monómeros agregados de péptidos amiloides, o de péptidos similares a amiloide, o de péptidos amiloides modificados o truncados o de otros derivados de péptidos amiloides que forman estructuras oligoméricas o poliméricas que son solubles en el cuerpo del mamífero o del ser humano, más en particular en el cerebro, pero en particular a múltiples monómeros agregados de amiloide β ($A\beta$) o de péptidos amiloides β ($A\beta$) modificados o truncados o de derivados de los mismos, que son solubles en el cuerpo del mamífero o del ser humano, más en particular en el cerebro.

"Amiloide β , $A\beta$ o β -amiloide" es una expresión reconocida en la técnica, y se refiere a proteínas y péptidos amiloides β , proteína precursora de amiloide β (APP), así como las modificaciones, fragmentos y cualquier equivalente funcional de los mismos. En particular, el amiloide β , tal como se usa en la presente memoria, significa cualquier fragmento producido mediante escisión proteolítica de APP, pero especialmente aquellos fragmentos que están implicados o asociados a las patologías amiloides que incluyen, pero sin limitación, $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$, $A\beta_{1-42}$ y $A\beta_{1-43}$.

La estructura y las secuencias de los péptidos amiloides β , tal como se mencionó anteriormente, son muy conocidas para los expertos en la técnica, y los métodos para producir dichos péptidos o para extraerlos del cerebro y otros tejidos se describen, por ejemplo, en Glenner y Wong, Biochem Biophys Res Comm 129, 885-890 (1984). Además, los péptidos amiloides β también están disponibles comercialmente en diversas formas.

"Aislado" significa que una molécula biológica está libre de al menos algunos de los componentes con los que se da de manera natural.

Los términos "anticuerpo" o "anticuerpos", tal como se usan en la presente memoria, son términos reconocidos en la técnica, y se entiende que se refieren a moléculas o fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos, en particular a moléculas de inmunoglobulina y a las porciones inmunológicamente activas de las moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión que se une de manera específica a un antígeno. Una inmunoglobulina es una proteína que comprende uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por los genes de las regiones constantes kappa y lambda, alfa, gamma, delta, epsilon y mu de las inmunoglobulinas, así como por una miríada de genes de las regiones variables de las inmunoglobulinas. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o epsilon, las cuales a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. También se conocen las subclases de la cadena pesada. Por ejemplo, las cadenas pesadas de IgG en seres humanos pueden ser cualquiera de las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La inmunoglobulina según la invención puede ser de cualquier clase (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA e IgY) o subclase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) de molécula de inmunoglobulina.

Tal como se usa en la presente memoria, "se une de manera específica", en referencia a un anticuerpo, significa que el anticuerpo se une a su antígeno objetivo con una afinidad mayor que a un/varios antígeno(s) estructuralmente diferente(s).

Se sabe que una unidad estructural de inmunoglobulina típica comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, y cada par tiene una cadena "ligera" (alrededor de 25 kD) y una cadena "pesada" (alrededor de 50-70 kD). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de alrededor de 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento del antígeno. Las expresiones cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligeras y

pesadas, respectivamente.

Los anticuerpos existen como anticuerpos intactos de tamaño completo o como varios fragmentos bien caracterizados producidos mediante digestión con diversas peptidasas o productos químicos. Así, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de las uniones disulfuro en la región de la bisagra para producir $F(ab')_2$, un dímero de Fab que es en sí mismo una cadena ligera unida a V_H-CH_1 mediante un enlace disulfuro. El $F(ab')_2$ se puede reducir en condiciones suaves para romper la unión disulfuro en la región de la bisagra, por lo que se convierte el dímero $F(ab')_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es básicamente un fragmento Fab con parte de la región de la bisagra (véase, Fundamental Immunology, W. E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpos). Aunque se definen diversos fragmentos de anticuerpos con respecto a la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que se puede sintetizar cualquiera de una diversidad de fragmentos de anticuerpos de novo químicamente o mediante la utilización de la metodología de ADN recombinante. Así, el término anticuerpo, tal como se usa en la presente memoria, también incluye los fragmentos de anticuerpo producidos mediante la modificación de anticuerpos completos o sintetizados de novo, o los anticuerpos y fragmentos obtenidos mediante el uso de las metodologías de ADN recombinante.

Los "anticuerpos" pretenden estar dentro del alcance de la presente invención para incluir los anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, quiméricos, de cadena sencilla, bispecíficos, anticuerpos simianizados, humanos y humanizados, así como los fragmentos activos de los mismos. Los ejemplos de fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos incluyen cadenas ligeras y pesadas separadas, fragmentos Fab, Fab/c, Fv, Fab', y $F(ab')_2$, que incluyen los productos de una biblioteca de expresión de inmunoglobulinas Fab y los fragmentos de unión al epítipo de cualquiera de los anticuerpos y fragmentos mencionados anteriormente.

Estos fragmentos activos pueden derivarse de un anticuerpo de la presente invención mediante varias técnicas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden escindir con una enzima, tal como pepsina, y someterlos a filtración en gel mediante HPLC. La fracción adecuada que contiene los fragmentos Fab se puede recoger después y concentrarla mediante filtración con membrana y similares. Para una descripción adicional de las técnicas generales para el aislamiento de fragmentos activos de anticuerpos, véase, por ejemplo, Khaw, B. A. et al. J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982); Rousseaux et al. Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986.

Los anticuerpos producidos de manera recombinante pueden ser anticuerpos de tamaño completo convencionales, fragmentos de anticuerpos activos conocidos de la digestión proteolítica, fragmentos de anticuerpos activos únicos, tales como Fv o Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos con delección de dominios, y similares. Un anticuerpo Fv tiene un tamaño de alrededor de 50 Kd, y comprende las regiones variables de las cadenas ligera y pesada. Un polipéptido Fv de cadena sencilla ("scFv") es un heterodímero $VH::VL$ unido de manera covalente que se puede expresar a partir de un ácido nucleico que incluye secuencias que codifican VH y VL unidas directamente o unidas mediante un ligador que codifica un péptido. Véase Huston, et al. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883. Varias estructuras para convertir las cadenas polipeptídicas ligeras y pesadas agregadas de manera natural, pero químicamente distintas, de una región V de un anticuerpo hasta una molécula scFv que se plegará en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión al antígeno. Véanse, p.ej. las Patentes de EE.UU. N°s 5.091.513, 5.132.405 y 4.956.778.

El sitio de combinación se refiere a la parte de una molécula de anticuerpo que participa en la unión al antígeno. El sitio de unión al antígeno está formado por residuos de aminoácidos de las regiones variables ("V") N-terminales de las cadenas pesadas ("H") y ligeras ("L"). Las regiones variables del anticuerpo comprenden tres tramos muy divergentes denominados "regiones hipervariables" o "regiones determinantes de la complementariedad" (CDRs) que están interpuestas entre tramos flanqueantes más conservados conocidos como "regiones estructurales" (FRs). En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera (LCDR1, LCDR2, y LCDR3) y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) están dispuestas entre sí en un espacio tridimensional para formar una superficie o bolsillo de unión al antígeno. El sitio de combinación del anticuerpo, por lo tanto, representa los aminoácidos que constituyen las CDRs de un anticuerpo y cualquier residuo estructural que constituya el bolsillo del sitio de unión.

La identidad de los residuos de aminoácidos en un anticuerpo particular que constituyen el sitio de combinación se puede determinar mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden identificar las CDRs del anticuerpo como las regiones hipervariables definidas originariamente por Kabat et al. (véase, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," E. Kabat et al., U.S. Department of Health and Human Services; Johnson, G y Wu, TT (2001) Kabat Database and its applications: future directions. Nucleic Acids Research, 29: 205-206; <http://immuno.bme.nwa.edu>). Las posiciones de las CDRs se pueden identificar también como las estructuras de bucles estructurales descritas originariamente por Chothia y otros, (véase Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901 (1987), Chothia et al., Nature 342, 877 (1989), y Tramontano et al., J. Mol. Biol. 215, 175 (1990)). Otros métodos incluyen la "definición AbM" que es un compromiso entre Kabat y Chothia, y se deriva mediante el uso del programa informático de modelización de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (ahora Accelrys) o la "definición de contactos" de las CDRs de Macallum et al., ("Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography," J Mol Biol. 11 de oct. de 1996; 262(5):732-45). El siguiente gráfico identifica las CDRs basándose en las diversas definiciones conocidas.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24 -- L34	L24 -- L34	L24 -- L34	L30 -- L36
L2	L50 -- L56	L50 -- L56	L50 -- L56	L46 -- L55
L3	L89 -- L97	L89 -- L97	L89 -- L97	L89 -- L96
H1	H31 -- H35B (Numeración de Kabat)	H26 -- H35B	H26 -- H32..34	H30 -- H35B
H1	H31 -- H35 (Numeración de Chothia)	H26 -- H35	H26 -- H32	H30 -- H35
H2	H50 -- H65	H50 -- H58	H52 -- H56	H47 -- H58
H3	H95 -- H102	H95 -- H102	H95 -- H102	H93 -- H101

5 Las directrices generales mediante las cuales se pueden identificar las CDRs en un anticuerpo a partir de la secuencia solamente son las siguientes:

LCDR1:

10 Inicio - Aproximadamente el residuo 24.
El residuo anterior es siempre una Cys.
El residuo posterior es siempre un Trp. En general, TRP va seguido por TYR-GLN, pero también puede ir seguido por LEU-GLN, PHE-GLN, o TYR-LEU.
La longitud es de 10 a 17 residuos.

15 LCDR2:

Inicio - 16 residuos tras el final de L1.
La secuencia anterior es generalmente ILE-TYR, pero también puede ser VAL-TYR, ILE-LYS, o ILE-PHE. La longitud es generalmente de 7 residuos.

20 LCDR3:

Inicio - generalmente 33 residuos tras el final de L2.
El residuo anterior es una Cys.
25 La secuencia posterior es PHE-GLY-X-GLY.
La longitud es de 7 a 11 residuos.

HCDR1:

30 Inicio - aproximadamente en el residuo 26 (cuatro residuos tras una CYS) [definición de Chothia / AbM] la definición de Kabat comienza 5 residuos después.
La secuencia anterior es CYS-X-X-X.
Los residuos posteriores son un TRP, en general seguido por VAL, pero también seguido por ILE, o ALA.
35 La longitud es de 10 a 12 residuos en la definición de AbM, mientras la definición de Chothia excluye los últimos 4 residuos.

HCDR2:

40 Inicio - 15 residuos tras el final de la definición de Kabat /AbM de CDR-H1.
La secuencia anterior es en general LEU-GLU-TRP-ILE-GLY (SEQ ID N°. 1), pero son posibles diversas variaciones.
La secuencia posterior es LYS/ARG-LEU/ILE/VAL/PHE/THR/ALA-THR/SER/ILE/ALA
La longitud es de 16 a 19 residuos en la definición de Kabat (la definición de AbM termina 7 residuos antes).

45 HCDR3:

Inicio - 33 residuos tras el final de CDR-H2 (dos residuos tras una CYS).
La secuencia anterior es CYS-X-X (en general CYS-ALA-ARG).
La secuencia posterior es TRP-GLY-X-GLY.
50 La longitud es de 3 a 25 residuos.

55 La identidad de los residuos de aminoácidos en un anticuerpo particular que están fuera de las CDRs, pero que sin embargo constituyen parte del sitio de combinación al tener una cadena lateral que es parte del recubrimiento del sitio de combinación (es decir, está disponible para la unión a través del sitio de combinación), se puede determinar mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica, tales como modelización molecular y cristalografía de rayos X. Véase, p.ej., Riechmann et al., (1988) Nature, 332:323-327.

Los anticuerpos quiméricos son aquellos en los que una o más regiones del anticuerpo son de una especie animal, y una o más regiones del anticuerpo son de una especie animal diferente. Un anticuerpo quimérico preferido es uno que incluye regiones de una inmunoglobulina de primate. Se entiende en general que un anticuerpo quimérico para uso clínico en seres humanos tiene las regiones variables de un animal no humano, p.ej. un roedor, con las regiones constantes de un ser humano. En contraste, un anticuerpo humanizado usa las CDRs del anticuerpo no humano con la mayoría o todas las regiones estructurales variables y todas las regiones constantes de una inmunoglobulina humana. Se entiende en general que un anticuerpo quimérico humano tiene las regiones variables de un roedor. Un anticuerpo quimérico humano típico tiene las regiones constantes pesadas humanas y las regiones constantes de las cadenas ligeras humanas con las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras que proceden de un anticuerpo de roedor. Un anticuerpo quimérico puede incluir ciertos cambios en una secuencia nativa de aminoácidos de las regiones constantes humanas y la secuencia nativa de la región variable de roedor. Los anticuerpos quiméricos y humanizados se pueden preparar mediante métodos muy conocidos en la técnica, que incluyen las aproximaciones de injerto de CDRs (véanse, p.ej., las Patentes de EE.UU. N°s 5.843.708; 6.180.370; 5.693.762; 5.585.089; 5.530.101), las estrategias de reordenamiento aleatorio de cadenas (véase p.ej., la Patente de EE.UU. N° 5.565.332; Rader et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95:8910-8915), estrategias de modelización molecular (Patente de EE.UU. N° 5.639.641), y similares.

Un "anticuerpo humanizado", tal como se usa en la presente memoria en el caso de un anticuerpo de dos cadenas, es uno en el que al menos una cadena está humanizada. Una cadena de anticuerpo humanizado tiene una región variable en la que una o más de las regiones estructurales son humanas. Un anticuerpo humanizado que es de cadena sencilla es uno en el que la cadena tiene una región variable en la que una o más de las regiones estructurales son humanas. Las porciones no humanas de la región variable de la cadena de anticuerpo humanizado o fragmento del mismo derivan de una fuente no humana, en particular un anticuerpo no humano, en general de origen roedor. La contribución no humana al anticuerpo humanizado se proporciona en general en forma de al menos una región CDR que está intercalada entre las regiones estructurales derivadas de una (o más) inmunoglobulina(s) humana(s). Además, los residuos de soporte estructural se pueden alterar para conservar la afinidad de unión.

El anticuerpo humanizado puede comprender además regiones constantes (p.ej., al menos una región constante o porción de la misma, en el caso de una cadena ligera, y preferiblemente tres regiones constantes en el caso de una cadena pesada). Las regiones constantes de un anticuerpo humanizado, si están presentes, generalmente son humanas.

Los métodos para obtener "anticuerpos humanizados" son muy conocidos para los expertos en la técnica. (véase, p.ej., Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)).

Un "anticuerpo humanizado" se puede obtener también mediante una nueva aproximación de ingeniería genética que posibilita la producción de anticuerpos policlonales similares a los humanos madurados por afinidad en animales grandes, tales como, por ejemplo, conejos y ratones. Véase, p.ej., la Pat. de EE.UU. N° 6.632.976.

La expresión región constante (CR), tal como se usa en la presente memoria, se refiere a los genes de las regiones constantes de la inmunoglobulina. Los genes de las regiones constantes codifican la porción de la molécula de anticuerpo que confiere funciones efectoras. Para los anticuerpos humanos quiméricos y los anticuerpos humanizados, en general no humanos (p.ej., murinos), las regiones constantes están sustituidas por regiones constantes humanas. Las regiones constantes de los anticuerpos quiméricos o humanizados de interés derivan en general de las inmunoglobulinas humanas. La región constante de la cadena pesada se puede seleccionar de cualquiera de los cinco isotipos: alfa, delta, épsilon, gamma o mu. Además, las cadenas pesadas de las diversas subclases (tales como las subclases IgG de las cadenas pesadas) son responsables de diferentes funciones efectoras, y así, mediante la elección de la región constante de la cadena pesada deseada, se pueden producir anticuerpos con la función efectora deseada. Las regiones constantes que se pueden usar dentro del alcance de esta invención son gamma 1 (IgG1), en particular una región Fc del isotipo gamma 1 (IgG1), gamma 3 (IgG3) y especialmente gamma 4 (IgG4). La región constante de la cadena ligera puede ser del tipo kappa o lambda, preferiblemente del tipo kappa. En una realización, la región constante de la cadena ligera es la cadena constante kappa humana (Heiter *et al.* (1980) *Cell* 22:197-207) y la cadena constante pesada es la cadena constante IgG4 humana.

La expresión "anticuerpo monoclonal" también se reconoce en la técnica y se refiere a un anticuerpo que es el producto de una única célula productora de anticuerpos clonada. Los anticuerpos monoclonales se producen en general fusionando una célula B productora de anticuerpos, de vida normalmente corta, con una célula de crecimiento rápido, tal como una célula cancerosa (a veces denominada célula "inmortal"). La célula híbrida resultante, o hibridoma, se multiplica rápidamente, lo que crea un clon que produce el anticuerpo.

Para el propósito de la presente descripción, se debe entender también que el "anticuerpo monoclonal" comprende los anticuerpos que se producen mediante un clon originario que todavía no ha alcanzado una monoclonalidad completa.

"Anticuerpo funcionalmente equivalente" se entiende que se refiere a un anticuerpo que comparte sustancialmente al menos una propiedad funcional importante con un anticuerpo mencionado anteriormente y descrito en la presente memoria, que comprende: especificidad de unión a la proteína β -amiloide, en particular a la proteína $A\beta_{1-42}$, y más en particular a la región epitópica 16-21 de la proteína $A\beta_{1-42}$, inmunorreactividad *in vitro*, inhibición de la agregación de los monómeros de $A\beta_{1-42}$ hasta fibrillas poliméricas de peso molecular elevado y/o desagregación de fibrillas poliméricas de $A\beta_{1-42}$ preformadas, y/o una propiedad de ruptura de láminas β y aliviar los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados a la formación de placas de amiloide, que incluyen la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, tales como enfermedades que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tales como la Enfermedad de Alzheimer (EA), demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch); el complejo Parkinson-Demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan o están asociadas a proteínas similares a amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del adulto; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos, y otros, lo que incluye la degeneración macular, cuando se administra de manera profiláctica o terapéutica. Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase, tal como IgG, IgM, o IgA, etc., o cualquier subclase tal como IgG1, IgG2a, etc., y otras subclases mencionadas anteriormente en la presente memoria o conocidas en la técnica, pero en particular de la clase IgG4. Además, los anticuerpos se pueden producir mediante cualquier método, tal como expresión en fagos, o se pueden producir en cualquier organismo o línea celular, que incluye bacterias, células o líneas celulares de insecto, mamífero o de otro tipo que producen anticuerpos con características deseadas, tales como anticuerpos humanizados. Los anticuerpos se pueden formar también mediante la combinación de una porción Fab y una región Fc de una especie diferente.

El término "hibridar", tal como se usa, se refiere a condiciones de hibridación convencionales, preferiblemente a condiciones de hibridación en las que se usa SSPE 5x, 1% de SDS, disolución de Denhardt 1x como disolución, y/o las temperaturas de hibridación están entre 35 °C y 70 °C, preferiblemente 65 °C. Tras la hibridación, se lleva a cabo el lavado preferiblemente primero con SSC 2x, 1% de SDS y posteriormente con SSC 0,2x a temperaturas entre 35 °C y 70 °C, preferiblemente a 65 °C (con respecto la definición de SSPE, SSC y la disolución de Denhardt, véase Sambrook et al. loc. cit.). Se prefieren en particular las condiciones de hibridación rigurosas, como se describe, por ejemplo, en Sambrook et al, anteriormente mencionado. Las condiciones de hibridación rigurosas especialmente preferidas están presentes, por ejemplo, si la hibridación y el lavado se dan a 65 °C como se indicó anteriormente. Las condiciones de hibridación no rigurosas, por ejemplo con hibridación y lavado llevados a cabo a 45 °C, se prefieren menos, y a 35 °C aún menos.

La "homología" entre dos secuencias se determina mediante la identidad de secuencias. Si dos secuencias que se van a comparar entre sí difieren en la longitud, la identidad de secuencias se refiere preferiblemente al porcentaje de los residuos de nucleótidos de la secuencia más corta que son idénticos a los residuos de nucleótidos de la secuencia más larga. La identidad de secuencias se puede determinar de manera convencional con el uso de programas informáticos tales como el programa BestFit (Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711). BestFit utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489, para hallar el segmento que tiene la identidad de secuencias más alta entre dos secuencias. Cuando se usa BestFit u otro programa de alineación de secuencias para determinar si una secuencia particular tiene, por ejemplo, un 95% de identidad con una secuencia de referencia de la presente invención, los parámetros se ajustan preferiblemente de forma que el porcentaje de identidad se calcula a lo largo de la longitud completa de la secuencia de referencia, y de forma que se permiten huecos de homología de hasta el 5% del número total de nucleótidos de la secuencia de referencia. Cuando se usa BestFit, los denominados parámetros opcionales se dejan preferiblemente en los valores preseleccionados ("por defecto"). Las desviaciones que aparecen en la comparación entre una secuencia dada y las secuencias anteriormente descritas de la invención pueden estar provocadas, por ejemplo, por la adición, delección, sustitución, inserción o recombinación. Tal comparación de secuencias preferiblemente se puede llevar a cabo también con el programa "fasta20u66" (versión 2.0u66, septiembre de 1998 de William R. Pearson y la Universidad de Virginia; véase también W.R. Pearson (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98, ejemplos adjuntos y <http://workbench.sdsc.edu/>). Para este propósito, se pueden usar los ajustes de parámetros "por defecto".

El anticuerpo puede ser una inmunoglobulina o un anticuerpo, que se entiende que tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos (si son multivalentes) o, como alternativa, puede ser un "anticuerpo bifuncional" o "biespecífico".

Un "anticuerpo bifuncional" o "biespecífico" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante una diversidad de métodos, que incluyen la fusión de hibridomas o la unión de fragmentos Fab'. Véase, p.ej., Songsivilai y Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321, (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

El término "fragmento" se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende menos residuos de aminoácidos que un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacta o completa. Se pueden obtener fragmentos por medio del tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacta o completa. Los fragmentos se pueden obtener también por medios recombinantes. Los fragmentos ejemplares incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc y/o Fv. La expresión "fragmento de unión al antígeno" se refiere a

un fragmento polipeptídico de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une al antígeno o que compete con el anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto del que derivaron) por la unión al antígeno (es decir, la unión específica).

- 5 Los fragmentos de unión se producen mediante técnicas de ADN recombinante, o mediante escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv, cadenas sencillas, y anticuerpos de cadena sencilla.

10 El término "antígeno" se refiere a una entidad o fragmento de la misma que se puede unir a un anticuerpo. Un inmunógeno se refiere a un antígeno que puede generar una respuesta inmunitaria en un organismo, en particular un animal, más en particular un mamífero que incluye un ser humano. El término antígeno incluye las regiones conocidas como determinantes antigénicos o epítomos, que se refieren a una porción del antígeno (que entra en contacto o que desempeña un papel significativo en mantener un contacto) que reside en el antígeno responsable de la antigenicidad o los determinantes antigénicos.

15 Tal como se usa en la presente memoria, el término "soluble" significa parcialmente o completamente disuelto en una disolución acuosa.

20 También tal como se usa en la presente memoria, el término "inmunógeno" se refiere a sustancias que provocan la producción de anticuerpos, células T y otras células inmunitarias reactivas dirigidas hacia un antígeno del inmunógeno.

25 Una respuesta inmunitaria se da cuando un individuo produce anticuerpos suficientes, células T y otras células inmunitarias reactivas hacia las composiciones inmunógenas administradas de la presente invención para moderar o aliviar el trastorno a tratar.

30 El término inmunogenicidad, tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una medida de la capacidad de un antígeno para generar una respuesta inmunitaria (humoral o celular) cuando se administra a un receptor. La presente invención se ocupa de las aproximaciones que reducen la inmunogenicidad de los anticuerpos quiméricos humanos o humanizados de interés.

Un anticuerpo humanizado de inmunogenicidad reducida se refiere a un anticuerpo humanizado que exhibe una inmunogenicidad reducida respecto del anticuerpo original, p.ej., el anticuerpo murino.

35 Un anticuerpo humanizado que conserva sustancialmente las propiedades de unión del anticuerpo original se refiere a un anticuerpo humanizado que conserva la capacidad de unirse de manera específica al antígeno reconocido por el anticuerpo original usado para producir tal anticuerpo humanizado. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado exhibirá la misma o sustancialmente la misma afinidad de unión al antígeno y aidez que el anticuerpo original. Idealmente, la afinidad del anticuerpo no será menor del 10% de la afinidad del anticuerpo original, más
40 preferiblemente no será menor de alrededor del 30%, y lo más preferiblemente, la afinidad no será menor del 50% del anticuerpo original. Los métodos para ensayar la afinidad de unión al antígeno se conocen bien en la técnica, e incluyen ensayos de unión semimáxima, ensayos competitivos, y análisis de Scatchard. Los ensayos de unión al antígeno adecuados se describen en esta solicitud.

