

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 590**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2008** **E 08837467 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013** **EP 2238166**

54 Título: **Uso de anticuerpo anti-amiloide beta en enfermedades oculares**

30 Prioridad:

05.10.2007 US 960614 P

05.10.2007 US 960615 P

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

04.03.2014

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (50.0%)

1 DNA Way

South San Francisco, CA 94080, US y

AC IMMUNE S.A. (50.0%)

72 Inventor/es:

PFEIFER, ANDREA;

MUHS, ANDREAS;

WATTS, RYAN y

PIHLGREN, MARIA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 445 590 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

Uso de anticuerpo anti-amiloide beta en enfermedades oculares

- 5 La presente invención está relacionada con métodos y composiciones para el uso terapéutico y diagnóstico en el tratamiento de enfermedades y trastornos que están provocados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo amiloidosis, un grupo de trastornos y anomalías asociados con proteína amiloide tales como enfermedad de Alzheimer.
- 10 La amiloidosis no es una única entidad de enfermedad sino más bien un grupo diverso de procesos de enfermedad progresiva caracterizados por depósitos de tejido extracelular de una proteína de tipo almidón, cerosa, llamada amiloide, que se acumula en uno o más órganos o sistemas corporales. A medida que se acumulan depósitos amiloides, comienzan a interferir con la función normal del órgano o sistema corporal. Hay al menos 15 tipos diferentes de amiloidosis. Las formas principales son amiloidosis primaria sin antecedente conocido, amiloidosis
- 15 secundaria después de alguna otra afección y amiloidosis hereditaria.
- La amiloidosis secundaria se produce en personas que tienen una infección crónica o enfermedad inflamatoria, tal como tuberculosis, una infección bacteriana llamada fiebre Mediterránea familiar, infecciones óseas (osteomielitis), artritis reumatoide, inflamación del intestino delgado (ileítis granulomatosa), enfermedad de Hodgkin y lepra.
- 20 Las fibrillas de proteína amiloide, que representan aproximadamente 90% del material amiloide, comprenden uno de varios tipos diferentes de proteínas. Algunas de estas proteínas son capaces de plegarse en fibrillas de lámina llamada "plegada en beta", una configuración proteica única que muestra sitios de unión para rojo Congo que dan como resultado las propiedades de tinción únicas de la proteína amiloide. Además, los depósitos amiloides están
- 25 asociados estrechamente con el componente P amiloide (pentagonal) (AP), una glicoproteína relacionada con amiloide P de suero normal (SAP), y con glicosaminoglicanos (GAG) sulfatados, carbohidratos complejos de tejido conectivo.
- Muchas enfermedades del envejecimiento están basadas en o se asocian con proteínas de tipo amiloide y se
- 30 caracterizan, en parte, por la acumulación de depósitos extracelulares de material amiloide o de tipo amiloide que contribuyen a la patogenia, así como a la progresión de la enfermedad. Estas enfermedades incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpos de Lewy (LBD), síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con
- 35 amiloidosis (tipo Dutch); y el complejo de Demencia de Parkinson de Guam. Otras enfermedades que se basan en o se asocian con proteínas de tipo amiloide son la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), miositis de cuerpos de inclusión (IBM), Diabetes de Aparición en Adultos; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos y otras enfermedades, incluyendo enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios
- 40 patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual, lo que conduce a déficits visuales corticales, la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma, el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide, el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular, la
- 45 retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad, el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica, y la córnea lo que conduce a distrofia reticular.
- Aunque la patogenia de estas enfermedades puede ser diversa, sus depósitos característicos con frecuencia
- 50 contienen muchos constituyentes moleculares compartidos. En un grado significativo, esto puede atribuirse a la activación local de vías proinflamatorias asociadas de este modo con la deposición simultánea de componentes del complemento activado, reactivos de fase aguda, moduladores inmunitarios y otros mediadores inflamatorios (McGeer *et al*, 1994).
- 55 La Enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno neurológico que se cree principalmente que está provocado por placas amiloides, una acumulación de depósito anómalo de proteínas en el cerebro. El tipo más frecuente de amiloide encontrado en el cerebro de individuos aquejados está compuesto principalmente de fibrillas de A β . Las pruebas científicas demuestran que un aumento en la producción y acumulación de proteína beta amiloide en placas conduce a muerte de células nerviosas, lo que contribuye al desarrollo y progresión de AD. La pérdida de células
- 60 nerviosas en áreas estratégicas del cerebro, a su vez, provoca reducción de los neurotransmisores y deterioro de la memoria. Las proteínas principalmente responsables de la acumulación de placas incluyen proteína precursora amiloide (APP) y dos presenilinas (presenilina I y presenilina II). La escisión secuencial de la proteína precursora amiloide (APP), que se expresa constitutivamente y se cataboliza en la mayoría de las células, por las enzimas secretasa β y γ conduce a la liberación de un péptido A β de 39 a 43 aminoácidos. La degradación de APP
- 65 probablemente aumenta su propensión a agregarse en placas. El fragmento de A β ₍₁₋₄₂₎ en particular tiene una alta propensión a acumulación de agregados debido a dos restos de aminoácidos muy hidrófobos en su extremo C. Se

cree por lo tanto que el fragmento de $A\beta_{(1-42)}$ está principalmente implicado y es responsable del inicio de la formación de placas neuríticas en AD que tiene, por lo tanto, un alto potencial patológico. Existe por lo tanto la necesidad de anticuerpos específicos que puedan dirigirse a y difundir la formación de placas amiloides.

5 Los síntomas de AD se manifiestan lentamente y el primer síntoma puede ser solamente pérdida de memoria leve. En este estadio, los individuos pueden olvidar acontecimientos recientes, actividades, los nombres de personas familiares o cosas y pueden no ser capaz de resolver problemas matemáticos sencillos. A medida que la enfermedad progresa, los síntomas se notan más fácilmente y se hacen suficientemente graves para provocar que las personas con AD o miembros de su familia busquen ayuda médica. Los síntomas de estadio medio de AD
10 incluyen olvidar como realizar tareas sencillas tales como acicalamiento, y se desarrollan problemas con el lenguaje, entendimiento, lectura o escritura. Los pacientes de AD de estadio tardío pueden volverse ansiosos o agresivos, pueden alejarse de casa y en última instancia necesitar cuidados totales.

15 En la actualidad, el único modo definitivo de diagnosticar AD es identificar placas y ovillos en tejidos cerebral en una autopsia después de la muerte del individuo. Por lo tanto, los doctores solamente pueden realizar un diagnóstico de AD "posible" o "probable" mientras la persona aún está viva. Usando métodos actuales, los médicos pueden diagnosticar AD correctamente hasta el 90 por ciento de las veces usando varias herramientas para diagnosticar AD "probable". Los médicos realizan preguntas acerca de la salud general de la persona, problemas médicos anteriores y el historial de cualquier dificultad que tenga la persona para llevar a cabo actividades diarias. Ensayos
20 conductuales de memoria, resolución de problemas, atención, conteo y lenguaje proporcionan información sobre la degeneración cognitiva y ensayos médicos tales como ensayos de sangre, orina, o líquido cefalorraquídeo, y exploraciones cerebrales pueden proporcionar alguna información adicional.

25 El tratamiento de AD consiste en tratamientos basados en medicación y no basados en medicación. Los tratamientos dirigidos a cambiar el transcurso subyacente de la enfermedad (retardar o invertir la progresión) han sido hasta la fecha en gran medida infructuosos. Se ha mostrado que las medicinas que restauran el déficit (defecto), o mal funcionamiento, en los mensajeros químicos de las células nerviosas (neurotransmisores), en particular los inhibidores de colinesterasa (ChEI) tales como tacrina y rivastigmina, mejoran los síntomas. Los ChEI impiden la degradación enzimática de neurotransmisores aumentando de este modo la cantidad de mensajeros
30 químicos disponibles para transmitir las señales nerviosas en el cerebro.

Para algunas personas en los estadios temprano y medio 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 evitar que algunos síntomas empeoren durante un tiempo
35 limitado. Otro fármaco, memantina (NAMENDA[®], Nueva York, NY), se ha aprobado para tratamiento de AD de moderada a grave. También están disponibles medicaciones para abordar las manifestaciones psiquiátricas de AD. Además, algunas medicinas pueden ayudar a combatir síntomas conductuales de AD tales como insomnio, agitación, deambuleo, ansiedad y depresión. El tratamiento de estos síntomas con frecuencia aumenta la comodidad de los pacientes y hacen su cuidado más fácil para los cuidadores. Desafortunadamente, a pesar de avances
40 significativos en el tratamiento que muestran que esta clase de agentes es uniformemente mejor que un placebo, la enfermedad continúa progresando, y el efecto medio en las funciones mental ha sido solamente modesto. Muchos de los fármacos usados en medicación de AD, tales como, por ejemplo, ChEI también tienen efectos secundarios que incluyen la disolución gastrointestinal, toxicidad hepática y pérdida de peso.

45 Los déficits visuales corticales se asocian con frecuencia con AD, a pesar del hallazgo negativo de agudeza visual deteriorada o enfermedad ocular. Las pruebas post mórtem de pacientes con AD han mostrado cambios patológicos en las estructuras visuales precorticales y una reducción en las fibras de nervios ópticos.

50 La disfunción del procesamiento visual en AD también se asocia con cambios neurológicos y patología dentro de la vía ventral, que se extiende de la retina con las células ganglionares P a través de las capas parvocelulares del núcleo geniculado lateral (LGN), que alcanzan la corteza inferotemporal (IT), y la vía dorsal que se extiende desde la retina con las células ganglionares M a través de las capas magnocelulares del LGN, alcanzando la corteza temporal media. Las placas seniles de pacientes de AD crean anomalías y disfunciones dentro de estas regiones corticales. Las placas seniles también provocan una pérdida en las tareas de percepción visual, tales como una disfunción en el
55 reconocimiento facial de personas familiares, una afección conocida como prosopagnosia.

Otras enfermedades que se basan en o se asocian con la acumulación y depósito de proteína de tipo amiloide son deterioro cognitivo leve, demencia de cuerpos de Lewy (LBD), síndrome de Down (trisomía del 21), esclerosis lateral
60 amiotrófica (ALS), miositis de cuerpos de inclusión (IBM), y enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías patológicas relacionadas con beta amiloide/cambios en los tejidos del sistema visual, tales como degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la
65 retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis

óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular.

El deterioro cognitivo leve (MCI) es un término general más habitualmente definido como un trastorno de la memoria sutil pero medible. Una persona con MCI experimenta problemas de la memoria mayores de lo que se esperaría normalmente con el envejecimiento, pero no muestra otros síntomas de la demencia, tales como criterio o razonamiento alterados. El MCI es una afección que refleja frecuentemente un estadio preclínico de AD.

Se cree que la deposición de β amiloide dentro de la corteza entorrinal (EC) desempeña un papel clave en el desarrollo del deterioro cognitivo leve (MCI) en los ancianos. Esto concuerda con la observación de que los niveles de CSF-A $A\beta_{(1-42)}$ se reducen significativamente una vez que la AD se hace clínicamente evidente. A diferencia de CSF-A $A\beta_{(1-42)}$ los niveles de CSF-tau aumentan significativamente en el estadio de MCI. Estos valores continúan elevados a continuación, lo que indica que los niveles aumentados de CSF-tau pueden ayudar a detectar sujetos con MCI que se predice que desarrollarán AD.

La demencia de cuerpos de Lewy (LBD) es un trastorno neurodegenerativo que puede aparecer en personas mayores de 65 años de edad, que típicamente provoca síntomas de deterioro cognitivo (pensamiento) y cambios conductuales anómalos. Los síntomas pueden incluir deterioro cognitivo, señales neurológicas, trastornos del sueño e insuficiencia autónoma. El deterioro cognitivo es la característica de presentación de la LBD en la mayoría de los casos. Los pacientes tienen episodios recurrentes de confusión que empeoran progresivamente. La fluctuación en la capacidad cognitiva con frecuencia se asocia con grados cambiantes de atención y alerta. El deterioro cognitivo y las fluctuaciones del pensamiento pueden variar a lo largo de minutos, horas o días.

Los cuerpos de Lewy se forman a partir de proteínas de neurofilamentos fosforiladas y no fosforiladas; contienen la proteína sináptica alfa-sinucleína así como ubiquitina, parte de un cromosoma extra 21 y se asocian con frecuencia con algo de deterioro de la capacidad cognitiva y del crecimiento físico. DS se caracteriza por envejecimiento prematuro: la mayoría de los individuos aquejados de la enfermedad desarrollan la enfermedad de Alzheimer en su quinta década, incluyendo depósitos de la proteína formadora de placas beta amiloide que son con frecuencia más graves que en la mayoría de los otros pacientes con Alzheimer. Además, muchas personas con DS desarrollan cataratas comenzando en la infancia y muchos padecen glaucoma congénito. En seres humanos, el gen para la proteína precursora amiloide, que se escinde para formar beta amiloide, se localiza en el cromosoma 21. En individuos aquejados de DS, tanto beta amiloide soluble como intracelular se acumulan antes que el beta amiloide extracelular, que es responsable de la formación de placas seniles. Los aumentos en los niveles de beta amiloide en síndrome de Down pueden reflejar la expresión aumentada y niveles de proteína de la enzima de escisión de la proteína precursora de beta amiloide 2 en el cromosoma 21.

La esclerosis lateral amiotrófica (ALS) se caracteriza por una degeneración de las neuronas motoras superiores e inferiores. En algunos pacientes con ALS, puede estar presente demencia o afasia (ALS-D). La demencia es más habitualmente una demencia frontotemporal (FTD), y muchos de estos casos tienen inclusiones positivas para ubiquitina, negativas para tau en neuronas del giro dentado y capas superficiales de los lóbulos frontal y temporal.

La miositis de cuerpos de inclusión (IBM) es una enfermedad que conduce a la parálisis habitualmente hallada en personas de más de 50 años de edad, en la que las fibras musculares desarrollan inflamación y comienzan a atrofiarse, mientras que el cerebro no se ve afectado y los pacientes mantienen su intelecto completo. Se descubrió que dos enzimas implicadas en la producción de proteína beta amiloide estaban aumentadas dentro de las células musculares de pacientes con esta enfermedad muscular progresiva, más habitual, de personas mayores, en la que también estaba aumentada beta amiloide.

El síndrome de Down (DS) o trisomía del 21 es un trastorno genético provocado por la presencia de todo o parte de un cromosoma 21 extra y se asocia con frecuencia con algo de deterioro de la capacidad cognitiva y el crecimiento físico. El DS se caracteriza por envejecimiento prematuro: la mayoría de los individuos aquejados de la enfermedad desarrollan enfermedad de Alzheimer en su quinta década, incluyendo depósitos de la proteína formadora de placa beta amiloide que con frecuencia son más graves que en la mayoría de los otros pacientes de Alzheimer. Además, muchas personas con DS desarrollan cataratas comenzando en la infancia y muchos padecen glaucoma congénito. En seres humanos, el gen para la proteína precursora amiloide, que se escinde para formar beta amiloide, se localiza en el cromosoma 21. En individuos aquejados de DS se acumula beta amiloide tanto soluble como intracelular antes que beta amiloide extracelular, que es responsable de la formación de placas seniles. Los aumentos de los niveles beta amiloides en síndrome de Down pueden reflejar los niveles aumentados de expresión y proteína de enzima de escisión de proteína precursora beta amiloide 2 en el cromosoma 21.

Otra enfermedad que se basa en o se asocia con la acumulación y depósito de proteína de tipo amiloide es la degeneración macular.

La degeneración macular es una enfermedad ocular habitual que provoca deterioro de la mácula, que es el área central de la retina (el tejido muy fino en la parte posterior del ojo donde las células sensibles a la luz envían señales visuales al cerebro). La visión definida, clara, "directa" se procesa por la mácula. El daño a la mácula da como resultado el desarrollo de puntos ciegos y visión borrosa o distorsionada. La degeneración macular relacionada con

la edad (AMD) es una causa principal de deterioro visual en los Estados Unidos y para personas de más de 65 años de edad es la causa principal de ceguera legal entre los Caucásicos. Aproximadamente 1,8 millones de Americanos de 40 años de edad y mayores tienen AMD avanzada, y otros 7,3 millones de personas con AMD intermedia están en riesgo sustancial de pérdida de visión. El gobierno estima que para el año 2020 habrá 2,9 millones de personas con AMD avanzada. Las víctimas de AMD con frecuencia se sorprenden y se frustran al descubrir lo poco que se sabe sobre las causas y el tratamiento de esta afección que provoca ceguera.

Hay dos formas de degeneración macular: degeneración macular seca y degeneración macular húmeda. La forma seca, en la que las células de la mácula lentamente comienzan a degradarse, se diagnostica en 85 por ciento de los casos de degeneración macular. Ambos ojos se ven aquejados habitualmente de AMD seca, aunque un ojo puede perder visión mientras que el otro ojo sigue sin verse afectado. Las drusas, que son depósitos amarillos bajo la retina, son señales tempranas habituales de AMD seca. El riesgo de desarrollar AMD seca o AMD húmeda avanzada aumenta a medida que aumenta el número o tamaño de las drusas. Es posible que la AMD seca avance y provoque pérdida de visión sin convertirse en la forma húmeda de la enfermedad; sin embargo, también es posible que la AMD seca de estadio temprano cambie repentinamente a la forma húmeda.

La forma húmeda, aunque solamente representa 15 por ciento de los casos, da como resultado 90 por ciento de la ceguera, y se considera AMD avanzada (no hay estadio temprano o intermedio de AMD húmeda). La AMD húmeda también se ve precedida siempre por la forma seca de la enfermedad. A medida que la forma seca empeora, algunas personas comienzan a tener vasos sanguíneos anómalos creciendo detrás de la mácula. Estos vasos son muy frágiles y filtrarán líquido y sangre (por ello es degeneración macular "húmeda"), provocando daño rápido a la mácula.

La forma seca de AMD inicialmente provocará con frecuencia visión ligeramente borrosa. El centro de visión en particular puede hacerse borroso y esta región crece más a medida que progresa la enfermedad. Pueden no observarse síntomas si solamente está aquejado un ojo. En AMD húmeda, las líneas rectas pueden parecer onduladas y puede producirse rápidamente pérdida de visión central.

El diagnóstico de la degeneración macular típicamente implica un examen ocular dilatado, ensayo de agudeza visual, y una vista del fondo del ojo usando un procedimiento llamado fundoscopia para ayudar a diagnosticar AMD y, si se sospecha que hay AMD húmeda, también puede realizarse angiografía de fluoresceína. Si la AMD seca alcanza los estadios avanzados, no hay tratamiento actual para evitar la pérdida de visión. Sin embargo, una fórmula de dosis alta específica de antioxidantes y cinc puede retardar o evitar que la AMD intermedia progrese al estadio avanzado. Macugen® (inyección de pegaptanib sódico), fotocoagulación con láser y terapia fotodinámica pueden controlar el crecimiento de vasos sanguíneos anómalos y hemorragia en la mácula, lo que es útil para algunas personas que tienen AMD húmeda; sin embargo, la visión que ya se ha perdido no se restaurará por estas técnicas. Si ya se ha perdido visión, existen ayudas de baja visión que pueden ayudar a mejorar la calidad de vida.

Una de las señales tempranas de degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es la acumulación de drusas entre la lámina basal del epitelio pigmentado retiniano (RPE) y membrana de Bruch (BM). Estudios recientes realizados por Anderson *et al.* han confirmado que las drusas contienen beta amiloide (Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256).

La investigación en curso continúa con estudios que exploran factores ambientales, genéticos y dietéticos que pueden contribuir a la AMD. También se están explorando nuevas estrategias de tratamiento, incluyendo trasplantes de células retinianas, fármacos que eviten o ralenticen el progreso de la enfermedad, radioterapia, terapias génicas, una microplaca informática implantada en la retina que pueda ayudar a estimular la visión y agentes que eviten el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos bajo la mácula.

Un factor importante para considerar al desarrollar nuevos fármacos es la facilidad de uso para los pacientes diana. El suministro farmacológico oral, específicamente comprimidos, cápsulas y geles blandos, representan 70% de todas las formas de dosificación consumidas debido a la conveniencia para los pacientes. Los desarrolladores de fármacos están de acuerdo en que los pacientes prefieren el suministro oral en lugar de someterse a inyecciones u otras formas más invasivas de administración médica. También son preferibles formulaciones que den como resultado intervalos de dosificación bajos (es decir una vez al día o liberación prolongada). La facilidad de administrar antibióticos en formas de dosificación oral da como resultado un aumento de la conformidad de los pacientes durante el tratamiento.

Lo que se necesitan son métodos y composiciones eficaces para generación de anticuerpos altamente específicos y altamente eficaces, lo que es un prerrequisito si los anticuerpos van a proporcionarse en una forma de dosificación oral. Preferentemente dichos anticuerpos reconocerán epítopos específicos en diversos antígenos tales como proteína amiloide.

Lo que se necesita también, por lo tanto, son composiciones y métodos eficaces para abordar las complicaciones asociadas con enfermedades y trastornos en sujetos que lo necesitan que están provocados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con

la formación de placas amiloides incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad incluyendo, pero sin limitación, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpos de Lewy (LBD), síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch); el complejo de Demencia de Parkinson de Guam así como otras enfermedades que se basan en o se asocian con proteínas de tipo amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), miositis de cuerpos de inclusión (IBM), Diabetes de Aparición en Adultos; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos y otras enfermedades, incluyendo enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales, la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide, el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular. En particular, lo que se necesitan son anticuerpos especializados y altamente eficaces capaces de contrarrestar las manifestaciones fisiológicas de la enfermedad, tales como la formación de placas asociadas con la agregación de fibras del péptido amiloide o de tipo amiloide.

Se ha demostrado que los anticuerpos anti amiloides inducidos por la inoculación de A β ₁₋₄₂ mezclado con adyuvante completo o incompleto de Freund son capaces de reducir la carga amiloide en ratones transgénicos para enfermedad de Alzheimer humana (Schenk *et al.*, 1999).

La inoculación intraperitoneal de A β ₁₋₁₆ tetrapalmitilado reconstituido en liposomas a ratones transgénicos NORBA indujo titulaciones indicativas de anticuerpos anti amiloides, que también demostraron ser capaces de solubilizar fibras amiloides y placas *in vitro* e *in vivo* (Nicolau *et al.*, 2002).

Un posible mecanismo por el que se produce la disolución de placas y fibras amiloides se sugirió en primer lugar por Bard *et al.*, (2000), que avanzó la conclusión, basándose en sus datos, de que los anticuerpos opsonizaban las placas, que posteriormente se destruían por los macrófagos de la microglía. De Mattos *et al.*, (2001) indicaron que un mAb dirigido contra el dominio central de β amiloide era capaz de unirse con y secuestrar completamente el amiloide en plasma. Argumentaron que la presencia de estos mAb en circulación desplazaba el equilibrio de A β entre cerebro y plasma favoreciendo la eliminación periférica y el catabolismo en lugar de la deposición dentro del cerebro.