45 Una "retromutación" es una mutación introducida en una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo humanizado, y la mutación da como resultado un aminoácido que corresponde a un aminoácido del anticuerpo original (p.ej., anticuerpo donante, por ejemplo, un anticuerpo murino). Ciertos residuos estructurales del anticuerpo original se pueden conservar durante la humanización de los anticuerpos de la invención para conservar sustancialmente las propiedades de unión del anticuerpo original, mientras al mismo tiempo se minimiza la
50 inmunogenicidad potencial del anticuerpo resultante. En una realización de la invención, el anticuerpo original es de ratón. Por ejemplo, la retromutación cambia un residuo estructural humano por un residuo murino original. Los ejemplos de residuos estructurales que se pueden retromutar incluyen, pero sin limitación, residuos canónicos, residuos de empaquetamiento de la interfase, residuos originales poco habituales que están cerca del sitio de unión, residuos en la "Zona de Vernier" (que forma una plataforma sobre la que se apoyan las CDRs) (Foote y Winter, 1992, *J. Mol. Biol.* 224, 487-499), y los cercanos a CDR H3.

60 Tal como se usa en la presente memoria, un "cambio conservativo" se refiere a alteraciones que son sustancialmente neutras conformacionalmente o antigénicamente, que producen cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o que producen cambios mínimos en los determinantes antigénicos de los polipéptidos mutantes, respectivamente, en comparación con la proteína nativa. Cuando hace referencia a los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, un cambio conservativo significa una sustitución de aminoácidos que no hace que el anticuerpo sea incapaz de unirse al receptor objetivo. Los expertos en la técnica podrán predecir qué sustituciones de aminoácidos se pueden hacer a la vez que se mantiene una probabilidad elevada de que sean neutras conformacionalmente y antigénicamente. Tal orientación se proporciona, por ejemplo, en Berzofsky, (1985) *Science* 229:932-940 y Bowie *et al.* (1990) *Science* 247:1306-1310. Los factores a considerar que afectan a la
65 probabilidad de mantener la neutralidad conformacional y antigénica incluyen, pero sin limitación: (a) la sustitución

de aminoácidos hidrófobos es menos probable que afecte a la antigenicidad, debido a que es más probable que los residuos hidrófobos estén localizados en el interior de una proteína; (b) la sustitución de aminoácidos similares fisicoquímicamente es menos probable que afecte a la conformación, debido a que el aminoácido sustituido imita estructuralmente al aminoácido nativo; y (c) la alteración de secuencias conservadas evolutivamente es probable que afecte de manera adversa a la conformación, ya que tal conservación sugiere que las secuencias de aminoácidos pueden tener una importancia funcional. Alguien de experiencia habitual en la técnica será capaz de determinar las alteraciones en la conformación de proteínas mediante el uso de ensayos muy conocidos, tales como, pero sin limitación, métodos de fijación del microcomplemento (Wasserman *et al.* (1961) *J. Immunol.* 87:290-295; Levine *et al.* (1967) *Meth. Enzymol.* 11:928-936) y por medio de estudios de unión mediante el uso de anticuerpos monoclonales dependientes de la conformación (Lewis *et al.* (1983) *Biochem.* 22:948-954).

Además, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de anticuerpo que, cuando se administra a un ser humano o animal, es suficiente para dar como resultado un efecto terapéutico en dicho ser humano o animal. Un experto en la técnica determina fácilmente la cantidad eficaz siguiendo procedimientos rutinarios.

Tal como se usan en la presente memoria, los términos "tratar", "prevenir", y "prevención" se refieren a la prevención de la reaparición o el inicio de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto que es el resultado de la administración de un agente profiláctico o terapéutico.

Construcción de Anticuerpos Humanizados

En la presente memoria se describen métodos y composiciones que comprenden anticuerpos muy específicos y muy eficaces que tienen la capacidad de reconocer y unirse de manera específica a epítomos específicos de una diversidad de antígenos β -amiloides. Los anticuerpos proporcionados por las enseñanzas de la presente descripción son especialmente útiles para el tratamiento de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados a la formación de placas de amiloide que incluyen la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tales como la Enfermedad de Alzheimer (EA), demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch); el complejo Parkinson-Demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan o están asociadas a proteínas similares a amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo Dutch, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del adulto; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, lo que incluye la degeneración macular, por nombrar solo algunas.

Una región variable completamente humanizada o remodelada se puede crear diseñando primero una secuencia de aminoácidos de la región variable que contiene CDRs no humanas, en particular derivadas de roedor, pero especialmente CDRs derivadas del anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2 (denominado "mC2" a lo largo de la solicitud y depositado el 01 de diciembre de 2005 en la "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Branuschweig, bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest y con el n° de acceso DSM ACC2750) incrustadas en las secuencias estructurales derivadas de ser humano. Las CDRs no humanas, en particular las derivadas de roedor, que se pueden obtener del anticuerpo, proporcionan la especificidad deseada. Por lo tanto, estos residuos se deben incluir en el diseño de la región variable remodelada básicamente inalterados. Cualquier modificación se debería limitar así al mínimo y se deberían vigilar atentamente los cambios de especificidad y afinidad del anticuerpo. Por otra parte, los residuos estructurales pueden derivar en teoría de cualquier región variable humana.

Para crear un anticuerpo remodelado que muestre una afinidad aceptable o incluso mejorada, se debería elegir una secuencia estructural humana, que es igualmente adecuada para crear una región variable remodelada y para conservar la afinidad del anticuerpo.

Para alcanzar este objetivo, se desarrolló la estrategia del mejor ajuste. Debido a que se sabe que las secuencias estructurales sirven para mantener las CDRs en su orientación espacial correcta para la interacción con el antígeno, y que los residuos estructurales a veces pueden incluso participar en la unión al antígeno, esta estrategia se dirige a minimizar los cambios que puedan afectar negativamente a la estructura tridimensional del anticuerpo haciendo derivar una secuencia estructural humana usada para la remodelación del anticuerpo a partir de la región variable humana que sea más homóloga o similar a la región variable no humana, en particular derivada de roedor. Esto también maximizará la probabilidad de que el anticuerpo remodelado retenga la afinidad.

A su nivel más simple, la estrategia del "mejor ajuste" implica comparar la región V de roedor donante con todas las secuencias de aminoácidos de las regiones V humanas conocidas, y después seleccionar la más homóloga para proporcionar las regiones estructuralesceptoras para los ejercicios de humanización. En realidad existen otros diversos factores que se deberían considerar, y que pueden influir en la selección final de las regiones estructuralesceptoras. Las predicciones mediante modelización molecular se pueden usar a este respecto antes de cualquier trabajo experimental en un intento de maximizar la afinidad del anticuerpo remodelado resultante. Básicamente, el objetivo de la modelización es predecir qué residuos clave (si los hay) de la región estructural humana más

homóloga se deberían dejar como en el roedor para obtener la mejor afinidad en el anticuerpo remodelado.

En una realización de la invención, las CDRs se pueden obtener a partir de un anticuerpo monoclonal de ratón, en particular a partir del anticuerpo monoclonal de ratón ACI-01-Ab7C2 (denominado "mC2" a lo largo de la solicitud) descrito en la solicitud pendiente junto con la presente EP 05 02 7092.5 presentada el 12-12-2005.

Las células de hibridoma FP-12H3-C2, que producen el anticuerpo monoclonal de ratón ACI-01-Ab7C2 (denominado "mC2" y hC2 para el anticuerpo C2 humanizado, a lo largo de la solicitud) se depositaron el 01 de diciembre de 2005 en la solicitud pendiente junto con la presente nº EP05027092.5 en la "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest y se les dio el nº de acceso DSM ACC2750.

El anticuerpo de ratón se puede generar hacia una construcción antigénica supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del péptido β -amiloide, en particular del péptido β -amiloide $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-16}$ y $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$, modificado con un resto hidrófobo tal como, por ejemplo, ácido palmítico o un resto hidrófilo tal como, por ejemplo, polietilén glicol (PEG) o una combinación de ambos, en el que el resto hidrófobo e hidrófilo, respectivamente, está unido de manera covalente a cada uno de los extremos del péptido antigénico por medio de al menos uno, en particular uno o dos aminoácidos tales como, por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisteína o cualquier otro aminoácido adecuado o análogo de aminoácido capaz de servir como dispositivo de conexión para acoplar el resto hidrófobo e hidrófilo al fragmento de péptido. Cuando se usa un PEG como resto hidrófilo, los extremos de PEG libres se unen de manera covalente a fosfatidiletanolamina o cualquier otro compuesto adecuado para funcionar como elemento de anclaje, por ejemplo, para incrustar la construcción antigénica en la bicapa de un liposoma.

En particular, se puede generar un anticuerpo de ratón hacia una construcción antigénica supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del péptido β -amiloide $A\beta_{1-16}$ modificado con un resto hidrófilo tal como, por ejemplo, polietilén glicol (PEG), y el resto hidrófilo está unido de manera covalente a cada uno de los extremos del péptido antigénico por medio de al menos uno, en particular uno o dos aminoácidos tales como, por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisteína o cualquier otro aminoácido adecuado o análogo de aminoácido capaz de servir como dispositivo de conexión para acoplar el resto hidrófobo e hidrófilo al fragmento peptídico. Cuando se usa un PEG como resto hidrófilo, los extremos de PEG libres se unen de manera covalente a fosfatidiletanolamina o cualquier otro compuesto adecuado para funcionar como elemento de anclaje, por ejemplo, para incrustar la construcción antigénica en la bicapa de un liposoma.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende en la región variable al menos una CDR de origen no humano incrustada en una o más regiones estructurales derivadas de ser humano o de primate y combinada con una región constante derivada de un anticuerpo de procedencia humana o de primate, cuyo anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo es capaz de reconocer y unirse de manera específica al péptido monomérico de β -amiloide.

Las CDRs contienen los residuos que con más probabilidad se unen al antígeno, y se deben conservar en el anticuerpo remodelado. Las CDRs se definen mediante su secuencia según Kabat *et al.*, Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, The United States Department of Health and Human Services, The United States Government Printing Office, 1991. Las CDRs se dividen en clases canónicas (Chothia *et al.*, 1989 *Nature*, 342, 877-883) en las que los residuos clave determinan en gran medida la conformación estructural del bucle de la CDR. Estos residuos están casi siempre conservados en el anticuerpo remodelado.

En el proceso de preparación de un anticuerpo humanizado, las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (V_H y V_K) de C2 se comparan con las secuencias de V_H y V_K del anticuerpo de roedor en las bases de datos del NCBI y de Kabat.

El gen de la línea germinal de ratón con la coincidencia más cercana para V_K de C2 es bb1, Locus MMU231201, (Schable *et al.*, 1999). Una comparación revela que dos aminoácidos difieren de esta secuencia de la línea germinal, ambos localizados dentro de CDRL1. Se pueden encontrar anticuerpos murinos maduros con secuencias similares, pero no idénticas. Varios tienen una CDRL2 idéntica y CDRL3 idéntica, pero la CDRL1 de C2 parece ser única. La comparación con las secuencias de V_K de la línea germinal humana demuestra que los genes del subgrupo V_{KII} son la mejor coincidencia para V_K de C2 (Cox *et al.*, 1994). La V_K de C2 se puede asignar así al subgrupo de Kabat MuV_{KII} .

DPK15, junto con la región J humana HuJ_{K1} , se puede seleccionar para proporcionar las secuencias estructurales aceptoras para la V_K humanizada.

Se han definido los residuos de la interfase entre las cadenas ligeras y pesadas variables (Chothia *et al.*, 1985 *J. Mol. Biol.*, 186, 651-663). Estos se conservan normalmente en el anticuerpo remodelado. La Phe de la posición 87 de V_K de C2 de ratón es poco habitual en la interfase, en la que Tyr es más común en el subgrupo V_{KII} , lo que indica que

este residuo estructural puede ser importante para la actividad del anticuerpo. Tyr 87 está presente en C2VK de la línea germinal humana y humanizada.

Las secuencias de V_K humanizadas, así, se pueden diseñar de forma que el C2HuVK1 consista en CDRs de V_K de C2 de ratón con regiones estructurales de DPK 15 y J_K1 humana. En una realización específica de la invención, los residuos murinos se pueden sustituir en la región estructural humana en las posiciones 45 y/o 87. En la región CDR2 obtenible a partir de un anticuerpo monoclonal de ratón, en particular el anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos en las posiciones de Kabat 50 y/o 53. El residuo 45 puede estar implicado en el soporte de la conformación de las CDRs. El residuo 87 está localizado en la interfase de los dominios de V_H y de V_K . Por lo tanto, estos residuos pueden ser críticos para el mantenimiento de la unión del anticuerpo.

El gen de la línea germinal de ratón con la coincidencia más cercana a V_H AF de C2 es VH7183, Locus AF120466, (Langdon *et al*, 2000). La comparación con las secuencias de V_H de la línea germinal humana demuestra que los genes del subgrupo V_{HIII} son la mejor coincidencia para V_H de C2. V_H AF de C2 se puede asignar al subgrupo de Kabat $MuV_{HIII}D$. La secuencia DP54, junto con la región J humana HuJ_H6 , se puede seleccionar para proporcionar las secuencias estructuralesceptoras para la V_H humanizada.

La comparación demuestra que hay nueve diferencias de aminoácidos entre las secuencias de V_H de C2 y la secuencia de la línea germinal aceptora humana DP54 y J_H6 , y la mayoría están localizadas dentro de CDRH2. Se hallan anticuerpos murinos maduros con CDRH1 idénticas o similares (un residuo diferente) o con CDRH2 similares (un residuo diferente), pero ninguno con las tres CDRs idénticas a V_H AF de C2. La CDRH3 del anticuerpo C2 es excepcionalmente corta, y consiste solamente en tres residuos. Sin embargo, se hallan otros anticuerpos en la base de datos con CDRH3 de esta longitud. El residuo 47 de V_H de C2 es Leu en vez del Trp más habitual, y el residuo 94 es Ser en vez de la Arg normal, lo que indica que estos residuos estructurales pueden ser importantes para la actividad del anticuerpo.

Se pueden diseñar diversas secuencias humanizadas de V_H . C2HuVH1 consiste en CDRs de V_H AF de C2 con regiones estructurales de DP54 y HuJ_H6 . En una realización específica de la invención, los residuos murinos se pueden sustituir en la región estructural humana en las posiciones 47 y/o 94, o ambas. El residuo 47 de la región estructural 2 entra en contacto tanto con las CDRs como con el dominio V_K . El residuo 94 puede estar implicado en el soporte de la conformación de las CDRs. Por lo tanto, estos residuos pueden ser críticos para el mantenimiento de la unión del anticuerpo.

Se pueden diseñar diferentes regiones HCVR y LCVR que comprenden las CDRs no humanas obtenibles del anticuerpo donante, por ejemplo, un anticuerpo murino, incrustadas en las regiones estructurales derivadas de ser humano o de primate nativas o modificadas. La modificación puede implicar en particular un cambio de uno o más residuos de aminoácidos de la región estructural por residuos no humanos, en particular residuos murinos, hallados más habitualmente en esta posición en los subgrupos respectivos o por residuos que tienen propiedades similares a los hallados más habitualmente en esta posición en los subgrupos respectivos.

La modificación de las secuencias de la región estructural sirve para mantener las CDRs en su orientación espacial correcta para la interacción con el antígeno, y esos residuos estructurales a veces pueden incluso participar en la unión al antígeno. En una realización de la invención, se toman medidas para adaptar adicionalmente las secuencias estructurales humanas seleccionadas para hacerlas muy similares a las secuencias de las regiones estructurales de roedor para maximizar la probabilidad de que se conserve la afinidad en el anticuerpo remodelado.

Por lo tanto, se pueden sustituir los residuos murinos de la región estructural humana. En particular, se pueden sustituir los residuos murinos de la región estructural humana de la región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) en las posiciones 47 ó 94 o ambas, y en la región estructural humana de la región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) en las posiciones 45 y/o 87. En la región CDR2 obtenible a partir de un anticuerpo monoclonal de ratón, en particular el anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos en las posiciones de Kabat 50 y/o 53.

Los residuos hallados en las posiciones anteriormente indicadas en la región estructural humana se pueden cambiar por residuos murinos hallados más habitualmente en esta posición en los subgrupos respectivos. En particular, el Trp de la posición de Kabat 47 de la región estructural derivada de ser humano o de primate de la Región Variable de la Cadena Pesada como se muestra en SEQ ID N°: 15 se puede sustituir por una Leu o por un residuo de aminoácido que tiene propiedades similares, y la sustitución del mismo conduce a alteraciones que son sustancialmente neutras conformacionalmente o antigénicamente, lo que produce cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produce cambios mínimos en los determinantes antigénicos. En particular, el Trp de la posición de Kabat 47 de la región estructural derivada de ser humano o de primate de la Región Variable de la Cadena Pesada como se muestra en SEQ ID N°: 15 se puede sustituir adicionalmente por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en norleucina, Ile, Val, Met, Ala, y Phe, en particular por Ile. Se pueden contemplar sustituciones conservativas alternativas que son neutras conformacionalmente y antigénicamente.

La Arg de la posición de Kabat 94 de la región estructural derivada de ser humano o de primate de la Región

Variable de la Cadena Pesada como se muestra en SEQ ID N°: 15 se puede sustituir por Ser o por un residuo de aminoácido que tiene propiedades similares, y la sustitución de la misma conduce a alteraciones que son sustancialmente neutras conformacionalmente o antigénicamente, lo que produce cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produce cambios mínimos en los determinantes antigénicos. En particular, la Arg de la posición de Kabat 94 de la región estructural derivada de ser humano o de primate de la Región Variable de la Cadena Pesada como se muestra en SEQ ID N°: 15 se puede sustituir de manera alternativa por Thr.

En otra alternativa, ambos residuos se pueden sustituir en el anticuerpo humanizado.

La Gln de la posición de Kabat 45 de la región estructural derivada de ser humano o de primate de la Región Variable de la Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID N°: 12 se puede sustituir por Lys o por un residuo de aminoácido que tiene propiedades similares, y la sustitución de la misma conduce a alteraciones que son sustancialmente neutras conformacionalmente o antigénicamente, lo que produce cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produce cambios mínimos en los determinantes antigénicos. En particular, la Gln de la posición de Kabat 45 de la región estructural derivada de ser humano o de primate de la Región Variable de la Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID N°: 12 se puede sustituir por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gln, y Asn, en particular por Arg.

La Leu de la posición de Kabat 50 de la región estructural derivada de ser humano o de primate de la Región Variable de la Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID N°: 12 se puede sustituir por Lys o por un residuo de aminoácido que tiene propiedades similares, y la sustitución de la misma conduce a alteraciones que son sustancialmente neutras conformacionalmente o antigénicamente, lo que produce cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produce cambios mínimos en los determinantes antigénicos. En particular, la Leu de la posición de Kabat 50 de la región estructural derivada de ser humano o de primate de la Región Variable de la Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID N°: 12 se puede sustituir por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gln, y Asn, en particular por Arg.

La Asn de la posición de Kabat 53 de la región estructural derivada de ser humano o de primate de la Región Variable de la Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID N°: 12 se puede sustituir por His y Gln o por un residuo de aminoácido que tiene propiedades similares, y la sustitución de la misma conduce a alteraciones que son sustancialmente neutras conformacionalmente o antigénicamente, lo que produce cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produce cambios mínimos en los determinantes antigénicos. En particular, la Asn de la posición de Kabat 53 de la región estructural derivada de ser humano o de primate de la Región Variable de la Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID N°: 12 se puede sustituir por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gln, His, Lys y Arg.

La Thr de la posición de Kabat 87 de la región estructural derivada de ser humano o de primate de la Región Variable de la Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID N°: 12 se puede sustituir por Phe o por un residuo de aminoácido que tiene propiedades similares, y la sustitución de la misma conduce a alteraciones que son sustancialmente neutras conformacionalmente o antigénicamente, lo que produce cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produce cambios mínimos en los determinantes antigénicos. En particular, la Tyr de la posición de Kabat 87 de la región estructural derivada de ser humano o de primate de la Región Variable de la Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID N°: 12 se puede sustituir por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Val, Ile, y Ala, en particular por Leu.

La región variable así obtenida que comprende al menos una CDR de origen no humano incrustada en una o más regiones estructurales derivadas de ser humano o de primate se puede combinar después con una región constante derivada de un anticuerpo de procedencia humana o de primate, en particular con IgG4 o regiones constantes κ humanas, respectivamente. La región constante de IgG4 se puede modificar, por ejemplo, cambiando la Serina de la posición 228 de la región de la bisagra por Prolina (HulG4 Ser-Pro). Esta mutación estabiliza el enlace disulfuro intercatenar, y previene la formación de semi-moléculas que se pueden dar en preparaciones de IgG4 humana nativa. La región constante de IgG4 se puede modificar adicionalmente mediante la delección de la Lys terminal de la posición 439 como se muestra en SEQ ID N°: 16.

Se pueden construir regiones variables modificadas mediante un método conocido en la técnica tal como, por ejemplo, recombinación mediante PCR solapante. Los casetes de expresión para el anticuerpo quimérico, C2 ChV_H AF y C2 ChV_K, se pueden usar como moldes para la mutagénesis de las regiones estructurales para las secuencias necesarias. Se sintetizan grupos de pares de cebadores mutagénicos que abarcan las regiones a alterar. Los casetes de expresión de V_H y V_K humanizadas producidos se pueden clonar en vectores de clonación adecuados conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, pUC19. Después de confirmar que la secuencia de ADN completa es correcta para cada V_H y V_K, los genes de las regiones V de las cadenas pesadas y ligeras modificadas se pueden escindir del vector de clonación en forma de casetes de expresión. Estos se pueden transferir después a vectores de expresión adecuados, tales como pSVgpt y pSVhyg, que incluyen regiones constantes de IgG4 Ser-Pro o κ humanas, respectivamente.

Vectores de expresión

El vector de expresión *pSVgpt* se basa en *pSV2gpt* (Mulligan y Berg, 1980), e incluye el gen de resistencia a ampicilina para la selección en células bacterianas, el gen *gpt* para la selección en células de mamífero, la región del potenciador de inmunoglobulinas de la cadena pesada murina, la secuencia genómica que codifica el gen de la región constante y secuencias de poli A de SV40. La región variable de la cadena pesada para la expresión se inserta en forma de un fragmento *HindIII* a *BamHI*.

El vector de expresión *pSVhyg* incluye el gen de resistencia a ampicilina para la selección en células bacterianas, el gen *hyg* para la selección en células de mamífero, la región del potenciador de inmunoglobulinas de la cadena pesada murina, la secuencia genómica que codifica el gen de la región constante kappa y que incluye el potenciador de kappa y secuencias de poli A de SV40. La región variable de la cadena ligera para la expresión se inserta en forma de un fragmento *HindIII* a *BamHI*.

Después se debe confirmar que la secuencia de ADN es correcta para las V_H y V_K humanizadas en los vectores de expresión.

Para la producción de anticuerpos, los vectores de expresión de las cadenas pesada y ligera humanizadas se pueden introducir en líneas celulares de producción adecuadas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, células NS0. La introducción de los vectores de expresión se puede llevar a cabo mediante la co-transfección por medio de electroporación o cualquier otra tecnología de transformación adecuada disponible en la técnica. Las líneas celulares productoras de anticuerpos se pueden seleccionar después y expandirlas, y se pueden purificar los anticuerpos humanizados. Los anticuerpos purificados se pueden analizar después mediante técnicas habituales, tales como SDS-PAGE.

Anticuerpo con afinidad, especificidad, estabilidad mejoradas

La secuencia de CDRL2 ("KVSNRFS") del anticuerpo C2 de ratón se puede modificar ligeramente sin afectar de manera adversa a la actividad del anticuerpo. Se pueden hacer sustituciones conservativas por medio del cambio de R por K en la posición 50 y S por N en la posición 53. Las dos secuencias de CDRL2 alternativas son, por lo tanto, "RVSNRFS" y "KVSSRFS", respectivamente. Estas se incorporan en la secuencia de V_K murina sin ningún otro cambio, como C2 VK-R y C2 VK-S, respectivamente.

La afinidad, especificidad y estabilidad de un anticuerpo como se describió anteriormente en la presente memoria o un fragmento del mismo se puede modificar mediante el cambio de su perfil o patrón de glicosilación, lo que da como resultado valores terapéuticos mejorados.