Los documentos WO 2007/068412 y WO 2008/156621 desvelan métodos y composiciones que comprenden anticuerpos altamente específicos y altamente eficaces que tienen la capacidad para reconocer específicamente y unirse a epítopos específicos de una serie de proteínas beta amiloides, para el uso terapéutico y de diagnóstico en el tratamiento de enfermedades y trastornos que están provocados o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo amiloidosis, un grupo de trastornos y anomalías asociados con proteína amiloide. Se indica que los anticuerpos y composiciones son útiles también en el tratamiento de la degeneración macular y otras enfermedades oculares incluyendo neuropatía óptica relacionada con drusas y/o cataratas.

Se desvelan en la presente memoria nuevos métodos y composiciones que comprenden anticuerpos altamente específicos y altamente eficaces que tienen la capacidad de reconocer específicamente y unirse a proteínas β amiloides específicas. Los anticuerpos posibilitados por las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria son particularmente útiles para el tratamiento de enfermedades y trastornos en sujetos que lo necesiten que están provocados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo amiloidosis, grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placas amiloides incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad incluyendo, pero sin limitación, trastornos neurológicos tales como Enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpos de Lewy (LBD), síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch); el complejo de Demencia de Parkinson de Guam; así como otras enfermedades que se basan en o se asocian con proteínas de tipo amiloide tales como la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo Dutch, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), miositis de cuerpos de inclusión (IBM), Diabetes de Aparición en Adultos; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos, y otras enfermedades, incluyendo enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma, el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide, el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular, la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular,

por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular.

- Además, se desvelan en la presente memoria métodos y composiciones nuevos para conservar o aumentar la capacidad de memoria cognitiva en un mamífero que muestra una enfermedad o afección asociada con amiloide que comprenden administrar a un sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que necesite dicho tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención.
- La presente invención hace uso de presentaciones de antígenos que dan como resultado exposición y estabilización potenciadas de una conformación antigénica preferida, que en última instancia da como resultado anticuerpos con propiedades únicas.
- En una primera realización de la invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de glaucoma, neuritis óptica, o distrofia reticular, pero particularmente en glaucoma, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, que reconoce y se une a una proteína β amiloide que comprende una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9; una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10; una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11; una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12; una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 13; y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14.
- En una realización específica, la composición farmacéutica anterior se proporciona para su uso en el tratamiento de glaucoma, en el que el glaucoma se selecciona del grupo que consiste en glaucoma de ángulo abierto crónico (COAG), glaucoma de cierre de ángulo agudo (AACG), glaucoma de mecanismo mixto o combinado, glaucoma de tensión normal, glaucoma congénito, glaucoma secundario, y glaucoma exfoliante.
- En una realización, el anticuerpo comprendido en la composición farmacéutica anterior para su uso en uno cualquiera de los tratamientos anteriores se selecciona del grupo de un anticuerpo monoclonal, quimérico, monocatenario, simianizado, humano y humanizado, pero particularmente un anticuerpo humanizado, o es un fragmento activo del mismo.
- En una realización adicional la invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el anticuerpo es:
- (a) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7; un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8; o tanto el dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7 como el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8; o
 - (b) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7; un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8; o tanto el dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7 como el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8, en el que el aminoácido en la posición 52 de SEC ID N°:8 es cisteína; o
 - (c) un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma EJ1A9 depositada el 25 de mayo de 2007 y a la que se dio el número de depósito DSM ACC2844.
- En otra realización, se proporcionó un anticuerpo monoclonal, o una parte funcional del mismo, que reconoce y se une a una proteína β amiloide, que comprende una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9; una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10; una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11; una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12; una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 13; y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14 para su uso en la prevención, tratamiento o alivio de los efectos de glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular.
- En una realización específica, este anticuerpo o parte funcional del mismo se proporciona para su uso en la reducción de la carga de placa y/o la cantidad de placas en la capa de células ganglionares retinianas de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano, que padece glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular.
- En otra realización específica, este anticuerpo o parte funcional del mismo se proporciona para su uso en la reducción de la cantidad total de β amiloide soluble en la capa de células ganglionares retinianas de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano, que padece glaucoma, neuritis óptica o distrofia

reticular.

En otra realización específica más, este anticuerpo o parte funcional del mismo se proporciona para su uso en la conservación o reducción de la presión ocular en los ojos de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano, que padece glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular.

En una realización, el anticuerpo o parte funcional del mismo de cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en uno cualquiera de los tratamientos anteriores se selecciona del grupo de un anticuerpo monoclonal, quimérico, monocatenario, simianizado, humano y humanizado, pero particularmente un anticuerpo humanizado, o es un fragmento activo del mismo.

En una realización, la invención se refiere a un método para diagnosticar glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular en un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano, que comprende detectar la unión inmunoespecífica de un anticuerpo monoclonal que comprende una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9; una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10; una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11; una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12; una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 13; y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14, o una parte funcional del mismo, con un epítipo de la proteína amiloide en una muestra del sujeto que incluye las etapas de

- (a) poner la muestra que se sospecha que contiene la proteína amiloide en contacto con el anticuerpo, uniéndose dicho anticuerpo con un epítipo de la proteína amiloide;
- (b) permitir que el anticuerpo se una con la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;
- (c) detectar la formación del complejo inmunológico, particularmente de modo que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de proteína amiloide; y
- (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra.

En una realización, la invención se refiere a un método para diagnosticar una predisposición a glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular en un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano, que comprende detectar la unión específica de un anticuerpo monoclonal que comprende una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9; una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10; una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11; una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12; una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 13; y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14, o una parte funcional del mismo, con un epítipo de la proteína amiloide en una muestra del sujeto que incluye las etapas de

- (a) poner la muestra que se sospecha que contiene la proteína amiloide en contacto con el anticuerpo, en el que el anticuerpo se une con un epítipo conformacional de la proteína amiloide;
- (b) permitir que el anticuerpo se una con cualquier proteína amiloide en la muestra para formar un complejo inmunológico;
- (c) detectar la formación del complejo inmunológico;
- (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra; y
- (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal,

en el que un aumento de la cantidad de dicho complejo en comparación con un valor de control normal indica que el sujeto padece o está en riesgo de desarrollar glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular.

En una realización, la invención se refiere a un método para controlar el glaucoma residual mínimo, neuritis óptica o distrofia reticular en un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano, después del tratamiento con la composición farmacéutica de la reivindicación 1, comprendiendo dicho método:

- (a) poner una muestra del sujeto que se sospecha que contienen la proteína amiloide en contacto con un anticuerpo monoclonal que comprende una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9; una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10; una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11; una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12; una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 13; y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14, o una parte funcional del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con un epítipo de la proteína amiloide;
- (b) permitir que el anticuerpo se una con la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;
- (c) detectar la formación del complejo inmunológico;
- (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra; y

- (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal,

en el que un aumento de la cantidad de dicho complejo en comparación con un valor de control normal indica que el sujeto aún padece glaucoma residual mínimo, neuritis óptica o distrofia reticular.

En otra realización, la invención se refiere a un método para predecir la sensibilidad de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano, que se trata con la composición farmacéutica de la reivindicación 1 que comprende las etapas de:

(a) poner una muestra del sujeto que se sospecha que contiene una proteína amiloide en contacto con un anticuerpo monoclonal que comprende una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9; una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10; una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11; una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12; una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 13; y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14, o una parte funcional del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con un epítipo de la proteína amiloide;

(b) permitir que el anticuerpo se una con la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;

(c) detectar la formación del complejo inmunológico;

(d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra; y

(e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico antes y después del comienzo del tratamiento,

en el que una reducción de la cantidad de dicho complejo inmunológico indica que el sujeto tiene un alto potencial de ser sensible al tratamiento.

En una realización, el anticuerpo usado en el método de cualquiera de las realizaciones precedentes se selecciona del grupo de un anticuerpo monoclonal, quimérico, monocatenario, simianizado, humano y humanizado, pero particularmente un anticuerpo humanizado, o es un fragmento activo del mismo.

En una realización adicional, la invención se refiere al método de una cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que anticuerpo es:

(a) un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes; o

(b) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7; un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8; o tanto el dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7 como el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8; o

(c) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7; un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8; o tanto el dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7 como el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8, en el que el aminoácido en la posición 52 de SEC ID N°: 8 es cisteína; o

(d) un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma EJ1A9 depositada el 25 de mayo de 2007 y a la que se dio el número de depósito DSM ACC2844.

En una realización, la invención se refiere al uso de un anticuerpo monoclonal que comprende una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9; una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10; una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11; una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12; una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 13; y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14 para la preparación de un medicamento para

a) prevenir, tratar o aliviar los efectos de glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular;

b) reducir la carga de placas en la capa de células ganglionares retinianas de un sujeto que padece glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular;

c) reducir la cantidad de placas en la capa de células ganglionares retinianas de un sujeto que padece glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular;

d) reducir la cantidad total de β amiloide soluble en la capa de células ganglionares retinianas de un sujeto que padece glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular; o

e) mantener o reducir la presión ocular en los ojos de un sujeto que padece glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular.

En una realización específica, la invención se refiere al uso anterior, en el que anticuerpo es:

(a) un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes; o

(b) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7; un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8; o tanto el dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7 como el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8; o

(c) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7; un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8; o tanto el dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7 como el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8, en el que el aminoácido en la posición 52 de SEC ID N°:8 es cisteína; o

(d) un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma EJ1A9 depositada el 25 de mayo de 2007 y a la que se dio el número de depósito DSM ACC2844.

En una realización de la invención, se proporciona un anticuerpo incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo o, más particularmente, un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que se ha inducido contra una construcción antigénica supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del péptido β amiloide, particularmente de un fragmento seleccionado del péptido β amiloide, modificado con un resto hidrófilo tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o, como alternativa, con un resto hidrófobo, tal como, por ejemplo un ácido palmítico, en el que dicho resto hidrófilo o hidrófobo está unido covalentemente a cada uno de los extremos del péptido antigénico mediante al menos uno, particularmente uno o dos aminoácidos tales como, por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisteína o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácidos adecuado capaz de actuar como un dispositivo de conexión para acoplar el resto hidrófilo o hidrófobo con el fragmento peptídico.

Cuando se usa un resto hidrófilo tal como PEG, el fragmento del péptido β amiloide puede ser un fragmento correspondiente a la secuencia de aminoácidos $A\beta_{22-35}$ y $A\beta_{29-40}$, respectivamente, y los extremos de PEG libres pueden unirse covalentemente a fosfatidiletanolamina o cualquier otro compuesto adecuado para actuar como el elemento de anclaje, por ejemplo para incluir la construcción antigénica en la bicapa de un liposoma.

Cuando se usa un resto hidrófobo tal como un ácido palmítico, el fragmento seleccionado del péptido β amiloide puede ser un fragmento correspondiente a la secuencia de aminoácidos $A\beta_{1-15}$ y este resto hidrófobo puede actuar directamente como el elemento de anclaje, por ejemplo, para incluir la construcción antigénica en la bicapa de un liposoma.

También se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, reconociendo dicho anticuerpo y uniéndose a un epítipo conformacional y uniéndose a amiloide soluble polimérico y a fibrillas o fibras amiloides, respectivamente, particularmente a péptidos $A\beta$ amiloides solubles poliméricos y fibrillas o fibras $A\beta$ amiloides, respectivamente.

También se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, reconociendo dicho anticuerpo y uniéndose a un epítipo conformacional preferentemente presentado en péptidos amiloide soluble polimérico y amiloide oligomérico, respectivamente, particularmente en péptidos $A\beta$ amiloides solubles poliméricos y péptidos $A\beta$ amiloides oligoméricos que comprenden una pluralidad de péptidos $A\beta_{1-42}$ monoméricos, respectivamente.

También se describe en la presente memoria un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, reconociendo dicho anticuerpo y uniéndose a un epítipo conformacional preferentemente presentado en péptidos amiloides solubles poliméricos y amiloides oligoméricos, respectivamente, pero también en fibrillas o fibras amiloides, particularmente en péptidos $A\beta$ amiloides solubles poliméricos y péptidos $A\beta$ amiloides oligoméricos que comprenden una pluralidad de péptidos $A\beta_{1-42}$ monoméricos, y en fibrillas o fibras amiloides que incorporan una pluralidad de dichos péptidos oligoméricos, respectivamente.

La herencia del alelo $\epsilon 4$ de la proteína apolipoproteína E (apoE4) es un factor de riesgo genético fuerte para AD. Esta proteína es capaz de unirse a amiloide y se sabe que está implicada tanto en la eliminación de $A\beta$ a través de la barrera hematoencefálica como en la promoción de la deposición de $A\beta$. Por el contrario, la unión de amiloide se mapea en la región de unión de lipoproteína hidrófoba de ApoE y esta asociación reduce drásticamente la capacidad de unión con lípidos global de ApoE.

En consecuencia, se describe en la presente memoria además un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria, siendo capaz dicho anticuerpo de inhibir o reducir de otro modo la interacción de amiloide con ApoE4 en el cerebro de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano, particularmente en el cerebro de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que

padece una enfermedad o afección asociada con concentración aumentada de A β en el cerebro. El anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, se une por lo tanto preferentemente a péptidos amiloides solubles poliméricos y amiloides oligoméricos, respectivamente, particularmente a péptidos A β poliméricos solubles y péptidos A β oligoméricos que comprenden una pluralidad de péptidos monoméricos A β_{1-42} , respectivamente. En un aspecto se describe en la presente memoria un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con péptidos monoméricos A β que tienen al menos 30, más particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, aún más particularmente al menos 40 restos de aminoácidos pero esencialmente no muestra unión con péptidos monoméricos A β que tienen menos de 30 restos, particularmente péptidos que tienen menos de 20 restos, más particularmente péptidos que tienen menos de 10 restos, pero especialmente péptidos que tienen 8 y menos restos.

En un aspecto específico, se describe en la presente memoria un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con péptidos monoméricos A β que tienen al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, aún más particularmente al menos 40 restos de aminoácidos particularmente con la región monomérica A β 1-40 y con péptido amiloide polimérico soluble y/u oligomérico que comprende una pluralidad de péptidos monoméricos A β_{1-42} pero esencialmente no muestra unión con péptidos monoméricos A β 17-40.

También se describe en la presente memoria un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con el péptido monomérico A β 1-40, particularmente con el péptido monomérico A β 1-40 y con péptido amiloide polimérico soluble y/u oligomérico que comprende una pluralidad de péptidos monoméricos A β_{1-42} , pero no muestra esencialmente unión con el péptido monomérico A β 17-40.

También se describe en la presente memoria un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con el péptido monomérico A β 1-40, particularmente con el péptido monomérico A β 1-40 y con péptido amiloide polimérico soluble y/u oligomérico que comprende una pluralidad de péptidos monoméricos A β_{1-42} , pero muestra una unión sustancialmente más débil con el péptido monomérico A β 1-28.

En otro aspecto específico, se describe un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con el péptido monomérico A β 1-40, particularmente con el péptido monomérico A β 1-40 y con péptido amiloide polimérico soluble y/u oligomérico que comprende una pluralidad de péptidos monoméricos A β_{1-42} , pero muestra una unión intermedia con el péptido monomérico A β_{1-42} .

En otro aspecto específico, se describe un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con el péptido monomérico A β 1-40, particularmente con el péptido monomérico A β 1-40 y con péptido amiloide polimérico soluble y/u oligomérico que comprende una pluralidad de péptidos monoméricos A β_{1-42} , pero muestra una unión sustancialmente más débil con el péptido monomérico A β 1-28 y una unión intermedia con el péptido monomérico A β_{1-42} .

En otro aspecto específico, se describe un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con el péptido monomérico A β 1-40, particularmente con el péptido monomérico A β 1-40 y con péptido amiloide polimérico soluble y/u oligomérico que comprende una pluralidad de péptidos monoméricos A β_{1-42} , pero muestra una unión sustancialmente más débil con el péptido monomérico A β 1-28 y esencialmente ninguna unión con el péptido monomérico A β 17-40.

En otro aspecto específico, se describe un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con el péptido monomérico A β 1-40, particularmente con el péptido monomérico A β 1-40 y con péptido amiloide polimérico soluble y/u oligomérico que comprende una pluralidad de péptidos monoméricos A β_{1-42} , pero muestra una unión intermedia con el péptido monomérico A β 1-42 y esencialmente ninguna unión con el péptido monomérico A β 17-40.

En otro aspecto específico, se describe un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con el péptido monomérico A β 1-40, particularmente con el péptido monomérico A β 1-40 y con péptido amiloide polimérico soluble y/u oligomérico que comprende una pluralidad de péptidos monoméricos

A β ₁₋₄₂, pero muestra una unión sustancialmente más débil con el péptido monomérico A β 1-28 y una unión intermedia con el péptido monomérico A β ₁₋₄₂ y esencialmente ninguna unión con el péptido monomérico A β 17-40.

También se describe un anticuerpo como se describe en la presente memoria, que tras su coincubación con un péptido monomérico A β en una forma monomérica y/o una oligomérica que tiene al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, aún más particularmente al menos 40 restos de aminoácidos en una forma monomérica y/u oligomérica, pero especialmente con un péptido monomérico A β ₁₋₄₂ y/o un péptido oligomérico que comprende una pluralidad de dichos péptidos monoméricos A β ₁₋₄₂, particularmente a una relación de concentración molar de anticuerpo y A β ₁₋₄₂ de hasta 1:1000, pero especialmente a una relación de concentración molar de entre 1:10 y 1:100, inhibe la agregación de los monómeros y/u oligómeros de A β en fibrillas poliméricas moleculares altas.

En particular, la coincubación del anticuerpo con péptidos monoméricos y/u oligoméricos amiloides se lleva a cabo durante 24 horas a 60 horas, particularmente durante 30 horas a 50 horas, más particularmente durante 48 horas a una temperatura de entre 28 °C y 40 °C, particularmente de entre 32 °C y 38 °C, más particularmente a 37 °C.

En un aspecto específico, se consigue coincubación con péptidos monoméricos y/u oligoméricos amiloides durante 48 horas a una temperatura de 37 °C.

En particular, el anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal como se describe en la presente memoria incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo se une preferentemente a péptido monomérico A β ₁₋₄₀ y, tras su coincubación con péptido monomérico y/u oligomérico A β ₁₋₄₀ inhibe la agregación de los monómeros de A β en fibrillas poliméricas de alto peso molecular.

En un aspecto, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, uniéndose dicho anticuerpo preferentemente con el péptido monomérico A β ₁₋₄₀ particularmente con el péptido monomérico A β 1-40 y con péptido amiloide polimérico soluble y/u oligomérico que comprende una pluralidad de péptidos monoméricos A β ₁₋₄₂, pero muestra una unión sustancialmente más débil con el péptido monomérico A β 1-28 y una unión intermedia con el péptido monomérico A β ₁₋₄₂ y esencialmente ninguna unión con el péptido monomérico A β 17-40 y, tras su coincubación con el péptido monomérico y/u oligomérico A β ₁₋₄₂ inhibe la agregación de los monómeros de A β en fibrillas poliméricas de alto peso molecular.

En un aspecto, se describe un anticuerpo particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, uniéndose dicho anticuerpo preferentemente con el péptido monomérico A β ₁₋₄₀ y también con péptidos oligoméricos y/o poliméricos A β ₁₋₄₂, pero muestra una unión sustancialmente más débil con el péptido monomérico A β ₁₋₂₈ y/o una unión intermedia con el péptido monomérico A β ₁₋₄₂ y/o esencialmente ninguna unión con el péptido monomérico A β 17-40 y, tras su coincubación con el péptido monomérico y/u oligomérico A β ₁₋₄₂ inhibe la agregación de los monómeros y/u oligómeros A β en fibrillas poliméricas de alto peso molecular.

En un aspecto el anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se ha descrito anteriormente en la presente memoria inhibe la agregación de los monómeros A β en fibrillas poliméricas de alto peso molecular en al menos 40%, al menos 50%, particularmente al menos 60%, particularmente al menos 65%, más particularmente al menos 75%, aún más particularmente al menos 80%, pero especialmente al menos 85%-90%, o más en comparación con los monómeros peptídicos amiloides respectivos incubados en tampón (control).

En un aspecto, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, uniéndose dicho anticuerpo preferentemente con el péptido monomérico A β ₁₋₄₀ y también con péptidos oligoméricos y/o poliméricos A β ₁₋₄₂, pero muestra una unión sustancialmente más débil con el péptido monomérico A β 1-28 y/o una unión intermedia con el péptido monomérico A β ₁₋₄₂ y/o esencialmente ninguna unión con el péptido monomérico A β 17-40 y, tras su coincubación con el péptido monomérico y/u oligomérico A β ₁₋₄₂ durante 24 horas a una temperatura de 37 °C inhibe la agregación de los monómeros y/u oligómeros A β en fibrillas poliméricas de alto peso molecular en al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, particularmente al menos 60%, particularmente al menos 65%, más particularmente al menos 75%, aún más particularmente al menos 80%, pero especialmente al menos 85%-90% a una relación de concentración molar de anticuerpo y A β ₁₋₄₂ de 1:100 y en al menos 40%, al menos 50%, particularmente al menos 60%, particularmente al menos 65%, más particularmente al menos 75%, aún más particularmente al menos 80%, pero especialmente al menos 85%-90% a una relación de concentración molar de anticuerpo y A β ₁₋₄₂ de 1:10 como se determina por un ensayo fluorescente de tioflavina T (Th-T), particularmente un ensayo fluorescente de tioflavina T (Th-T) como se describe en los Ejemplos 1.4 y 2.4 posteriores.

La unión de los anticuerpos como se describen en la presente memoria con péptidos monoméricos y/u oligoméricos amiloidogénicos pero, particularmente, con la forma amiloide (1-42) conduce a inhibición de la agregación de péptidos amiloidogénicos monoméricos y/u oligoméricos en fibrillas o filamentos de alto peso molecular. Mediante la inhibición de la agregación de péptidos monoméricos y/u oligoméricos amiloidogénicos los anticuerpos desvelados son capaces de prevenir o ralentizar la formación de placas amiloides, particularmente la forma amiloide (1-42), que se sabe que se hace insoluble por un cambio de conformación secundaria y que es la parte principal de las placas amiloides en cerebros de animales o seres humanos enfermos.

El potencial de inhibición de la agregación del anticuerpo desvelado puede determinarse por cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo por ultracentrifugación en gradiente de densidad seguido de un análisis de sedimentación de SDS-PAGE en un gradiente preformado y/o mediante un ensayo fluorescente de tioflavina T (Th-T).

En un aspecto, el anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, como se describe en la presente memoria incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tras su coincubación, particularmente en una relación de concentración molar de entre 1:10 y 1:1000, más particularmente en una relación de 1:100 con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos preformados de alto peso molecular formados por la agregación de péptidos monoméricos y/u oligoméricos A β que tienen al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, aún más particularmente al menos 40 restos de aminoácidos en una forma monomérica y/u oligomérica que comprende una pluralidad de dichos péptidos monoméricos, pero especialmente péptidos monoméricos y/u oligoméricos A β ₁₋₄₂, es capaz de disgregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en al menos 20%, al menos 30%, al menos 35%, particularmente al menos 40%, más particularmente al menos 50%, aún más particularmente al menos 60%, pero especialmente al menos 70% o más.