Para conseguir este cambio en el patrón de glicosilación, se pueden modificar las células hospedadoras de forma que sean capaces de expresar una diversidad preferida de actividad de glicosil transferasas que modifican glicoproteínas que incrementa los oligosacáridos con unión en N complejos que portan GlcNAc bisecante. Además, se pueden obtener glicoformas modificadas de glicoproteínas, por ejemplo anticuerpos, que incluyen moléculas de anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpos, o proteínas de fusión que incluyen una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, que tienen una citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada.

Los expertos en la técnica conocen los métodos de obtención de anticuerpos con un patrón de glicosilación modificado, y se describen, por ejemplo, en los documentos EP1071700, US2005272128, Ferrara et al (2006) J Biol Chem 281(8), 5032-5036; Ferrara et al (2006) Biotechnology and Bioengineering 93(5), 851-861.

Preparación farmacéutica y administración

Los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden preparar en una formulación fisiológicamente aceptable, y pueden comprender un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptables mediante el uso de técnicas conocidas. Por ejemplo, el anticuerpo según la invención y como se describió anteriormente en la presente memoria se combina con un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable para formar una composición terapéutica. Los vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticos adecuados se conocen bien en la técnica, e incluyen, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc.

La formulación de la composición farmacéutica según la invención se puede llevar a cabo según la metodología estándar conocida para los expertos en la técnica.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar a un sujeto en forma de un sólido, líquido o aerosol a una dosis adecuada, farmacéuticamente eficaz. Los ejemplos de composiciones sólidas incluyen píldoras, cremas, y unidades de dosis implantables. Las píldoras se pueden administrar de manera oral. Las cremas terapéuticas se pueden administrar de manera tópica. Las unidades de dosis implantables se pueden administrar de manera local, por ejemplo, en la localización de un tumor, o se pueden implantar para la liberación sistemática de la

composición terapéutica, por ejemplo, de manera subcutánea. Los ejemplos de composiciones líquidas incluyen formulaciones adaptadas para la inyección de manera intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraarterial, y formulaciones para la administración tópica e intraocular. Los ejemplos de formulaciones en aerosol incluyen formulaciones de inhalador para la administración en los pulmones.

Las composiciones se pueden administrar mediante las vías habituales de administración. En general, la composición se puede administrar mediante la vía tópica, oral, rectal, nasal, intradérmica, intraperitoneal, o parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, o intramuscular). Además, la composición se puede incorporar en matrices de liberación sostenida tales como polímeros biodegradables, y los polímeros se implantan cerca del lugar donde se desea la administración, por ejemplo, en la localización de un tumor. El método incluye la administración de una dosis única, la administración de dosis repetidas a intervalos de tiempo predeterminados, y la administración sostenida durante un período de tiempo predeterminado.

Una matriz de liberación sostenida, tal como se usa en la presente memoria, es una matriz hecha de materiales, normalmente polímeros, que son degradables mediante hidrólisis enzimática o hidrólisis ácido/base, o mediante disolución. Una vez insertada en el cuerpo, la matriz se ve afectada por las enzimas y los fluidos corporales. La matriz de liberación sostenida se elige de manera deseable de materiales biocompatibles tales como liposomas, polilactidas (poli(ácido láctico)), poliglicolidas (polímero de ácido glicólico), polilactida co-glicolida (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), polianhídridos, poli(orto)ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, sulfato de condroitina, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, poliaminoácidos, aminoácidos tales como fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, polivinil propileno, polivinilpirrolidona y silicona. Una matriz biodegradable preferida es una matriz de uno de polilactida, poliglicolida, o polilactida co-glicolida (co-polímeros de ácido láctico y ácido glicólico).

Los expertos en la técnica pertinente conocen bien que la dosis de la composición dependerá de diversos factores tales como, por ejemplo, la afección a tratar, la composición particular usada, y otros factores clínicos tales como el peso, la altura, el sexo y el estado de salud general del paciente, el área de la superficie corporal, el compuesto o composición particular a administrar, otros fármacos que se administran al mismo tiempo, y la vía de administración.

La composición se puede administrar en combinación con otras composiciones, que comprenden una sustancia o compuesto biológicamente activo, en particular al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos contra el estrés oxidativo, compuestos anti-apoptóticos, agentes quelantes de metales, inhibidores de la reparación del ADN tales como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de α -secretasa, inhibidores de β - y γ -secretasa, proteínas tau, neurotransmisores, agentes de ruptura de láminas β , agentes atractores para componentes celulares de eliminación / disminución de amiloide beta, inhibidores de amiloide beta truncado en posición N-terminal que incluyen amiloide beta 3-42-pirrolutamato, moléculas anti-inflamatorias, "antipsicóticos atípicos" tales como, por ejemplo clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina o inhibidores de colinesterasa (ChEIs) tales como tacrina, rivastigmina, donepezilo, y/o galantamina, agonistas M1 y otros fármacos que incluyen cualquier fármaco modificador de amiloide o tau y suplementos nutritivos tales como, por ejemplo, vitamina B12, cisteína, un precursor de acetilcolina, lecitina, colina, Ginkgo biloba, acetil-L-carnitina, idebenona, propentofilina, o un derivado de xantina, junto con un anticuerpo según la presente invención y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable y procedimientos para el tratamiento de enfermedades.

La materia farmacéuticamente activa proteica puede estar presente en cantidades de entre 1 ng y 10 mg por dosis. En general, el régimen de administración debería estar en el intervalo de entre 0,1 μ g y 10 mg del anticuerpo según la invención, en particular en un intervalo de 1,0 μ g a 1,0 mg, y más en particular en un intervalo de entre 1,0 μ g y 100 μ g, y todos los números individuales que se hallan dentro de estos intervalos también son parte de la invención. Si la administración se da por medio de infusión continua, una dosis más adecuada puede estar en el intervalo de entre 0,01 μ g y 10 mg por kilogramo de peso corporal por hora, y todos los números individuales que se hallan dentro de estos intervalos también son parte de la invención.

La administración será en general de manera parenteral, p.ej. intravenosa. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas y no acuosas estériles. Los disolventes no acuosos incluyen, sin limitación, propileno glicol, polietileno glicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los disolventes acuosos se pueden elegir del grupo que consiste en agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, que incluyen solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen una disolución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato, o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen regeneradores de líquidos y nutrientes, regeneradores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y otros. También puede haber presentes conservantes tales como, por ejemplo, antimicrobianos, anti-oxidantes, agentes quelantes, gases inertes, etc.

La composición farmacéutica puede comprender además vehículos proteicos tales como, por ejemplo, albúmina de suero o inmunoglobulina, en particular de origen humano. Puede haber presentes agentes biológicamente activos adicionales en la composición farmacéutica de la invención, dependiendo de su uso deseado.

Cuando el objetivo de unión está localizado en el cerebro, ciertas realizaciones de la invención posibilitan que el anticuerpo o fragmento activo del mismo atraviese la barrera hematoencefálica. Ciertas enfermedades neurodegenerativas están asociadas a un incremento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, de forma que el anticuerpo o fragmento activo del mismo se puede introducir fácilmente en el cerebro. Cuando la barrera hematoencefálica permanece intacta, existen varias aproximaciones conocidas en la técnica para transportar moléculas a través de ella, que incluyen, pero sin limitación, métodos físicos, métodos basados en lípidos, y métodos basados en receptores y canales.

Los métodos físicos para transportar el anticuerpo o fragmento activo del mismo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero sin limitación, evitar la barrera hematoencefálica completamente, o mediante la creación de aperturas en la barrera hematoencefálica. Los métodos para evitarla incluyen, pero sin limitación, la inyección directa en el cerebro (véase, p.ej., Papanastassiou et al., *Gene Therapy* 9: 398-406 (2002)) y el implante de un dispositivo de administración en el cerebro (véase, p.ej., Gill et al., *Nature Med.* 9: 589-595 (2003); y Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical). Los métodos para crear aperturas en la barrera incluyen, pero sin limitación, los ultrasonidos (véase, p.ej., la Publicación de Patente de EE.UU. N° 2002/0038086), la presión osmótica (p.ej., mediante la administración de manitol hipertónico (Neuwelt, E. A., *Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation*, Vol. 1 y 2, Plenum Press, N.Y. (1989))), la permeabilización mediante, p.ej., bradicinina o el permeabilizante A-7 (véase, p.ej., las Patentes de EE.UU. N°s 5.112.596, 5.268.164, 5.506.206, y 5.686.416), y la transfección de neuronas que actúan como puente con la barrera hematoencefálica con vectores que contienen genes que codifican el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno (véase, p.ej., la Publicación de Patente de EE.UU. N° 2003/0083299).

Los métodos basados en lípidos para transportar el anticuerpo o fragmento activo del mismo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero sin limitación, encapsular el anticuerpo o fragmento activo del mismo en liposomas que están acoplados a fragmentos de unión de anticuerpos que se unen a receptores del endotelio vascular de la barrera hematoencefálica (véase, p.ej., la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N° 20020025313), y revestir el anticuerpo o fragmento activo del mismo en partículas de lipoproteínas de baja densidad (véase, p.ej., la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N° 20040204354) o apolipoproteína E (véase, p.ej., la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N° 20040131692).

Los métodos basados en receptores y canales para transportar el anticuerpo o fragmento activo del mismo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero sin limitación, el uso de agentes bloqueantes de glucocorticoides para incrementar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (véanse, p.ej., las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. N°s 2002/0065259, 2003/0162695, y 2005/0124533); activar los canales de potasio (véase, p.ej., la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N° 2005/0089473), inhibir los transportadores de fármacos ABC (véase, p.ej., la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N° 2003/0073713); revestir los anticuerpos con una transferrina y modular la actividad de uno o más receptores de transferrina (véase, p.ej., la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N° 2003/0129186), y añadir cationes a los anticuerpos (véase, p.ej., la Patente de EE.UU. N° 5.004.697).

Detección/diagnóstico

En una realización adicional, la presente invención proporciona métodos y equipos para la detección y el diagnóstico de enfermedades o afecciones asociadas a amiloide. Estos métodos incluyen métodos inmunológicos conocidos usados habitualmente para detectar o cuantificar sustancias en muestras biológicas o en una afección *in situ*.

El diagnóstico de una enfermedad o afección asociada a amiloide en un paciente se puede llevar a cabo detectando la unión inmuno-específica de un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo del mismo a un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ*, lo que incluye poner la muestra o una parte o área específica del cuerpo que se sospecha que contiene la proteína amiloide en contacto con un anticuerpo que se une a un epítipo de la proteína amiloide, permitir que el anticuerpo se una a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico, detectar la formación del complejo inmunológico y correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína amiloide en la muestra o en la parte o área específica del cuerpo.

Las muestras biológicas que se pueden usar en el diagnóstico de una enfermedad o afección asociada a amiloide son, por ejemplo, fluidos tales como suero, plasma, saliva, secreciones gástricas, mucosidad, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático y similares, o muestras de tejidos o células obtenidas de un organismo tal como el tejido neural, cerebral, cardíaco o vascular. Para determinar la presencia o ausencia de la proteína amiloide en una muestra se puede usar cualquier inmunoensayo conocido para los expertos en la técnica (Véase Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York 1988 555-612) tal como, por ejemplo, ensayos que utilizan métodos de detección indirecta mediante el uso de reactivos secundarios para la detección, ELISA y ensayos de inmunoprecipitación y aglutinación. Se proporciona una descripción detallada de estos ensayos, por ejemplo, en el documento WO96/13590 de Maertens y Stuyver, Zrein et al. (1998) y el documento WO96/29605.

Para el diagnóstico *in situ*, se puede administrar el anticuerpo o cualquier parte activa y funcional del mismo al

organismo en el que se va a realizar el diagnóstico mediante métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, inyección intravenosa, intranasal, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial, de forma que se puede dar una unión específica entre el anticuerpo según la invención con una región epitópica de la proteína amiloide. El complejo anticuerpo/antígeno se puede detectar por medio de un marcador unido al anticuerpo o un fragmento funcional del mismo.

Los inmunoensayos usados en las aplicaciones de diagnóstico se basan en general en antígenos, anticuerpos, o reactivos secundarios marcados para la detección. Estas proteínas o reactivos se pueden marcar con compuestos conocidos en general para los expertos en la técnica, que incluyen enzimas, radioisótopos, y sustancias fluorescentes, luminiscentes y cromogénicas que incluyen partículas coloreadas, tales como oro coloidal y microesferas de látex. De estos, se puede usar el marcaje radioactivo para casi todos los tipos de ensayos y con la mayoría de variaciones. Los marcadores conjugados con enzimas son especialmente útiles cuando se debe evitar la radioactividad o cuando se necesitan resultados rápidos. Los fluorocromos, aunque requieren un equipo caro para su uso, proporcionan un método de detección muy sensible. Los anticuerpos útiles en estos ensayos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, y anticuerpos policlonales purificados mediante afinidad.

De manera alternativa, el anticuerpo se puede marcar indirectamente mediante la reacción con sustancias marcadas que tienen una afinidad hacia la inmunoglobulina, tal como proteína A o G o segundos anticuerpos. El anticuerpo se puede conjugar con una segunda sustancia y detectarlo con una tercera sustancia marcada que tiene afinidad hacia la segunda sustancia conjugada al anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar a biotina, y el conjugado anticuerpo-biotina se puede detectar mediante el uso de avidina o estreptavidina marcada. De forma similar, el anticuerpo se puede conjugar a un hapteno y el conjugado anticuerpo-hapteno se puede detectar mediante el uso de un anticuerpo anti-hapteno marcado.

Los expertos en la técnica conocerán estos y otros marcadores adecuados que se pueden emplear de acuerdo con la presente invención. La unión de estos marcadores a anticuerpos o fragmentos de los mismos se puede llevar a cabo mediante el uso de técnicas habituales conocidas normalmente para los expertos en la técnica. Las técnicas típicas fueron descritas por Kennedy, J. H., et al., 1976 (Clin. Chim. Acta 70:1-31), y Schurs, A. H. W. M., et al. 1977 (Clin. Chim. Acta 81:1-40). Las técnicas de acoplamiento mencionadas en este último caso son el método de glutaraldehído, el método de peryodato, el método de dimaleimida, y otros.

Los inmunoensayos actuales utilizan un método de anticuerpo doble para detectar la presencia de un analito, en el que el anticuerpo se marca indirectamente mediante la reactividad con un segundo anticuerpo que se ha marcado con un marcador detectable. El segundo anticuerpo es preferiblemente uno que se une a los anticuerpos del animal del que deriva el anticuerpo monoclonal. En otras palabras, si el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo de ratón, el segundo anticuerpo marcado es un anticuerpo anti-ratón. Para el anticuerpo monoclonal a usar en el ensayo descrito más adelante, este marcador es preferiblemente una microesfera revestida de anticuerpo, en particular una microesfera magnética. Para el anticuerpo policlonal a emplear en el inmunoensayo descrito en la presente memoria, el marcador es preferiblemente una molécula detectable tal como una sustancia radiactiva, fluorescente o electroquimioluminiscente.

También se puede emplear dentro del alcance de la presente invención un sistema de anticuerpo doble alternativo, a menudo denominado sistemas de formato rápido porque se adaptan a determinaciones rápidas de la presencia de un analito. El sistema requiere una afinidad elevada entre el anticuerpo y el analito. Según una realización de la presente invención, la presencia de la proteína amiloide se determina mediante el uso de una pareja de anticuerpos, cada uno específico de la proteína amiloide. Uno de dicha pareja de anticuerpos se denomina en la presente memoria "anticuerpo detector", y el otro de dicha pareja de anticuerpos se denomina en la presente memoria "anticuerpo de captura". El anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede usar como un anticuerpo de captura o como un anticuerpo detector. El anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede usar también como anticuerpo de captura y detector, juntos en un único ensayo. Una realización de la presente invención, así, usa el método de tipo sándwich con anticuerpo doble para detectar la proteína amiloide en una muestra de líquido biológico. En este método, el analito (proteína amiloide) se intercala entre el anticuerpo detector y el anticuerpo de captura, y el anticuerpo de captura está inmovilizado de manera irreversible sobre un soporte sólido. El anticuerpo detector contendría un marcador detectable para identificar la presencia del sándwich anticuerpo-analito, y así la presencia del analito.

Las sustancias de la fase sólida ejemplares incluyen, pero sin limitación, placas de microtitulación, tubos de ensayo de poliestireno, microesferas magnéticas, de plástico o de vidrio, y portaobjetos que se conocen bien en el campo de los radioinmunoensayos e inmunoensayos enzimáticos. Los expertos en la técnica también conocen bien los métodos para acoplar los anticuerpos a las fases sólidas. Más recientemente, se han empleado varios materiales porosos tales como nailon, nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio y otros polímeros porosos como soportes sólidos.

También se describe un equipo de diagnóstico para detectar la proteína amiloide en una muestra biológica, que comprende una composición como se definió anteriormente. Además, la presente invención se refiere al último equipo de diagnóstico que, además de una composición como se definió anteriormente, también comprende un

reactivo de detección como se definió anteriormente. La expresión "equipo de diagnóstico" se refiere en general a cualquier equipo de diagnóstico conocido en la técnica. De manera más específica, esta última expresión se refiere a un equipo de diagnóstico como se describió en Zrein et al. (1998).

Todavía otro objetivo es proporcionar nuevas inmunosondas y equipos de ensayo para la detección y el diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas a amiloide que comprenden anticuerpos. Para las inmunosondas, los anticuerpos se unen directamente o indirectamente a una molécula indicadora adecuada, p.ej., una enzima o un radionúclido. El equipo de ensayo incluye un recipiente que alberga uno o más anticuerpos e instrucciones para usar los anticuerpos con el propósito de unirlos a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico y detectar la formación del complejo inmunológico, de forma que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlaciona con la presencia o ausencia de la proteína amiloide.

Ejemplos

Materiales

El desarrollo y la preparación del anticuerpo monoclonal de ratón ACI-01-Ab7C2 (denominado "mC2" y hC2 para el anticuerpo C2 humanizado, a lo largo de la solicitud) se describe en la solicitud pendiente junto con la presente EP 05 02 7092.5 presentada el 12-12-2005.

Se depositaron células de hibridoma FP-12H3-C2, que producían el anticuerpo monoclonal de ratón ACI-01-Ab7C2 (denominado "mC2" y hC2 para el anticuerpo C2 humanizado, a lo largo de la solicitud) el 01 de diciembre de 2005 en la solicitud pendiente junto con la presente nº EP05027092.5 en la "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest y se les dio el nº de acceso DSM ACC2750.

Se cultivaron las células de hibridoma en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con un 10% de suero bovino fetal y antibióticos (Penicilina/Estreptomicina). Se comprobó el isotipo del anticuerpo producido y se descubrió que era IgG2b/kappa de ratón, tal como se esperaba.

Ensayo

Un ELISA de la unión a Amiloide Beta proporcionó una medida fiable de la potencia de los anticuerpos C2. Anticuerpos de control positivo, anticuerpo FP-12H3-C2 murino (Genovac, Nº de Lote: AK379/01), y anticuerpo 1560 estándar de Chemicon (Nº de Lote: 0508008791).

Elección de las regiones constantes humanas

Debido a que no es deseable la activación del sistema inmunitario para el candidato a anticuerpo clínico, la región constante humana seleccionada para la cadena pesada fue IgG4 humana, modificada para cambiar la Serina de la posición 228 de la región de la bisagra por Prolina (HulgG4 Ser-Pro). Esta mutación estabiliza el enlace disulfuro intercatenario, y previene la formación de semi-moléculas que se pueden dar en preparaciones de IgG4 humana nativa. El anticuerpo expresado a partir de las líneas celulares de producción también tendrá eliminada la lisina terminal. Las secuencias de las regiones constantes humanas HulgG4 Ser-Pro y Kappa humana se proporcionan en SEQ ID Nº: 17 y 14, respectivamente.

Ejemplo 1 Clonación y Secuenciación de las Regiones Variables del Anticuerpo

Se preparó el ARN total a partir de 3×10^6 células de hibridoma (un matraz T175) mediante el uso del equipo Qiagen RNeasy Mini (Nº de Cat.: 74104). El ARN se eluyó en 50 µL de agua y se comprobó en un gel de agarosa del 1,2%. El medio acondicionado de las células se conservó, y se usó una muestra para ensayarla en el ensayo de actividad del anticuerpo.

Se prepararon cADNs de V_H y de V_K mediante el uso de transcriptasa inversa con cebadores de las regiones constantes de IgG y κ de ratón. Las primeras cadenas de cADN se amplificaron mediante PCR con el uso de un gran grupo de cebadores de secuencias señal. Los ADNs amplificados se purificaron en gel y se clonaron en el vector pGem® T Easy (Promega). Los clones de V_H y V_K obtenidos se cribaron en busca de los insertos del tamaño esperado mediante PCR, y se determinó la secuencia de ADN de los clones seleccionados mediante secuenciación de ADN automatizada. Se determinaron las localizaciones de las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) en las secuencias con respecto a otras secuencias de anticuerpos (Kabat EA *et al.*, 1991). Se usa la convención de numeración de Kabat para las regiones variables de anticuerpos a lo largo de esta solicitud; por lo tanto, los números de residuos pueden diferir del número lineal estricto.

Se muestra la secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos deducida para V_K de mC2 en SEQ ID Nº: 29 y 27, respectivamente. Cuatro clones proporcionaron esta secuencia productiva idéntica. También se halló una secuencia de V_K anormal no productiva que surge de la pareja de fusión del hibridoma en varios clones.

Para V_H de mC2, se aislaron dos secuencias productivas diferentes. La secuencia V_H AF de mC2 (véase SEQ ID N°: 30) se halló en un total de 29 clones, con 14 cambios de pares de bases simples en clones individuales. La secuencia V_H B de mC2 se halló en un total de 8 clones. Cinco de estos representaron la secuencia mayoritaria, y los otros 3 clones fueron variaciones de estos. Es posible que estas secuencias V_H B similares surjan como un artefacto de la amplificación mediante PCR. También se obtuvo una V_H anormal no productiva a partir del hibridoma de C2, y se atribuye a una unión V-D-J defectuosa.

Para determinar cuál es la V_H de mC2 activa correcta, se prepararon dos anticuerpos quiméricos con las dos secuencias de V_H diferentes, AF y B, combinadas con la V_K de mC2, para ensayar en busca de la actividad correcta del anticuerpo.

Ejemplo 2 Construcción de Genes de Anticuerpos Quiméricos

Un anticuerpo quimérico humano en su forma más habitual consiste en regiones constantes humanas unidas a regiones variables murinas (u otras no humanas). Un anticuerpo quimérico proporciona una herramienta muy útil, en primer lugar para la confirmación de que se han identificado las regiones variables correctas, en segundo lugar para el uso como un anticuerpo de control en ensayos de unión a antígenos con las mismas funciones efectoras y mediante la utilización de los mismos reactivos de detección secundarios que un anticuerpo humanizado o modificado, y también se puede usar para investigar las propiedades farmacocinéticas y de otro tipo de las regiones constantes humanas con respecto al objetivo particular para el anticuerpo.

Se construyeron dos vectores de expresión de cadena pesada quimérica que consistieron en las regiones variables V_H AF de mC2 o V_H B de mC2 unidas a la región constante $Hu\lg G4$ (Ser-Pro) en el vector de expresión *pSVgpt*. Este se basa en *pSV₂gpt* (Mulligan y Berg, 1980), e incluye el gen de resistencia a ampicilina para la selección en células bacterianas, el gen *gpt* para la selección en células de mamífero, la región del potenciador de inmunoglobulinas de la cadena pesada murina, la secuencia genómica que codifica el gen de la región constante y secuencias de poli A de SV40. La región variable de la cadena pesada para la expresión se inserta en forma de un fragmento *HindIII* a *BamHI*.

Se construyó un vector de la cadena ligera quimérica que consistió en V_K de C2 unida a la región constante C Kappa humana en el vector de expresión *pSVhyg*. (Hieter PA et al, 1980) *pSVhyg* incluye el gen de resistencia a ampicilina para la selección en células bacterianas, el gen *hyg* para la selección en células de mamífero, la región del potenciador de inmunoglobulinas de la cadena pesada murina, la secuencia genómica que codifica el gen de la región constante kappa y que incluye el potenciador de kappa y secuencias de poli A de SV40. La región variable de la cadena ligera para la expresión se inserta en forma de un fragmento *HindIII* a *BamHI*.

Se construyeron casetes de expresión para las secuencias de V_H y V_K de C2 murino mediante la adición de la secuencia flanqueante de 5' que incluye el péptido señal líder, el intrón líder y el promotor de inmunoglobulinas murinas, y la secuencia flanqueante de 3' que incluye el sitio de corte y empalme y la secuencia del intrón, mediante el uso de los vectores V_H -PCR1 y V_K -PCR1 como moldes (Riechmann et al., 1988). Se confirmó que la secuencia de ADN era correcta para V_H y V_K en los vectores de expresión quiméricos. Las secuencias de ADN y de aminoácidos de los genes de V_H y V_K en los casetes de expresión se muestran en las Figuras 1 y 2.

Ejemplo 3 Expresión de Anticuerpos Quiméricos

3.1 Expresión en líneas celulares estables

La línea celular hospedadora para la expresión de anticuerpos fue NS0, un mieloma de ratón que no produce inmunoglobulinas, obtenida de la Colección Europea de Cultivos Celulares Animales, Porton, R.U. (ECACC N° 85110503). Los vectores de expresión de las cadenas pesada y ligera se co-transfectaron en células NS0 mediante electroporación. Se seleccionaron las colonias que expresaban el gen *gpt* en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS), 0,8 µg/ml de ácido micofenólico y 250 µg/ml de xantina. Los clones de células transfectadas se cribaron en función de la producción de anticuerpo humano mediante ELISA para IgG humana. Las líneas celulares que secretaban anticuerpo se expandieron y las líneas que producían más se seleccionaron y se congelaron en nitrógeno líquido. Las mejores líneas celulares productoras para cada anticuerpo se expandieron en un medio como se describió anteriormente, pero con solamente un 5% de FBS. Los anticuerpos quiméricos se purificaron mediante el uso de Prosep®-A (Bioprocessing Ltd). La concentración se determinó mediante un ELISA para un anticuerpo IgGk humano. Los anticuerpos también se analizaron mediante SDS-PAGE.

3.2 Expresión transitoria de anticuerpos quiméricos

Para facilitar el ensayo de los diferentes anticuerpos quiméricos, se usó la expresión transitoria para producir rápidamente cantidades pequeñas de un sobrenadante celular que contenía el anticuerpo recombinante para el ensayo. Los casetes de expresión de V_H y V_K de mC2 se transfirieron a vectores basados en pcDNA3.1 (Invitrogen)

para la expresión transitoria. El vector de la cadena pesada incluyó una región constante de IgG humana. El vector de la cadena ligera incluyó una región constante kappa humana. Tanto V_H AF de mC2 como V_H B de mC2 se transfectaron con V_K de mC2 en células renales embrionarias humanas (HEK 298) con el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen, N° de Cat.: 11668) según el protocolo suministrado por el fabricante. El medio acondicionado se recogió de las células 3 días tras la transfección. La cantidad de anticuerpo producida se determinó mediante ELISA para el anticuerpo IgGk humano.

Ejemplo 4 Actividad de Anticuerpos C2 Quiméricos

4.1 Actividad de anticuerpos C2 quiméricos producidos mediante transfección transitoria

Se ensayaron muestras de medio acondicionado de la transfección transitoria para los dos anticuerpos quiméricos diferentes en el ELISA en función de la unión a Amiloide Beta. Los resultados indican claramente que la V_H AF de C2 es la secuencia correcta. El anticuerpo quimérico C2 V_H AF/C2 V_K se une bien en el ensayo, pero C2 V_H B/C2 V_K no muestra unión en absoluto. El anticuerpo de control murino Chemicon 1560 mostró una buena unión, pero la unión mediante el anticuerpo C2 murino purificado suministrado fue baja. Se debería indicar que se empleó un anticuerpo secundario diferente para los anticuerpos murinos con las regiones constantes de ratón en comparación con los anticuerpos quiméricos con regiones constantes humanas, de forma que los resultados no son directamente comparables. Más tarde se descubrió que el medio acondicionado del hibridoma de C2 proporcionaba un buen resultado en el ensayo.

4.2 Actividad de anticuerpos C2 quiméricos purificados

Los dos anticuerpos quiméricos C2 diferentes se purificaron a partir de líneas celulares NS0 estables como se describió, y se ensayaron mediante el uso del ELISA de Amiloide Beta. Los resultados obtenidos están de acuerdo con los resultados obtenidos con el anticuerpo expresado de manera transitoria. El anticuerpo C2 ChVH AF/ChVK se une bien en el ELISA, y el anticuerpo C2 ChVH B/ChVK no se une en absoluto.

Ejemplo 5 Diseño de Genes del Anticuerpo C2 Humanizado

Las secuencias de aminoácidos de V_H y V_K de mC2 se compararon con las secuencias de V_H y V_K del anticuerpo de roedor en las bases de datos del NCBI y de Kabat.

5.1 Región variable de la cadena ligera

El gen de la línea germinal de ratón con la coincidencia más cercana a V_K de mC2 es bb1, Locus MMU231201, (Schable *et al*, 1999). Solamente dos aminoácidos difieren de esta secuencia de la línea germinal, ambos localizados dentro de CDRL1. Se hallan anticuerpos murinos maduros con secuencias similares, pero no idénticas. Varios tienen una CDRL2 idéntica y CDRL3 idéntica, pero la CDRL1 de mC2 parece ser única. La V_K de mC2 se puede asignar al subgrupo de Kabat MuV_KII. La posición 87 de V_K de mC2 es F en vez de la Y que es más común en el subgrupo, lo que indica que este residuo estructural puede ser importante para la actividad del anticuerpo. La comparación con las secuencias de V_K de la línea germinal humana demuestra que los genes del subgrupo V_KII son la mejor coincidencia para V_K de mC2 (Cox *et al*, 1994). La secuencia DPK15, junto con la región J humana HuJk1, se seleccionó para proporcionar las secuencias estructurales aceptoras para la V_K humanizada.

Se diseñaron cuatro secuencias de V_K humanizadas. C2HuVK1 consiste en CDRs de V_K de mC2 con regiones estructurales de DPK 15 y Jk1 humanas. En las versiones 2, 3 y 4, los residuos murinos se han sustituido en la región estructural en las posiciones 45 ó 87 o ambas. El residuo 45 puede estar implicado en el soporte de la conformación de las CDRs. El residuo 87 está localizado en la interfase de los dominios de V_H y de V_K. Por lo tanto, estos residuos pueden ser críticos para el mantenimiento de la unión del anticuerpo.

Las posiciones y cambios que se han hecho en las regiones estructurales de la cadena ligera se muestran en la Tabla 6. Una comparación de las secuencias humanizadas con la secuencia de V_K de mC2, y con DPK15 y Jk1 humanas

5.2 Región variable de la cadena pesada

El gen de la línea germinal de ratón con la coincidencia más cercana a V_H AF de mC2 es VH7183, Locus AF120466, (Langdon *et al*, 2000). La comparación se muestra en la Figura 3. Nueve aminoácidos difieren de esta secuencia de la línea germinal, y la mayoría están localizados dentro de CDR2. Se hallan anticuerpos murinos maduros con CDR1 idénticas o similares (un residuo diferente) o con CDR2 similares (un residuo diferente), pero ninguno con las tres CDRs idénticas a V_H AF de mC2. La CDR3 del anticuerpo mC2 es excepcionalmente corta, y consiste solamente en tres residuos. Sin embargo, se hallan otros anticuerpos en la base de datos con CDR3 de esta longitud. V_H AF de mC2 se puede asignar al subgrupo de Kabat MuV_HIIID. El residuo 47 de V_H de mC2 es L en vez del W más habitual, y el residuo 94 es S en vez de la R normal, lo que indica que estos residuos estructurales pueden ser importantes para la actividad del anticuerpo. La comparación con las secuencias de V_H de la línea germinal humana demuestra

que los genes del subgrupo V_HIII son la mejor coincidencia para V_H de mC2. La secuencia DP54, junto con la región J humana HuJ_H6, se seleccionó para proporcionar las secuencias estructuralesceptoras para la V_H humanizada.

Se diseñaron cuatro secuencias de V_H humanizadas. C2HuVH1 consiste en CDRs de V_H AF de mC2 con regiones estructurales de DP54 y HuJ_H6. En las versiones 2, 3 y 4, los residuos murinos se han sustituido en la región estructural en las posiciones 47 ó 94 o ambas. El residuo 47 de la región estructural 2 entra en contacto tanto con las CDRs como con el dominio V_K. El residuo 94 puede estar implicado en el soporte de la conformación de las CDRs. Por lo tanto, estos residuos pueden ser críticos para el mantenimiento de la unión del anticuerpo.

Las posiciones y cambios que se han hecho en las regiones estructurales de la cadena pesada se muestran en la Tabla 7.

Ejemplo 6 Construcción de Genes del Anticuerpo Humanizado

Las regiones variables modificadas se construyeron mediante el método de recombinación por PCR solapante. Los casetes de expresión para el anticuerpo quimérico, C2 ChV_H AF y C2 ChV_K, se usaron como moldes para la mutagénesis de las regiones estructurales hasta las secuencias necesarias. Se sintetizaron grupos de pares de cebadores mutagénicos que abarcaban las regiones a alterar. Los casetes de expresión producidos de V_H y V_K humanizadas se clonaron en pUC19, y se confirmó que la secuencia de ADN completa era correcta para cada V_H y V_K. Los genes de las regiones V de las cadenas pesada y ligera modificadas se cortaron de pUC19 como casetes de expresión de *Hind*III a *Bam*HI. Estos se transfirieron a los vectores de expresión pSVgpt y pSVhyg que incluyen las regiones constantes de IgG4 Ser-pro humana o κ , respectivamente, como para los vectores de anticuerpos quiméricos. Se confirmó que la secuencia de ADN era correcta para las V_H y V_K humanizadas en los vectores de expresión.

Ejemplo 7 Expresión de Anticuerpos Humanizados

7.1 Expresión en líneas celulares estables

Los vectores de expresión de las cadenas pesada y ligera humanizadas se co-transfectaron en células NS0 mediante electroporación, como para la expresión de los anticuerpos quiméricos. Las líneas celulares productoras de anticuerpos se seleccionaron y se expandieron, y se purificaron los anticuerpos humanizados, exactamente como para el anticuerpo quimérico. Los anticuerpos purificados se analizaron mediante SDS-PAGE.

7.2 Expresión transitoria de anticuerpos humanizados

Para facilitar el ensayo de las construcciones de V_H y V_K humanizadas diferentes, también se transfirieron los casetes de expresión de V_H y V_K humanizadas de C2 a los vectores para la expresión transitoria descrita en la sección 7.2. Las cuatro construcciones de V_K de C2 humanizado se co-transfectaron con la construcción de V_H de C2 quimérico en células HEK293. De forma similar, las cuatro construcciones de V_H de C2 humanizado se co-transfectaron con la construcción de V_K de C2 quimérico en células HEK293. El medio acondicionado se recogió de las células tres días tras la transfección. La cantidad de anticuerpo producida se determinó mediante ELISA para el anticuerpo IgG κ humano.

Ejemplo 8 Actividad de Anticuerpos C2 Humanizados

8.1 Actividad de anticuerpos C2 humanizados producidos mediante transfección transitoria

Las muestras de medio acondicionado de la transfección transitoria se ensayaron en el ELISA de Amiloide Beta. Los resultados obtenidos indican claramente que las versiones 2 y 4 de las construcciones C2 HuVH AF de VH humanizada son funcionales cuando se combinan con la cadena kappa de C2 quimérico, y son comparables al anticuerpo C2 quimérico en el ensayo. En contraste, los anticuerpos que contienen las versiones 1 y 3 de C2 HuVH AF combinadas con la cadena kappa del C2 quimérico no muestran unión en absoluto en el ensayo. Esto indica que la sustitución del residuo murino en la posición 94 es esencial para la actividad del anticuerpo. Todos los anticuerpos que contienen la cadena pesada de C2 quimérico combinada con las cuatro cadenas kappa de C2 humanizado muestran una buena unión, comparable con el anticuerpo quimérico, en el ELISA.

8.2 Actividad de los anticuerpos C2 humanizados purificados

Se purificaron ocho anticuerpos C2 humanizados diferentes que comprendían todas las combinaciones de dos cadenas pesadas humanizadas y cuatro cadenas ligeras humanizadas a partir de líneas celulares NS0 estables como se describió y se ensayó mediante el uso del ELISA de Amiloide Beta (Figura 4).

Los resultados obtenidos indican claramente que los anticuerpos C2 HuVH4 se comportan mejor en el ensayo que los anticuerpos C2 HuVH2. De los anticuerpos C2 HuVH2, C2 HuVH2/HuVK3 muestra la mejor actividad de unión, pero esta se reduce aproximadamente 2 veces en comparación con el anticuerpo de control quimérico C2

ChVHAF/ChVK. La actividad de C2 HuVH2/HuVK2 se reduce de cuatro a cinco veces en comparación con el control. Las actividades de los anticuerpos que comprenden C2HuVH4 con las cuatro cadenas ligeras humanizadas diferentes son similares. La actividad más alta se observa para C2HuVH4/HuVK1, y los cuatro anticuerpos se acercan al anticuerpo quimérico de control en el ensayo.

Ejemplo 9 Modificaciones de CDRL2

9.1 Diseño de la cadena Ligera con CDR 2 modificada

Como se indicó anteriormente, muchos anticuerpos comparten la misma secuencia de CDRL2 ("KVSNRFS") que el anticuerpo C2. Se decidió ensayar si CDRL2 se podría modificar ligeramente sin afectar de manera adversa a la actividad del anticuerpo. Se seleccionaron dos sustituciones conservativas: R por K en la posición 50 y S por N en la posición 53. Las dos secuencias de CDRL2 alternativas son, por lo tanto, "RVSNRFS" y "KVSSRFS". Estas se incorporaron en la secuencia de V_K murina sin ningún otro cambio, como mC2 VK-R y mC2 VK-S, respectivamente.

9.2 Expresión transitoria del anticuerpo con CDRL2 modificada

Las dos construcciones de la cadena ligera de C2 con CDRL2 modificada descritas en la Sección 11.2.1 se clonaron en el vector de la cadena ligera para la expresión transitoria. Cada una se co-transfectó con el vector de V_H de C2 quimérico en células HEK293. El medio acondicionado se recogió de las células tres días tras la transfección. La cantidad de anticuerpo producida se determinó mediante ELISA para el anticuerpo IgGk humano.

9.3 Actividad del anticuerpo C2 con CDRL2 modificada

Las muestras de medio acondicionado de la transfección transitoria de las V_Ks de mC2 con CDRL2 modificada combinadas con V_H de mC2 se ensayaron en el ELISA de Amiloide Beta (Figura 5). Los dos anticuerpos VK-R y VK-S son comparables al anticuerpo C2 quimérico, lo que indica que las modificaciones individuales en CDRL2 elegidas no afectan sensiblemente a la actividad del anticuerpo en el ensayo.

Ejemplo 10 Determinación de la Afinidad

Para estudiar la especificidad de la unión y la afinidad de los anticuerpos quiméricos (AF) y humanizados (H4K1; H4K4) de ratón (ACI-01-Ab-7-C2), se llevó a cabo el análisis de BIACORE™ mediante el uso de monómeros y fibras de amiloide beta 1-42 como antígeno inmovilizado sobre un chip CM5. La tecnología BIACORE™ utiliza los cambios del índice refractivo en la capa superficial tras la unión del anticuerpo al antígeno inmovilizado sobre la capa. La unión se detecta mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) de luz láser que se refracta desde la superficie. El análisis de la velocidad de asociación y disociación con la cinética de la señal permite distinguir entre la interacción específica e inespecífica. La concentración de anticuerpo usada estuvo en el intervalo de 0,05 μ M a 1,0 μ M.

Tabla 1: Especificidad y afinidad de unión de anticuerpos quiméricos (AF) y humanizados (H4K1; H4K4) de ratón (ACI-01-Ab-7-C2) por monómeros y fibras de amiloide beta 1-42

	Monómeros			Fibras		
	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	KD (M)	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	KD (M)
ACI-01-Ab-7-C2 de ratón	1,8E+04	2,7E-03	1,5E-07	2,4E+04	9,9E-04	4,1E-08
AF quimérico	4,7E+04	9,5E-04	2E-08	5,1E+04	3,3E-04	6,5E-09
H4K1 humanizado	5,0E+04	9,5E-04	1,9E-08	4,9E+04	2,3E-04	4,7E-09
H4K4 humanizado	2,5E+04	4,4E-04	1,8E-08	1,3E+05	3,0E-04	2,3E-09

Ejemplo 11 Ensayo de Unión Inmunohistoquímica

11.1 Cortes de cerebro humano

Se obtuvieron cerebros de pacientes sanos, pre-EA sin demencia y de EA de la Universitätsklinik de Bonn tras la aprobación del comité de ética. Los cerebros se fijaron en formaldehído y se deshidrató la región del hipocampo, se incrustó en parafina y se realizaron cortes de 5 μ m con un microtomo. Los cortes de parafina se almacenaron a TA hasta su uso. Para el material fresco, se realizaron criocortes de 5 μ m con un criostato y los cortes se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

11.2 Inmunohistoquímica

Los cortes de parafina se desparafinaron y se rehidrataron bañando los portaobjetos en xileno seguido de 100% de etanol, 90% de etanol y 70% de etanol. La señal de fondo se redujo mediante una incubación de 30 minutos en un 10% de H₂O₂, 10% de metanol en agua. La recuperación de antígenos se obtuvo incubando los portaobjetos en un 100% de ácido fórmico durante 3 minutos. Después de 3 lavados en solución salina tamponada con Tris (TBS, pH

7,5), el marcaje inespecífico se bloqueó mediante una incubación de 2 horas de los portaobjetos en 10% de BSA, 0,25% de Triton X-100 en TBS. Después de lavar (3 lavados en TBS) se llevó a cabo el bloqueo de los anticuerpos endógenos mediante la adición de anti-IgG humana sin marcar (Biomeda) e incubando los portaobjetos en cámaras húmedas durante la noche a TA. Después de otros 3 lavados, el anticuerpo anti-amiloide humano primario se añadió a los portaobjetos, y se incubaron otras 24 horas a TA. Tras el lavado, se añadió un anticuerpo secundario anti-IgG humana marcado con fosfatasa alcalina (Sigma) a los portaobjetos, y se incubaron durante 2 horas a TA. Tras el lavado, los portaobjetos se revelaron con Liquid Permanent Red (DakoCytomation), se lavaron con agua y se secaron al aire antes de montarlos con medio de montaje permanente (Corbitbalsam).

Los criocortes se fijaron en metanol durante 30 minutos a -80 °C y la señal de fondo se redujo mediante la adición de H₂O₂ al metanol frío a una concentración final del 10% e incubación durante 30 minutos a TA. Después de 3 lavados en solución salina tamponada con Tris (TBS, pH 7,5), se bloqueó el marcaje inespecífico mediante una incubación de 2 horas de los portaobjetos en un 10 % de BSA, 0,25% de Triton X 100 en TBS como se describió anteriormente, y se llevó a cabo el mismo procedimiento de tinción como se describió anteriormente.

Los cortes se examinaron con un microscopio Leica DMLB y se fotografiaron mediante el uso de una cámara Leica DC500 y el programa informático Leica FireCam1.2.0.

Los dos anticuerpos humanos A y C marcaron las placas de los cerebros de pacientes de EA (Figura 6). Se marcaron tanto placas difusas como placas concentradas. Además, las placas difusas en los pacientes pre-EA sin demencia también se pudieron detectar mediante los anticuerpos A y C. El amiloide en la angiopatía amiloide cerebral (AAC) se marcó con ambos anticuerpos, y también se detectó cierta tinción de neuronas que podría corresponder al amiloide intracelular. No se observó tinción en los cerebros de control de pacientes sanos. Las placas se pudieron detectar en cortes de parafina pretratados con ácido fórmico, pero no se marcaron placas en cortes de parafina sin pretratamiento con ácido fórmico y en criocortes fijados en metanol. El anticuerpo humano B no detectó placas en cortes de parafina, y el anticuerpo de ratón no tiñó cortes de parafina ni criocortes de cerebros humanos.

Abreviaturas:

A = unión de anticuerpo quimérico AF (IgG4) (mC2ChVHAF)
B = sin unión de anticuerpo quimérico B (IgG4) (mC2VHB)
C = unión de anticuerpo humanizado H4K1 (IgG4) (HuVH4/HuVK1)

Ratón = anticuerpo de ratón ACI-01-Ab-C2 (IgG2b)

Ejemplo 12 Funcionalidad de mC2 en Fibras de Amiloide

12.1 Modificación de la Conformación de Fibras de A β 1-42 e Inicio de la Desagregación tras la Unión del anticuerpo mC2

Para estudiar el mecanismo mediante el cual el anticuerpo es capaz de desagregar fibras de beta-amiloide (A β ₁₋₄₂) preformadas, se llevó a cabo una comparación directa del ensayo fluorescente de Tioflavina-T (Th-T) que mide la desagregación y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en estado sólido del péptido A β 1-42 marcado con U-¹³C Tirosina10 y Valina12 que analiza la conformación secundaria (Figura 7A). El anticuerpo mC2 solubilizó un 35,4 % de las fibras de A β 1-42 preformadas e indujo de manera simultánea un desplazamiento de la conformación secundaria de lámina beta a cadena aleatoria. La reducción de la población de la conformación de lámina beta con respecto a la cadena aleatoria es del orden del 35%, y por lo tanto concuerda con la medida realizada mediante el uso del ensayo Th-T de fluorescencia (Figura 7B). Estos datos indican que la unión del anticuerpo mC2 inicia una transición de la estructura secundaria que potencialmente provoca una desestabilización de la disposición intermolecular paralela de las láminas beta, que provoca una ruptura de las fibras elongadas hasta fragmentos más pequeños.

12.2 Afinidad de Unión Dependiente de la Conformación del anticuerpo mC2

Debido a que se conoce en la bibliografía científica que se puede usar una proporción de la energía de unión al antígeno del anticuerpo para la modificación dependiente de la energía de la conformación de un antígeno (Blond y Goldberg, 1987), se llevó a cabo un experimento de comparación de la afinidad de unión del anticuerpo C2 a la proteína A β ₁₋₄₂ completa y a un péptido más pequeño, de nueve aminoácidos de longitud, que comprende el epítipo del anticuerpo (Figura 8). Para esta comparación, se analizaron las afinidades del anticuerpo humanizado C2 mediante ELISA con el uso de péptidos biotinilados que cubrían la secuencia de aminoácidos completa del epítipo de C2 (producido por Mimotopes y adquirido de ANAWA Trading SA) y un péptido A β ₁₋₄₂ completo biotinilado (Bachem). El análisis se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante (Mimotopes). Como se demuestra en la Figura 8 y en la Tabla 2, el anticuerpo se une con un 36,0% de más afinidad al péptido que comprende su epítipo específico (aminoácidos 13-21 de la secuencia A β ₁₋₄₂) que a la proteína A β 1-42 completa. Por lo tanto, se propone que la diferencia de energía de afinidad de la unión se usó para la transición que consume energía de la

conformación secundaria de la proteína amiloide para presentar el antígeno en una posición más aceptable para la interacción del anticuerpo. Esto explica porqué la afinidad del anticuerpo es inferior para la subunidad nativa (la proteína amiloide completa) que para la subunidad aislada.

5 Tabla 2

	D.O.	
	Amiloide beta 13-21	Amiloide beta 1-42
hC2	1,225	0,9005
IgG de Control	0,171	0,196

Ejemplo 13 Efecto del hC2 anti-amiloide sobre la agregación del péptido amiloide beta 1-42

10 Para estudiar la capacidad del anticuerpo monoclonal hC2 anti-amiloide beta humano de mediar en los efectos anti-agregación y desagregación sobre el amiloide beta ($A\beta$), se llevó a cabo un ensayo de espectrofluorescencia con tioflavina T.

13.1 Ensayo de Inhibición de la Agregación

15 Se reconstituyó polvo liofilizado de $A\beta_{1-42}$ en hexafluoroisopropanol (HFIP) hasta 1 mM. La disolución de péptido se sometió a sonicación durante 15 min a temperatura ambiente, se agitó durante la noche, y se hicieron alícuotas en tubos de microcentrifuga sin silicona. El HFIP se evaporó después bajo una corriente de argón. La película de péptido resultante se secó a vacío durante 10 min y se almacenó a -80°C hasta su uso.

20 Para ensayar la inhibición mediada por anticuerpos de la agregación de $A\beta_{1-42}$, se pre-diluyó el anticuerpo hC2 en PBS y se hizo una disolución de ensayo que contenía los siguientes componentes en un tubo de incubación sin silicona: anticuerpo pre-diluido 3,3 o $0,33\ \mu\text{M}$, tioflavina T $10\ \mu\text{M}$, $A\beta_{1-42}$ $33\ \mu\text{M}$, y 8,2% de DMSO. Por lo tanto, las proporciones molares finales del anticuerpo respecto de $A\beta_{1-42}$ fueron 1:10 y 1:100. También se prepararon disoluciones de control adecuadas. Las disoluciones se incubaron después durante 24 hrs a 37°C , y se leyó la espectrofluorescencia (unidades de fluorescencia relativas; UFR) en seis duplicados en placas negras de 384 pocillos (Perkin-Elmer) en un espectrofluorímetro FluoroCount de Perkin-Elmer. Después se midió la espectrofluorescencia y se calculó el % de desagregación como se describe más adelante.