En un aspecto específico, la inhibición de la agregación y el potencial de disgregación del anticuerpo, respectivamente, se determinan por ultracentrifugación en gradiente de densidad seguido de un análisis de sedimentación de SDS-PAGE en un gradiente preformado.

Como alternativa, la inhibición de la agregación y el potencial de disgregación del anticuerpo, respectivamente, se determinan por ensayo fluorescente de tioflavina T (Th-T).

En otro aspecto específico, el anticuerpo desvelado se coincuba con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados durante 12 horas a 36 horas, particularmente durante 18 horas a 30 horas, más particularmente durante 24 horas a una temperatura de entre 28 °C y 40 °C, particularmente entre 32 °C y 38 °C, más particularmente a 37 °C.

En particular, la coincubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados se realiza durante 24 horas a una temperatura de 37 °C.

En un aspecto, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, como se describe en la presente memoria, uniéndose dicho anticuerpo preferentemente con el péptido monomérico A β ₁₋₄₀, particularmente con el péptido monomérico A β 1-40 y con péptido amiloide polimérico y/u oligomérico soluble que comprende una pluralidad de péptidos monoméricos A β ₁₋₄₂, pero muestra una unión sustancialmente más débil con el péptido monomérico A β 1-28 y una unión intermedia con el péptido monomérico 1-42 y esencialmente ninguna unión con el péptido monomérico A β 17-40 y, tras su coincubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptidos monoméricos y/u oligoméricos A β ₁₋₄₂ es capaz de disgregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados, particularmente en al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, particularmente al menos 30%, más particularmente al menos 40%, aún más particularmente al menos 50%, pero especialmente al menos 60% y más particularmente 70% o más.

En particular, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, como se describe en la presente memoria, uniéndose dicho anticuerpo preferentemente con el péptido monomérico A β ₁₋₄₀ y también con péptidos oligoméricos y/o poliméricos A β ₁₋₄₂, pero muestra una unión sustancialmente más débil con el péptido monomérico A β 1-28 y/o una unión intermedia con el péptido monomérico 1-42 y/o esencialmente ninguna unión con el péptido monomérico A β 17-40 y, tras la coincubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptidos monoméricos y/u oligoméricos A β ₁₋₄₂ es capaz de disgregar las fibrillas o los filamentos poliméricos preformados, particularmente en al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, particularmente al menos 30%, más particularmente al menos 40%, aún más particularmente al menos 50%, pero especialmente al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o más.

En un aspecto, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, como se describe en la presente memoria, uniéndose dicho anticuerpo preferentemente con el péptido monomérico A β ₁₋₄₀ y también con

- péptidos oligoméricos y/o poliméricos $A\beta_{1-42}$, pero muestra una unión sustancialmente más débil con el péptido monomérico $A\beta$ 1-28 y/o una unión intermedia con el péptido monomérico $A\beta_{1-42}$ y/o esencialmente ninguna unión con el péptido monomérico $A\beta$ 17-40 y tras su coincubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptido monomérico y/u oligomérico $A\beta_{1-42}$ durante 24 horas a una temperatura de 37 °C da como resultado una disgregación de las fibrillas o los filamentos poliméricos preformados en al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, particularmente al menos 55%, particularmente al menos 60%, más particularmente al menos 70% y más, a una relación de concentración molar de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$ de 1:100 y en al menos 40%, al menos 50%, particularmente al menos 60%, particularmente al menos 65%, más particularmente al menos 75%, aún más particularmente al menos 80%, pero especialmente al menos 85%-90% a una relación de concentración molar de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$ de 1:10 como se determina por un ensayo fluorescente de tioflavina T (Th-T), particularmente un ensayo fluorescente de tioflavina T (Th-T) como se describe en los Ejemplos 1.4 y 2.4 posteriores.
- Tanto durante la inhibición de la agregación de proteína amiloide como durante la disgregación de fibrillas o filamentos poliméricos amiloidogénicos los anticuerpos desvelados son capaces de prevenir o ralentizar la formación de placas amiloides lo que conduce a un alivio de los síntomas asociados con la enfermedad y un retardo o inversión de su progresión.
- En consecuencia, en un aspecto adicional, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria, siendo dicho anticuerpo capaz de reducir la cantidad total de $A\beta$ en el cerebro de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con concentración aumentada de $A\beta$ en el cerebro.
- En otro aspecto se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria, siendo dicho anticuerpo capaz de romper placas reduciendo de este modo la carga de placas en el cerebro de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con una carga de placas aumentada en el cerebro. Un anticuerpo de acuerdo con la invención incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo reduce la carga de placas en el cerebro en al menos 10%, al menos 20%, particularmente al menos 25%, más particularmente al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, particularmente al menos 60%, particularmente al menos 65%, más particularmente al menos 75%, aún más particularmente al menos 80%, pero especialmente al menos 85%-90%.
- En otro aspecto más se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria, siendo dicho anticuerpo capaz de solubilizar placas lo que se asocia con una reducción de la cantidad de placas en el cerebro de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padezca una enfermedad o afección asociada con un aumento de la carga de placas en el cerebro. Un anticuerpo como se describe en la presente memoria incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo reduce la cantidad de placas en el cerebro en al menos 10%, particularmente al menos 15%, más particularmente al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, particularmente al menos 60%, particularmente al menos 65%, más particularmente al menos 75%, aún más particularmente al menos 80%, pero especialmente al menos 85%-90%.
- Debe entenderse que el anticuerpo desvelado puede mostrar una, dos o más de las propiedades específicas descritas en la presente memoria en diversas combinaciones.
- Por ejemplo, en un aspecto, los anticuerpos, pero especialmente anticuerpos monoclonales incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, como se describe en la presente memoria son biespecíficos o bieficaces porque muestran tanto una propiedad de inhibición de la agregación como una propiedad de disgregación como se define en la presente memoria, particularmente emparejadas con un alto grado de sensibilidad conformacional.
- En un aspecto, un anticuerpo como se describe en la presente memoria es biespecífico y bieficaz y, tras su coincubación con un péptido monomérico y/u oligomérico $A\beta$ que tiene al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, aún más particularmente al menos 40 restos de aminoácidos en una forma monomérica y/u oligomérica que comprende una pluralidad de dichos péptidos monoméricos, pero especialmente con un péptido monomérico y/u oligomérico $A\beta_{1-42}$, inhibe la agregación de los monómeros $A\beta$ en fibrillas poliméricas de alto peso molecular y, además, tras su coincubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptidos monoméricos y/u oligoméricos $A\beta$ que tienen al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, aún más particularmente al menos 40 restos de aminoácidos en una forma monomérica y/u oligomérica que comprende una pluralidad de dichos péptidos monoméricos, pero especialmente péptidos monoméricos y/u oligoméricos $A\beta_{1-42}$, es capaz de disgregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados.

En particular, la coincubación con péptidos monoméricos y/u oligoméricos amiloides y fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados, respectivamente, tienen lugar a una relación de concentración molar de hasta 1:1000, pero especialmente a una relación de concentración molar de entre 1:10 y 1:100, particularmente a una relación de concentración molar de 1:100.

La coincubación de un anticuerpo como se describe en la presente memoria con péptidos monoméricos y/u oligoméricos amiloides se lleva a cabo durante 24 horas a 60 horas, particularmente durante 30 horas a 50 horas, más particularmente durante 48 horas a una temperatura de entre 28 °C y 40 °C, particularmente de entre 32 °C y 38 °C, más particularmente a 37 °C, mientras que la coincubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados amiloides se lleva a cabo durante 12 horas a 36 horas, particularmente durante 18 horas a 30 horas, más particularmente durante 24 horas a una temperatura de entre 28 °C y 40 °C, particularmente de entre 32 °C y 38 °C, más particularmente a 37 °C.

En un aspecto, un anticuerpo biespecífico o bieficaz como se describe en la presente memoria, es capaz de disgregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, particularmente al menos 55%, particularmente al menos 65%, más particularmente al menos 70%, aún más particularmente al menos 70%, pero especialmente al menos 75%-80%.

En un aspecto un anticuerpo biespecífico o bieficaz como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo inhibe la agregación de péptidos monoméricos y/u oligoméricos A β que tienen 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, aún más particularmente al menos 40 restos de aminoácidos en una forma monomérica y/u oligomérica que comprende una pluralidad de dichos péptidos monoméricos, pero especialmente péptidos monoméricos y/u oligoméricos A β ₁₋₄₂ en al menos 40%, al menos 50%, particularmente al menos 65%, más particularmente al menos 75%, aún más particularmente al menos 80%, pero especialmente al menos 85%-90%, o más en comparación con los monómeros peptídicos amiloides respectivos incubados en tampón (control).

En un aspecto un anticuerpo biespecífico o bieficaz como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, muestra alta especificidad por péptidos monoméricos A β ₁₋₄₀, particularmente por el péptido monomérico A β 1-40 y por péptido amiloide polimérico soluble y/u oligomérico que comprende una pluralidad de péptidos monoméricos A β ₁₋₄₂, pero esencialmente ninguna o solamente de pequeña a moderada reactividad cruzada con un monómero de péptido amiloide seleccionado del grupo que consiste en los péptidos monoméricos A β ₁₋₂₈, A β ₁₇₋₄₀, A β ₁₋₃₈, A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₄₁ y/o A β ₁₋₄₂.

En un aspecto específico se describe un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, siendo dicho anticuerpo hasta 1000 veces, particularmente de 50 a 100 veces, más particularmente de 80 a 100 veces, pero especialmente 100 veces más sensible a péptido amiloide A β ₁₋₄₀ en comparación con A β ₁₋₂₈, A β ₁₇₋₄₀, A β ₁₋₃₈, A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₄₁, A β ₁₋₄₂ y capaz de inhibir, *in vitro* e *in vivo*, la agregación de péptidos monoméricos y/u oligoméricos amiloidogénicos.

En un aspecto, un anticuerpo biespecífico o bieficaz como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, se une preferentemente al péptido monomérico A β ₁₋₄₀ y también a péptidos oligoméricos y/o poliméricos A β ₁₋₄₂, pero muestra una unión sustancialmente más débil con el péptido monomérico A β 1-28 y/o una unión intermedia con el péptido monomérico 1-42 y/o esencialmente ninguna unión con el péptido monomérico A β 17-40 y, tras su coincubación con el péptido monomérico y/u oligomérico A β ₁₋₄₂ durante 24 horas a una temperatura de 37 °C inhibe la agregación de los monómeros y/u oligómeros A β en fibrillas poliméricas de alto peso molecular en al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, particularmente al menos 55%, particularmente al menos 65%, más particularmente al menos 70%, a una relación de concentración molar de anticuerpo y A β ₁₋₄₂ de 1:100 y en al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, particularmente al menos 60%, particularmente al menos 65%, más particularmente al menos 75%, aún más particularmente al menos 80%, pero especialmente al menos 85%-90% a una relación de concentración molar de anticuerpo A β ₁₋₄₂ de 1:10 y tras su coincubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptido monomérico y/u oligomérico A β ₁₋₄₂ durante 24 horas a una temperatura de 37 °C da como resultado una disgregación de las fibrillas o los filamentos poliméricos preformados en al menos 10% a una relación de concentración molar de anticuerpo A β ₁₋₄₂ de 1:100 y en al menos 20% a una relación de concentración molar de anticuerpo A β ₁₋₄₂ de 1:10 como se determina por un ensayo fluorescente de tioflavina T (Th-T), particularmente un ensayo fluorescente de tioflavina T (Th-T) como se describe en los Ejemplos 1.4 y 2.4 posteriores.

En otro aspecto específico un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tiene una

sensibilidad de unión alta con el péptido amiloide A β ₁₋₄₀ y es capaz de detectar péptidos amiloides poliméricos y/u oligoméricos solubles A β ₁₋₄₂ en una concentración de hasta 0,01 μ g, pero particularmente en un intervalo de concentración de entre 0,5 μ g y 0,01 μ g, más particularmente entre 0,1 μ g y 0,01 μ g, pero especialmente en una concentración de 0,01 μ g.

En un aspecto se describe un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, habiéndose inducido dicho anticuerpo contra una construcción antigénica supramolecular que comprende un péptido antigénico correspondiente a la secuencia de aminoácidos del péptido β amiloide, A β ₁₋₁₅, modificado con restos de ácido palmítico hidrófobos, en el que dicho resto hidrófobo está unido covalentemente con cada extremo mediante un aminoácido tal como, por ejemplo, lisina o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado capaz de actuar como una molécula enlazadora.

El anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo reconoce y se une a un epítipo conformacional.

En un aspecto se describe una región variable de cadena ligera que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias dadas en SEC ID N°: 7, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDR de cadena ligera que tienen las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 9-11, pero especialmente todas las CDR incluidas en sus regiones marco conservadas naturales.

En un aspecto se describe una región variable de cadena pesada que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias dadas en SEC ID N°: 8, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDR de cadena pesada que tienen las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 12-14, pero especialmente todas las CDR incluidas en sus regiones marco conservadas naturales.

Además, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria en el que dicho anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias dadas en SEC ID N°: 7, o una parte funcional del mismo que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDR de cadena ligera que tienen las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 9-11, pero especialmente todas las CDR incluidas en sus regiones marco conservadas naturales.

Además, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria en el que dicho anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias dadas en SEC ID N°: 8, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDR de cadena pesada que tienen las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 12-14, pero especialmente todas las CDR incluidas en sus regiones marco conservadas naturales.

En un aspecto, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria, en el que dicho anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada y cadena ligera que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias dadas en SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 8, o una parte funcional del mismo que comprende parte de o todas las CDR de cadena pesada y ligera que tienen las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 9-14.

La invención describe además un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, comprendiendo dicho anticuerpo una secuencia polipeptídica representada en SEC ID N°: 7 y/o SEC ID N°: 8. También se describe el anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 7-8.

También se describe un anticuerpo cuya secuencia se ha alterado introduciendo al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 o más sustituciones conservativas en la secuencia de SEC ID N°: 7-8, de modo que el anticuerpo mantenga esencialmente su funcionalidad completa.

En un aspecto se describe un fragmento peptídico que comprende la cadena ligera CDR1 como se proporciona en SEC ID N°: 9 y/o la cadena ligera CDR2 como se proporciona en SEC ID N°: 10 y/o la CDR3 de cadena ligera como se proporciona en SEC ID N°: 11.

En un aspecto se describe un fragmento peptídico que comprende la CDR1 de cadena pesada como se proporciona en SEC ID N°: 12 y/o la CDR2 de cadena pesada como se proporciona en SEC ID N°: 13 y/o la CDR3 de cadena pesada como se proporciona en SEC ID N°: 14.

5 En un aspecto se describe la CDR1 de cadena ligera como se proporciona en SEC ID N°: 9.

También se describe la CDR2 de cadena ligera como se proporciona en SEC ID N°: 10.

También se describe la CDR3 de cadena ligera como se proporciona en SEC ID N°: 11.

10

También se describe la CDR1 de cadena pesada como se proporciona en SEC ID N°: 12.

También se describe la CDR2 de cadena pesada como se proporciona en SEC ID N°: 13.

15 También se describe la CDR3 de cadena pesada como se proporciona en SEC ID N°: 14.

En un aspecto se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena ligera que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias proporcionadas en SEC ID N°: 7, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDR de cadena ligera que tienen las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 9-11, pero especialmente todas las CDR incluidas en sus regiones marco conservadas naturales. En una realización, la invención se refiere a un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena pesada que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias proporcionadas en SEC ID N°: 8, o una parte funcional del mismo que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDR de cadena pesada que tienen las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 12-14, pero especialmente todas las CDR incluidas en sus regiones marco conservadas naturales.

20

25

30

En un aspecto se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria en el que dicho anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias proporcionadas en SEC ID N°: 7, o una parte funcional de las mismas que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDR de cadena ligera que tienen las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 9-11, pero especialmente todas las CDR incluidas en sus regiones marco conservadas naturales.

35

40

En un aspecto se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria en el que dicho anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias proporcionadas en SEC ID N°: 8, o una parte funcional del mismo que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDR de cadena pesada que tienen las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 12-14, pero especialmente todas las CDR incluidas en sus regiones marco conservadas naturales.

45

En un aspecto, se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria, en el que dicho anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera y cadena pesada que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias proporcionadas en SEC ID N°: 7 y en SEC ID N°: 8, o una parte funcional del mismo que comprende las CDR de cadena ligera y cadena pesada que tienen las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 9-14.

50

55

En otro aspecto, se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo como se describe en la presente memoria, pero particularmente una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo monoclonal que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 7-8. En particular estas secuencias polinucleotídicas son SEC ID N°: 15-16.

60

En otro aspecto, se describe un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo monoclonal que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 7-8. En particular se describe un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con las secuencias de nucleótidos SEC ID N°: 15-16.

65

En particular, la posición 52 de SEC ID N°: 8 puede ser cualquier aminoácido. En un aspecto adicional, la posición

52 puede ser un resto de tirosina, serina o cisteína. Más particularmente la posición 52 es un resto de cisteína.

En un aspecto específico se describe un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo teniendo dicho anticuerpo las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma EJ1A9, depositada el 25 de mayo de 2007 y a la que se dio el número de depósito DSM ACC2844.

En particular se describe un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo producido por la línea celular de hibridoma EJ1A9, depositada el 25 de mayo de 2007 y a la que se dio el número de depósito DSM ACC2844.

En particular, se describe un epítipo de A β que se une a un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, habiéndose inducido dicho anticuerpo contra una construcción antigénica supramolecular que comprende un péptido antigénico correspondiente a la secuencia de aminoácidos del péptido β amiloide, A β ₁₋₁₅, modificado con restos de ácido palmítico hidrófobos, en el que dicho resto hidrófobo está unido covalentemente a cada extremo mediante un aminoácido tal como, por ejemplo, lisina o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado capaz de actuar como una molécula enlazadora. También se describe el epítipo A β que se une al anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3.

En un aspecto se describe un anticuerpo, como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con péptidos monoméricos A β que tienen al menos 10, particularmente al menos 20, más particularmente al menos 30, aún más particularmente al menos 40 restos de aminoácidos y/o con péptidos amiloides poliméricos solubles que comprenden una pluralidad de dichos péptidos monoméricos amiloides y/o con fibras o fibrillas amiloides que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos pero especialmente con un péptido monomérico A β ₁₋₄₂ y péptidos A β solubles poliméricos que comprenden una pluralidad de péptidos monoméricos A β ₁₋₄₂ y fibrillas o fibras A β que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos y esencialmente no muestra unión con péptidos monoméricos A β que tienen 8 o menos restos de aminoácidos.

En un aspecto específico, se describe un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con péptidos monoméricos A β que tienen al menos 30, aún más particularmente al menos 40 restos de aminoácidos y/o con péptidos amiloides poliméricos solubles que comprenden una pluralidad de dichos péptidos monoméricos amiloides y/o con fibras o fibrillas amiloides que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos pero especialmente con un péptido monomérico A β ₁₋₄₂ y péptidos A β solubles poliméricos que comprenden una pluralidad de péptidos monoméricos A β ₁₋₄₂ y fibrillas o fibras A β que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos pero esencialmente no muestra unión con el péptido monomérico A β 17-40.

En otro aspecto específico, se describe un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con el péptido monomérico A β ₁₋₄₂ y péptidos A β solubles poliméricos que comprenden una pluralidad de péptidos monoméricos A β ₁₋₄₂ y fibrillas o fibras A β que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil con el péptido monomérico A β 1-28.

En otro aspecto específico, se describe un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con el péptido monomérico A β ₁₋₄₂ y péptidos A β solubles poliméricos que comprenden una pluralidad de péptidos monoméricos A β ₁₋₄₂ y fibrillas o fibras A β que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil con el péptido monomérico A β 1-28 y esencialmente ninguna unión con el péptido monomérico A β 17-40.

En particular, el anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal como se describe en la presente memoria, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, se une al péptido monomérico A β ₁₋₄₂ y péptidos A β solubles poliméricos que comprenden una pluralidad de péptidos monoméricos A β ₁₋₄₂ y fibrillas o fibras A β que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil con el péptido monomérico A β 1-28 y/o esencialmente ninguna unión con el péptido monomérico A β 17-40 y, tras la incubación con el péptido A β ₁₋₄₂ monomérico y/u oligomérico, inhibe la agregación de los monómeros A β con fibrillas poliméricas de alto peso molecular.

En un aspecto, el anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal como se describe en la presente memoria incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, inhibe la agregación de los monómeros y/u oligómeros de A β con fibrillas poliméricas de alto peso molecular en al menos 20%, al menos 30%, particularmente al menos 40%, particularmente al menos 50%, más particularmente al menos 60%, aún más particularmente al menos 70%, pero especialmente al menos 80%-90%, o más en comparación con los monómeros

peptídicos amiloides respectivos incubados en tampón (control).

En un aspecto, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal como se describe en la presente memoria incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con el péptido monomérico $A\beta_{1-42}$ y péptidos $A\beta$ solubles poliméricos que comprenden una pluralidad de péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$ y fibrillas o fibras $A\beta$ que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil con el péptido monomérico $A\beta$ 1-28 y/o esencialmente ninguna unión con el péptido monomérico $A\beta$ 17-40 y, tras la coincubación con el péptido monomérico y/u oligomérico $A\beta_{1-42}$ durante 24 horas a una temperatura de 37 °C inhibe la agregación de los monómeros de $A\beta$ con fibrillas poliméricas de alto peso molecular en al menos 20%, al menos 30%, particularmente al menos 40%, particularmente al menos 50%, más particularmente al menos 60%, aún más particularmente al menos 70% a una relación de concentración molar de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$ de 1:100 y en al menos 50%, más particularmente al menos 60%, más particularmente al menos 65%, aún más particularmente el menos 70% a una relación de concentración molar de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$ de 1:10 como se determina por ensayo fluorescente de tioflavina T (Th-T), particularmente un ensayo fluorescente de tioflavina T (Th-T) como se describe en los Ejemplos 1.4 y 2.4.

En particular se describe un anticuerpo, particularmente el anticuerpo monoclonal como se describe en la presente memoria incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con el péptido monomérico $A\beta_{1-42}$ y los péptidos poliméricos solubles $A\beta$ que comprenden una pluralidad de péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$ y fibrillas o fibras $A\beta$ que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil con el péptido monomérico $A\beta$ 1-28 y/o esencialmente ninguna unión con el péptido monomérico $A\beta$ 17-40 y, tras la coincubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptidos monoméricos y/u oligoméricos $A\beta_{1-42}$ es capaz de disgregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados, particularmente en al menos 10%, al menos 20%, particularmente al menos 30%, más particularmente al menos 40%, aún más particularmente al menos 50%, pero especialmente al menos 60% o más.

En un aspecto se describe un anticuerpo particularmente un anticuerpo monoclonal como se describe en la presente memoria incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con el péptido monomérico $A\beta_{1-42}$ y péptidos $A\beta$ solubles poliméricos que comprenden una pluralidad de péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$ y fibrillas o fibras $A\beta$ que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil con el péptido monomérico $A\beta$ 1-28 y/o esencialmente ninguna unión con el péptido monomérico $A\beta$ 17-40 y, tras la coincubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptido monomérico y/u oligomérico $A\beta_{1-42}$ durante 24 horas a una temperatura de 37 °C da como resultado una disgregación de las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, particularmente al menos 40%, particularmente al menos 50%, más particularmente al menos 60%, aún más particularmente al menos 70%, a una relación de concentración molar de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$ de 1:100 y en al menos 40%, particularmente al menos 50%, más particularmente al menos 60%, aún más particularmente al menos 70% a una relación de concentración molar de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$ de 1:10 como se determina por un ensayo fluorescente de tioflavina T (Th-T), particularmente un ensayo fluorescente de tioflavina T (Th-T) como se describe en los Ejemplos 1.4 y 2.4 posteriores.

Mediante la inhibición de la agregación de proteína amiloide y/o mediante la disgregación de fibrillas o filamentos poliméricos amiloidogénicos los anticuerpos como se describe en la presente memoria son capaces de prevenir o ralentizar la formación de placas amiloides lo que conduce a un alivio de los síntomas asociados con la enfermedad y un retardo o inversión de su progresión.

En consecuencia, en un aspecto adicional se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria, siendo dicho anticuerpo capaz de reducir la cantidad total de $A\beta$ en el cerebro de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con aumento de la concentración de $A\beta$ en el cerebro.

En otro aspecto, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria, siendo dicho anticuerpo capaz de romper placas reduciendo de este modo la carga de placas en el cerebro de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con un aumento de la carga de placas en el cerebro. Un anticuerpo como se describe en la presente memoria, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, reduce la carga de placas en el cerebro en al menos 20%, particularmente al menos 25%, más particularmente al menos 30%, aún más particularmente más de 30%.

En otro aspecto más se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier

anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria, siendo dicho anticuerpo capaz de solubilizar placas, lo que se asocia con una reducción de la cantidad de placas en el cerebro de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con un aumento de la carga de placas en el cerebro. Un anticuerpo de acuerdo con la invención, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, reduce la cantidad de placas en el cerebro en al menos 10%, particularmente al menos 15%, más particularmente al menos 20%.

Debe entenderse que un anticuerpo como se describe en la presente memoria puede mostrar una, dos o más de las propiedades específicas descritas en la presente memoria en diversas combinaciones.

Por ejemplo, en un aspecto se desvelan anticuerpos, pero especialmente anticuerpos monoclonales, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, siendo dichos anticuerpos biespecíficos o bieficaces porque muestran tanto una propiedad de inhibición de la agregación como una propiedad de disgregación como se define en la presente memoria, particularmente acompañada de un alto grado de sensibilidad conformacional.

En un aspecto, un anticuerpo como se describe en la presente memoria es biespecífico y bieficaz y, tras la coincubación con un péptido monomérico y/u oligomérico A β que tiene al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, aún más particularmente al menos 40 restos de aminoácidos, pero especialmente con un péptido monomérico y/u oligomérico A β_{1-42} , inhibe la agregación de los monómeros A β con fibrillas poliméricas de alto peso molecular y, además, tras la coincubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptidos monoméricos y/u oligoméricos A β que tienen al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, aún más particularmente al menos 40 restos de aminoácidos y, pero especialmente péptidos monoméricos y/u oligoméricos A β_{1-42} , es capaz de disgregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados.

En particular, la coincubación con péptidos monoméricos y/u oligoméricos amiloides y fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados, respectivamente, tiene lugar a una relación de concentración molar de hasta 1:1000, pero especialmente a una relación de concentración molar de entre 1:10 y 1:100, particularmente a una relación de concentración molar de 1:100.

La coincubación de un anticuerpo como se describe en la presente memoria con péptidos monoméricos y/u oligoméricos amiloides se lleva a cabo durante 24 horas a 60 horas, particularmente durante 30 horas a 50 horas, más particularmente durante 48 horas a una temperatura de entre 28 °C y 40 °C, particularmente de entre 32 °C y 38 °C, más particularmente a 37 °C, mientras que la coincubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados amiloides se lleva a cabo durante 12 horas a 36 horas, particularmente durante 18 horas a 30 horas, más particularmente durante 24 horas a una temperatura de entre 28 °C y 40 °C, particularmente de entre 32 °C y 38 °C, más particularmente a 37 °C.

En un aspecto, un anticuerpo biespecífico o bieficaz como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, es capaz de disgregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, particularmente al menos 40%, particularmente al menos 50%, más particularmente al menos 60%, aún más particularmente al menos 70%.

En un aspecto, un anticuerpo biespecífico o bieficaz como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, es capaz de inhibir la agregación de péptidos monoméricos y/u oligoméricos A β que tienen al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, aún más particularmente al menos 40 restos de aminoácidos, pero especialmente péptidos monoméricos y/u oligoméricos A β_{1-42} en al menos 30%, particularmente al menos 40%, particularmente al menos 50%, más particularmente al menos 60%, aún más particularmente al menos 70%, pero especialmente al menos 80%-90%, o más en comparación con los monómeros peptídicos amiloides respectivos incubados en tampón (control).

En un aspecto se describe un anticuerpo biespecífico o bieficaz como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, mostrando dicho anticuerpo alta especificidad por péptidos monoméricos A β_{1-42} pero que esencialmente no muestra o muestra solamente reactividad cruzada pequeña con un monómero peptídico amiloide seleccionado del grupo que consiste en péptidos monoméricos A β_{1-28} y A β_{17-40} .

En un aspecto específico se describe un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, siendo dicho anticuerpo hasta 1000 veces, particularmente de 50 a 1000 veces, más particularmente de 80 a 100 veces, pero especialmente 100 veces más sensible al péptido amiloide A β_{1-42} en comparación con A β_{1-28} y/o A β_{17-40} .

y es capaz de inhibir, *in vitro* e *in vivo*, la agregación de péptidos monoméricos y/u oligoméricos amiloidogénicos y/o de disgregar fibrillas o filamentos poliméricos preformados.

En un aspecto se describe un anticuerpo biespecífico o bieficaz como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con el péptido monomérico $A\beta_{1-42}$ y péptidos $A\beta$ solubles poliméricos que comprende una pluralidad de péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$ y fibrillas o fibras $A\beta$ que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos, peor muestra una unión sustancialmente más débil con el péptido monomérico $A\beta$ 1-28 y/o esencialmente ninguna unión con el péptido monomérico $A\beta$ 17-40 y, tras la coincubación con el péptido monomérico y/u oligomérico $A\beta_{1-42}$ durante 24 horas a una temperatura de 37 °C inhibe la agregación de los monómeros $A\beta$ con fibrillas poliméricas de alto peso molecular en al menos 30% a una relación de concentración molar de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$ de 1:100 y en al menos 65% a una relación de concentración molar de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$ de 1:10 y, tras la coincubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptido monomérico y/u oligomérico $A\beta_{1-42}$ durante 24 horas a una temperatura de 37 °C da como resultado una disgregación de las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en al menos 20%, a una relación de concentración molar de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$ de 1:100 y en al menos 50% a una relación de concentración molar de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$ de 1:10 como se determina por un ensayo fluorescente de tioflavina T (Th-T), particularmente un ensayo fluorescente de tioflavina T (Th-T) como se describe en los Ejemplos 1.4 y 2.4 posteriores.

En otro aspecto específico se describe un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, teniendo dicho anticuerpo una alta sensibilidad de unión con el péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ y siendo capaz de detectar fibras de $A\beta_{1-42}$ en una concentración de hasta 0,01 μg , pero particularmente en un intervalo de concentración entre 0,5 μg y 0,01 μg , más particularmente entre 0,1 μg y 0,01 μg , pero especialmente en una concentración de 0,01 μg .

En un aspecto se describe un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, habiéndose inducido dicho anticuerpo contra una construcción antigénica supramolecular que comprende un péptido antigénico correspondiente a la secuencia de aminoácidos del péptido β amiloide $A\beta_{22-35}$ y $A\beta_{29-40}$, respectivamente, modificado con un resto hidrófilo tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), en el que dicho resto hidrófilo está unido covalentemente con cada extremo mediante un aminoácido tal como, por ejemplo, lisina o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado capaz de actuar como una molécula enlazadora.

El anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo reconoce y se une a un epítipo conformacional.

En un aspecto se describe una región variable de cadena ligera que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias proporcionadas en SEC ID N°: 17 y SEC ID N°: 19, respectivamente, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDR de cadena ligera, pero especialmente todas las CDR incluidas en sus regiones marco conservadas naturales.

En un aspecto se describe una región variable de cadena pesada que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias proporcionadas en SEC ID N°: 18 y SEC ID N°: 20, respectivamente, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDR de cadena pesada, pero especialmente todas las CDR incluidas en sus regiones marco conservadas naturales.

Además, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria en el que dicho anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias proporcionadas en SEC ID N°: 17 y SEC ID N°: 19, respectivamente, o una parte funcional de la misma, que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDR de cadena ligera, pero especialmente todas las CDR incluidas en sus regiones marco conservadas naturales.

Además, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria en el que dicho anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias proporcionadas en SEC ID N°: 18 y SEC ID N°: 20, respectivamente, o una parte funcional del mismo que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDR de cadena pesada, pero especialmente todas las CDR incluidas en sus regiones marco conservadas naturales.

- En un aspecto, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria, en el que dicho anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera y cadena pesada que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias proporcionadas en SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 18 y SEC ID N°: 20, o una parte funcional del mismo que comprende parte de o todas las CDR de cadena pesada y ligera.
- También se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo comprendiendo dicho anticuerpo la secuencia polipeptídica como se proporciona en SEC ID N°: 17 y SEC ID N°: 19 y/o en SEC ID N°: 18 y SEC ID N°: 20. La invención se refiere además al anticuerpo monoclonal ACI-11-Ab-9 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 17-18 y ACI-12-Ab-11 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 19-20.
- También se describe un anticuerpo cuya secuencia se ha alterado introduciendo al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 o más sustituciones conservativas en las secuencias de SEC ID N°: 17-18 y SEC ID N°: 19-20, respectivamente, de modo que el anticuerpo mantiene esencialmente su funcionalidad completa.
- En un aspecto se describe un fragmento peptídico que comprende la CDR1 de cadena ligera como se proporciona en SEC ID N°: 21 y/o la CDR2 de cadena ligera como se proporciona en SEC ID N°: 22 y/o la CDR3 de cadena ligera como se proporciona en SEC ID N°: 23.
- En un aspecto se describe un fragmento peptídico que comprende la CDR1 de cadena pesada como se proporciona en SEC ID N°: 24 y/o la CDR2 de cadena pesada como se proporciona en SEC ID N°: 25 y/o la CDR3 de cadena pesada como se proporciona en SEC ID N°: 26.
- En un aspecto se describe la CDR1 de cadena ligera como se proporciona en SEC ID N°: 21.
- En un aspecto se describe la CDR2 de cadena ligera como se proporciona en SEC ID N°: 22.
- En un aspecto se describe la CDR3 de cadena ligera como se proporciona en SEC ID N°: 23.
- En un aspecto se describe la CDR1 de cadena pesada como se proporciona en SEC ID N°: 24.
- En un aspecto se describe la CDR2 de cadena pesada como se proporciona en SEC ID N°: 25.
- En un aspecto se describe la CDR3 de cadena pesada como se proporciona en SEC ID N°: 26.
- En un aspecto se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena ligera que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias proporcionadas en SEC ID N°: 17 y SEC ID N°: 19, respectivamente, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDR de cadena ligera como se representan en SEC ID N°: 21-23, pero especialmente todas las CDR incluidas en sus regiones marco conservadas naturales.
- En un aspecto se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena pesada que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias proporcionadas en SEC ID N°: 18 y SEC ID N°: 20, respectivamente, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDR de cadena pesada como se representan en SEC ID N°: 24-26, pero especialmente todas las CDR incluidas en sus regiones marco conservadas naturales.
- En un aspecto se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria, en el que dicho anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias proporcionadas en SEC ID N°: 17 y SEC ID N°: 19, respectivamente, o una parte funcional de las mismas que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDR de cadena ligera como se representan en SEC ID N°: 21-23, pero especialmente todas las CDR incluidas en sus regiones marco conservadas naturales.
- En un aspecto se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria en el que dicho anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85%, 86%, 87%, 88%, 89%,

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias proporcionadas en SEC ID N°: 18 y SEC ID N°: 20, respectivamente, o una parte funcional del mismo que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDR de cadena pesada como se representan en SEC ID N°: 24-26, pero especialmente todas las CDR incluidas en sus regiones marco conservadas naturales.

5 En un aspecto, se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria, en el que dicho anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera y cadena pesada que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85%, 86%,
10 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias proporcionadas en SEC ID N°: 17 y SEC ID N°: 19 y en SEC ID N°: 18 y SEC ID N°: 20, respectivamente, o una parte funcional del mismo que comprende las CDR de cadena ligera y cadena pesada como se representan en SEC ID N°: 21-26.

15 En otro aspecto, se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo como se describe en la presente memoria, pero particularmente una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo monoclonal que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 17-18 o un anticuerpo monoclonal que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 19-20. En particular, los polinucleótidos que codifican SEC ID N°: 17-18 y SEC ID N°: 19-20 son las SEC ID N°: 27-28 y SEC ID N°: 29-30, respectivamente.

20 En otro aspecto, se describe un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo monoclonal que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 17-18 o un anticuerpo monoclonal que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 19-20. En particular se proporciona un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con las secuencias de nucleótidos SEC ID N°: 27-28 o SEC ID N°: 29-30. En una realización específica, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier
25 anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, teniendo dicho anticuerpo las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma FG1F9E4, depositada el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2845.

30 En particular se describe un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo producido por la línea celular de hibridoma FG1F9E4, depositada el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2845.

35 En un aspecto específico se describe un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, teniendo dicho anticuerpo las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma FK2A6A6, depositada el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2846.

40 En particular, se describe un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo producido por la línea celular de hibridoma FK2A6A6, depositada el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2846.

45 En particular, se describe un epítipo de A β que se une a un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, habiéndose inducido dicho anticuerpo contra una construcción antigénica supramolecular que comprende un péptido antigénico correspondiente a la secuencia de aminoácidos del péptido β amiloide, A β ₂₂₋₃₅ y A β ₂₉₋₄₀, respectivamente, modificado con un resto hidrófilo tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), en el que dicho resto hidrófilo está unido covalentemente a cada extremo mediante un aminoácido tal como, por ejemplo, lisina o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado capaz de actuar como una molécula enlazadora. También se describe un epítipo de A β que se une al anticuerpo monoclonal ACI-11-Ab-9. También se describe un epítipo de A β que se une al anticuerpo monoclonal
50 ACI-12-Ab-11. En un aspecto, el anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, es capaz de reducir la cantidad total de A β soluble en el cerebro de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con aumento de las concentraciones de A β soluble en el cerebro.

55 En otro aspecto, un anticuerpo como se describe en la presente memoria es capaz de romper placas reduciendo de este modo la carga de placas en el cerebro de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con un aumento de la carga de placas en el cerebro.

60 En otro aspecto, el anticuerpo como se describe en la presente memoria es capaz de solubilizar placas, lo que se asocia con una reducción de la cantidad de placas en el cerebro de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con un aumento de la carga de placas en el cerebro.

65 También se desvelan en la presente memoria métodos y composiciones que comprenden un anticuerpo como se

describe en la presente memoria para la prevención y/o el tratamiento terapéutico y/o alivio de los efectos de enfermedades y trastornos en un sujeto que lo necesite que están provocados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide, inmunizando pasivamente a un sujeto, incluyendo un mamífero o un ser humano, con un anticuerpo como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. Estas enfermedades y trastornos incluyen, pero sin limitación, amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas amiloides incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tal como enfermedades que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tales como Enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpos de Lewy (LBD), síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch); el complejo de Demencia de Parkinson de Guam; así como otras enfermedades y afecciones que se basan en o se asocian con proteínas de tipo amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), miositis de cuerpos de inclusión (IBM), Diabetes de Aparición en Adultos y amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otras enfermedades, incluyendo enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como por ejemplo, degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma, el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide, el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular, la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular.

En un aspecto específico, el anticuerpo monoclonal de estos métodos es ACI-24-Ab-3 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 7-8 o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria.

En otro aspecto específico, el anticuerpo monoclonal de estos métodos es ACI-11-Ab-9 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 17-18 o ACI-12-Ab-11 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 9-10, respectivamente, o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria.

También se describe en la presente memoria una composición terapéutica que comprende un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, en una cantidad terapéuticamente eficaz.

En un aspecto, la composición farmacéutica comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable, particularmente en una cantidad terapéuticamente eficaz.

En un aspecto, se describe una composición como se describe en la presente memoria para su uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos que están provocados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo, pero sin limitación, amiloidosis, tumores y otras enfermedades, incluyendo enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociados con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual tales como, por ejemplo, degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual, lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma, el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide, el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular, la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular.

En un aspecto específico, el anticuerpo monoclonal usado es ACI-24-Ab-3 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 7-8 o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria.

En otro aspecto específico, el anticuerpo monoclonal usado se selecciona del anticuerpo monoclonal AC-11-Ab-9 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 17-18 y el anticuerpo monoclonal ACI-12-Ab-11 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 19-20 o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria.

Un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo puede administrarse en combinación con otras sustancias biológicamente activas u otros procedimientos de tratamiento para el tratamiento de enfermedades. Las otras sustancias biológicamente activas pueden ser parte de la misma composición que ya comprende un anticuerpo como se describe en la presente memoria, en forma de una mezcla, en la que el anticuerpo y la otra sustancia biológicamente activa están entremezcladas en o con el mismo disolvente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable o el anticuerpo y la otra sustancia biológicamente activa pueden proporcionarse por separado como parte de una composición separada, que puede ofrecerse por separado o junta en forma de un kit de partes.

El anticuerpo, particularmente el anticuerpo monoclonal como se describe en la presente memoria incluyendo

cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo puede administrarse a un sujeto que lo necesite al mismo tiempo que la otra sustancia o sustancias biológicamente activas, de forma intermitente o secuencial. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal como se describe en la presente memoria incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo puede administrarse simultáneamente con una primera sustancia biológicamente activa adicional o secuencialmente después o antes de la administración del anticuerpo. Si se elige un esquema de aplicación en el que se administra más de una sustancia biológicamente activa adicional junto con el al menos un anticuerpo descrito en la presente memoria, el compuesto o las sustancias pueden administrarse parcialmente de forma simultánea, parcialmente de forma secuencial en diversas combinaciones.

En un aspecto se describe una composición que comprende un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo en una cantidad terapéuticamente eficaz y una sustancia o compuesto biológicamente activo adicional, particularmente un compuesto usado en la medicación de enfermedades y trastornos que están provocados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo, pero sin limitación, amiloidosis, tumores endocrinos, y otras enfermedades, incluyendo enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociados con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual tales como, por ejemplo, degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual, lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma, el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide, el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular, la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular y/o un vehículo, un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, se describe una composición que comprende un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, y que comprende además al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos contra el estrés oxidativo, compuestos antiapoptóticos, quelantes metálicos, inhibidores de la reparación de ADN tales como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de secretasa, inhibidores de secretasa β y γ , proteínas tau, neurotransmisores, destructores de láminas β , moléculas antiinflamatorias o inhibidores de colinesterasa (ChEI) tales como tacrina, rivastigmina, donepecilo y/o galantamina y otros fármacos y complementos nutritivos y, opcionalmente, un vehículo, un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto específico se describe una composición que comprende un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que comprende además al menos un compuesto que es un inhibidor de colinesterasa (ChEI).

En otro aspecto específico se describe una composición que comprende un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que comprende además al menos un compuesto adicional seleccionado del grupo que consiste en tacrina, rivastigmina, donepecilo, galantamina, niacina y memantina.

En otro aspecto más se desvelan composiciones que comprende un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que comprende además al menos un "antipsicótico atípico", tal como, por ejemplo, clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina para el tratamiento de síntomas psicóticos positivos y negativos incluyendo alucinaciones, delirios, trastornos del pensamiento (manifestados por incoherencia notable, pensamiento disgregado, tangencialidad), y comportamiento extraño o desorganizado, así como anhedonia, afecto plano, apatía y aislamiento social, y, opcionalmente, que comprende además un vehículo, un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otros compuestos que pueden usarse de forma adecuada en composiciones en combinación con un anticuerpo como se describe en la presente memoria, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, se describen, por ejemplo, en el documento WO 2004/058258 (véase especialmente las páginas 16 y 17) incluyendo dianas farmacológicas terapéuticas (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 antiinflamatorios no esteroideos (páginas 60-61), antioxidantes (páginas 61-62), agonistas del receptor activado por proliferadores de peroxisoma (PPAR) (páginas 63-67), agentes rededores de colesterol (páginas 68-75); inhibidores de amiloides (páginas 75-77), inhibidores de la formación de amiloides (páginas 77-78), quelantes metálicos (páginas 78-79), antipsicóticos y antidepresivos (páginas 80-82), complementos nutricionales (páginas 83-89) y compuestos que aumentan la disponibilidad de sustancias biológicamente activas en el cerebro (véase páginas 89-93) y profármacos (páginas 93 y 94).

En particular, la composición como se describe en la presente memoria comprende el anticuerpo monoclonal y/o la

sustancia biológicamente activa, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, en una cantidad terapéuticamente eficaz.

En un aspecto se describe un método para producir un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, comprendiendo dicho método inducir en un organismo hospedador adecuado un anticuerpo contra una construcción antigénica supramolecular que comprende un péptido antigénico correspondiente a la secuencia de aminoácidos del péptido β amiloide o un fragmento del mismo, particularmente del péptido β amiloide $A\beta_{1-15}$, modificado con restos hidrófobos, particularmente un resto de ácido palmítico, o, como alternativa, particularmente del péptido β amiloide $A\beta_{22-35}$ y $A\beta_{29-40}$, respectivamente, modificado con restos hidrófilos, particularmente un resto de polietilenglicol (PEG), en el que dicho resto hidrófobo o hidrófilo está unido covalentemente a cada extremo mediante al menos uno, particularmente uno o dos aminoácidos tales como, por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisteína o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado capaz de actuar como una molécula enlazadora; y aislar el anticuerpo.

Cuando se usa un resto hidrófilo tal como PEG, el fragmento seleccionado del péptido β amiloide puede ser un fragmento correspondiente a la secuencia de aminoácidos $A\beta_{22-35}$ y $A\beta_{29-40}$, respectivamente, y los extremos de PEG libres pueden estar unidos covalentemente con fosfatidiletanolamina o cualquier otro compuesto adecuado para actuar como el elemento de anclaje, por ejemplo, para incluir la construcción antigénica en la bicapa de un liposoma.