30 13.2 Ensayo de Desagregación

Para ensayar la desagregación mediada por anticuerpos de $A\beta_{1-42}$ pre-agregado, se hizo un $A\beta_{1-42}$ de peso molecular bajo, preparado como se describió anteriormente, en forma de una disolución $110\ \mu\text{M}$ en un 27% de DMSO y PBS 1x. Esta disolución se dejó agregar después a 37°C durante 24 hrs, tras lo cual se añadió lo siguiente: anticuerpo pre-diluido 3,3 o $0,33\ \mu\text{M}$, y tioflavina T $10\ \mu\text{M}$. Esto dio como resultado una proporción molar de 1:10 y 1:100 de anticuerpo respecto de $A\beta_{1-42}$. Esta disolución se incubó después durante otras 24 hrs a 37°C . Después se midió la espectrofluorescencia y se calculó el % de desagregación como se describe más adelante.

40 13.3 Cálculo

La inhibición de la agregación o desagregación se expresa como el % de inhibición media o desagregación, respectivamente, $\pm$ el error estándar de la media (EEM) según la ecuación siguiente:

$$\% \text{inhibición} = \frac{(\text{UFR del contr. pos.} - \text{UFR de contr. neg.}) - (\text{UFR de la muestra con } A\beta_{1-42} - \text{UFR de la muestra sin } A\beta_{1-42})}{(\text{UFR del contr. pos.} - \text{UFR del contr. neg.})} \times 100\%$$

45 13.4 Resultado

13.4.1 Inhibición de la agregación de $A\beta_{1-42}$

50 La inhibición de la agregación de $A\beta_{1-42}$ mediante el uso del anticuerpo hC2 se muestra en la Tabla 3 y la Figura 11. A una proporción molar de anticuerpo respecto de $A\beta_{1-42}$ de 1:100 la inhibición media fue de un 30% (2 experimentos independientes), mientras que a una proporción molar de 1:10 la inhibición fue de un 80% (2 experimentos independientes; véase la Tabla 3).

55 Tabla 3. Inhibición mediada por hC2 de la agregación de $A\beta_{1-42}$ a proporciones molares de 1:100 y 1:10 de anticuerpo respecto de $A\beta_{1-42}$.

Anticuerpo	Proporción molar (anticuerpo respecto de $A\beta_{1-42}$)	
	1:100	1:10
hC2	$30,0 \pm 4,1\%$	$80,4 \pm 6,9\%$

13.4.2 Desagregación de $A\beta_{1-42}$ pre-agregado

La desagregación de A β 1-42 pre-agregado mediante el uso del anticuerpo hC2 se muestra en la Tabla 4 y la Figura 12. A una proporción molar de anticuerpo respecto de A β 1-42 de 1:100 la desagregación media fue de un 24%, mientras que a una proporción molar de 1:10 la desagregación fue de un 32% (3 experimentos independientes; véase la Tabla 4).

Tabla 4. Desagregación mediada por hC2 de Ab1-42 pre-agregado a proporciones molares de 1:100 y 1:10 de anticuerpo respecto de A β 1-42.

Anticuerpo	Proporción molar (anticuerpo respecto de A β 1-42)	
	1:100	1:10
hC2	23,9 $\pm$ 4,4%	31,9 $\pm$ 3,5%

Mediante el uso del ensayo de tioflavina T, se pueden demostrar las propiedades bi-funcionales del anticuerpo humanizado anti-A β hC2, concretamente en la inhibición de la agregación de A β 1-42 hasta una conformación protofibrilar patógena y además en la disgregación de las protofibrillas preformadas de A β 1-42. hC2 inhibió la agregación de A β 1-42 en un 80% a una proporción molar de anticuerpo respecto de A β 1-42 de 1:10. Se demostró que la capacidad de hC2 de disgregar las protofibrillas pre-agregadas de A β 1-42 a una proporción molar de 1:10 fue de un 32%.

Ejemplo 14: Unión específica de la conformación de mC2 a diferentes clases de Proteína Amiloide

Para estudiar la especificidad de mC2 en diferentes etapas de la proteína amiloide polimerizada, amiloide monomérico, polimérico soluble y fibrilar, se llevó a cabo un ELISA revestido con estas etapas diferentes de beta-amiloide polimérico (Figura 9). Los monómeros se prepararon según un método modificado publicado por (Klein, 2002), el amiloide beta polimérico soluble según (Barghorn et al., 2005), mientras las fibras se realizaron mediante incubación de amiloide (Bachem, Suiza) con una concentración final de 1 μ g/ μ l en Tris/HCl de pH 7,4 a 37 °C durante 5 días, seguido de una etapa de centrifugación (10.000 rpm durante 5 minutos). Después, los polímeros de amiloide se revistieron sobre placas de ELISA con una concentración final de 55 μ g/ml y se llevó a cabo un ELISA de afinidad de unión mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón (Jackson) marcado con fosfatasa alcalina. Como se demuestra en la Tabla 5, el anticuerpo mC2 se une con una afinidad superior al amiloide beta polimérico soluble que a las fibras, y con la más baja a los monómeros. Estos datos indican que la unión del anticuerpo se ve influida por el epítipo del amiloide y por la conformación de los diferentes agregados de amiloide.

Tabla 5 Unión específica de la conformación de mC2 a Monómeros, Oligómeros y Fibras de Amiloide

mC2	D.O.		
	Conc. de Ab (ug/ml)	Oligómero	Fibras
	0,625	2,806	1,620
	0,312	1,724	0,989
	0,156	1,036	0,631
	0,078	0,652	0,499

Ejemplo 15: Cartografía de epítipos del anticuerpo monoclonal hC2 de AC Immune

La cartografía de epítipos del anticuerpo monoclonal humanizado hC2 se llevó a cabo mediante ELISA con el uso de tres bibliotecas de péptidos diferentes. Una biblioteca comprendió un total de 33 péptidos biotinilados que cubrían la secuencia de aminoácidos (aa) completa de A β 1-42 (producida por Mimotopes y adquirida de ANAWA Trading SA), la segunda biblioteca contiene péptidos biotinilados usando el péptido 12 (aa 12-20 de A β) de la primera biblioteca de péptidos y sustituyendo cada aa de la secuencia por una alanina (véase la tabla 8 más adelante), y la tercera biblioteca contiene los péptidos biotinilados 13, 14, o 15 (aa 13-21, 14-22 ó 15-23 de A β) y sustituyendo en cada caso los últimos aminoácidos por una alanina o por una glicina para el aa 21, que ya es una alanina (véase la tabla 9 más adelante). Se usó un péptido A β 1-42 completo biotinilado como control positivo (Bachem). La cartografía de epítipos se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante (Mimotopes). Brevemente, se bloquearon placas revestidas de estreptavidina (NUNC) con un 0,1% de BSA en PBS durante la noche a 4 °C. Tras el lavado con PBS-0,05% de Tween 20, las placas se revistieron durante 1 hora a TA con los diferentes péptidos de la biblioteca, diluidos en un 0,1% de BSA, 0,1 % de Azida sódica en PBS a una concentración final de 10 μ M. Tras el lavado, las placas se incubaron durante 1 hora a TA con el anticuerpo hC2 o un anticuerpo IgG4 quimérico sin unión a A β diluido a 200 ng/ml en un 2% de BSA, 0,1% de Azida sódica en PBS. Las placas se lavaron de nuevo y se incubaron con anticuerpo anti-IgG humana de cabra conjugado a fosfatasa alcalina durante 1 h a TA. Después de un lavado final, las placas se incubaron con sustrato de fosfatasa (pNPP) y se leyeron a 405 nm mediante el uso de un lector de placas de ELISA.

Se demostró que el anticuerpo monoclonal humanizado hC2 se unió de manera específica a los péptidos 12, 13, 14, 15 y 16 de la primera biblioteca de péptidos. Estos péptidos comprenden los aa 12-20, 13-21, 14-22, 15-23 y 16-24, respectivamente, de A β 1-42, lo que sugiere que el epítipo se halla en la región 12-24 de A β . Se usó una segunda

biblioteca con sustituciones de alanina para determinar los aa críticos para la unión a A β 12-20 (VHHQKLTVFF). La unión del anticuerpo hC2 se pierde completamente cuando se sustituyen los aminoácidos 16, 17, 19 ó 20 por una alanina, lo que indica que estos aa son absolutamente críticos para la unión del anticuerpo a A β . La unión del anticuerpo hC2 se pierde parcialmente cuando se sustituyen los aa 15 y 18.

La unión también se perdió casi completamente cuando se sustituyó el aa 14 por una alanina, lo que indica que el aa 14 también es muy importante para la unión.

Finalmente, se usó una tercera biblioteca para determinar si los aa 21, 22 ó 23 son críticos para la unión al epítipo. La unión del anticuerpo a los aa 15-23 se redujo cuando se sustituyó el aa 23 por una alanina, lo que indica que el aa 23 también es importante para la unión. La unión se perdió parcialmente cuando se sustituyó el aa 21 por una glicina y se perdió ligeramente cuando se sustituyó el aa 22 por una alanina.

Ejemplo 16: Neuroprotección mediante el Anticuerpo hC2

Se estudió la capacidad del anticuerpo hC2 de proteger las neuronas de la degeneración inducida por oligómeros de Abeta en un ensayo in vitro. En el día embrionario 16,5-17,5, se aislaron neuronas corticales de ratón, se disociaron, y se cultivaron in vitro en medios N3-F12. Las células se cultivaron durante nueve días en total, y se nutrieron en el día 3 y en el día en que se añadió oligómero de Abeta, u oligómero de Abeta más anticuerpo hC2 anti-Abeta. En el día cinco ("4 días Abeta") o en el día seis ("3 días Abeta"), ciertos pocillos de células se trataron con oligómero de Abeta solo 2 μ M, o una combinación de oligómero de Abeta 2 μ M y 50 μ g/mL de anticuerpo hC2 anti-Abeta.

El oligómero de Abeta se preparó disolviendo Abeta 1-42 (rPeptide) en HFIP, del cual se alicuotaron los péptidos Abeta en alícuotas de 10 μ l a 1 mg/ml y después se evaporaron en una campana de gas durante 30 minutos, y se almacenaron las películas de péptidos a -80 °C hasta su uso. Antes del uso, la película de péptido se disolvió en 10 μ l de DMSO, después 78,6 μ l de HAMS F12, y la disolución de péptido Abeta se incubó a 4 °C durante 24-48 horas (concentración final 25 μ M de Abeta).

Para las células de control, se añadió DMSO-F12 solo al mismo volumen como Abeta-DMSO en el día 5, y las células se cultivaron durante 4 días adicionales sin ningún tratamiento adicional. En el día 9, las neuronas de todas las condiciones de cultivo se fijaron y se tiñeron con Tuj1 (un anticuerpo anti-beta-tubulina), seguido de tinción con anticuerpos secundarios marcados con FITC para visualizar los microtúbulos, y así las prolongaciones neuronales en general. Los resultados se muestran en la Figura 13.

Las neuronas corticales embrionarias de ratón sin tratamiento mostraron una morfología normal después de nueve días de cultivo (Figura 13, panel de la izquierda). El tratamiento de las células con oligómero de Abeta durante tres días indujo la degeneración de los axones y provocó una disminución del número total de axones (Figura 13, panel central inferior), y este efecto fue aún más pronunciado a los cuatro días del tratamiento (Figura 13, panel central superior). En contraste, las células tratadas con la combinación de oligómero de Abeta y anticuerpo hC2 anti-Abeta tuvieron un aspecto similar a las células de control (Figura 13, paneles derechos superior e inferior). Estos resultados indican que el anticuerpo hC2 anti-Abeta fue capaz de proteger a las neuronas corticales de ratón embrionario de la degeneración inducida por oligómeros de Abeta.

Tabla 6: Posiciones y cambios hechos en las regiones estructurales de la cadena ligera de C2 humanizado

Posición en la Cadena Ligera	45	87	50	53
C2V _K de Ratón	K	F	K	N
C2HuV _K 1 Humanizado	Q	Y	K	N
C2HuV _K 2 Humanizado	Q	F	K	N
C2HuV _K 3 Humanizado	K	Y	K	N
C2HuV _K 4 Humanizado	K	F	K	N
dPk15 de la Línea Germinal Humana	Q	Y	L	N
C2V _K -R de Ratón			R	
C2V _K -S de Ratón				S

Tabla 7: Posiciones y cambios hechos en las regiones estructurales de la cadena pesada de C2 humanizado

Posición en la Cadena Pesada	47	94
C2VHAF de Ratón	L	S
C2HuVHAF1 Humanizado	W	R
C2HuVHAF2 Humanizado	W	S
C2HuVHAF3 Humanizado	L	R
C2HuVHAF4 Humanizado	L	S
DP-54 de la Línea Germinal Humana	W	R

Se construyeron un total de 8 anticuerpos diferentes con las cadenas ligeras humanizadas C2HuV_K1, C2HuV_K2, C2HuV_K3, C2HuV_K4 y las cadenas pesadas C2HuVHAF4 y C2HuVHAF2

5 Tabla 8. Resumen de los péptidos usados en la segunda biblioteca.

Los aa que son importantes para la unión están marcados en cursiva y subrayados, y los aa absolutamente críticos para la unión están marcados en cursiva y negrita.

p12-20	V	H	H	Q	K	L	V	F	F
A12	A	H	H	Q	K	L	V	F	F
A13	V	A	H	Q	K	L	V	F	F
A14	V	H	A	Q	K	L	V	F	F
A15	V	H	H	A	K	L	V	F	F
A16	V	H	H	Q	A	L	V	F	F
A17	V	H	H	Q	K	A	V	F	F
A18	V	H	H	Q	K	L	A	F	F
A19	V	H	H	Q	K	L	V	A	F
A20	V	H	H	Q	K	L	V	F	A
aa n°	12	13	14	15	16	17	18	19	20

10 Tabla 9. Resumen de los péptidos usados en la tercera biblioteca.

Los aa que son importantes para la unión están marcados en cursiva y subrayados, y los aa absolutamente críticos para la unión están marcados en cursiva y negrita.

p13-21		H	H	Q	K	L	V	F	F	A		
p13-21	G21	H	H	Q	K	L	V	F	F	G		
p14-22			H	Q	K	L	V	F	F	A	E	
p14-22	A22		H	Q	K	L	V	F	F	A	A	
p15-23				Q	K	L	V	F	F	A	E	D
p15-23	A23			Q	K	L	V	F	F	A	E	A
aa n°		13	14	<u>15</u>	16	17	<u>18</u>	19	20	21	22	<u>23</u>

Lista de Referencias

- 5 Barghom S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, Keller P, Janson B, Bahr M, Schmidt M, Bitner RS, Harlan J, Barlow E, Ebert U, Hillen H (2005) Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 95:834-847.
- Blond y Goldberg, 1987, PNAS 1 de marzo, 1987 Vol. 84 | nº. 5|1147-1151
- 10 Cox JPL, Tomlinson IM y Winter G. *Eur. J. Immunol.* 1994; 24: 827-836. A directory of human germ-line Vk segments reveals a strong bias in their usage.
- Hieter PA, Max EE, Seidman JG, Maizel JV Jr, Leder P. Cloned human and mouse kappa immunoglobulin constant and J region genes conserve homology in functional segments. *Cell. nov. de 1980; 22(1 Pt 1):197-207.*
- 15 Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, 1991.
- Klein WL (2002) Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular soluble polymeric amyloid beta (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41(5):345-352.
- 20 Langdon SD, Inaioki M, Kelsoe G. y Tedder TF. *Immunogenetics* 2000; 51: 241-245. Germline sequences of V(H)7183 gene family members in C57BL/6 mice demonstrate natural selection of particular sequences during recent evolution.
- 25 Mulligan RC y Berg P. *Science* 1980; 209: 1422-1427. Expression of a bacterial gene in mammalian cells.
- Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G, *Nature* 1988; 332: 323-327. Reshaping human antibodies for therapy.
- 30 Schable KF, Thiebe R, Bensch A, Brensing-Kueppers J, Heim V, Kirschbaum T, Lamm R, Ohnrich M, Pourrajabi S, Rosenthaler F, Schwendinger J, Wichelhaus D, Zocher I y Zachau HG. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29: 2082-2086. Characteristics of the immunoglobulin V kappa genes, pseudogenes, relics and orphans in the mouse genome.
- 35 Tomlinson IM, Walter G, Marks JD, Llewelyn MB y Winter G. *J. Mol. Biol.* 1992; 227: 776-798. The repertoire of human germline VH sequences reveals about 50 groups of VH segments with different hypervariable loops.

Listado de Secuencias

5 <110> AC Immune S.A.
 <110> Genentech, Inc.
 <120> Anticuerpo humanizado
 <130> M1967 EP/A BS
 10 <140> EP 07840408.4
 <141> 13-07-2007
 <150> EP 06014730.3
 15 <151> 14-07-2006
 <150> EP 06020765.1
 <151> 02-10-2006
 20 <150> US 60/943.289
 <151> 11-06-2007
 <150> US 60/943.499
 <151> 12-06-2007
 25 <160> 32
 <170> PatentIn version 3.3
 30 <210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35 <220>
 <223> región variable de la cadena pesada humanizada (CDR1) de C2 HuVH AF 4
 <400> 1

 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
 1 5 10
 40 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 45 <220>
 <223> región variable de la cadena pesada humanizada (CDR2) de C2 HuVH AF 4
 <400> 2
 50 Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 55 <210> 3
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 60 <220>
 <223> región variable de la cadena pesada humanizada (CDR3) de C2 HuVH AF 4
 <400> 3

Gly Asp Tyr
1

5 <210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

10 <220>
<223> región variable de la cadena ligera humanizada (CDR1) de C2 HuVK 1
<400> 4

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

15 <210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

20 <220>
<223> región variable de la cadena ligera humanizada (CDR2) de C2 HuVK 1
<400> 5

25 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

30 <210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

35 <220>
<223> región variable de la cadena ligera humanizada (CDR3) de C2 HuVK 1
<400> 6

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

40 <210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 <220>
<223> región 2 del epítipo de A-beta
<400> 7

50 Val Phe Phe Ala Glu Asp
1 5

55 <210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<223> región 1 del epítipo de A-beta

<400> 8

His Gln Lys Leu Val
1 5

5

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens

<220>
<221> característica misc.
<222> (1) (1)
15 <223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe o Ile

<220>
<221> característica misc.
<222> (4) (4)
20 <223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, Ser o Ile

<220>
<221> característica misc.
<222> (5) (5)
25 <223> Xaa puede ser Glu o Asp

<220>
<221> característica misc.
<222> (6) (6)
30 <223> Xaa puede ser Glu o Asp

<400> 9

Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
1 5

35

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
40 <213> Homo sapiens

<220>
<221> característica misc.
<222> (1) (1)
45 <223> Xaa puede ser His, Asn, Gln, Lys o Arg

<220>
<221> característica misc.
<222> (2) (2)
50 <223> Xaa puede ser Asn o Gln

<220>
<221> característica misc.
<222> (5) (5)
55 <223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe o Ile

<400> 10

Xaa Xaa Lys Leu Xaa
1 5

60

<210> 11
<211> 10

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 5 <221> característica misc.
 <222> (1) (1)
 <223> Xaa puede ser His, Asn, Gln, Lys o Arg

 <220>
 10 <221> característica misc.
 <222> (2) (2)
 <223> Xaa puede ser Asn o Gln

 <220>
 15 <221> característica misc.
 <222> (5) (5)
 <223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe o ILe

 <220>
 20 <221> característica misc.
 <222> (8) (8)
 <223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, Ser o Ile

 <220>
 25 <221> característica misc.
 <222> (10) (10)
 <223> Xaa puede ser Glu o Asp

 <400> 11
 30
 Xaa Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

 <210> 12
 <211> 112
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cadena ligera variable humanizada artificial de C2 HuVK 1
 40
 <400> 12

 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

 Gly Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
 20 25 30

 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

 45

 50

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 13
<211> 219
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> cadena ligera humanizada artificial de C2

<400> 13

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

5

<210> 14
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> región constante de la cadena ligera de C2 artificial humanizada

5 <400> 14

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

10 <210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> cadena pesada variable artificial humanizada de C2 HuVH AF 4

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

20 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 16
<211> 439
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> cadena pesada artificial humanizada de C2

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
115 120 125

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
130 135 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 180 185 190
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 195 200 205
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 210 215 220
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 225 230 235 240
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 245 250 255
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 260 265 270
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 275 280 285
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 290 295 300
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 305 310 315 320
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 325 330 335
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 340 345 350
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 355 360 365
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 370 375 380
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 385 390 395 400
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 405 410 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
420 425 430

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435

<210> 17
<211> 326
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> región C de la cadena IG Gamma-4 modificada

<400> 17

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu

ES 2 436 112 T3

195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 325

<210> 18
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> región variable de la cadena pesada humanizada de C2 HuVH AF 4 (CDR2)
 <400> 18

agcatcaata gtaatggtgg tagcacctat tatccagaca gtgtgaaggg c 51

<210> 19
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> región variable de la cadena pesada humanizada de C2 HuVH AF 4 (CDR3)
 <400> 19

ggtgactac 9

<210> 20
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> región variable de la cadena ligera humanizada de C2 HuVK 1 (CDR1)

<400> 20
 agatctagtc agagccttgt atatagtaat ggagacacct atttacatt 49

5 <210> 21
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cadena ligera variable artificial humanizada de C2 HuVK 1

<400> 21
 gatattgtga tgacccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctcttggtga gcctgcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta ttacattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggcctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttcct 300
 tggacgttcg gccaaaggcac caaggtggaa atcaaa 336

15 <210> 22
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cadena ligera artificial humanizada de C2

25 <400> 22
 gatattgtga tgacccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctcttggtga gcctgcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta ttacattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggcctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttcct 300
 tggacgttcg gccaaaggcac caaggtggaa atcaaaagga ctgtggctgc accatctgtc 360
 ttcattctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggga aggtggataa cgccctccaa 480
 tctgggttaact ccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
 agcagcacc ctagcgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 600
 gtcaccatc agggcctgag ctgcctcgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

30 <210> 23
 <211> 321
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> región constante de la cadena ligera artificial humanizada de C2

35

<400> 23

```
aggactgttg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctgttggtgt cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
tggaagggtg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcaciaag 300
agcttcaaca ggggagagtg t , 321
```

5 <210> 24
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cadena pesada variable artificial humanizada de C2 HuVH AF 4

<400> 24

```
yaggtgcagc tggcgcagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tccgccaggct 120
ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180
ccagacagtg tgaagggcgc attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctccctgtac 240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtgggtgac 300
tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctca. 336
```

20 <210> 25
 <211> 1317
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cadena pesada artificial humanizada de C2

25 <400> 25

gagggtgcagc tgggtcgagtc tgggggagggc ttagtgcagc ctggaggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tgcgcaggct 120
 ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180
 ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctccctgtac 240
 ctgcaaataga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtgggtgac 300
 tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctcagctt ccaccaaggg cccatccgtc 360
 ttccccctgg cgccctgctc cagatcgacc tccgagagca cagccgccct gggctgcctg 420
 gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 480
 ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg 540
 gtgaccgtgc cctccagcag cttggggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag 600
 cccagcaaca ccaagggtga caagagagtt gagtccaaat atgggtcccc gtgtcccca 660
 tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag 720
 gacactctca tgatctcccg gaccctgag gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag 780
 gaagaccccc aggtccagtt caactggtac gtggatggcg tggagggtgca taatgccaa 840
 acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 900
 ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc 960
 ccgtctctca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga gccacagggtg 1020
 tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1080
 gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1140
 aacaactaca agaaccagcc tcccgtcctc gattccgacg gctccttctt cctctacagc 1200
 aggctaaccg tggacaagag caggtggcag gagggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg 1260
 catgaggctc tgcacaacca ctacacacag aagagcctct cctgtctctt gggtaaa 1317

5 <210> 26
 <211> 981
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> región constante de la cadena pesada artificial humanizada de C2

<400> 26

15

gcttccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct getccagatc gacctccgag 60
 agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagttc 300
 aaatatggtc ccccggtgcc cccatgcccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 360
 ttctgtttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgagggtcacg 420
 tgcgtgggtg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540
 cgtgtgggtc gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
 tgcaagggtc ccaacaaagg cctcccgctc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 720
 aaccagggtc gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccg tctcgattcc 840
 gacggctcct tcttctctca cagcaggcta accgtggaca agagcagggtg gcaggagggg 900
 aatgtcttct catgtccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960
 ctctccctgt ctctgggtaa a 981