En un aspecto se describe el uso de un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo y/o de una composición farmacéutica como se describe en la presente memoria, o de una mezcla como se describe en la presente memoria para la preparación de un medicamento para tratar o aliviar los efectos de enfermedades y trastornos en un sujeto que lo necesite que están provocados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo, pero sin limitación, amiloidosis, tumores endocrinos y otras enfermedades, incluyendo enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales, la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma, el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide, el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular, la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular.

En un aspecto se describe un método para la preparación de una composición farmacéutica o de una mezcla como se describe en la presente memoria usando un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo para su uso en el tratamiento o alivio de los efectos de enfermedades y trastornos en un sujeto que lo necesite que están provocados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo, pero sin limitación, amiloidosis, tumores endocrinos y otras enfermedades, incluyendo enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociados con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales, la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma, el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide, el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular, la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular.

En un aspecto se describe un método para la preparación de un medicamento usando un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición farmacéutica o una mezcla como se describe en la presente memoria, para prevenir, tratar o aliviar los efectos de enfermedades y trastornos en un sujeto que lo necesite que están provocados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo, pero sin limitación, amiloidosis, tumores endocrinos y otras enfermedades, incluyendo enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociados con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales, la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma, el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide, el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular, la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular.

En un aspecto específico se describe un método para la preparación de una composición farmacéutica usando particularmente un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que comprende formular dicho anticuerpo en una forma farmacéuticamente aceptable, particularmente de modo que el anticuerpo

esté comprendido en la composición en una cantidad terapéuticamente eficaz.

En un aspecto se describe un método para reducir la carga de placas en el cerebro de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con un aumento de la carga de placas en el cerebro que comprende administrar a un sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que necesite dicho tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

En un aspecto específico, el anticuerpo monoclonal usado en estos métodos es ACI-24-Ab-3 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 7-8 o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma EJ1A9, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2844.

En un aspecto específico adicional, el anticuerpo monoclonal usado en este métodos es el anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo de anticuerpos que comprende ACI-11-Ab-9 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 17-18 y ACI-12-Ab-11 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 19-20 o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria. En particular el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma FG1F9E4, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2845, o el hibridoma FK2A6A6, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2846.

En particular, la carga de placa se reduce en al menos 20 %, particularmente al menos 25%, más particularmente al menos 30%, aún más particularmente más de 30%.

En otro aspecto, se proporciona un método para reducir la cantidad de placas en el cerebro de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con un aumento de la carga de placas en el cerebro que comprende administrar a un sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que necesite dicho tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

En un aspecto específico, el anticuerpo monoclonal usado en dichos métodos es ACI-24-Ab-3 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 7-8 o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma EJ1A9, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2844.

En un aspecto específico adicional, el anticuerpo monoclonal usado en estos métodos es el anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo de anticuerpos que comprenden ACI-11-Ab-9 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 17-18 y ACI-12-Ab-11 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 19-20 o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria. En particular el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma FG1F9E4, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2845, o el hibridoma FK2A6A6, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2846.

En particular, la cantidad de placas en el cerebro se reduce en al menos 10 %, particularmente al menos 15%, más particularmente en más del 15%.

En otro aspecto, se proporciona un método para reducir la cantidad de total de A β soluble en el cerebro de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con aumento de las concentraciones de A β soluble en el cerebro que comprende administrar a un sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que necesite dicho tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla como se describe en la presente memoria.

En un aspecto específico, el anticuerpo monoclonal de estos métodos es ACI-24-Ab-3 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 7-8 o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma EJ1A9, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2844.

En un aspecto específico adicional, el anticuerpo monoclonal usado en estos métodos es el anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo de anticuerpos que comprende ACI-11-Ab-9 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 17-18 y ACI-12-Ab-11 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 19-20 o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria. En particular el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma FG1F9E4, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2845, o el hibridoma FK2A6A6, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2846.

mayo de 2007 como DSM ACC2846.

En otro aspecto, se proporciona un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de enfermedades y trastornos provocados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide, en un sujeto que lo necesite, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano aquejado de dicho trastorno, administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla como se describe en la presente memoria al sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que necesite dicho tratamiento. Estas enfermedades y trastornos incluyen, pero sin limitación, amiloidosis, tumores endocrinos, y otras enfermedades, incluyendo enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual tales como, por ejemplo, degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual, lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma, el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide, el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular, la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular.

En otro aspecto más, se proporciona un método para conservar o aumentar la capacidad de memoria cognitiva en un sujeto que muestre una enfermedad o afección asociada con amiloide que comprende administrar al sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que necesite dicho tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

En un aspecto, se describe una línea celular de hibridoma caracterizada por que produce un anticuerpo monoclonal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

En particular, se describe una línea celular de hibridoma caracterizada porque produce un anticuerpo monoclonal teniendo dicho anticuerpo las propiedades características de un anticuerpo producido por el hibridoma EJ1A9, depositado el 25 de mayo de 2007 y al que se dio el número de depósito DSM ACC2844.

En un aspecto específico, se proporciona la línea celular de hibridoma EJ1A9, depositada el 25 de mayo de 2007 y a la que se dio el número de depósito DSM ACC2844.

En particular, se describe una línea celular de hibridoma caracterizada porque produce un anticuerpo monoclonal teniendo dicho anticuerpo las propiedades características de un anticuerpo producido por el hibridoma FG1F9E4, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2845, o el hibridoma FK2A6A6, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2846.

En un aspecto específico, se proporciona la línea celular de hibridoma FG1F9E4, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2845.

En otro aspecto específico, se proporciona la línea celular de hibridoma FK2A6A6, depositada el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2846.

En un aspecto se describe un método de diagnóstico de una enfermedad o afección asociada con amiloide, en un sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano aquejado de dicho trastorno, que comprende detectar la unión inmuno-específica de un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, con un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ* que incluye las etapas de

(a) poner la muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica del sujeto que se sospecha que contiene la proteína amiloide en contacto con un anticuerpo como se describe en la presente memoria, uniéndose dicho anticuerpo con un epítipo conformacional de la proteína amiloide;

(b) permitir que el anticuerpo se una con la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;

(c) detectar la formación del complejo inmunológico, particularmente de modo que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de la proteína amiloide; 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 del cuerpo específica del sujeto.

En un aspecto específico la composición de la etapa (a) comprende una combinación de anticuerpos para el tratamiento de dicho sujeto. La enfermedad o afección asociada con amiloide incluye enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal, en las que dichas anomalías patológicas pueden producirse, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior

y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular.

En un aspecto, se proporciona un método para determinar el alcance de la carga de placas amiloidogénicas en un tejido de un sujeto que lo necesite que comprende

- (a) obtener una muestra representativa del tejido del sujeto que se investiga;
- (b) ensayar dicha muestra con respecto a la presencia de placa amiloide con un anticuerpo como se ha descrito en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo;
- (c) determinar la cantidad de anticuerpo unido a la muestra, particularmente de modo que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de la placa amiloide; y
- (d) calcular la carga de placas en el tejido del sujeto. El sujeto puede padecer una enfermedad o afección asociada con amiloide que incluye enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal, en los que pueden producirse dichas anomalías patológicas, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular.

En un aspecto, se proporciona un método para diagnosticar una predisposición a una enfermedad o afección asociada con amiloide en un sujeto, que comprende detectar la unión específica de un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, con un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ* que incluye las etapas de

- (a) poner la muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica del sujeto que se sospecha que contiene la proteína amiloide en contacto con el anticuerpo, en el que el anticuerpo se une con un epítipo conformacional de la proteína amiloide;
- (b) permitir que el anticuerpo se una con cualquier proteína amiloide en la muestra para formar un complejo inmunológico;
- (c) detectar la formación del complejo inmunológico;
- (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra o parte o área del cuerpo específica del sujeto; y
- (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal,

en el que un aumento en la cantidad de dicho complejo en comparación con un valor de control normal indica que dicho paciente padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o afección asociada con amiloide. La enfermedad o afección asociada con amiloide incluye enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal. Las anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular.

En un aspecto, se proporciona un método para controlar la enfermedad residual mínima en un sujeto después del tratamiento con un anticuerpo o una composición como se describe en la presente memoria, en el que dicho método comprende:

- (a) poner la muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica del sujeto que se sospecha que contiene la proteína amiloide en contacto con un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con un epítipo conformacional de la proteína amiloide;
- (b) permitir que el anticuerpo se una con la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;
- (c) detectar la formación del complejo inmunológico;
- (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra o parte o área del cuerpo específica del sujeto; y

- (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal,

en el que un aumento de la cantidad de dicho complejo en comparación con un valor de control normal indica que dicho sujeto aún padece una enfermedad residual mínima. La enfermedad residual mínima incluye enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal. Las anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular.

En un aspecto específico la composición de la etapa (a) comprende una combinación de anticuerpos para el tratamiento de dichos sujetos.

En un aspecto, se proporciona un método para predecir la sensibilidad de un sujeto que se trata con un anticuerpo o una composición como se describe en la presente memoria que comprende

- (a) poner la muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha que contiene la proteína amiloide en contacto con un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con un epítipo conformacional de la proteína amiloide;
- (b) permitir que el anticuerpo se una con el antígeno amiloide para formar un complejo inmunológico;
- (c) detectar la formación del complejo inmunológico;
- (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra o parte o área del cuerpo específica del sujeto; y
- (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico antes y después del comienzo del tratamiento,

en el que una reducción de la cantidad de dicho complejo inmunológico indica que dicho sujeto tiene un alto potencial de ser sensible al tratamiento. En una realización específica, el tratamiento es para una enfermedad o afección asociada con amiloide que incluye enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal. Las anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular.

En un aspecto específico la composición de la etapa (a) comprende una combinación de anticuerpos para el tratamiento de dicho sujeto.

En un aspecto se describe un kit de ensayo para la detección y diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas con amiloide en un sujeto que lo necesite que comprende un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo e instrucciones para usar el anticuerpo para el fin de unirse a proteína amiloide para formar un complejo inmunológico y detectar la formación del complejo inmunológico de modo que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de la proteína amiloide. Las enfermedades y afecciones asociadas con amiloide incluyen enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos de los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal. Las anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular.

Estos y otros objetos, elementos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes después de una revisión de la siguiente descripción detallada de la realización desvelada y las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

- La Figura 1 muestra los resultados de un estudio de mapeo de epítomos del anticuerpo monoclonal murino ACI-24-Ab-3 realizado por ELISA usando la biblioteca peptídica de péptidos solapantes que abarcan la secuencia de aminoácidos completa de $A\beta_{1-42}$. La unión con el $A\beta_{1-42}$ completo se usó como un control positivo. Todos los otros péptidos eran de 8-10 aminoácidos de longitud. El número del péptido corresponde al aminoácido en la secuencia de $A\beta_{1-42}$ en el que comienza el péptido. Los resultados se expresan como D.O.
- La Figura 2 muestra los resultados de un estudio de mapeo de epítomos del anticuerpo monoclonal murino ACI-24-Ab-3 realizado por ELISA usando péptidos más largos que abarcan $A\beta$ 1-28, 17-40, 1-40, $_{1-42}$ A (Anaspec) o $_{1-42}$ B (Bachem). Los resultados se expresan como D.O., después de restar el fondo. Los resultados muestran la media $\pm$ 1 error típico de 2 experimentos independientes.
- La Figura 3 representa la inhibición mediada por ACI-24-Ab-3 de la agregación de $A\beta_{1-42}$ a una relación molar de 1:100 y 1:10 de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$. Los resultados muestran la media $\pm$ 1 error típico de 2 experimentos independientes.
- La Figura 4 representa la disgregación mediada por ACI-24-Ab-3 de $A\beta_{1-42}$ preagregado a una relación molar de 1:100 y 1:10 de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$. Los resultados muestran la media $\pm$ 1 error típico de 2 experimentos independientes.
- La Figura 5 representa la unión del anticuerpo ACI-24-Ab-3 con preparaciones enriquecidas con oligómero protofibrilar (PF) de alto peso molecular (APM) y monoméricas de bajo peso molecular (BPM) del péptido $A\beta_{1-42}$.
- La Figura 6 representa la unión del anticuerpo de control 6E10 con preparaciones monoméricas de bajo peso molecular (BPM) y protofibrilares enriquecidas con oligómeros protofibrilares (PF) de alto peso molecular (APM) del péptido $A\beta_{1-42}$.
- La Figura 7 representa la unión del anticuerpo ACI-24-Ab-3 (A) y el anticuerpo de control 6E10 (B) con monómeros y oligómeros del péptido $A\beta_{1-42}$. Los resultados se presentan como la media ($\pm$ ETM) de los valores de densidad óptica (D.O.) de tres experimentos independientes.
- La Figura 8 muestra los resultados de un estudio de mapeo de epítomos del anticuerpo monoclonal murino ACI-11-Ab-9 realizado por ELISA usando una biblioteca peptídica de péptidos solapantes que abarcan la secuencia de aminoácidos completa de $A\beta_{1-42}$. La unión con el $A\beta_{1-42}$ completo se usó como un control positivo. Todos los otros péptidos fueron de 8-10 aminoácidos de longitud. El número del péptido corresponde al aminoácido en la secuencia de $A\beta_{1-42}$ en el que comienza el péptido. Los resultados se expresan como D.O.
- La Figura 9 muestra los resultados de un estudio de mapeo de epítomos del anticuerpo monoclonal murino ACI-11-Ab-9 realizado por ELISA usando péptidos más largos que abarcan $A\beta$ 1-28, 17-40, 1-40, $_{1-42}$ A (Anaspec) o $_{1-42}$ B (Bachem). Los resultados se expresan como D.O., después de restar el fondo. Los resultados muestran la media $\pm$ 1 error típico de 2 experimentos independientes.
- La Figura 10 muestra los resultados de un estudio de mapeo de epítomos del anticuerpo monoclonal murino ACI-12-Ab-11 realizado por ELISA usando una biblioteca peptídica de péptidos solapantes que abarcan la secuencia de aminoácidos completa de $A\beta_{1-42}$. La unión con el $A\beta_{1-42}$ completo se usó como un control positivo. Todos los otros péptidos eran de 8-10 aminoácidos de longitud. El número de péptido corresponde al aminoácido en la secuencia de $A\beta_{1-42}$ en la que comienza el péptido. Los resultados se expresan como D.O.
- La Figura 11 muestra los resultados de un estudio de mapeo de epítomos del anticuerpo monoclonal murino ACI-11-Ab-9 realizado por ELISA usando péptidos más largos que abarcan $A\beta$ 1-28, 17-40, 1-40, $_{1-42}$ A (Anaspec) o $_{1-42}$ B (Bachem). Los resultados se expresan como D.O., después de restar el fondo. Los resultados muestran la media $\pm$ 1 error típico de 2 experimentos independientes.
- La Figura 12 representa la inhibición mediada por ACI-11-Ab-9 de la agregación de $A\beta_{1-42}$ a una relación molar de 1:100 y 1:10 de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$. Los resultados muestran la media $\pm$ 1 error típico de 2 experimentos independientes.
- La Figura 13 representa la disgregación mediada por ACI-11-Ab-9 de $A\beta_{1-42}$ preagregado a una relación molar de 1:100 y 1:10 de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$. Los resultados muestran la media $\pm$ 1 error típico de 3 experimentos independientes.
- La Figura 14 representa la inhibición mediada por ACI-12-Ab-11 de la agregación de $A\beta_{1-42}$ a una relación molar de 1:100 y 1:10 de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$. Los resultados muestran la media $\pm$ 1 error típico de 2 experimentos

independientes.

La Figura 15 representa la disgregación mediada por ACI-12-Ab-11 de $A\beta_{1-42}$ preagregado a una relación molar de 1:100 y 1:10 de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$. Los resultados muestran la media $\pm$ 1 error típico de 2 experimentos independientes.

La Figura 16 representa la unión del anticuerpo ACI-12-Ab-11 (a) y el anticuerpo de control 6E10 (B) con monómeros y oligómeros del péptido $A\beta_{1-42}$. Los resultados se presentan como la media ($\pm$ ETM) de los valores de densidad óptica (D.O.) de tres experimentos independientes.

La Figura 17 representa esquemáticamente etapas en el ensayo de ELISA que pueden usarse para analizar la unión de rhApoE4 con $A\beta_{42}$ -biotina.

La Figura 18 representa los resultados obtenidos del desarrollo de un ensayo de ELISA para unión de rhApoE4 con $A\beta_{42}$ -biotina. Para optimizar las concentraciones de rhApoE4 y $A\beta_{42}$ -biotina, se ensayan diluciones de rhApoE4 con una concentración constante de $A\beta_{42}$ -biotina.

La Figura 19 representa el efecto del exceso de $A\beta_{42}$ -biotina en la unión de $A\beta_{42}$ -biotina en complejo con rhApoE4 en el ensayo de ELISA descrito.

La Figura 20 representa una determinación de muestra de la concentración óptima de $A\beta_{42}$ -biotina para el ensayo de ELISA descrito.

Breve descripción de las tablas

La Tabla 1.1 expone los anticuerpos y construcciones antigénicas usados para inducir ciertos anticuerpos descritos en la presente memoria.

Tabla 1.2 Unión de péptidos $A\beta$ con ACI-24-Ab-3. Los resultados se expresan como D.O. después de restar el fondo.

Tabla 1.3 Unión de ACI-24-Ab-3 con 33 péptidos solapantes de $A\beta_{1-42}$ como se analiza por ELISA. La unión con el $A\beta_{1-42}$ completo se usó como un control positivo. Todos los otros péptidos eran de 8-10 aminoácidos de longitud. El número del péptido corresponde al aminoácido en la secuencia de $A\beta_{1-42}$ en el que comienza el péptido. Los resultados se expresan como D.O.

Tabla 1.4 Unión del anticuerpo ACI-24-Ab-3 (EJ1A9 de ratón) con preparaciones monoméricas de bajo peso molecular (BPM) y enriquecidas con oligómero protofibrilar (PF) de alto peso molecular (APM) del péptido $A\beta_{1-42}$.

Tabla 1.5 Unión del anticuerpo de control 6E10 con preparaciones monoméricas de bajo peso molecular (BPM) y enriquecidas con oligómero protofibrilar (PF) de alto peso molecular (APM) protofibrilares y APM del péptido $A\beta_{1-42}$.

Tabla 1.6 Unión del anticuerpo ACI-24-Ab-3 (EJ1A9 de ratón) con monómeros y oligómeros del péptido $A\beta_{1-42}$. Los resultados se expresan como valores de D.O.

Tabla 1.7 Unión del anticuerpo de control 6E10 con monómeros y oligómeros del péptido $A\beta_{1-42}$. Los resultados se expresan como valores de D.O.

La Tabla 2.1 expone los anticuerpos y construcciones antigénicas usados para inducir ciertos anticuerpos descritos en la presente memoria.

Tabla 2.2 Unión de péptidos $A\beta$ con ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11. Los resultados se expresan como D.O. después de restar el fondo.

Tabla 2.3 Unión de ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 con 33 péptidos solapantes de $A\beta_{1-42}$ como se analiza por ELISA. La unión con el $A\beta_{1-42}$ completo se usó como un control positivo. Todos los otros péptidos fueron de 8-10 aminoácidos de longitud. El número del péptido corresponde al aminoácido en la secuencia $A\beta_{1-42}$ en el que comienza el péptido. Los resultados se expresan como D.O.

Tabla 2.4 Unión del anticuerpo ACI-12-Ab-11 (clon FK2A6A6) con monómeros y oligómeros del péptido $A\beta_{1-42}$. Los resultados se expresan como valores de D.O.

Tabla 2.5 Unión del anticuerpo de control 6E10 con monómeros y oligómeros del péptido $A\beta_{1-42}$. Los resultados se expresan como valores de D.O.

Breve descripción de las secuencias

	SEC ID N°: 1:	péptido antigénico A β ₂₂₋₃₅
5	SEC ID N°: 2:	péptido antigénico A β ₂₉₋₄₀
	SEC ID N°: 3:	fragmento de péptido A β A β ₁₋₂₈
10	SEC ID N°: 4:	fragmento de péptido A β A β ₁₇₋₄₀
	SEC ID N°: 5:	fragmento de péptido A β A β ₁₋₄₀
	SEC ID N°: 6:	fragmento de péptido A β A β ₁₋₄₂
15	SEC ID N°: 7:	secuencia de aminoácidos de la secuencia de dominio variable de cadena ligera de ACI-24-Ab-3.
	SEC ID N°: 8:	secuencia de aminoácidos de la secuencia de dominio variable de cadena pesada de ACI-24-Ab-3.
20	SEC ID N°: 9:	secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera
	SEC ID N°: 10:	secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera
	SEC ID N°: 11:	secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera
25	SEC ID N°: 12:	secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada
	SEC ID N°: 13:	secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada
30	SEC ID N°: 14:	secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada
	SEC ID N°: 15:	secuencia polinucleotídica que codifica la secuencia de dominio variable de cadena ligera de ACI-24-Ab-3
35	SEC ID N°: 16:	secuencia polinucleotídica que codifica la secuencia de dominio variable de cadena pesada de ACI-24-Ab-3.
	SEC ID N°: 17:	secuencia de aminoácidos de la secuencia de dominio variable de cadena ligera de ACI-11-Ab-9.
40	SEC ID N°: 18:	secuencia de aminoácidos de la secuencia de dominio variable de cadena pesada de ACI-11-Ab-9
	SEC ID N°: 19:	secuencia de aminoácidos de la secuencia de dominio variable de cadena ligera de ACI-12-Ab-11.
45	SEC ID N°: 20:	secuencia de aminoácidos de la secuencia de dominio variable de cadena pesada de ACI-12-Ab-11.
	SEC ID N°: 21:	secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera
	SEC ID N°: 22:	secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera
50	SEC ID N°: 23:	secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera
	SEC ID N°: 24:	secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada
55	SEC ID N°: 25:	secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada
	SEC ID N°: 26:	secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada
60	SEC ID N°: 27:	secuencia polinucleotídica que codifica la secuencia de dominio variable de cadena ligera de ACI-11-Ab-9.
	SEC ID N°: 28:	secuencia polinucleotídica que codifica la secuencia de dominio variable de cadena pesada de ACI-11-Ab-9.
65	SEC ID N°: 29:	secuencia polinucleotídica que codifica la secuencia de dominio variable de cadena ligera de ACI-12-Ab-11.

SEC ID N°: 30 secuencia polinucleotídica que codifica la secuencia de dominio variable de cadena ligera de ACI-11-Ab-9.

5 Descripción detallada de la invención

Los anticuerpos de la presente invención que incluyen cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo o, más particularmente, un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, como se describe en la presente memoria puede usarse para el tratamiento de enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal. Estas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular.

En particular, puede usarse una composición, particularmente una composición terapéutica que comprende un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, como se describe en la presente memoria en una cantidad terapéuticamente eficaz para el tratamiento de enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal. Las anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tal como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular.