<210> 27
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 27

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

ES 2 436 112 T3

<210> 28
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 28
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110

10 <210> 29
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15 <400> 29

gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta ttacattgg 120
 taccctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctctgact acaaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagaçagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcct 300
 tggacgttcg gtggaggcac caagctagaa atcaaa 336

20 <210> 30
 <211> 417
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

25 <400> 30

atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttcttgcttc cagcagtgat 60
 gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
 tcttgcagat ctagtcagag ccttgtatat agtaatggag acacctatct acattggtac 180
 ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240
 ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcaggacag atttcacact caagatcagc 300
 agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccttgg 360
 acgttcggtg gaggcaccaa gctagaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgta 417

<210> 31
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 31

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggaggggc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccagacaaga ggctggaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180
 ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaata gtagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagtgggtgac 300
 tactggggcc aaggctccac tctcacagtc tectca 336

<210> 32
 <211> 408
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 32

atgrasttsg ggytcagmtt grttttcctt gcccttattt taaaagggtg ccaatgtgag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggctcct gaaactctcc 120
 tgtgcagcct ctggaitcac ttccagtagc tatggcatgt cttgggttcg ccagactcca 180
 gacaagaggg tgggaattggt cgcaagcatc aatagtaatg gtggtagcac ctattatcca 240
 gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag tgggtgactac 360
 tggggccaag gctccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacaccc 408

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que reconoce y se une a la proteína β -amiloide, en el que dicho anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprende:
 - i) una Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 15, y
 - ii) una Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 12.
2. El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo según la reivindicación 1, que comprende: una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 16 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 13.
3. El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo según la reivindicación 2, en el que se ha eliminado la Lys C-terminal de la región constante de la cadena pesada.
4. El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo según la reivindicación 1, cuyo anticuerpo humanizado o fragmento del mismo es del isotipo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4.
5. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 5 que comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID N°: 22 o la secuencia nucleotídica de SEQ ID N°: 21.
7. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 5 que comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID N°: 25 o la secuencia nucleotídica de SEQ ID N°: 24.
8. Un vector de expresión que comprende la secuencia nucleotídica de cualquiera de las reivindicaciones 5-7.
9. Una célula que comprende el vector de expresión de la reivindicación 8.
10. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humanizado o el fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y que opcionalmente comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, que opcionalmente comprende además uno o más de lo siguiente: una sustancia biológicamente activa, un diluyente, o un excipiente.
12. La composición farmacéutica según la reivindicación 11, que comprende además una sustancia biológicamente activa que es un compuesto usado en el tratamiento de la amiloidosis.
13. La composición farmacéutica según la reivindicación 11 que comprende al menos uno de los compuestos siguientes: un compuesto anti-estrés oxidativo; un compuesto anti-apoptótico; un agente quelante de metales; un inhibidor de la reparación del ADN tal como pirenzepina y metabolitos; ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3 APS); 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS); activador de α -secretasa; inhibidor de A β -secretasa; un inhibidor de γ -secretasa; una proteína tau; un neurotransmisor; un agente de ruptura de láminas β ; un agente atractor para componentes celulares de eliminación / disminución de amiloide beta; un inhibidor del amiloide beta truncado en posición N-terminal, tal como amiloide beta 3-42-piroglutamato; una molécula anti-inflamatoria; o un inhibidor de colinesterasa (ChEI) tal como tacrina, rivastigmina, donepezilo, y/o galantamina; un agonista MI; u otro fármaco tal como un fármaco modificador de amiloide o tau o suplemento nutritivo.
14. El uso del anticuerpo humanizado o el fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y/o la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, para la preparación de un medicamento para tratar o aliviar los efectos de la amiloidosis, tal como amiloidosis secundaria, amiloidosis relacionada con la edad, trastornos neurológicos tales como la Enfermedad de Alzheimer (EA), demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch); el complejo Parkinson-Demencia de Guam; enfermedades basadas o asociadas a proteínas similares a amiloide, tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del adulto; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y degeneración macular.
15. El uso según la reivindicación 14, en el que el tratamiento del animal, tal como el mamífero o ser humano,

conduce a uno o más de lo siguiente:

- i) un incremento de la capacidad de la memoria cognitiva;
- ii) la retención de la capacidad de la memoria cognitiva; y/o
- iii) un restablecimiento completo de la capacidad de la memoria cognitiva.

16. La composición farmacéutica según la reivindicación 10 ó 13, para el uso en un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de la amiloidosis, tal como amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, tales como enfermedades que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tales como la Enfermedad de Alzheimer (EA), demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch), el complejo Parkinson-Demencia de Guam, enfermedades que se basan o están asociadas a proteínas similares a amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, y esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del adulto, amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y degeneración macular.

17. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 16, en la que el tratamiento del animal, tal como el mamífero o ser humano, conduce a:

- i) un incremento de la capacidad de la memoria cognitiva,
- ii) la retención de la capacidad de la memoria cognitiva, y/o
- iii) una inversión de la capacidad de la memoria cognitiva y un restablecimiento completo de la capacidad de la memoria cognitiva.

18. Un método para determinar el grado de carga de placa amiloidogénica en una muestra de tejido y/o muestra de fluido corporal, que comprende:

- a) ensayar en una muestra de tejido o muestra de fluido corporal la presencia de proteína amiloide con el anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4;
- b) determinar la cantidad de anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido a la proteína; y
- c) calcular la carga de placa en la muestra de tejido o de fluido corporal.

19. Un equipo para la detección y el diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas a amiloide que comprende, en uno o más recipientes, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, un reactivo de detección, e instrucciones para el uso de los anticuerpos.

20. El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para el uso en la desagregación de fibras hasta formas poliméricas y monoméricas solubles.

21. Un método in vitro para desagregar fibras de beta-amiloide preformadas, que comprende poner en contacto el anticuerpo o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3 con fibras de beta-amiloide preformadas.

22. El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, cuyo anticuerpo o fragmento del mismo es para el uso en la protección de las neuronas de la degradación inducida por A β .

23. El uso del anticuerpo humanizado o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para la preparación de un medicamento para prevenir la degeneración de neuronas tras la exposición al oligómero de A β .

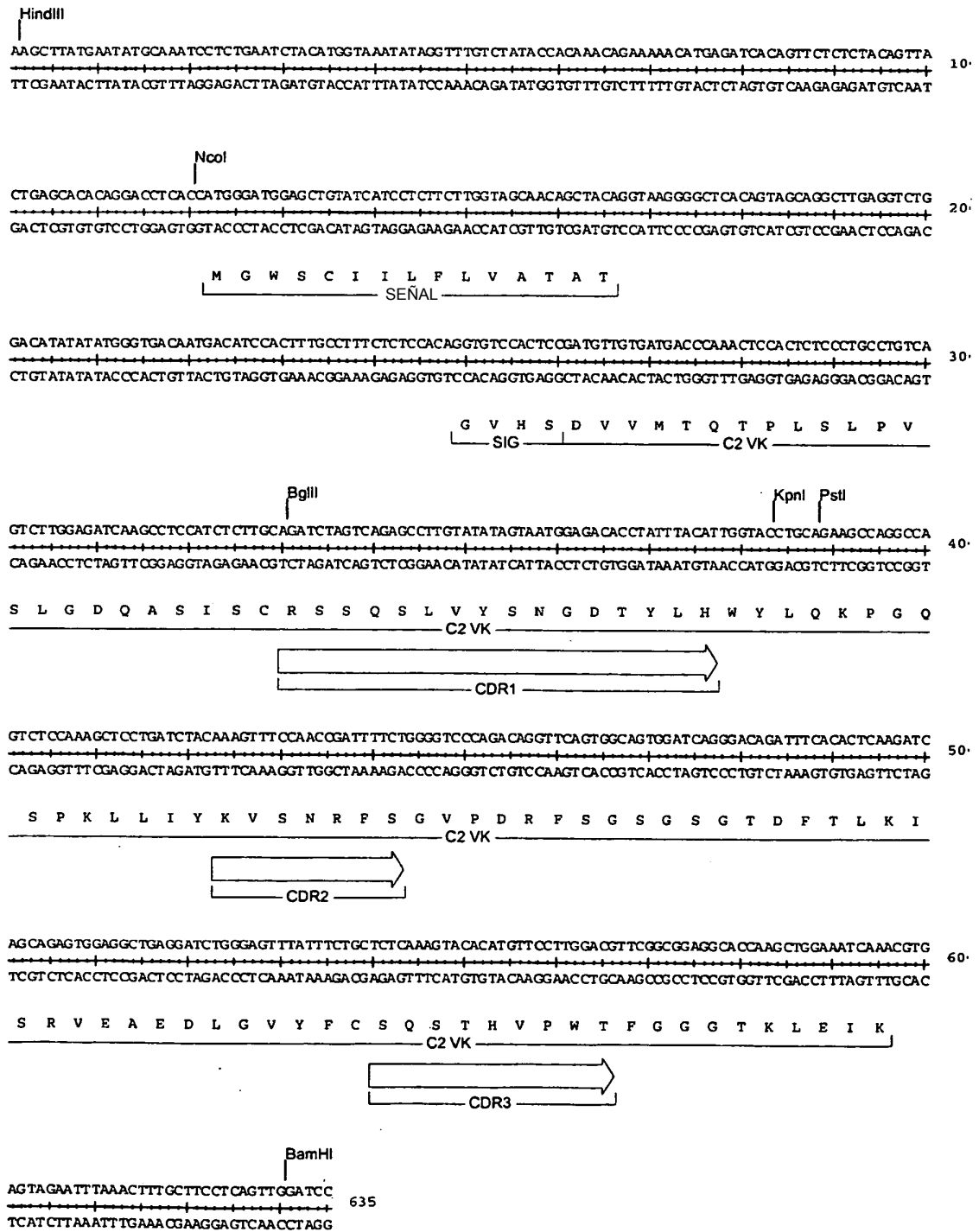


FIG 1
(Ejemplo 2)

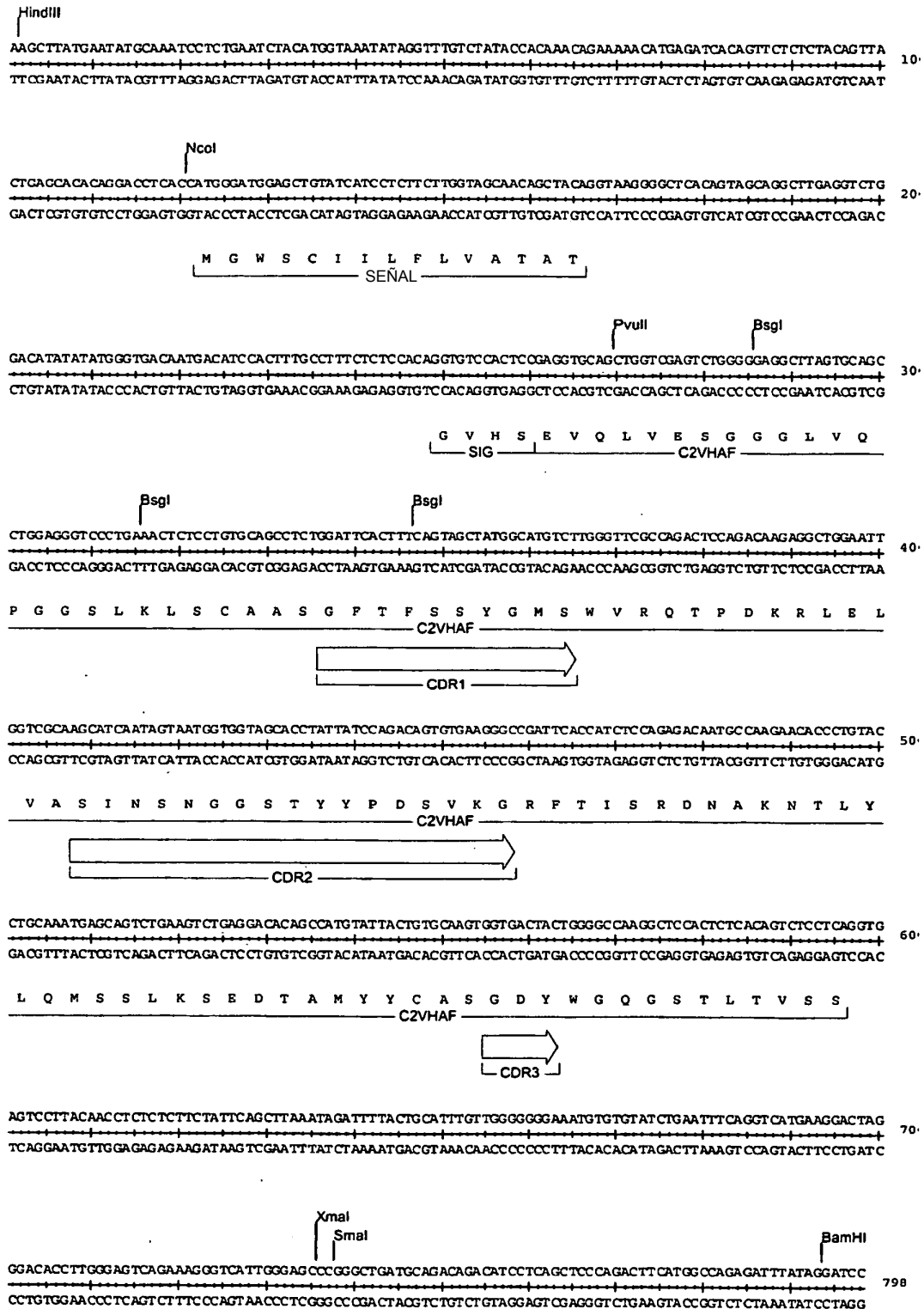


FIG 2
(Ejemplo 2)

		10		20		30																								
C2VHAF	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	
AF120466	E	V	K	L	V	E	S	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	
		40		50		60																								
C2VHAF	S	Y	G	M	S	W	V	R	Q	T	P	D	K	R	L	E	L	V	A	S	I	N	S	N	G	G	S	T	Y	Y
AF120466	S	Y	G	M	S	W	V	R	Q	T	P	D	K	R	L	E	W	V	A	T	I	S	S	G	G	S	Y	T	Y	Y
		70		80		90																								
C2VHAF	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	S	L	K	S	E	D
AF120466	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	S	L	K	S	E	D
		100		110																										
C2VHAF	T	A	M	Y	Y	C	A	S	G	D	Y	W	G	Q	G	S	T	L	T	V	S	S								
AF120466	T	A	M	Y	Y	C	A	R	R																					

FIG 3
(Ejemplo 5.2)

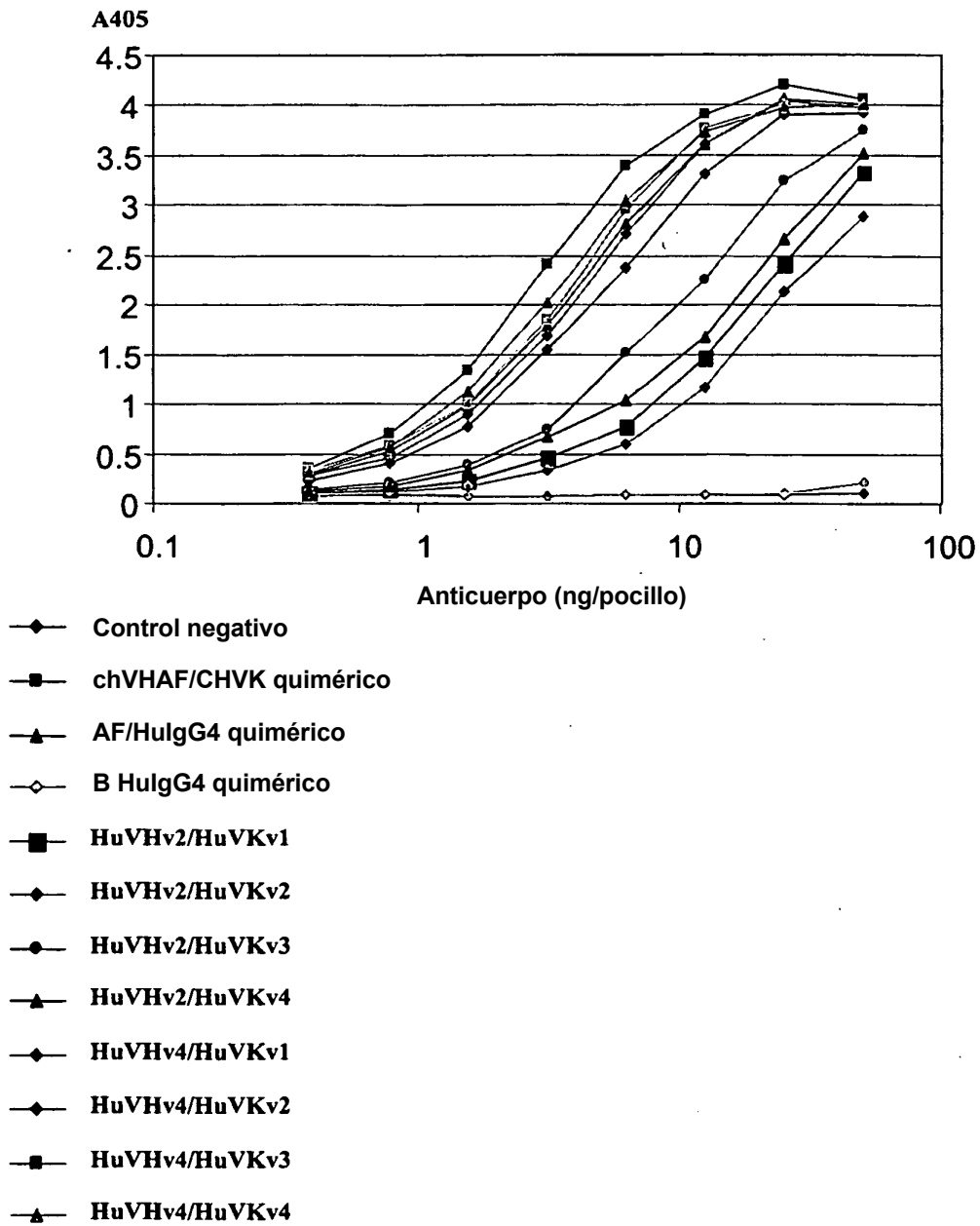


FIG 4
(Ejemplo 8)

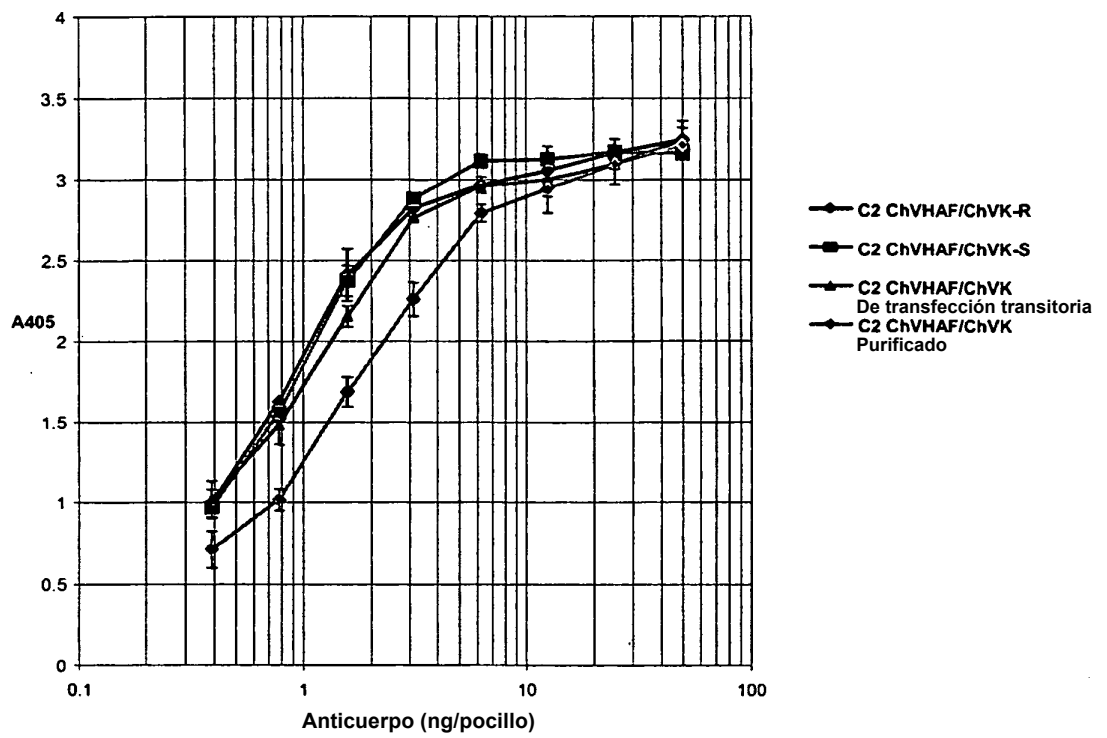


FIG 5
(Ejemplo 9)

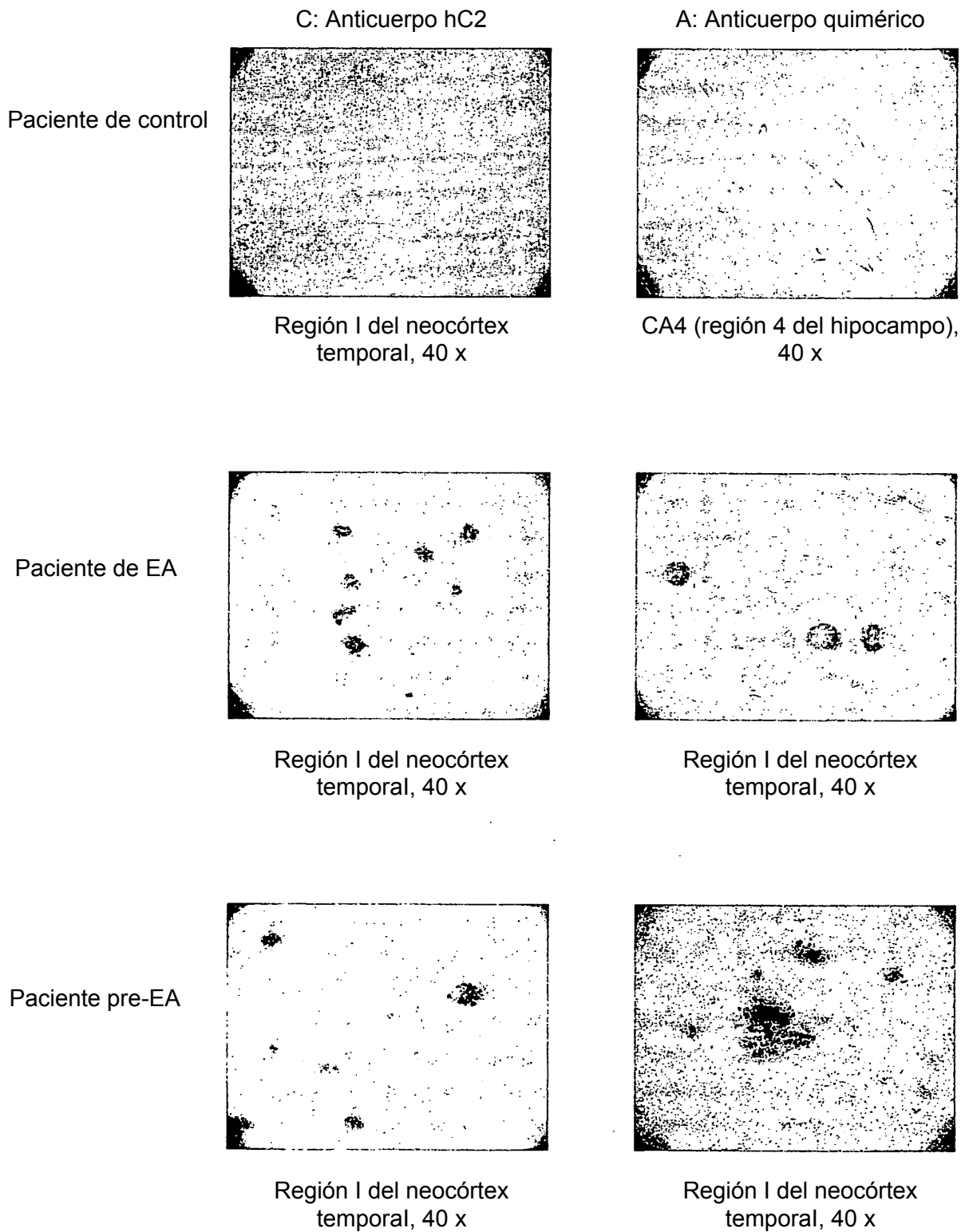
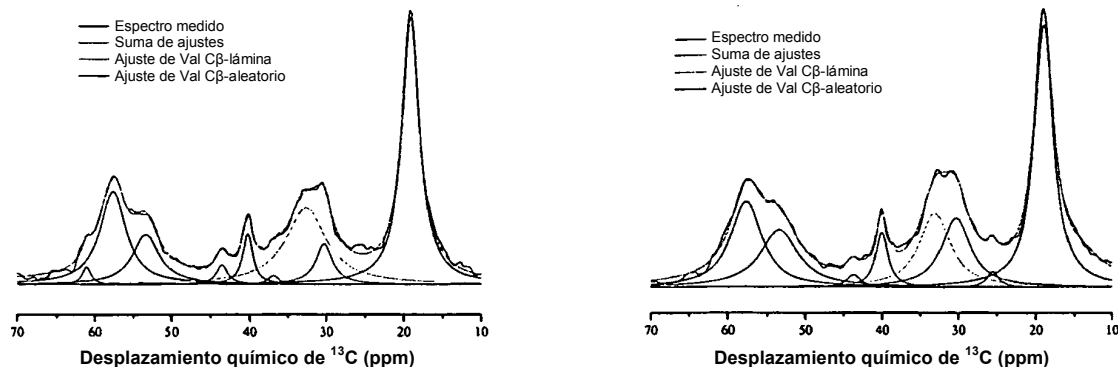


FIG 6 (Ejemplo 11)

A)**B)**

Resonancia	PBS			C2 de ratón		
	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	% de intens. integral	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	% de intensidad integral
Val C β - lámina	32.60	479	81.7	33.09	366	53.5
Val C β - aleatorio	30.27	200	18.3	30.27	340	46.5

A) Comparación de espectros de ^{13}C CPMAS y ajustes para fibras de amiloide β 1-42 marcadas con U- ^{13}C Tyr10 y Val12 incubadas con PBS (izquierda; sirvió como control) o ACI-7-C2 (derecha) durante 24 hrs y después liofilizadas. Los ajustes para las dos conformaciones de Val12 C β se muestran en verde (lámina) y azul (cadena aleatoria). El máximo en 33 ppm corresponde a la conformación de lámina beta de las fibras, mientras el de 30 ppm es el resultado de la conformación de cadena aleatoria.

B): Comparación de los parámetros ajustados para las dos conformaciones de Val 12 C β . Los desplazamientos químicos ajustados para las dos conformaciones son bastante similares, pero las intensidades integrales son muy diferentes, lo que refleja una reducción de la conformación de lámina beta original en aprox. un 35% (1-(53,5/81,7)). Esto está de acuerdo con el valor obtenido de la medida de fluorescencia.

FIG 7
(Ejemplo 12)

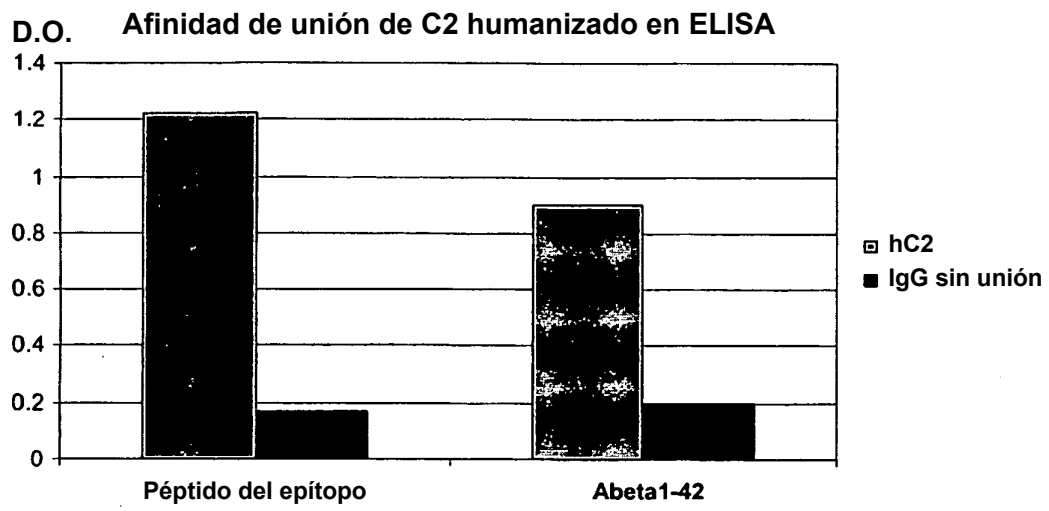


FIG 8
(Ejemplo 12)

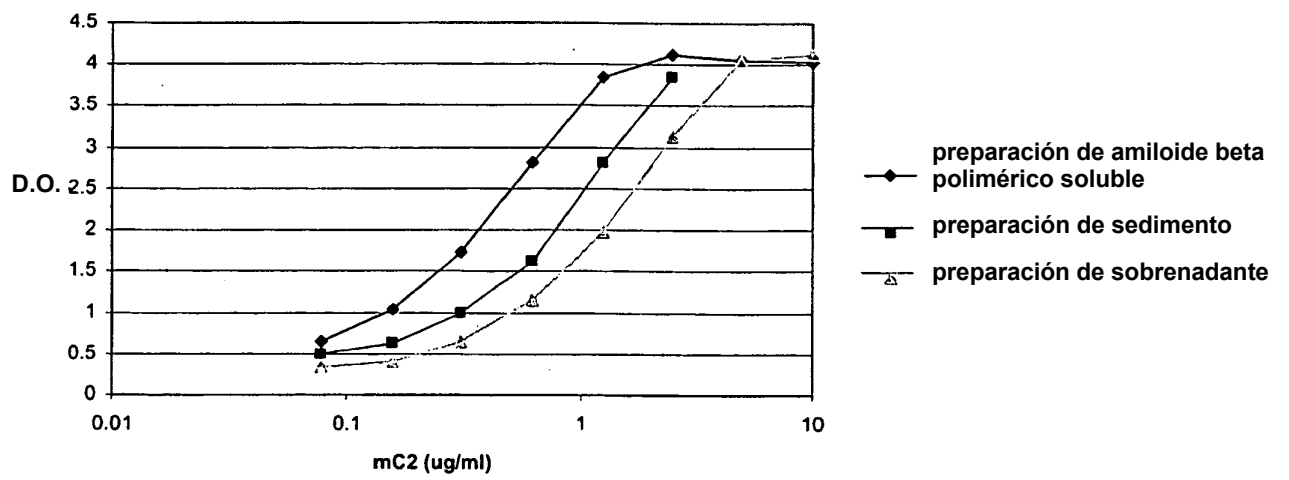


FIG 9
(Ejemplo 13)

		10	20	30																										
C2VK	D	V	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V
C2HuVK1	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V
C2HuVK2	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V
C2HuVK3	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V
C2HuVK4	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V
dpk15	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	L
JK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

		40	50	60																										
C2VK	Y	S	N	G	D	T	Y	L	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F
C2HuVK1	Y	S	N	G	D	T	Y	L	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F
C2HuVK2	Y	S	N	G	D	T	Y	L	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F
C2HuVK3	Y	S	N	G	D	T	Y	L	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F
C2HuVK4	Y	S	N	G	D	T	Y	L	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F
dpk15	H	S	N	G	Y	N	Y	L	D	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	L	G	S	N	R	A
JK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

		70	80	90																										
C2VK	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	L	G	V
C2HuVK1	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V
C2HuVK2	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V
C2HuVK3	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V
C2HuVK4	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V
dpk15	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V
JK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

		100	110																								
C2VK	Y	F	C	S	Q	S	T	H	V	P	W	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K					
C2HuVK1	Y	Y	C	S	Q	S	T	H	V	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K					
C2HuVK2	Y	F	C	S	Q	S	T	H	V	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K					
C2HuVK3	Y	Y	C	S	Q	S	T	H	V	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K					
C2HuVK4	Y	F	C	S	Q	S	T	H	V	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K					
dpk15	Y	Y	C	M	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	L	Q	T	P						
JK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K

FIG 10.

	10	20	30
C2VHAF	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L	K L S C A A S	G F T F S
C2HuVHAF1	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L	R L S C A A S	G F T F S
C2HuVHAF2	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L	R L S C A A S	G F T F S
C2HuVHAF3	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L	R L S C A A S	G F T F S
C2HuVHAF4	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L	R L S C A A S	G F T F S
DP-54	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L	R L S C A A S	G F T F S
HUJH6	- - - - -	- - - - -	- - - - -
	40	50	60
C2VHAF	S Y G M S W V R Q T P D K R L E L V A	S I N S N G G S T Y Y	
C2HuVHAF1	S Y G M S W V R Q A P G K G L E W V A	S I N S N G G S T Y Y	
C2HuVHAF2	S Y G M S W V R Q A P G K G L E W V A	S I N S N G G S T Y Y	
C2HuVHAF3	S Y G M S W V R Q A P G K G L E L V A	S I N S N G G S T Y Y	
C2HuVHAF4	S Y G M S W V R Q A P G K G L E L V A	S I N S N G G S T Y Y	
DP-54	S Y W M S W V R Q A P G K G L E W V A	N I K Q D G S E K Y Y	
HUJH6	- - - - -	- - - - -	- - - - - Y Y
	70	80	90
C2VHAF	P D S V K G R F T I S R D N A K N T	L Y L Q M S S L K S E D	
C2HuVHAF1	P D S V K G R F T I S R D N A K N S	L Y L Q M N S L R A E D	
C2HuVHAF2	P D S V K G R F T I S R D N A K N S	L Y L Q M N S L R A E D	
C2HuVHAF3	P D S V K G R F T I S R D N A K N S	L Y L Q M N S L R A E D	
C2HuVHAF4	P D S V K G R F T I S R D N A K N S	L Y L Q M N S L R A E D	
DP-54	V D S V K G R F T I S R D N A K N S	L Y L Q M N S L R A E D	
HUJH6	- - - - -	- - - - -	- - - - -
	100	110	
C2VHAF	T A M Y Y C A S G D Y W G Q G S T L T V S S		
C2HuVHAF1	T A V Y Y C A R G D Y W G Q G T T V T V S S		
C2HuVHAF2	T A V Y Y C A S G D Y W G Q G T T V T V S S		
C2HuVHAF3	T A V Y Y C A R G D Y W G Q G T T V T V S S		
C2HuVHAF4	T A V Y Y C A S G D Y W G Q G T T V T V S S		
DP-54	T A V Y Y C A R		
HUJH6	- - - Y Y Y G M - D V W G Q G T T V T V S S		

FIG 11.