En otra realización, la composición de acuerdo con la invención se proporciona en forma de una mezcla, en la que el anticuerpo está entremezclado con otra sustancia biológicamente activa en o con el mismo disolvente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable o el anticuerpo y la otra sustancia biológicamente activa pueden proporcionarse por separado como parte de una composición separada, que puede ofrecerse por separado o junta en forma de un kit de partes. La composición puede usarse en el tratamiento de enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal. Las anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular.

El glaucoma es un grupo de enfermedades del nervio óptico que implica pérdida de células ganglionares retinianas (RGC) en un patrón característico de neuropatía óptica. El glaucoma se acompaña con frecuencia, pero no siempre, de un aumento de la presión ocular, lo que puede ser el resultado del bloqueo de la circulación del humor acuoso, o su drenaje.

Aunque el aumento de la presión intraocular es un factor de riesgo significativo para desarrollar glaucoma, no puede definirse ningún umbral de la presión intraocular que sería determinante para provocar glaucoma.

El daño también puede causarse por escaso riego sanguíneo a las fibras del nervio óptico vitales, una debilidad en la estructura del nervio y/o un problema en la salud de las fibras nerviosas en sí mismas.

El glaucoma no tratado conduce a daño permanente del nervio óptico y pérdida del campo visual resultante, que puede progresar a ceguera.

Las RGC son las células nerviosas que transmiten señales visuales del ojo al cerebro. La Caspasa 3 y la Caspasa 8, dos enzimas importantes en el proceso apoptótico, se activan en el proceso que conduce a apoptosis de las RGC. La Caspasa 3 escinde la proteína precursora amiloide (APP) para producir fragmentos neurotóxicos, incluyendo β amiloide. Sin el efecto protector de APP, la acumulación de β amiloide en la capa de células ganglionares retinianas da como resultado la muerte de las RGC y pérdida irreversible de visión.

Los diferentes tipos de glaucoma se clasifican como glaucomas de ángulo abierto, si la afección es crónica, o glaucomas de ángulo cerrado, si se produce glaucoma agudo repentinamente. El glaucoma afecta habitualmente a ambos ojos, pero la enfermedad puede progresar más rápidamente en un ojo que en el otro.

5 El glaucoma de ángulo abierto crónico (COAG), también conocido como glaucoma de ángulo abierto primario (POAG), es el tipo más común de glaucoma. El COAG está provocado por bloqueo microscópico en la red trabecular, que provoca el drenaje del flujo externo acuoso al canal de Schlemm y eleva la presión intraocular (IOP). El POAG afecta habitualmente a ambos ojos y está asociado fuertemente con la edad y un historial familiar positivo. Su frecuencia aumenta en personas mayores a medida que el mecanismo de drenaje puede obstruirse
10 gradualmente con el envejecimiento. El aumento de la presión intraocular en los sujetos aquejados de glaucoma de ángulo abierto crónico no se ve acompañado de ningún síntoma hasta que se nota la pérdida en el área visual central.

15 El Glaucoma de Ángulo Cerrado Agudo (AACG) o glaucoma de ángulo cerrado es un tipo de glaucoma relativamente poco común caracterizado por un aumento repentino de la presión intraocular hasta 4,66 a 10,64 kPa, que conduce a dolor grave y pérdida irreversible de visión. El aumento repentino de la presión está provocado por el cierre del ángulo de filtrado y bloqueo de los canales de drenaje. Los individuos con ángulos estrechos tienen un mayor riesgo de un cierre repentino del ángulo. El AACG habitualmente se produce en un solo ojo, pero el riesgo existe en ambos ojos. La edad, las cataratas y la pseudoexfoliación son también factores de riesgo puesto que están
20 asociados con agrandamiento del cristalino y cierre o estrechamiento del ángulo. Un ataque de glaucoma repentino puede estar asociado con dolor grave del ojo y cefalea, inflamación del ojo, náuseas, vómitos y visión borrosa.

25 El Glaucoma de Mecanismo Combinado o Mixto es una mezcla o combinación de glaucoma de ángulo abierto y cerrado. Afecta a pacientes con ACG agudo cuyo ángulo se abre después de iridotomía con láser, pero que continúan necesitando medicaciones para el tratamiento de IOP, así como pacientes con POAG o glaucoma pseudoexfoliante que gradualmente desarrollan estrechamiento del ángulo.

30 El glaucoma de tensión normal (NTG), también conocido como glaucoma de tensión baja (LTG), se caracteriza por daño progresivo del nervio óptico y pérdida de visión periférica similar a los vistos en otros tipos de glaucoma; sin embargo, la presión intraocular está en el intervalo normal o incluso por debajo de lo normal.

35 El glaucoma congénito (infantil) es un tipo relativamente poco común, heredado, de glaucoma de ángulo abierto. El desarrollo suficiente del área de drenaje da como resultado aumento de la presión en el ojo que puede conducir a la pérdida de visión por daño del nervio óptico y a un ojo agrandado. El diagnóstico y tratamiento tempranos son críticos para conservar la visión en bebés y niños aquejados de la enfermedad.

40 El glaucoma secundario puede resultar de una lesión ocular, inflamación en el iris del ojo (iritis), diabetes, cataratas, o el uso de esteroides en individuos susceptibles a esteroides. El glaucoma secundario también puede asociarse con desprendimiento de la retina u oclusión o bloqueo de la vena retiniana.

45 El glaucoma pigmentario se caracteriza por el desprendimiento de gránulos de pigmento del iris. Los gránulos provocan bloqueo del sistema de drenaje del ojo, conduciendo a aumento de la presión intraocular y daño al nervio óptico.

El glaucoma exfoliante (pseudoexfoliación) se caracteriza por depósitos de material escamoso en la cápsula anterior y en el ángulo del ojo. La acumulación del material escamoso bloquea el sistema de drenaje y eleva la presión del ojo.

50 El diagnóstico de glaucoma puede realizarse usando diversos ensayos. La tonometría determina la presión en el ojo midiendo el tono o firmeza de su superficie. Están disponibles varios tipos de tonómetros para este ensayo, siendo el más común el tonómetro de aplanamiento. La paquimetría determina el grosor de la córnea que, a su vez, mide la presión intraocular. La gonioscopia permite el examen del ángulo de filtrado y el área de drenaje del ojo. La gonioscopia también puede determinar si los vasos sanguíneos anómalos pueden estar bloqueando el drenaje del fluido acuoso fuera del ojo. La oftalmoscopia permite el examen del nervio óptico y puede detectar descenso de la capa de la fibra nerviosa o cambios en el disco óptico, o escotadura (ahuecamiento) de esta estructura, que puede
55 estar provocada por aumento de la presión intraocular o retirada axónica. La gonioscopia también es útil para evaluar el daño al nervio por mal flujo sanguíneo o aumento de la presión intraocular. Los ensayos de campo visual mapean el campo de visión, de forma subjetiva, lo que puede detectar señales de daño glaucomatoso al nervio óptico. Esto se representa por patrones específicos de pérdida del campo visual. La tomografía de coherencia ocular, una medida objetiva de la pérdida de capa de fibra nerviosa, se llevó a cabo mirando el grosor de la capa de fibra nerviosa óptica (alterada en glaucoma) mediante un diferencial de transmisión de la luz a través de tejido axónico dañado.
60

Las drusas del nervio óptico son concreciones globulares de proteína y sales de calcio que se cree que representan secreciones a través de estructuras vasculares alteradas de forma congénita que afectan a la capa de fibra nerviosa axónica. Estas acumulaciones aparecen en la capa de fibra nerviosa peripapilar y se cree que dañan la capa de fibra nerviosa directamente por compresión o indirectamente mediante alteraciones del aporte vascular a la capa de fibra
65

nerviosa. Habitualmente se hacen visibles después de la primera década de vida en individuos aquejados. Esto sucede con más frecuencia en ambos ojos pero también puede afectar a un ojo, y puede provocar pérdida leve de la visión periférica durante muchos años.

La neuropatía óptica es una enfermedad caracterizada por daño al nervio óptico provocado por desmielinización, bloqueo del riego sanguíneo, deficiencias nutricionales o toxinas. Las neuropatías ópticas desmielinizantes (véase neuritis óptica posteriormente) están provocadas típicamente por un proceso desmielinizante subyacente tal como esclerosis múltiple. El bloqueo del riego sanguíneo, conocido como neuropatía óptica isquémica, puede conducir a la muerte o disfunción de células nerviosas ópticas. La neuropatía óptica isquémica no arterítica aparece habitualmente en personas de mediana edad. Los factores de riesgo incluyen alta presión sanguínea, diabetes y aterosclerosis. La neuropatía óptica isquémica arterítica aparece habitualmente en personas mayores después de inflamación de las arterias (arteritis), particularmente la arteria temporal (arteritis temporal). La pérdida de visión puede ser rápida o desarrollarse gradualmente durante de 2 a 7 días y el daño puede ser en uno o ambos ojos. En personas con neuropatía óptica provocada por exposición a una toxina o a una deficiencia nutricional, habitualmente están afectados ambos ojos.

Aproximadamente 40% de las personas con neuropatía óptica isquémica no arterítica experimentan mejora espontánea a lo largo del tiempo. La neuropatía óptica isquémica no arterítica se trata controlando la presión sanguínea, la diabetes y los niveles de colesterol. La neuropatía óptica isquémica arterítica se trata con altas dosis de corticosteroides para prevenir pérdida de visión en el segundo ojo.

La neuritis óptica está asociada con pérdida de visión leve o grave en uno o ambos ojos y puede estar provocada por un proceso desmielinizante sistémico (véase anteriormente), infección viral, vacunación, meningitis, sífilis, esclerosis múltiple e inflamación intraocular (uveítis). El movimiento del ojo puede ser doloroso y la visión puede deteriorarse con episodios repetidos. El diagnóstico implica examinar las reacciones de las pupilas y determinar si el disco óptico está hinchado. La formación de imágenes por resonancia magnética (IRM) puede mostrar pruebas de esclerosis múltiple o, en pocas ocasiones, un tumor que presiona el nervio óptico, en cuyo caso la visión mejora una vez que se alivia la presión tumoral. La mayoría de los casos de neuritis óptica mejoran a lo largo de varios meses sin tratamiento. En algunos casos, puede ser necesario el tratamiento con corticosteroides intravenosos.

Una catarata es una opacidad que se desarrolla en el cristalino del ojo o en su envoltura. Las cataratas típicamente provocan pérdida de visión progresiva y pueden provocar ceguera si se dejan sin tratar. En la Catarata Morgagniana, la corteza de la catarata se licua progresivamente para formar un fluido blanco lechoso y puede provocar inflamación grave si la cápsula del cristalino se rompe y tiene fugas. Si se deja sin tratar, la catarata también puede provocar glaucoma facomórfico. Las cataratas pueden ser de naturaleza congénita o estar provocadas por factores genéticos, edad avanzada, exposición a ultravioleta a largo plazo, exposición a radiación, diabetes, lesión ocular o traumatismo físico.

La cirugía extracapsular (ECCE) es el tratamiento más eficaz para tratar las cataratas. En la cirugía, se retira el cristalino, pero la mayor parte de la cápsula del cristalino se deja intacta. La facoemulsificación, una incisión pequeña en el lateral de la córnea, se usa típicamente para romper la lente antes de su extracción.

La amiloidosis ocular es un trastorno hereditario asociado con la Polineuropatía Amiloidótica Familiar de Tipo I (FAP) y caracterizado por vasos conjuntivos anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías pupilares y, en algunos casos, opacidades vítreas y glaucoma secundario. La FAP de tipo I está asociada con mutaciones en la transtiretina (TTR), una proteína del plasma tetramérica (prealbúmina) sintetizada en el hígado, el pigmento retiniano epitelio 2 y el plexo coroidal del cerebro. Diferentes mutaciones provocan que la transtiretina polimerice en una estructura plegada de fibrillas amiloides, lo que conduce a amiloidosis hereditaria. La mutación más frecuente es TTR-met303, en la que la metionina reemplaza a la valina en la posición 30 en la transtiretina.

La FAP de Tipo IV está asociada con distrofia corneal reticular (LCD). La distrofia corneal reticular es una amiloidosis corneal heredada, primaria, habitualmente bilateral, caracterizada por la presencia de líneas reticulares refractarias con un doble contorno en el estroma corneal. La LCD de tipo I (Biber-Haab-Dimmer) es un trastorno corneal autosómico dominante, bilateralmente simétrico, caracterizado por la presencia de numerosas líneas reticulares finas translúcidas con puntos blancos y turbidez suave en las capas superficial y media del estroma central. Los síntomas comienzan durante la primera o segunda décadas de vida, provocando una pérdida progresiva de visión. La mayoría de los pacientes requieren un trasplante córneo a los 40 años de edad. La LCD de tipo II está asociada con amiloidosis sistémica (síndrome de Meretoja) y se caracteriza por la presencia de líneas reticulares gruesas en el limbo, córnea central y estroma. La visión no se ve afectada hasta un periodo posterior de la vida. La LCD de tipo III afecta a personas de mediana edad y se caracteriza por la presencia de líneas reticulares gruesas que se extienden de limbo a limbo. La LCD de tipo III A se caracteriza por la acumulación de depósitos amiloides en el estroma y la presencia de cintas de amiloide entre el estroma y la capa de Bowman. La LCD de tipo III A difiere de la LCD de tipo III debido a la presencia de erosiones corneales, la aparición en blancos y el patrón de herencia autosómica dominante.

El Síndrome de Down (SD) o trisomía del 21 es el trastorno genético más común con una incidencia de

aproximadamente 1:700 de nacimientos vivos, y se asocia con frecuencia con diversas anomalías congénitas. El trastorno, que está provocado por la presencia de un cromosoma 21 extra, está asociado con depósitos prematuros de la proteína formadora de placas beta amiloide y el desarrollo de enfermedad de Alzheimer al llegar a la mediana edad. Además, muchas personas aquejadas de SD padecen cataratas comenzando en la infancia y muchos padecen glaucoma congénito. Puesto que el gen para la proteína precursora amiloide, que se escinde para formar beta amiloide, está localizado en la rama larga del cromosoma 21 en seres humanos, la sobreexpresión de este gen puede conducir a aumento de los niveles de proteína precursora amiloide y la deposición de amiloide en síndrome de Down.

No hay cura para el glaucoma. Las medicaciones para el tratamiento del glaucoma incluyen agentes que reducen la producción del humor acuoso en el ojo, tales como bloqueadores beta (Timoptic, Betoptic), inhibidores de anhidrasa carbónica (Trusopt, Azopt) y agonistas alfa (Alphagan, Iopidine), y agentes que redirigen el drenaje del humor acuoso a través de una ruta diferente en el fondo del ojo, tales como prostaglandina (Xalatan). Las cirugías láser incluyen trabeculoplastia, un procedimiento que ayuda a que el humor acuoso deje el ojo más eficazmente. De acuerdo con la Fundación de Glaucoma, casi 80% de los pacientes responden bastante bien al procedimiento para retardar o evitar cirugía adicional. Además, la presión aumenta de nuevo en los ojos de la mitad de todos los pacientes en un periodo de dos años después de la cirugía láser, de acuerdo con el Instituto Nacional del Ojo. Se realiza cirugía con incisión si los tratamientos con medicación y láser inicial no tienen éxito en la reducción de la presión dentro del ojo. Un tipo de cirugía, una trabeculectomía, crea una apertura en la pared del ojo de modo que el humor acuoso puede drenarse. Sin embargo, aproximadamente un tercio de los pacientes con trabeculectomía desarrollan cataratas en un periodo de cinco años, de acuerdo con la Fundación del Glaucoma. Si la trabeculectomía fracasa, los procedimientos de incisión adicionales incluyen colocar un tubo de drenaje en el ojo entre la córnea y el iris y el uso de un tratamiento de láser o congelación para destruir tejido en el ojo que realiza el humor acuoso. La cirugía puede salvar la visión restante en el paciente, pero no mejora la visión. La visión puede de hecho empeorar después de la cirugía.

La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es una causa importante de ceguera entre Caucásicos de más de 65 años de edad. Aunque se ha realizado mucho progreso recientemente en la investigación de la generación macular, no hay tratamientos que rescaten la muerte celular neuronal que se produce durante el transcurso de la enfermedad. Tampoco hay tratamientos definitivos para otras enfermedades oculares asociadas con la degradación neuronal relacionada con beta amiloide, tales como déficits visuales corticales, drusas del nervio óptico, neuropatía óptica, neuritis óptica, amiloidosis ocular y distrofia reticular.

En consecuencia, existe la urgente necesidad en la técnica de opciones de tratamiento mejoradas para sujetos aquejados de enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal. Estas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular. La presente invención satisface esta necesidad proporcionando soluciones que se dirigen al proceso que provoca una enfermedad ocular asociada con degradación neuronal relacionada con beta amiloide en un paciente aquejado de la enfermedad.

Además de este objeto, la invención se refiere al uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención y como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo y/o de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención y como se describe en la presente memoria, o de una mezcla de acuerdo con la invención y como se describe en la presente memoria para la preparación de un medicamento para tratar o aliviar los efectos de enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular.

En una realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica o una mezcla de acuerdo con la invención y como se describe en la presente memoria usando un anticuerpo de acuerdo con la invención y como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo para su uso en el tratamiento o alivio de los efectos de enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual,

particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal. Las anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular.

En otra realización, la invención proporciona un medicamento que comprende un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, una composición farmacéutica o una mezcla que comprende el anticuerpo de acuerdo con la invención y como se describe en la presente memoria en una cantidad terapéuticamente eficaz, para prevenir, tratar o aliviar los efectos de enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal. Estas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular.

En un aspecto de la invención, se proporciona un método para reducir la carga de placas en la capa de células ganglionares retinianas de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal que comprende administrar al sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que necesite dicho tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla de acuerdo con la invención y como se describe en la presente memoria. Las anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular. En un aspecto de la invención el anticuerpo monoclonal usado en dichos métodos es ACI-24-Ab-3 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 7-8 o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma EJ1A9, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2844. En otro aspecto de la invención los anticuerpos monoclonales usados en dichos métodos son ACI-11-Ab-9 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 17-18 o ACI-12-Ab-11 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 19-20, o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma FG1F9E4, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2845, o el hibridoma FK2A6A6, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2846. En particular, la carga de placas se reduce en al menos 20 %, particularmente al menos 25%, más particularmente al menos 30%, aún más particularmente más de 30%.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para reducir la cantidad de placas en la capa de células ganglionares retinianas de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal, que comprende administrar al sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que necesite dicho tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla de acuerdo con la invención y como se describe en la presente memoria. Las anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular. En un aspecto de la invención el anticuerpo monoclonal usado en dichos métodos es ACI-24-Ab-3 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 7-8 o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma EJ1A9, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2844. En otro aspecto de la invención los anticuerpos monoclonales usados en dichos métodos son ACI-11-Ab-9 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 17-18 o ACI-12-Ab-11 que tiene las secuencias

polipeptídicas SEC ID N°: 19-20, o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma FG1F9E4, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2845, o el hibridoma FK2A6A6, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2846. En particular, la cantidad de placas en el cerebro se reduce en al menos 10 %, particularmente al menos 15%, más particularmente más de 15%.

En otro aspecto más de la invención, se proporciona un método para reducir la cantidad total de A β soluble en la capa de células ganglionares retinianas de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como, por ejemplo, degradación neuronal, que comprende administrar al sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que necesite dicho tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla de acuerdo con la invención y como se describe en la presente memoria. Las anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular. En un aspecto de la invención el anticuerpo monoclonal usado en dichos métodos es ACI-24-Ab-3 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 7-8 o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma EJ1A9, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2844. En otro aspecto de la invención los anticuerpos monoclonales usados en dichos métodos son ACI-11-Ab-9 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 17-18 o ACI-12-Ab-11 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 19-20, o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma FG1F9E4, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2845, o el hibridoma FK2A6A6, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2846.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal, en un sujeto, en particular un mamífero, más particularmente un ser humano aquejado de la enfermedad ocular asociada con degradación neuronal relacionada con beta amiloide, administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla de acuerdo con la invención y como se describe en la presente memoria al sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que necesite dicho tratamiento. Las anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular. En un aspecto de la invención el anticuerpo monoclonal usado en dichos métodos es ACI-24-Ab-3 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 7-8 o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma EJ1A9, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2844. En otro aspecto de la invención los anticuerpos monoclonales usados en dichos métodos son ACI-11-Ab-9 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 17-18 o ACI-12-Ab-11 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 19-20, o una parte funcional de los mismos como se describe en la presente memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma FG1F9E4, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2845, o el hibridoma FK2A6A6, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2846.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para diagnosticar una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como degradación neuronal, en un sujeto que lo necesite, que comprende detectar la unión inmuno-específica de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla de acuerdo con la invención y como se describe en la presente memoria, con un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ* que incluye las etapas de: (a) poner la muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha que contiene la proteína amiloide en contacto con un anticuerpo de acuerdo con la invención, uniéndose dicho anticuerpo con un epítipo conformacional de la proteína amiloide; (b) permitir que el anticuerpo se una con la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico; (c) detectar la formación del complejo inmunológico, particularmente de modo que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de la proteína amiloide; 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 del cuerpo específica. En un aspecto de la invención el anticuerpo monoclonal usado en dichos métodos es ACI-24-Ab-3 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 7-8 o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma EJ1A9, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2844. En otro aspecto de la invención los anticuerpos monoclonales usados en dichos métodos son ACI-11-Ab-9 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 17-18 o ACI-12-Ab-11 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 19-20, o una parte funcional de las mismas como se describe en la presente memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma FG1F9E4, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2845, o el hibridoma FK2A6A6, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2846.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para diagnosticar una predisposición a una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como degradación neuronal, en un sujeto que lo necesite que comprende detectar la unión específica de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla de acuerdo con la invención y como se describe en la presente memoria, con un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ* que incluye las etapas de: (a) poner la muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha que contiene la proteína amiloide en contacto con el anticuerpo, en el que el anticuerpo se une a un epítipo conformacional de la proteína amiloide; (b) permitir que el anticuerpo se una con la proteína amiloide en la muestra para formar un complejo inmunológico; (c) detectar la formación del complejo inmunológico; (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 del cuerpo específica, (e) y comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal, en el que un aumento en la cantidad del complejo en comparación con un valor de control normal indica que el sujeto padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual. En un aspecto de la invención el anticuerpo monoclonal usado en dichos métodos es ACI-24-Ab-3 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 7-8 o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma EJ1A9, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2844. En otro aspecto de la invención los anticuerpos monoclonales usados en dichos métodos son ACI-11-Ab-9 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 17-18 o ACI-12-Ab-11 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 19-20, o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma FG1F9E4, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2845, o el hibridoma FK2A6A6, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2846.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para controlar la enfermedad ocular residual mínima asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como degradación neuronal, en un sujeto después de tratamiento con una composición farmacéutica de acuerdo con la invención, en el que el método comprende: (a) poner una muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha que contiene la proteína amiloide en contacto con un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla de acuerdo con la invención y como se describe en la presente memoria, uniéndose dicho anticuerpo con un epítipo de la proteína amiloide; (b) permitir que el anticuerpo se una con la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico; (c) detectar la formación del complejo inmunológico; (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 del cuerpo específica, y (e) comparar la cantidad del complejo inmunológico con un valor de control normal, en el que un aumento en la cantidad del complejo en comparación con un valor de control normal indica que el sujeto aún padece una enfermedad ocular residual mínima asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual. En un aspecto de la invención el anticuerpo monoclonal usado en dichos métodos es ACI-24-Ab-3 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 7-8 o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma EJ1A9, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2844. En otro aspecto de la invención los anticuerpos monoclonales usados en dichos métodos son ACI-11-Ab-9 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 17-18 o ACI-12-Ab-11 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 19-20, o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma FG1F9E4, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2845, o el hibridoma FK2A6A6, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2846.