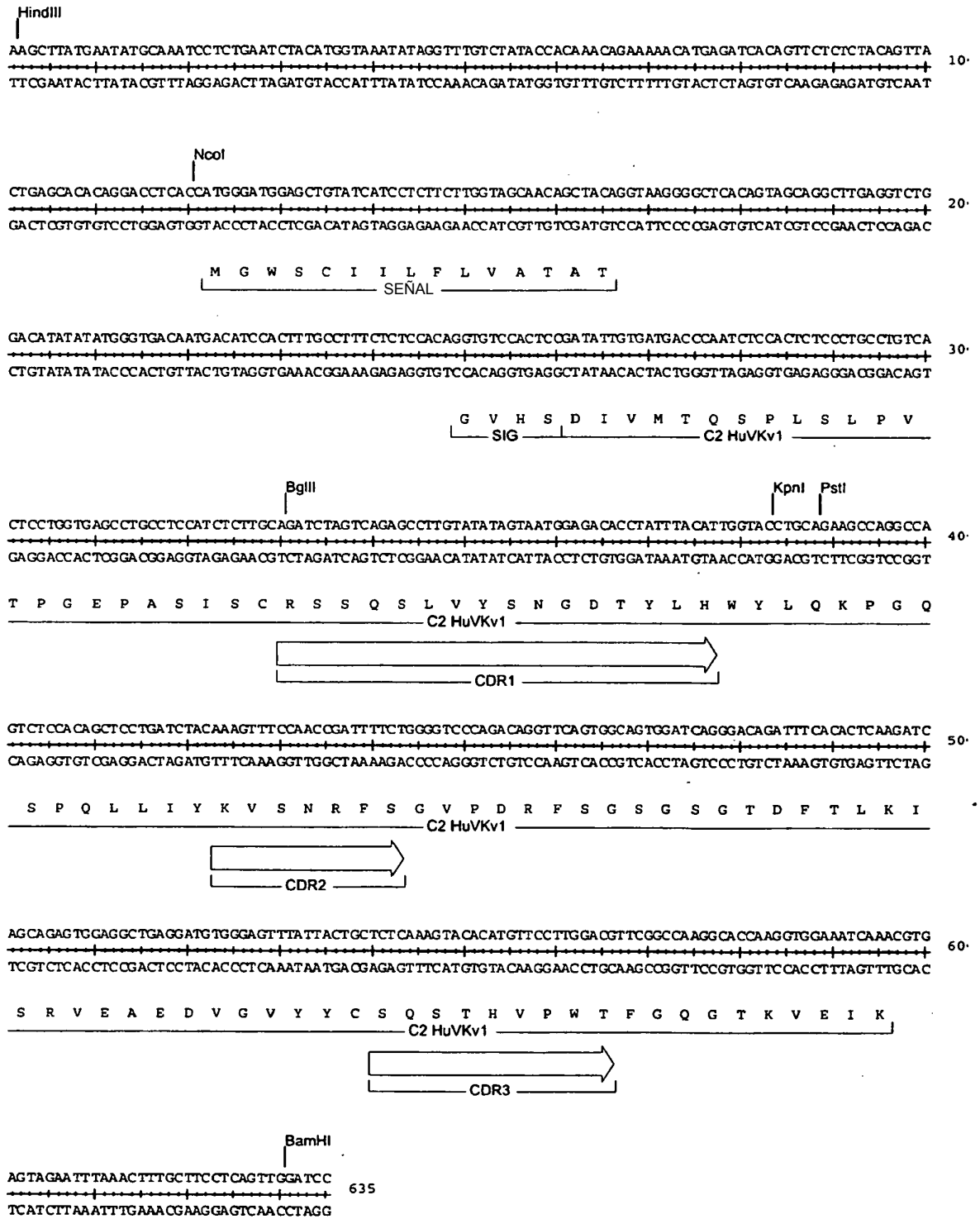


FIG 12

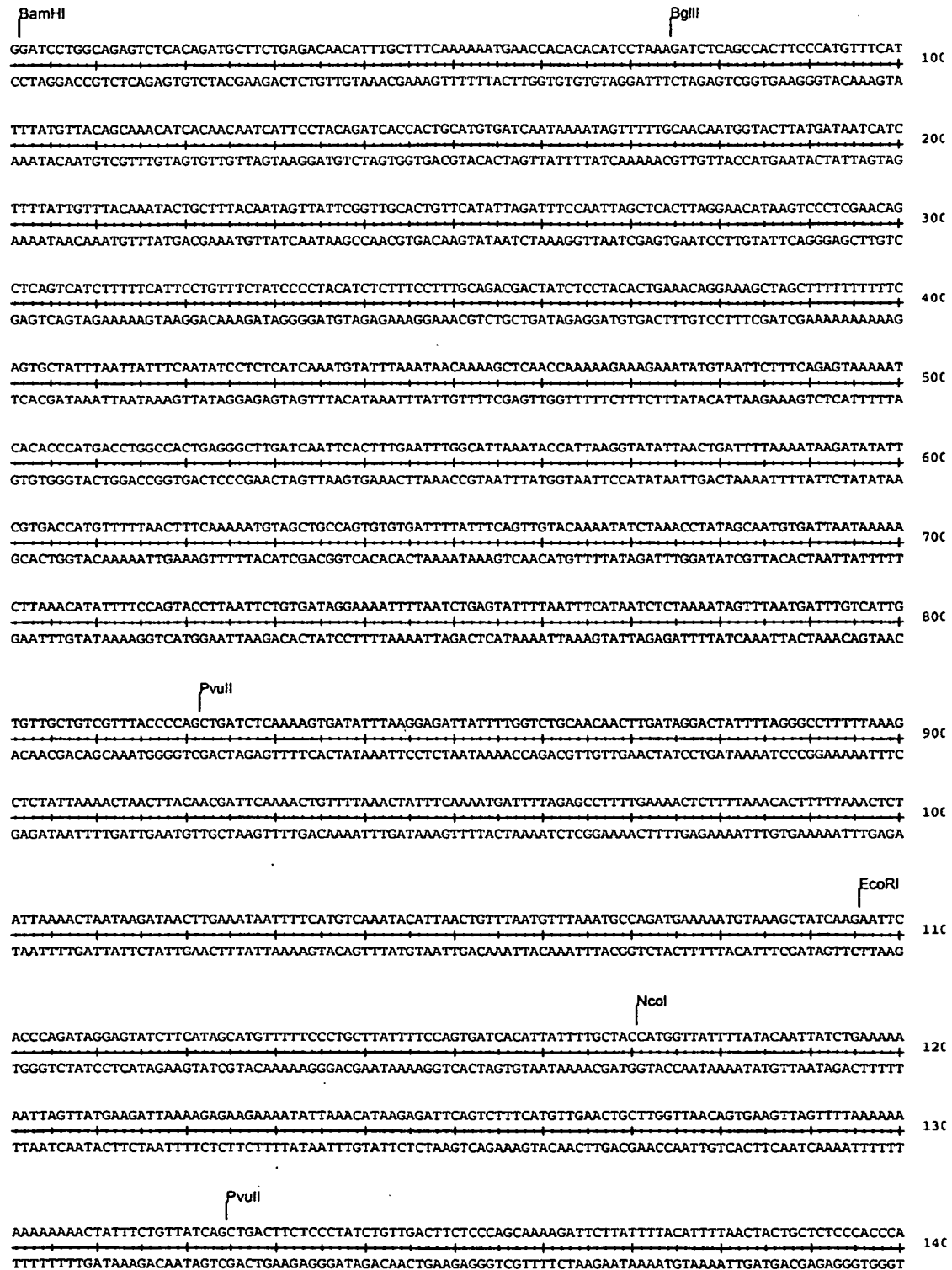


FIG 13-1

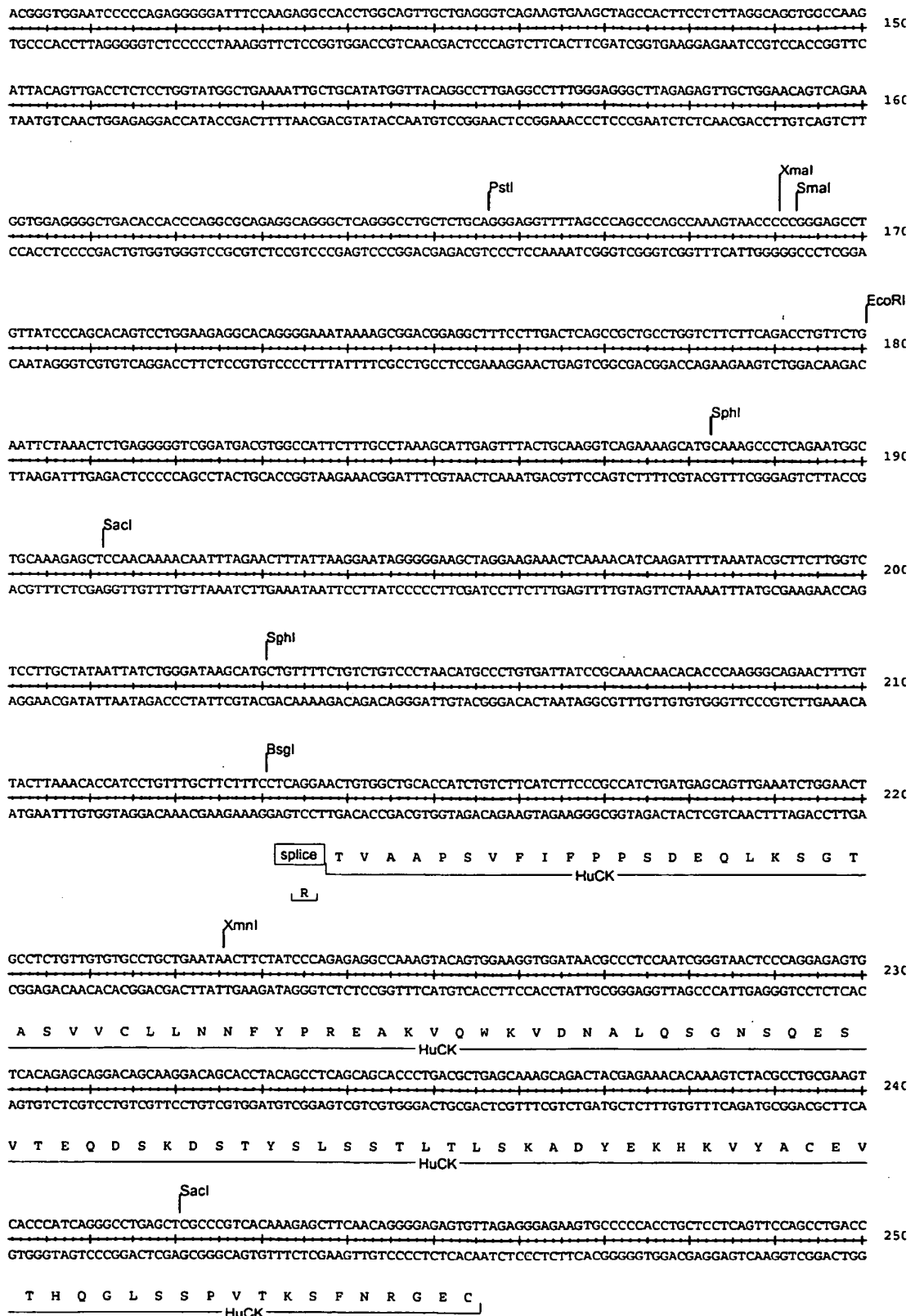


FIG 13-2

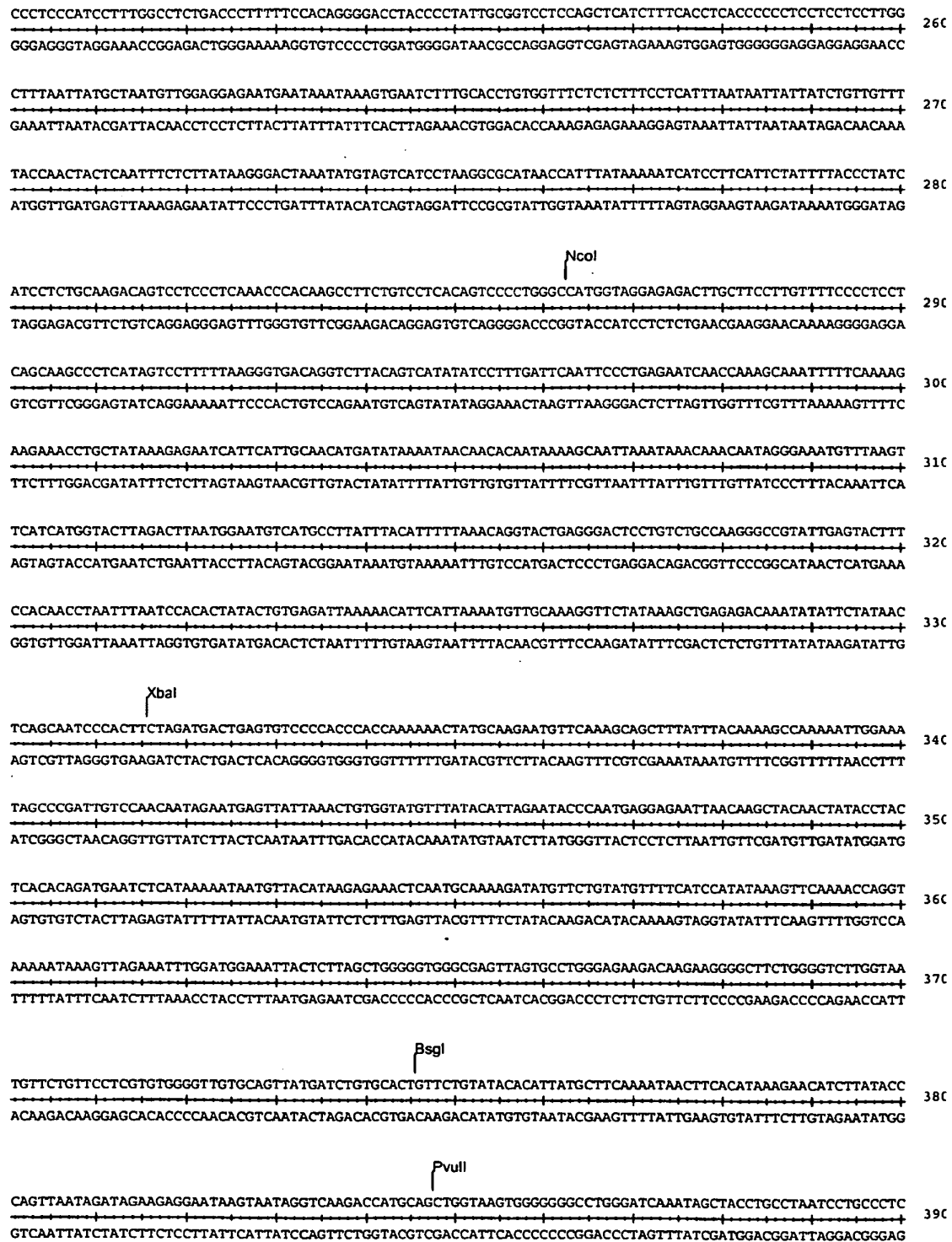


FIG 13-3

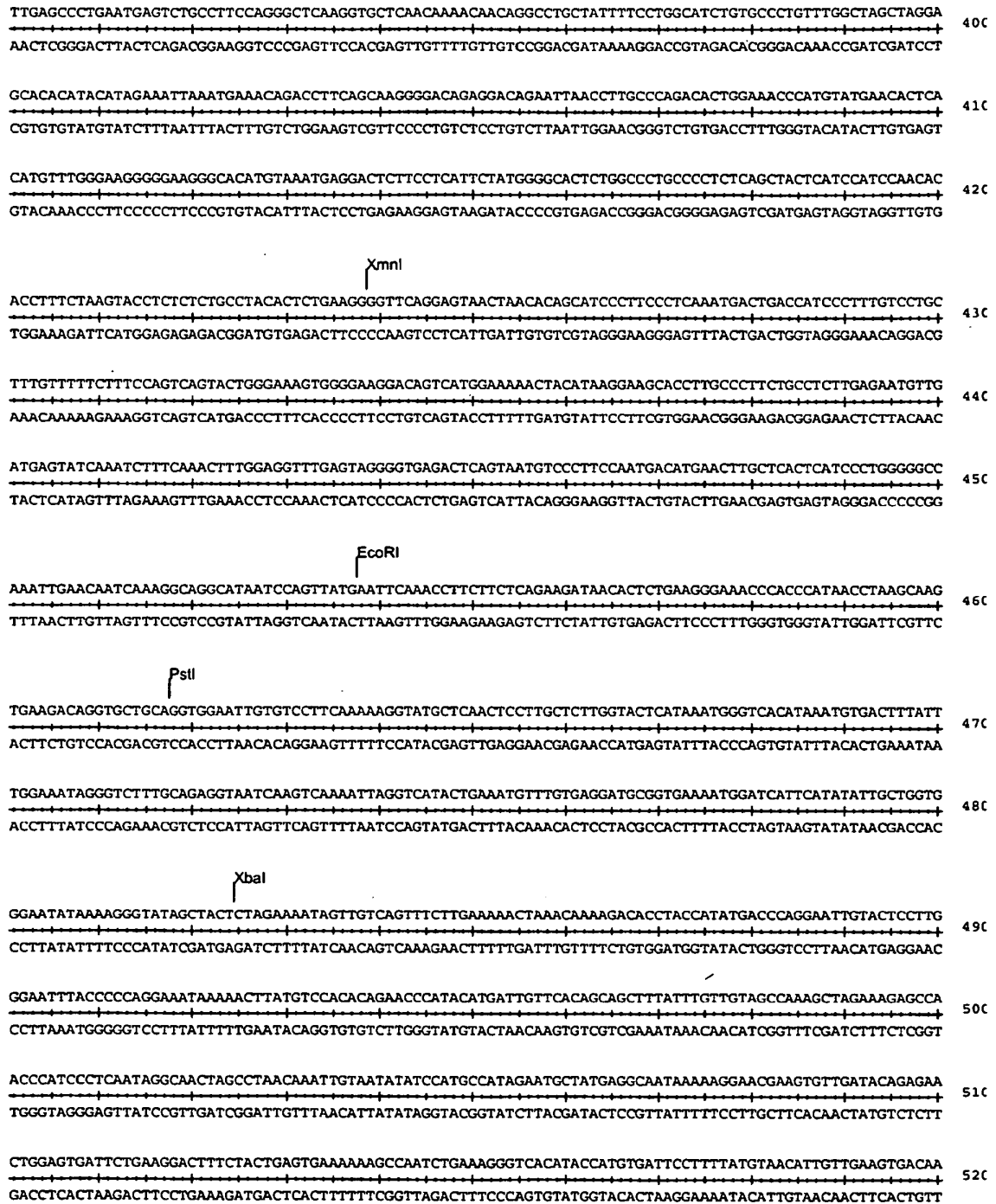


FIG 13-4

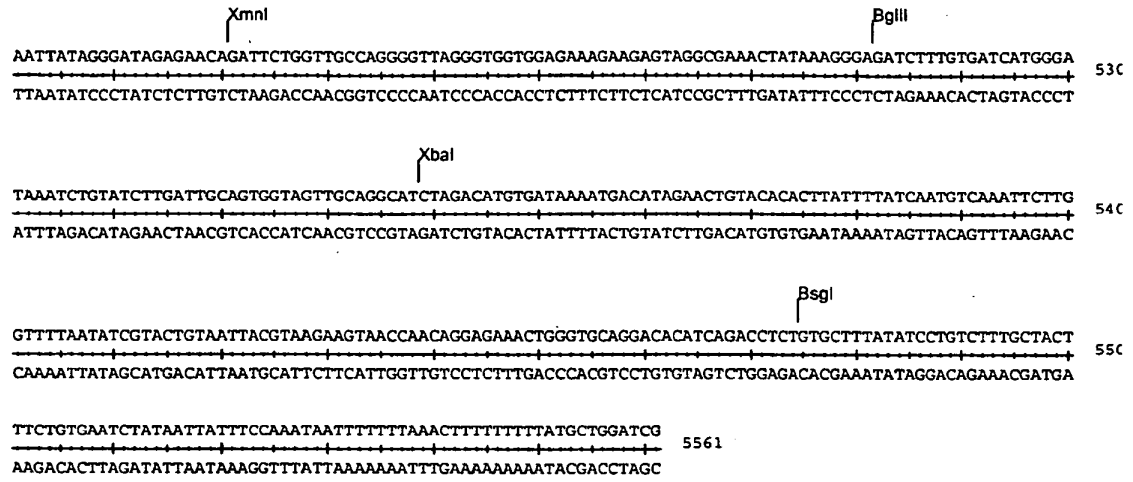


FIG 13-5

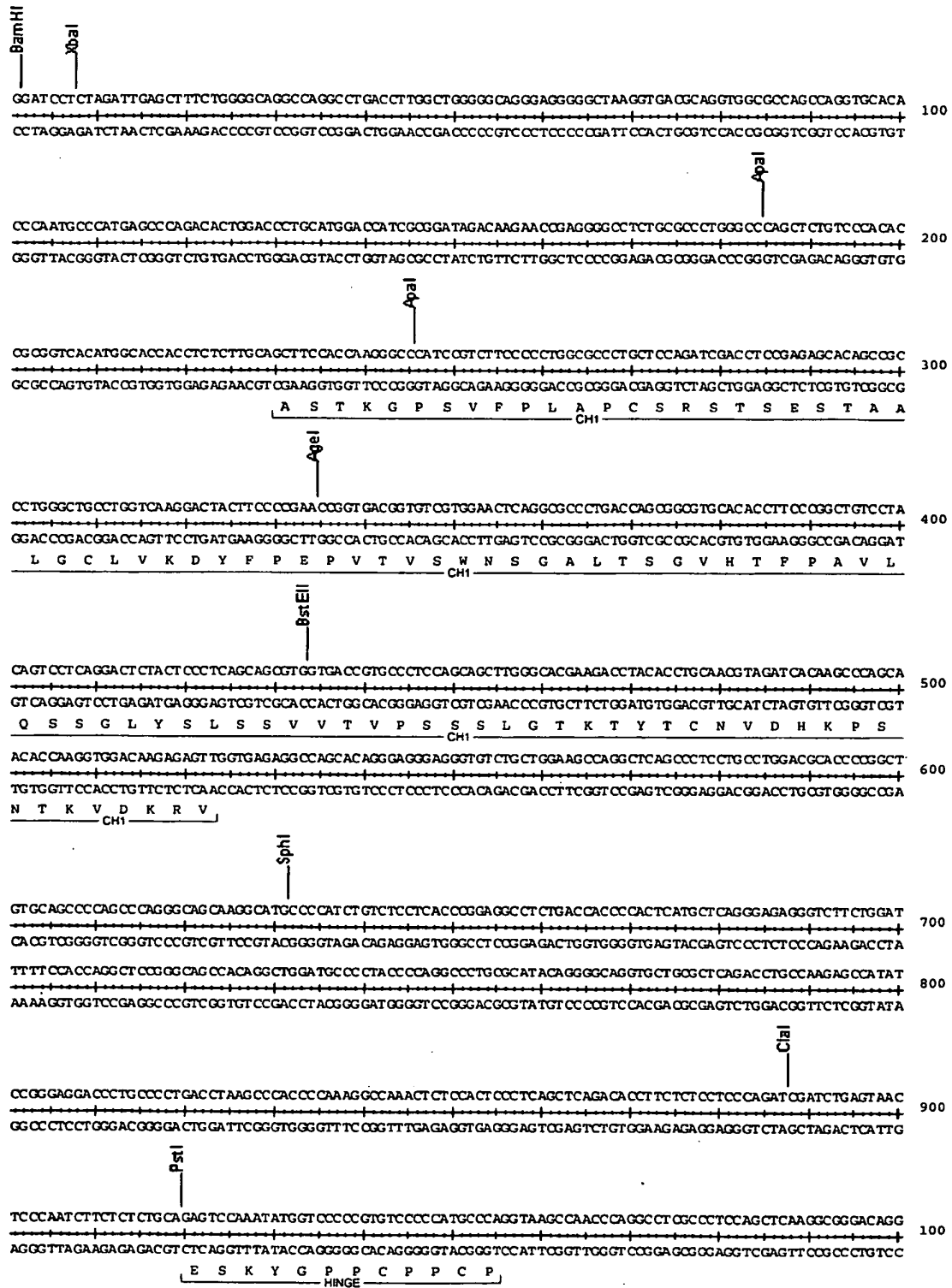


FIG 14 - 1

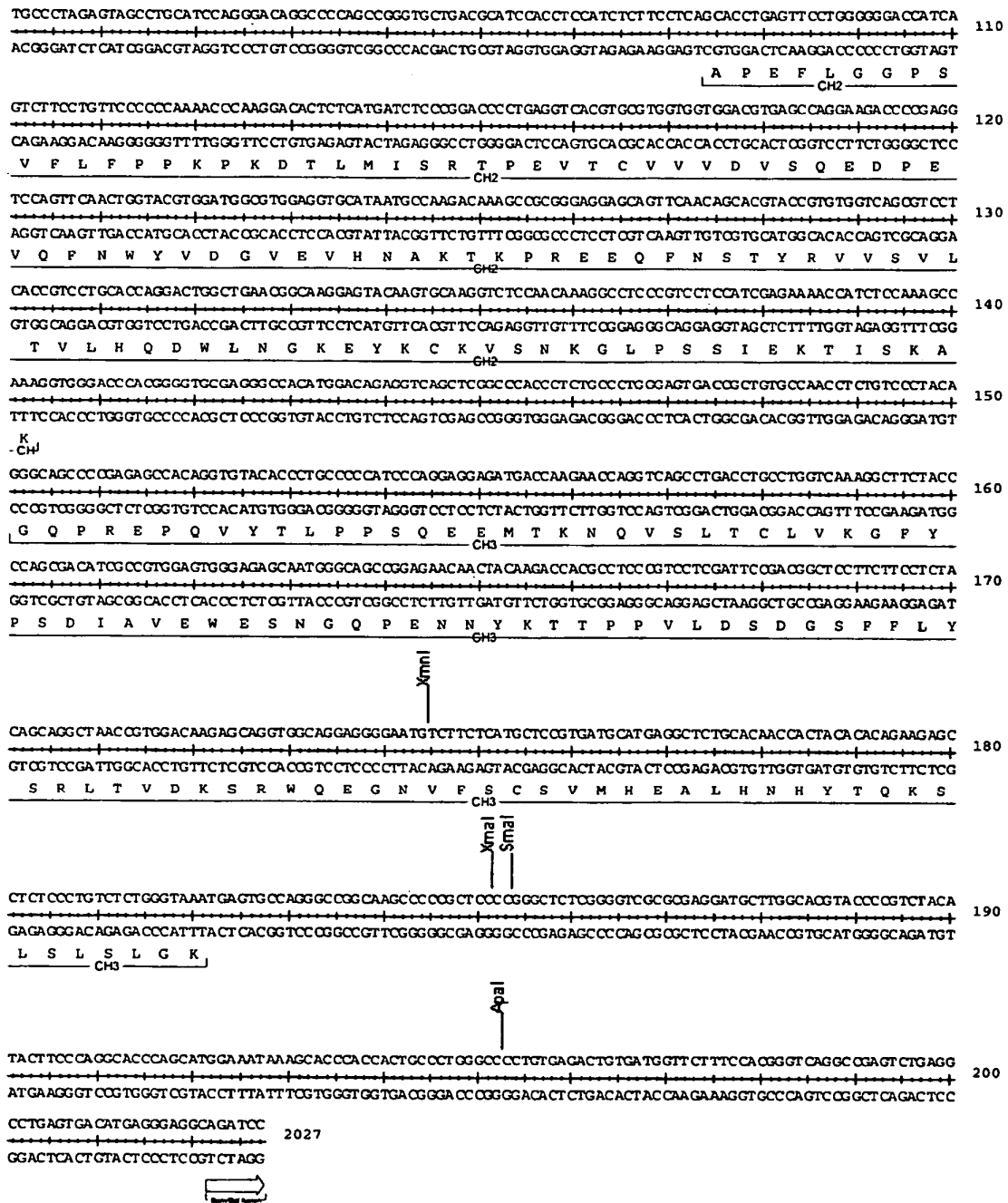


FIG 14 -2

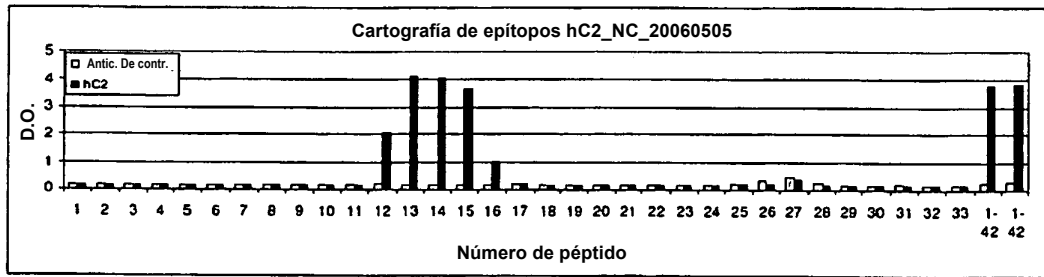


Figura 1. hC2 se une a los péptidos 12, 13, 14, 15 y 16 de la biblioteca de péptidos A β 1-42. La unión de hC2 a péptidos soapantes de A β 1-42 se analizó mediante ELISA. La unión a A β 1-42 completo y la unión de un anticuerpo químico sin unión (anticuerpo de control) se usó como controles positivos y negativos, respectivamente. El número de péptido corresponde al aminoácido de la secuencia de A β 1-42 en el que comienza el péptido. Los resultados se expresan como D.O.

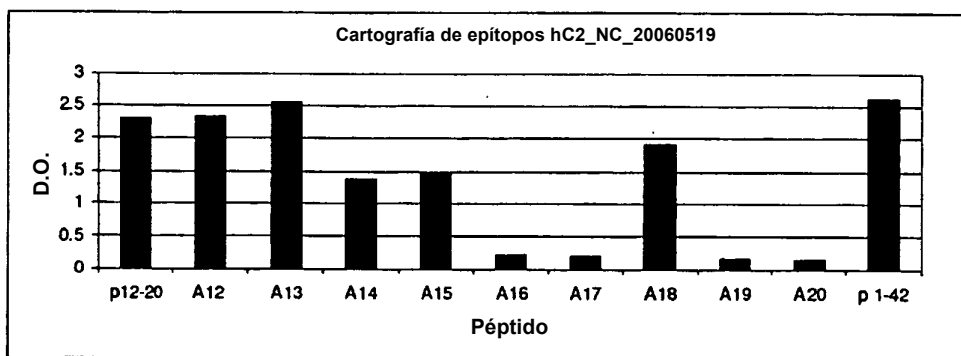


Figura 2. La unión de hC2 a A β 12-20 es completamente dependiente de los aa 16, 17, 19 y 20 y parcialmente dependiente de los aa 14, 15 y 18. La unión de hC2 a A β 12-20 y A β 12-20 con alaninas susituidas se analizó mediante ELISA. La unión al A β 1-42 completo se usó como control positivo. El número corresponde al aa que está sustituido por alanina. Los resultados se expresan como D.O.

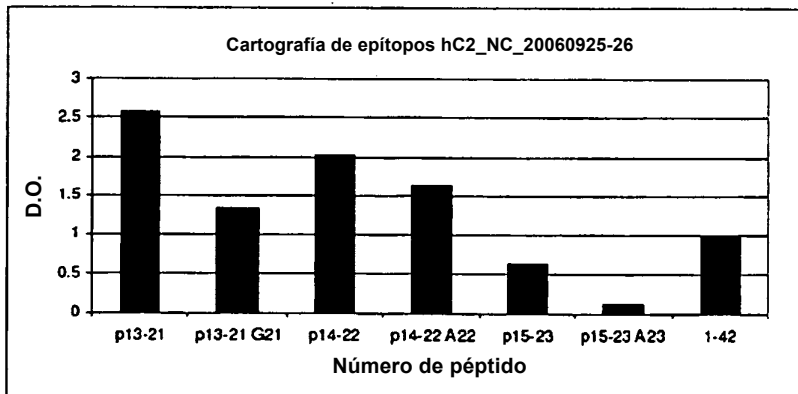


Figura 3. La unión de hC2 a A β 15-23 es dependiente del aa 23 y parcialmente del aa 21 y ligeramente dependiente del aa 22. La unión de hC2 a A β 13-21, 14-22 o 15-23 y a 13-21G21,14-22A22 o 15-23A23 se analizó mediante ELISA. La unión al A β 1-42 completo se usó como control positivo. Los resultados se expresan como D.O.

Fig 15

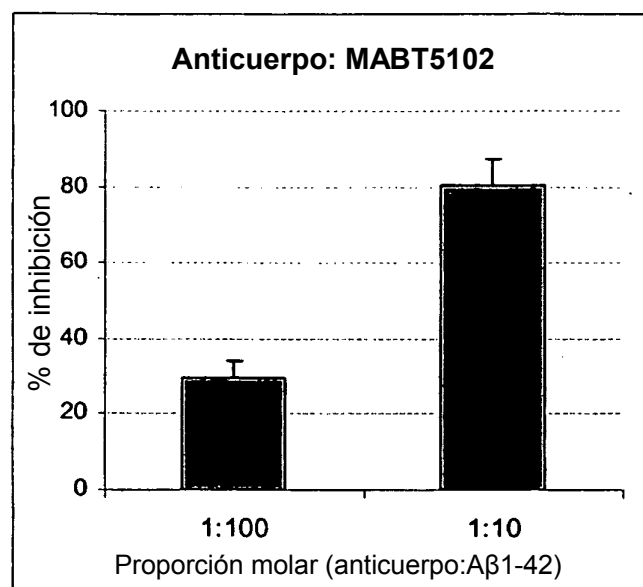


FIG. 16

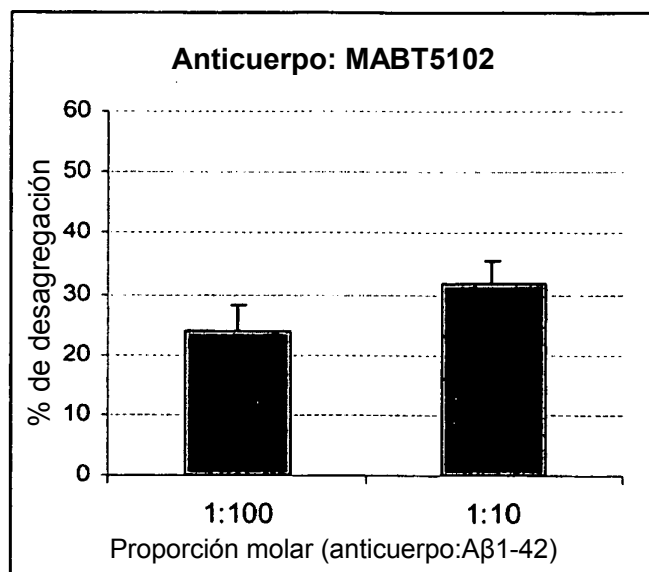
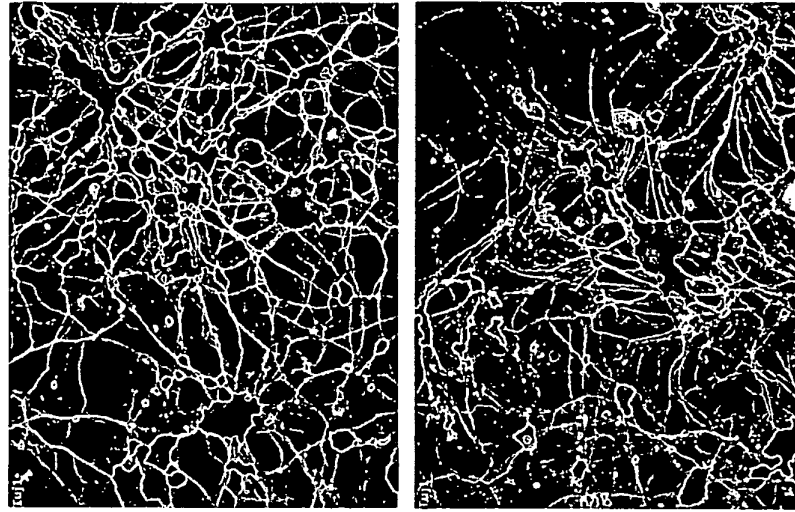
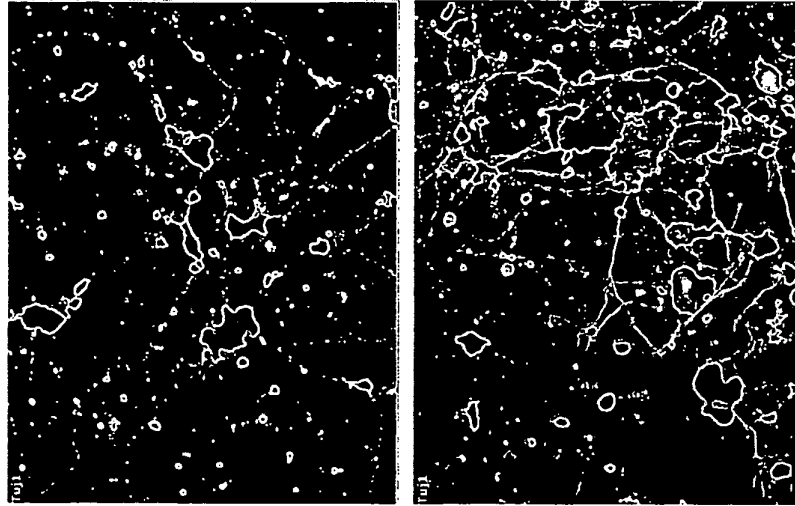


FIG. 17

Abeta 2 μ M + 50 μ g/ml de anti-Abeta



"Oligómeros" de Abeta 2 μ M



4 días Abeta

3 días Abeta

Control (DMSO/F12)

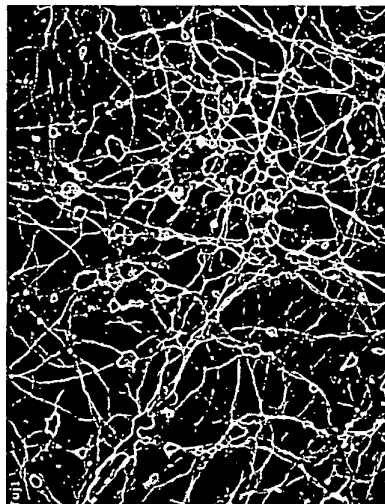


FIG. 18