En otro aspecto más de la invención, se proporciona un método para predecir la sensibilidad de un sujeto que se trata con una composición farmacéutica de acuerdo con la invención que comprende las etapas de: (a) poner una muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha que contiene una proteína amiloide en contacto con un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla de acuerdo con la

invención y como se describe en la presente memoria, uniéndose dicho anticuerpo con un epítipo de la proteína amiloide; (b) permitir que el anticuerpo se una con la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico; (c) detectar la formación del complejo inmunológico; (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 del cuerpo específica, y (e) comparar la cantidad del complejo inmunológico antes y después del comienzo del tratamiento, en el que una reducción en la cantidad del complejo inmunológico indica que el sujeto tiene un alto potencial de ser sensible al tratamiento. En un aspecto de la invención el anticuerpo monoclonal usado en dichos métodos es ACI-24-Ab-3 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 7-8 o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma EJ1A9, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2844. En otro aspecto de la invención los anticuerpos monoclonales usados en dichos métodos son ACI-11-Ab-9 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 17-18 o ACI-12-Ab-11 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 19-20, o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma FG1F9E4, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2845, o el hibridoma FK2A6A6, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2846.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para conservar o reducir la presión ocular en los ojos de un sujeto, específicamente un mamífero, más específicamente un ser humano que padece una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal, que comprende administrar al sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que necesite dicho tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla de acuerdo con la invención y como se describe en la presente memoria. Las anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular. En un aspecto de la invención el anticuerpo monoclonal usado en dichos métodos es ACI-24-Ab-3 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 7-8 o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma EJ1A9, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2844. En otro aspecto de la invención los anticuerpos monoclonales usados en dichos métodos son ACI-11-Ab-9 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 17-18 o ACI-12-Ab-11 que tiene las secuencias polipeptídicas SEC ID N°: 19-20, o una parte funcional del mismo como se describe en la presente memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal se produce por el hibridoma FG1F9E4, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2845, o el hibridoma FK2A6A6, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2846.

Definiciones

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína”, como se usan en la presente memoria, son intercambiables y se define que significan una biomolécula compuesta de aminoácidos ligados por un enlace peptídico.

Los términos “un” y “el” como se usan en la presente memoria se define que significan “uno o más” e incluyen el plural a no ser que el contexto sea inapropiado.

Los términos “detectar” o “detectado” como se usan en la presente memoria significan usar técnicas conocidas para la detección de moléculas biológicas tales como métodos inmunoquímicos o histológicos y se refieren a determinar cualitativa o cuantitativamente la presencia o concentración de la biomolécula que se investiga.

“Amiloide β , A β o β -amiloide” es un término reconocido en la técnica y se refiere a proteínas y péptidos β amiloides, proteínas precursoras de β amiloide (APP), así como modificaciones, fragmentos y cualquier equivalente funcional de los mismos. Como se usa en la presente memoria, β amiloide se refiere a cualquier fragmento producido por la escisión proteolítica de APP pero especialmente los fragmentos que están implicados en o asociados con las patologías amiloides incluyendo, pero sin limitación, A β ₁₋₃₈, A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₁, A β ₁₋₄₂ y A β ₁₋₄₃.

La estructura y las secuencias de los péptidos β amiloides como se ha mencionado anteriormente se conocen bien por los expertos en la materia y se describen métodos para producir dichos péptidos o extraerlos del cerebro y otros tejidos, por ejemplo, en Glenner y Wong, *Biochem Biophys Res Comm* 129, 885-890 (1984). Además, los péptidos β amiloides también están disponibles en el mercado en diversas formas.

Las expresiones “fibrilla de A β ” o “filamento de A β ” o “fibrillas amiloides” o “protofibrillas” se refieren a formas poliméricas de proteína monomérica que forman fibras individuales o agrupadas con diámetro de fibra constante que son insolubles en medio acuoso y contienen grandes cantidades de una estructura de cruce β en su núcleo; principalmente con cadenas beta perpendiculares al eje de la fibrilla.

Las expresiones “A β monomérico” o “monómero de A β ” se refieren a proteína β amiloide completamente solubilizada sin complejos agregados en medio acuoso.

- 5 Las expresiones “protofibrillas” o “preparación protofibrilar” como se usan en la presente memoria se refieren a fracciones de mayor peso molecular de péptidos amiloides A β poliméricos, que están enriquecidos con oligómeros de A β amiloides solubles.

- 10 Las frases “amiloide soluble polimérico” y “péptidos A β amiloides oligoméricos” y “oligómero A β ” se usan de forma intercambiable en la presente memoria y se refieren a múltiples monómeros agregados de péptidos amiloides, o de péptidos de tipo amiloide o de péptidos amiloides modificados o truncados o de otros derivados de péptidos amiloides que forman estructuras oligoméricas o poliméricas que son solubles tanto *in vitro* en medio acuoso como *in vivo* en el cuerpo del mamífero o humano más particularmente en el cerebro, pero particularmente se refieren a múltiples monómeros agregados de péptidos amiloides o de péptidos amiloides modificados o truncados o de derivados de los mismos, que son solubles en el cuerpo del mamífero o humano más particularmente en el cerebro.

- 15 Las frases “péptidos A β amiloides solubles poliméricos” y “péptidos A β amiloides oligoméricos” y “oligómero A β ” se usan de forma intercambiable en la presente memoria y se refieren a múltiples monómeros agregados de péptidos A β amiloides, o de péptidos A β amiloides modificados o truncados o de otros derivados de péptidos A β amiloides que forman estructuras oligoméricas o poliméricas que son solubles tanto *in vitro* en medio acuoso como *in vivo* en el cuerpo del mamífero o humano, más particularmente en el cerebro, pero particularmente a múltiples monómeros agregados de β amiloide (A β) o de péptidos β amiloides (A β) modificados o truncados o de derivados de los mismos, que son solubles en el cuerpo del mamífero o humano más particularmente en el cerebro.

- 20 Con respecto a un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con el péptido monomérico A β 1-40, particularmente con el péptido monomérico A β 1-40 y con péptido amiloide polimérico y/u oligomérico soluble que comprende una pluralidad de péptidos monoméricos A β ₁₋₄₂ pero muestra una unión sustancialmente más débil con el péptido monomérico A β 1-28 y una unión intermedia con el péptido monomérico 1-42 y esencialmente ninguna unión con el péptido monomérico A β 17-40; por una “unión sustancialmente más débil” se entiende una unión que es al menos aproximadamente 80%, particularmente al menos aproximadamente 85%, más particularmente al menos aproximadamente 90% pero especialmente al menos aproximadamente 95% menor que la unión con el péptido monomérico A β 1-40.

- 25 Con respecto a un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con el péptido monomérico A β 1-42 y péptidos A β solubles poliméricos que comprenden una pluralidad de péptidos monoméricos A β ₁₋₄₂ y fibrillas o fibras A β que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil con el péptido monomérico A β 1-28 y esencialmente ninguna unión con el péptido monomérico A β 17-40, por una “unión sustancialmente más débil” se entiende una unión que es al menos aproximadamente 60%, particularmente al menos aproximadamente 65%, más particularmente al menos aproximadamente 70%, aún más particularmente al menos aproximadamente 80%, pero especialmente al menos aproximadamente 90% y hasta 100% menor que la unión con el péptido monomérico A β 1-42.

- 30 Con respecto a un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con el péptido monomérico A β 1-40, particularmente con el péptido monomérico A β 1-40 y con péptido amiloide polimérico y/u oligomérico soluble que comprende una pluralidad de péptidos monoméricos A β ₁₋₄₂ pero muestra una unión sustancialmente más débil con el péptido monomérico A β 1-28 y una unión intermedia con el péptido monomérico 1-42 y esencialmente ninguna unión con el péptido monomérico A β 17-40; por una “unión intermedia” se entiende una unión, que es al menos aproximadamente 60%, particularmente al menos aproximadamente 65%, más particularmente al menos aproximadamente 70%, aún más particularmente al menos aproximadamente 80% menor que la unión con el péptido monomérico A β 1-40.

- 35 Con respecto a un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con el péptido monomérico A β 1-40, particularmente con el péptido monomérico A β 1-40 y con péptido amiloide polimérico y/u oligomérico soluble que comprende una pluralidad de péptidos monoméricos A β ₁₋₄₂ pero muestra una unión sustancialmente más débil con el péptido monomérico A β 1-28 y una unión intermedia con el péptido monomérico 1-42 y esencialmente ninguna unión con el péptido monomérico A β 17-40; por “esencialmente ninguna unión” se entiende una unión, que es al menos aproximadamente 95%, particularmente al menos aproximadamente 98%, pero especialmente al menos aproximadamente 99% y hasta 100% menor que la unión con el péptido monomérico A β 1-40.

Con respecto a un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes

funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con el péptido monomérico A β ₁₋₄₂ y péptidos A β solubles poliméricos que comprenden una pluralidad de péptidos monoméricos A β ₁₋₄₂ y fibrillas o fibras de A β que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil con el péptido monomérico A β 1-28 y esencialmente ninguna unión con el péptido monomérico A β 17-40, por “esencialmente ninguna unión” se entiende una unión que es al menos aproximadamente 85%, particularmente al menos aproximadamente 90%, más particularmente al menos aproximadamente 95%, aún más particularmente al menos aproximadamente 98%, pero especialmente al menos aproximadamente 99% y hasta 100% menor que la unión con el péptido monomérico A β 1-42.

La unión del anticuerpo de acuerdo con la invención como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, con péptidos monoméricos A β se determina por un ensayo de tipo ELISA, particularmente por un ensayo de ELISA usando péptidos monoméricos A β biotinilados, pero especialmente por un ensayo de ELISA como se describe en los Ejemplos 1.16 y 2.16 posteriores.

Por “aislado” se entiende una molécula biológica libre de al menos algunos de los componentes con los que se encuentra de forma natural.

La frase “enfermedades y trastornos que están provocados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide” incluye, pero sin limitación, enfermedades y trastornos provocados por la presencia o actividad de proteínas de tipo amiloide en estado monomérico, de fibrilla o polimérico, o cualquiera combinación de los tres. Dichas enfermedades y trastornos incluyen, pero sin limitación, amiloidosis, tumores endocrinos y enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal. Las anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular.

La frase “enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal”, se refiere a anomalías patológicas asociadas con función o deposición de beta amiloide aberrante que da como resultado degradación neuronal, que puede aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular.

El término “amiloidosis” se refiere a un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas amiloides incluyendo, pero sin limitación, amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tales como enfermedades que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpos de Lewy (LBD), síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch); el complejo de Demencia de Parkinson de Guam, así como otras enfermedades que se basan en o están asociadas con proteínas de tipo amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (IBM), Diabetes de Aparición en Adultos; y amiloidosis cardíaca senil, y otras enfermedades, incluyendo enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal. Las anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual, lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular.

Los términos “anticuerpo” o “anticuerpos” 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, particularmente a moléculas de inmunoglobulina y a partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir moléculas que contienen un sitio de unión que se une inmunoespecíficamente a un

antígeno. La inmunoglobulina de acuerdo con la invención puede ser de cualquier tipo (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA e IgY) o clase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

Se pretende que los "anticuerpos" dentro del alcance de la presente invención incluyen anticuerpos monoclonales, policlonales, quiméricos, monocatenarios, biespecíficos o bieficaces, simianizados, humanos y humanizados así como fragmentos activos de los mismos. Los ejemplos de fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos incluyen fragmentos Fab, F(ab')₂, scFv y Fv, incluyendo los productos de una biblioteca de expresión de inmunoglobulina Fab y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anticuerpos y fragmentos mencionados anteriormente.

Dichos fragmentos activos pueden derivar de un anticuerpo de la presente invención por varias técnicas conocidas en este campo. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales purificados pueden escindir-se con una enzima, tal como pepsina, y someterse a filtración en gel de HPLC. La fracción apropiada que contiene fragmentos Fab puede después recogerse y concentrarse por filtración de membrana y similares. Para una descripción adicional de técnicas generales para el aislamiento de fragmentos activos de anticuerpo, 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.

La frase "anticuerpo humanizado" se refiere a un tipo de anticuerpo modificado por ingeniería genética que tienen sus CDR derivadas de una inmunoglobulina donadora no humana, derivando las partes derivadas de inmunoglobulina restantes de la molécula de una o más inmunoglobulinas humanas. Además, los restos de soporte del armazón pueden alterarse para conservar la afinidad de unión. Se conocen bien por los expertos en la materia métodos para obtener "anticuerpos humanizados" (véase, por ejemplo, Queen *et al.*, Proc. Natl Acad Sci USA, 86: 10029-10032 (1989), Hodgson *et al.*, Biol. Technology, 9: 421 (1991)).

Un "anticuerpo humanizado" también puede obtenerse por un nuevo enfoque de ingeniería genética que permite la producción de anticuerpos policlonales tipo humano madurados por afinidad en animales grandes, tales como, por ejemplo, conejos (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 7.129.084).

La frase "anticuerpo monoclonal" también se reconoce bien en la técnica y se refiere a un anticuerpo que se produce en masa en el laboratorio a partir de un único clon y que reconoce solamente un antígeno. Los anticuerpos monoclonales se realizan típicamente fusionando un linfocito B productor de anticuerpos, normalmente de vida corta, con una célula de crecimiento rápido, tal como una célula cancerosa (en ocasiones denominada una célula "inmortal"). La célula híbrida resultante, o hibridoma, se multiplica rápidamente, creando un clon que produce grandes cantidades del anticuerpo. Para el fin de la presente invención, también se entiende que "anticuerpo monoclonal" comprende anticuerpos que se producen por un clon materno que no ha alcanzado aún la monoclonalidad completa.

El término "CDR" se refiere a la región hipervariable de un anticuerpo. La expresión "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se usa en la presente memoria se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en bucles estructuralmente definidos en secuencia y/o forma. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). Se usan y están abarcadas en la presente memoria varias delineaciones de región hipervariable. Las Regiones Determinantes de Complementariedad de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más habitualmente usadas (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)).

Las letras "HC" y "LC" que preceden el término "CDR" se refieren, respectivamente, a una CDR de una cadena pesada y una cadena ligera. Chothia se refiere en su lugar a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Las regiones hipervariables de AbM representan una solución intermedia entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan por el software de modelización de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los restos de cada una de estas regiones hipervariables se observan a continuación.

Bucle -----	Kabat -----	AbM -----	Chothia -----	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Numeración de Kabat)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Numeración de Chothia)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las regiones hipervariables pueden comprender “regiones hipervariables extendidas” como sigue: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en la VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102, o 95-102 (H3) en la VH. Los restos de dominio variable se enumeran de acuerdo con Kabat *et al.*, mencionado anteriormente, para cada una de estas definiciones.

La expresión “numeración de restos de dominio variable como en Kabat” o “numeración de posiciones de aminoácidos como en Kabat”, y variaciones de las mismas, se refieren al sistema de numeración usado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un inserto de un único aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo restos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del resto 82 de FR de cadena pesada. La numeración de Kabat de los restos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineamiento en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat “convencional”.

Se entiende que la frase “anticuerpo funcionalmente equivalente” dentro del alcance de la presente invención se refiere a un anticuerpo que comparte sustancialmente al menos una propiedad funcional importante con un anticuerpo, por ejemplo propiedades funcionales descritas en la presente memoria incluyendo, pero sin limitación: especificidad de unión por la proteína β amiloide, particularmente por la proteína $A\beta_{1-42}$, y más particularmente por la región epitópica 4-16 de la proteína $A\beta_{1-42}$, inmunorreactividad *in vitro*, inhibición de la agregación de los monómeros de $A\beta_{1-42}$ en fibrillas poliméricas de alto peso molecular y/o disgregación de fibrillas poliméricas de $A\beta_{1-42}$ preformadas, y/o una propiedad de rotura de láminas β y alivio de los efectos de enfermedades y trastornos que están provocados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo, pero sin limitación, amiloidosis, tumores endocrinos y enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como degradación neuronal, cuando se administra de forma 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 descritas en la presente memoria o conocidas en la técnica, pero particularmente de la clase IgG4. Además, los anticuerpos pueden producirse por cualquier método, tal como presentación de fagos o producirse en cualquier organismo o línea celular, incluyendo bacterias, insectos, mamíferos u otro tipo de célula o línea celular que produzca anticuerpos con características deseadas, tales como anticuerpos humanizados. Los anticuerpos también pueden formarse combinando una parte Fab y una región Fc de diferentes especies.

Los términos “biespecífico”, “bifuncional” y “bieficaz” se usan de forma sinónima dentro del alcance de la presente solicitud para caracterizar un anticuerpo que muestra una propiedad de inhibición en la formación de fibras amiloides o de tipo amiloide así como una propiedad de disgregación de fibras amiloides o de tipo amiloide.

El término “antígeno” se refiere a una entidad o fragmento de la misma que puede inducir una respuesta inmunitaria en un organismo, particularmente un animal, más particularmente un mamífero incluyendo un ser humano. El término incluye inmunógenos y regiones de los mismos responsables de la antigenicidad o determinantes antígenicos.

Como se usa en la presente memoria, el término “soluble” significa parcial o completamente disuelto en una solución acuosa.

También como se usa en la presente memoria, el término “inmunogénico” se refiere a sustancias que inducen o

potencian la producción de anticuerpos, linfocitos T u otras células inmunitarias reactivas dirigidas contra un agente inmunogénico y contribuyen a una respuesta inmunitaria en seres humanos o animales.

Se produce una respuesta inmunitaria cuando un individuo produce suficientes anticuerpos, linfocitos T y otras células inmunitarias reactivas contra composiciones inmunogénicas administradas de la presente invención para moderar o aliviar el trastorno para tratar.

La frase "amiloide soluble polimérico" se refiere a múltiples monómeros agregados de péptidos amiloides, o de péptidos de tipo 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 de mamífero o humano más particularmente en el cerebro, pero particularmente a múltiples monómeros agregados de β amiloide ($A\beta$) o de péptidos β amiloides modificados o truncados ($A\beta$) o de derivados de los mismos, que son solubles en el cuerpo del mamífero o humano más particularmente en el cerebro.

El término "hibridoma" se reconoce en la técnica y se entiende por los expertos en la materia que se refiere a una célula producida por la fusión de una célula productora de anticuerpos y una célula inmortal, por ejemplo una célula de mieloma múltiple. Dicha célula híbrida es capaz de producir un aporte continuo de anticuerpo. Véase la definición de "anticuerpo monoclonal" anterior y los Ejemplos posteriores para una descripción más detallada de un método de fusión conocido en la técnica.

El término "vehículo" como se usa en la presente memoria significa una estructura en la que puede incorporarse o con la que puede asociarse un péptido antigénico o construcción supramolecular, presentando o exponiendo de este modo péptidos antigénicos o parte del péptido al sistema inmunitario de un ser humano o animal. Cualquier partícula que puede usarse de forma adecuada en terapia animal o humana tal como, por ejemplo, una vesícula, una partícula o un cuerpo en partículas puede usarse como un vehículo dentro del contexto de la presente invención. El término comprende además métodos de suministro en los que pueden transportarse composiciones de construcciones antigénicas supramoleculares que comprenden el péptido antigénico a sitios deseados por mecanismos de suministro. Un ejemplo de dicho sistema de suministro utiliza metales coloidales tales como oro coloidal. El término "vehículo" comprende además mecanismos de suministro conocidos por los expertos habituales en la materia incluyendo, pero sin limitación, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) y otros adyuvantes.

En una construcción antigénica supramolecular de acuerdo con la presente invención, el liposoma puede tener una función dual porque puede usarse como un vehículo que comprende la construcción supramolecular como se ha descrito en la presente memoria y, al mismo tiempo, actuar como un adyuvante para aumentar o estimular la respuesta inmunitaria dentro del animal diana o ser humano para tratar con la vacuna terapéutica de acuerdo con la invención. También debe entenderse que las composiciones de construcciones antigénicas supramoleculares de la presente invención pueden comprender además adyuvantes adicionales tales como, por ejemplo, lípido A, alumbre, fosfato cálcico, interleucina 1 y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas, pero particularmente un lípido detoxificado A, tal como monofosforil o difosforil lípido A, o alumbre, más conservantes, diluyentes, emulsionantes, estabilizadores y otros componentes que se conocen y se usan en las vacunas en la técnica. Además, puede usarse cualquier sistema adyuvante conocido en la técnica en la composición de la presente invención. Dichos adyuvantes incluyen, pero sin limitación, adyuvante incompleto de Freund, adyuvante completo de Freund, manano acetilado ligado a β -(1,4) polidispersado ("Acemanano"), TITERMAX[®] (adyuvantes de copolímero de polioxi-etileno-polioxi-propileno de CytRx Corporation), adyuvantes lipídicos modificados de Chiron Corporation, adyuvantes derivados de saponina de Cambridge Biotech, *Bordetella pertussis* muertas, el lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram negativas, aniones poliméricos grandes tales como dextrán sulfato y geles inorgánicos tales como alumbre, hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio.

Las proteínas vehículo que pueden usarse en las composiciones de construcciones antigénicas supramoleculares de la presente invención incluyen, pero sin limitación, proteína de unión a maltosa "MBP"; albúmina de suero bovino "BSA"; hemocianina de lapa californiana "KLH"; ovoalbúmina; flagelina; tiroglobulina; albúmina del suero de cualquier especie; gamma globulina de cualquier especie; células singénicas; células singénicas que portan antígeno Ia; y polímeros de aminoácidos D y/o L.

Además, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de anticuerpo que, cuando se administra a un ser humano o animal, induce una respuesta inmunitaria que es suficiente para dar como resultado un efecto terapéutico en dicho ser humano o animal. La cantidad eficaz se determina fácilmente por un experto habitual en la materia siguiendo procedimientos rutinarios.

La "homología" entre dos secuencias se determina por identidad de secuencia. Si dos secuencias que van a compararse entre sí difieren en longitud, la identidad de secuencia preferentemente se refiere al porcentaje de los restos de nucleótidos de la secuencia más corta que son idénticos a los restos de nucleótidos de la secuencia más larga. La identidad de secuencia puede determinarse convencionalmente con el uso de programas informáticos tales como el programa Bestfit (Paquete de Análisis de Secuencias de Wisconsin, 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 encontrar el segmento que tiene la mayor identidad de secuencia entre dos secuencias. Cuando se usa Bestfit u otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular tiene, por ejemplo, 95% de identidad con una secuencia de referencia de la presente invención, los parámetros se ajustan preferentemente de modo que el porcentaje de identidad se calcule sobre la longitud completa de la secuencia de referencia y se permiten huecos de homología de hasta 5% del número total de los nucleótidos en la secuencia de referencia. Cuando se usa Bestfit, los parámetros llamados opcionales se dejan preferentemente en sus valores predefinidos ("por defecto"). Las desviaciones que aparecen en la comparación entre una secuencia dada y las secuencias descritas anteriormente de la invención pueden estar provocadas por ejemplo por adición, delección, sustitución, inserción o recombinación. Dicha comparación de secuencia también puede llevarse a cabo preferentemente 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 fin, pueden usarse los ajustes de parámetros "por defecto".

Como se usa en la presente memoria, un "cambio conservativo" se refiere a alteraciones que son sustancialmente conformacional o antigénicamente neutras, produciendo cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produciendo cambios mínimos en los determinantes antigénicos de los polipéptidos mutantes, respectivamente, en comparación con la proteína nativa. Cuando se hace referencia a los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención, un cambio conservativo significa una sustitución de aminoácidos que no hace al anticuerpo incapaz de unirse con el receptor objeto. Un experto en la materia podrá predecir qué sustituciones de aminoácidos pueden realizarse manteniendo a la vez una alta probabilidad de ser conformacionalmente y antigénicamente neutras. Dichas directrices se proporcionan, por ejemplo en Berzofsky, (1985) *Science* 229: 932-940 y Bowie *et al.* (1990) *Science* 247: 1306-1310. Los factores que deben considerarse que afectan a la probabilidad de mantener la neutralidad conformacional y antigénica incluyen, pero sin limitación: (a) es menos probable que la sustitución de aminoácidos hidrófobos afecte a la antigenicidad porque es más probable que los restos hidrófobos se localicen en el interior de una proteína; (b) es menos probable que la sustitución de aminoácidos fisicoquímicamente similares afecte a la conformación porque el aminoácido sustituido imita estructuralmente el aminoácido nativo; y (c) es probable que la alteración de secuencias conservadas evolutivamente afecte de forma adversa a la conformación ya que dicha conservación sugiere que las secuencias de aminoácidos pueden tener importancia funcional. Un experto en la materia podrá evaluar alteraciones en la conformación proteica usando ensayos bien conocidos, tales como, pero sin limitación métodos de fijación de microcomplementos (véase Wasserman *et al.* (1961) *J. Immunol.* 57: 290-295; Levine *et al.* (1967) *Meth. Enzymol.* 77: 928-936) y mediante estudios de unión usando anticuerpos monoclonales dependientes de conformación (véase Lewis *et al.* (1983) *Biochem.* 22: 948-954).

El término "hibridar" como se usa en la presente memoria se refiere a condiciones de hibridación convencionales, preferentemente a condiciones de hibridación en las que se usa SSPE 5x, SDS 1%, solución de Denhardt 1x como una solución y/o las temperaturas de hibridación están entre 35 °C y 70 °C, preferentemente 65 °C. Después de la hibridación, el lavado se lleva a cabo preferentemente en primer lugar con SSC 2x, SDS 1% y posteriormente con SSC 0,2x a temperaturas entre 35 °C y 70 °C, preferentemente a 65 °C (con respecto a la definición de SSPE, SSC y solución de Denhardt véase Sambrook *et al.* *Molecular Biology: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989). Se prefieren particularmente condiciones de hibridación rigurosas como se describen por ejemplo en Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente. Están presentes por ejemplo condiciones de hibridación rigurosas particularmente preferidas si la hibridación y el lavado suceden a 65 °C como se ha indicado anteriormente. Se prefieren menos condiciones de hibridación no rigurosas, por ejemplo con hibridación y lavado llevados a cabo a 45 °C, y aún menos a 35 °C.

La presente invención puede entenderse más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada de realizaciones específicas incluidas en la presente memoria. Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a detalles específicos de ciertas realizaciones de la misma, no se pretende que dichos detalles se consideren limitaciones sobre el alcance de la invención.

La presente invención proporciona anticuerpos y partes funcionales de los mismos que son anticuerpos conformacionalmente sensibles. Estos anticuerpos reconocen epítomos específicos en una amplia diversidad de antígenos proteicos amiloides. Los anticuerpos son útiles para intervención de diagnóstico y terapéutica en enfermedades y trastornos que están provocados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide, y especialmente en Enfermedad de Alzheimer.

Los anticuerpos pueden administrarse a individuos para inmunizarlos de forma pasiva contra una diversidad de enfermedades y trastornos que están provocados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide, tales como enfermedad de Alzheimer.

Los anticuerpos proporcionados en la presente memoria son anticuerpos monoclonales o policlonales que tienen especificidad de unión por péptidos antigénicos implicados en el inicio, progresión y/o empeoramiento de diversas enfermedades y trastornos que están provocados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide tales como enfermedad de Alzheimer.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se preparan inmunizando un animal, tal como un ratón, rata, conejo o cualquier otra especie animal que pueda producir anticuerpos nativos o humanos, con una composición de construcción antigénica supramolecular.

Las construcciones antigénicas supramoleculares como se desvelan en la presente memoria generalmente comprenden péptidos modificados para potenciar el efecto antigénico en los que dichos péptidos se modifican mediante pegilación (usando polietilenglicol o polietilenglicol modificado) o se modifican mediante otros métodos tales como por ácido palmítico, poliaminoácidos (por ejemplo poliglicina, polihistidina), polisacáridos (por ejemplo ácido poligalacturónico, ácido poliláctico, poliglicolida, quitina, quitosano), polímeros sintéticos (poliamidas, poliuretanos, poliésteres) o copolímeros (por ejemplo poli(ácido metacrílico) y N-(2-hidroxi) propil metacrilamida) y similares.

La modificación por ácido palmítico (palmitoilación), aunque proporciona un anclaje para el péptido en la bicapa liposómica, debido a la longitud relativa reducida del resto de ácido graso C_{16:0} conduce a que el péptido quede prácticamente sobre la superficie del liposoma. Por lo tanto, las células que procesan el antígeno tendrán que captar el liposoma completo con el péptido, lo que, en la mayoría de los casos, da como resultado una respuesta inmunitaria más lenta en términos relativos.

En una realización de la invención, se usa un péptido A β ₂₂₋₃₅ amiloide modificado y péptido A β ₂₉₋₄₀, respectivamente, en la preparación de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención.

En una realización de la invención, se usa un péptido A β ₁₋₁₅ amiloide modificado en la preparación de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención.

El péptido amiloide A β ₁₋₁₅ modificado puede sintetizarse siguiendo el método presentado en Nicolau *et al.* 2002. el enfoque presentado en Nicolau *et al.* implica modificar el péptido antigénico mediante un injerto en resina de un resto lipófilo o hidrófobo, con los restos de aminoácidos terminales de un péptido preformado dando como resultado un producto de pureza considerablemente alta. En particular, se une un aminoácido protegido, particularmente un aminoácido protegido por Fmoc a una resina usando química de acoplamiento conocida. El grupo protector se retira y se acopla un segundo resto de aminoácido protegido. Después se usa síntesis peptídica automática convencional usando química de protección conocida, particularmente química de Fmoc/tBu, y grupos protectores de cadenas laterales convencionales para sintetizar el péptido antigénico A β mediante acoplamiento en los aminoácidos 22 a 25, 29 a 40 y 1 a 15, respectivamente, de la proteína amiloide A β ₁₋₄₂ para producir el fragmento peptídico. En una etapa final se acoplan dos aminoácidos protegidos adicionales al fragmento peptídico creciente. Los grupos Mtt pueden después escindirse selectivamente y acoplarse con ácido palmítico. Después de lavar la resina, el grupo protector se retira y la resina se escinde simultáneamente, seguido de desprotecciones de cadena lateral usando metodología convencional. El producto final puede después obtenerse en alta pureza y su identidad confirmarse por métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, espectrometría de masas por electropulverización.

El resto lipófilo o hidrófobo de acuerdo con la presente invención puede ser un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido en el que la cadena principal de carbono de ácidos grasos tiene al menos 10 átomos de carbono. Particularmente, el resto lipófilo o hidrófobo es un ácido graso con una cadena principal de carbono de al menos aproximadamente 14 átomos de carbono y hasta aproximadamente 24 átomos de carbono, siendo cada número individual de átomos de carbono que quedan dentro de este intervalo también parte de la presente invención. Más particularmente, el resto lipófilo o hidrófobo tiene una cadena principal de carbono de al menos 14 átomos de carbono. Los ejemplos de restos hidrófobos incluyen, pero sin limitación, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico y colesterol o DSPE. En una realización específica de la presente invención el resto lipófilo o hidrófobo es ácido palmítico.

Para potenciar la respuesta inmunitaria, puede aplicarse de forma adecuada otro anclaje/espaciador para reconstituir el péptido en el liposoma, por ejemplo polietilenglicol (PEG).

El PEG se une covalentemente a un resto de aminoácido unido en ambos extremos del péptido, en particular los restos de aminoácidos Glu, Cys o Lys o cualquier otro resto de aminoácido que puede usarse adecuadamente para unir covalentemente PEG con el péptido. En el otro extremo de la cadena un resto hidrófobo puede unirse covalentemente para actuar como el elemento de anclaje en la bicapa liposómica tal como, por ejemplo, fosfatidiletanolamina (PEA). Por lo tanto, el liposoma aún actúa como un adyuvante y el péptido que está suficientemente lejos de la bicapa puede procesarse solo y de este modo aumenta su inmunogenicidad en comparación con el antígeno palmitoilado.

En ciertas realizaciones, las construcciones antigénicas supramoleculares usadas dentro del alcance de la presente invención comprenden una secuencia peptídica unida covalentemente a lisina pegilada, una en cada extremo. La longitud de la cadena de PEG (polietilenglicol) puede variar de n = 8 a n = 150.000 o más, particularmente de n = 10 a n = 80.000, más particularmente de n = 20 a n = 10.000. En una realización específica de la invención la longitud

de la cadena de PEG no es mayor de $n = 45$, particularmente entre $n = 5$ y $n = 40$, más particularmente entre $n = 10$ y $n = 30$, y aún más particularmente $n = 10$.

Las construcciones supramoleculares descritas en la presente memoria pueden sintetizarse usando síntesis peptídica automática y química de protección conocida, particularmente química de Fmoc/tBu y grupos protectores de cadena lateral convencionales. Típicamente, la pegilación de péptidos da como resultado mezclas de regioisómeros.

Para conseguir una unión específica de sitio de un conjugado de PEG-lípido con los extremos tanto C como N terminal de A β pueden usarse péptidos parcialmente protegidos. Para las secuencias peptídicas que contienen restos Lys o His internos se añade una Lys(ivDde) ortogonalmente protegido a cada extremo. Puede añadirse una Gly adicional al extremo C terminal para facilitar la síntesis. El grupo protector se retira y se N-acetila usando anhídrido acético seguido de escisión selectiva de los grupos ivDde.

Se va a favorecer una resina, particularmente una resina de 2-clorotritilo, que sea sensible a ácido y permita de este modo el aislamiento de péptidos protegidos.

En una realización específica de la invención, la reacción de acoplamiento se realiza en la fase de solución. La escisión selectiva de la resina en condiciones suaves libera después los péptidos protegidos de forma interna.

Se consiguieron acoplamientos de fase de solución con éxito con los péptidos derivados de una secuencia de proteína β amiloide tal como, por ejemplo, una A β_{22-35} y A β_{29-40} , respectivamente, o una A β_{1-15} con una molécula de PEG modificada por un ácido graso-fosfatidilcolina tal como, por ejemplo, DSPE. La separación de los productos mono y diacoplados antes de las desprotecciones de cadena lateral finales puede conseguirse usando cromatografía de intercambio catiónico. Desprotecciones de cadena lateral peptídica posteriores conducen al aislamiento de los conjugados deseados con una pureza aceptable. La purificación puede conseguirse por métodos bien conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, HPLC. etc.

Este enfoque para la síntesis de antígenos de β amiloide con lípido N y C terminal-PEG usando péptidos protegidos es aplicable a una amplia diversidad de secuencias peptídicas.

Después pueden prepararse antígenos liposómicos de acuerdo con la invención como se describe en Nicolau *et al.*, 2002. El péptido antigénico A β amiloide modificado, particularmente el péptido antigénico A β_{22-35} y A β_{29-40} PEGilado modificado, o el péptido antigénico A β_{1-15} palmitoilado, puede reconstituirse en una construcción que consiste en liposomas particularmente liposomas compuestos de dimiristoil fosfatidil colina (DMPC), dimiristoil fosfatidil etanolamina (DMPEA), dimiristoil fosfatidil glicerol (DMPG) y colesterol, opcionalmente que contienen monofosforil lípido A.

En una realización específica de la invención se usan liposomas con lípido A como adyuvante para preparar la vacuna anti-amiloide. Se mezclan dimiristoilfosfatidilcolina, glicerol y colesterol, particularmente en una relación molar de 0,9:1,0:0,7. Después se añade un inmunomodulador fuerte tal como, por ejemplo, monofosforil lípido A a una concentración adecuada, particularmente a una concentración de entre 30 y 50 mg por mmol, más particularmente a 40 mg por mmol de fosfolípidos. El péptido A β antigénico modificado se añade después a una relación molar de péptido y fosfolípidos de entre 1:30 y 1:200, particularmente una relación molar de 1:1000, 1:50 y 1:120, más particularmente de 1:100. Se retiran los disolventes, por ejemplo mediante evaporación, y la película resultante se hidrata con solución de tampón estéril tal como, por ejemplo PBS.

También pueden prepararse liposomas por la técnica de inyección de flujo cruzado como se describe, por ejemplo, en Wagner *et al.* (2002) *Journal of Liposome Research* Vol 72(3), pp 259 - 270. Durante la inyección de las soluciones lipídicas en un sistema de tampón acuoso, los lípidos tienden a formar "precipitados", seguido de autoordenamiento en vesículas. El tamaño de la vesícula obtenida depende de factores tales como la concentración de lípidos, la velocidad de agitación, la velocidad de inyección y la elección de lípidos. El sistema de preparación puede consistir en un módulo de inyección de flujo cruzado, vasos para la fase polar (por ejemplo una solución de tampón de PBS), un recipiente de solución de etanol/lípido y un dispositivo de presión, pero particularmente un dispositivo de presión de nitrógeno. Mientras la solución acuosa o polar se bombea a través del módulo de inyección de flujo cruzado, la solución de etanol/lípido se inyecta en la fase polar con diversas presiones aplicadas.

El liposoma aún actúa como un adyuvante y el péptido que está suficientemente lejos de la bicapa puede procesarse solo y de este modo aumenta su inmunogenicidad en comparación con el antígeno palmitoilado.

El extremo de PEG libre está unido covalentemente a una molécula de fosfatidiletanolamina (en la que el ácido graso puede ser: mirístico, palmítico, esteárico, oleico, etc. o una combinación de los mismos) para actuar como el elemento de anclaje. Esta estructura supramolecular puede anclarse por reconstitución en liposomas que consisten en fosfolípidos y colesterol (fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, colesterol en diversas relaciones molares). Pueden usarse otros fosfolípidos. El lípido A se usa a una concentración de aproximadamente 40 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ de

fosfolípidos.

En ciertas realizaciones, las construcciones antigénicas supramoleculares palmitoiladas o pegiladas comprenden un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de β amiloide. Los péptidos también pueden comprender o

5 corresponder a péptido β amiloide completo y fragmentos activos del mismo. Adicionalmente, los péptidos útiles para la presente invención comprenden en particular $A\beta_{22-35}$ y $A\beta_{29-40}$, respectivamente, o $A\beta_{1-15}$ y fragmentos activos de los mismos.

Para inducir y preparar anticuerpos y para determinar la inmunogenicidad de la construcción antigénica de $A\beta$ modificada se inmuniza un animal adecuado seleccionado del grupo que consiste en ratones, ratas, conejos, cerdos, aves, etc., pero particularmente ratones, especialmente ratones C57BL/6 con el péptido antigénico. La inmunogenicidad de la construcción antigénica se determina explorando muestras de suero en intervalos temporales adecuados después de inmunización usando un inmunoensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de ELISA.

10

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden prepararse usando técnicas clásicas de clonación y fusión celular bien conocidas en este campo. El inmunógeno (antígeno) de interés se administra típicamente (por ejemplo por inyección intraperitoneal) a ratones de tipo silvestre o endogámicos (por ejemplo ratones BALB/c o especialmente C57BL/6), ratas, conejos u otras especies animales o ratones transgénicos que pueden producir anticuerpos nativos o humanos. El inmunógeno puede administrarse solo, o mezclado con adyuvante, o expresarse a partir de un vector (vector de replicón de VEE, vaccinia), o como ADN, o como una proteína de fusión para inducir una respuesta inmunitaria. Las proteínas de fusión comprenden el péptido contra el que se desea una respuesta inmunitaria acoplado con proteínas vehículo, tales como, por ejemplo, beta galactosidasa, glutatión S-transferasa, hemocianina de lapa californiana (KLH), y albúmina de suero bovino. En estos casos, los péptidos actúan como

15 haptenos con las proteínas vehículo. Después de reforzarse el animal, por ejemplo, dos o más veces, se recogen células del bazo de los animales inmunizados e hibridomas generados fusionando células del bazo sensibilizadas con una línea celular de mieloma, tales como células de mieloma SP2/O murinas (ATCC, Manassas, VA) usando los procesos bien conocidos de Kohler y Milstein (*Nature* 256: 495-497 (1975)) y Harlow y Lane (*Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York 1988)).

20

25

En una realización específica de la invención la construcción antigénica de acuerdo con la invención, particularmente una composición de vacuna que comprende dicha construcción antigénica en una forma farmacéuticamente aceptable, se administran dosis repetidas, en particular en 1 a 15 dosis, más particularmente en 2 a 10 dosis, aún más particularmente en 3 a 7 dosis pero especialmente en 4 a 6 dosis, e intervalos temporales de entre 1 y 10 semanas, particularmente intervalos temporales de entre 1 y 6 semanas, más particularmente en intervalos temporales de entre 1 y 4 semanas, y aún más particularmente en intervalos temporales de entre 2 y 3 semanas. La respuesta inmunitaria se controla tomando muestras de suero en un momento adecuado después del refuerzo, particularmente de 3 a 10 días después del refuerzo, más particularmente de 4 a 8 días después del refuerzo y más particularmente de 5 a 6 días después del refuerzo y determinando la inmunogenicidad de la construcción antigénica usando metodología conocida, particularmente uno de los inmunoensayos habitualmente usados tales como, por

30 ejemplo, un ensayo de ELISA.

35

40

La inmunización con la construcción antigénica de acuerdo con la invención, pero particularmente con una composición de vacuna que comprende la construcción antigénica de acuerdo con la invención en una forma farmacéuticamente aceptable conduce a una respuesta inmunitaria significativa en el animal tratado. Los animales, pero especialmente los ratones con títulos terapéuticos se seleccionan para una fusión de células productoras de anticuerpos, particularmente linfocitos B con una línea celular de crecimiento continuo o inmortal, tal como una línea celular de mieloma. Se induce que las células se fusionen mediante la adición de polietilenglicol. Los títulos terapéuticos son los que dan un resultado positivo en un ensayo de ELISA en una dilución de entre 1:4000 y 1:6000, particularmente de entre 1:4500 y 1:5500, más particularmente de 1:5000.

45

50

Las células híbridas resultantes se clonan después de la manera convencional, por ejemplo usando dilución limitante, y los clones resultantes, que producen los anticuerpos monoclonales deseados, se cultivan.

Los hibridomas obtenidos de este modo se seleccionan químicamente sembrando en placas las células en un medio de selección que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT).

55

Los hibridomas se exploran posteriormente con respecto a la capacidad para producir anticuerpos monoclonales contra enfermedades o trastornos asociados con amiloide específicos. Los hibridomas que producen anticuerpos de interés se clonan, se expanden y se almacenan congelados para producción futura. El hibridoma preferido produce un anticuerpo monoclonal que tiene el isotipo IgG.

60

El anticuerpo policlonal se prepara inmunizando animales, tales como ratones o conejos, o cualquier otro animal adecuado con composiciones de construcciones antigénicas supramoleculares de la presente invención descritas en la presente memoria. Posteriormente se recoge suero de la sangre de los animales, y se exploran los anticuerpos en los sueros con respecto a reactividad de unión frente a la proteína amiloide.

65

Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden prepararse en una formulación fisiológicamente aceptable y pueden comprender un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable usando técnicas conocidas. Por ejemplo, el anticuerpo de acuerdo con la invención y como se describe en la presente memoria incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, en particular, el anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo 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, soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc.

En la formulación de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede conseguirse de acuerdo con metodología convencional conocida por los expertos habituales en la materia.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse a un sujeto en forma de un sólido, líquido o aerosol en una dosis adecuada, farmacéuticamente eficaz. Los ejemplos de composiciones sólidas incluyen píldoras, cremas y unidades de dosificación implantables. Las píldoras pueden administrarse por vía oral. Las cremas terapéuticas pueden administrarse por vía tópica. Las unidades de dosificación implantables pueden administrarse por vía local, por ejemplo, en un sitio de tumor, o pueden implantarse para liberación sistemática de la composición terapéutica, por ejemplo, por vía subcutánea. Los ejemplos de composiciones líquidas incluyen formulaciones adaptadas para inyección por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intraarterial y formulaciones para administración tópica e intraocular. Los ejemplos de formulaciones de aerosol incluyen formulaciones de inhalador para administración a los pulmones.

Las composiciones pueden administrarse por vías convencionales de administración. En general, la composición puede administrarse por vías tópica, oral, rectal, nasal, intradérmica, intraperitoneal o parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular). Además, la composición puede incorporarse en matrices de liberación prolongada tales como polímeros biodegradables, implantándose los polímeros cerca de donde se desee el suministro, por ejemplo, en el sitio de un tumor. El método incluye la administración de una única dosis, la administración de dosis repetidas a intervalos temporales predeterminados, y la administración prolongada durante un periodo de tiempo predeterminado.

Una matriz de liberación prolongada, como se usa en la presente memoria, es una matriz compuesta de materiales, habitualmente polímeros que son degradables por hidrólisis enzimática o de ácido/base o por disolución. Una vez insertada en el cuerpo, sobre la matriz actúan enzimas y fluidos corporales. La matriz de liberación prolongada idealmente se elige por materiales biocompatibles tales como liposomas, polilactidas (ácido poliláctico), poliglicolida (polímero de ácido glicólico), polilactida coglicolida (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), polianhídridos, poli(orto)ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, condroitín sulfato, 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 coglicolida (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico).

Se conoce bien por los expertos habituales en la materia pertinente que la dosificación de la composición dependerá de diversos factores tales como, por ejemplo, la afección que se trata, la composición particular usada, y otros factores clínicos tales como el peso, talla, sexo y condición de salud general del paciente, área de superficie corporal, el compuesto o composición particular para administrar, otros fármacos que se administren simultáneamente, y la vía de administración.

La composición puede administrarse en combinación con otras composiciones que comprenden una sustancia o compuesto biológicamente activo, particularmente al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos contra el estrés oxidativo, compuestos anti apoptóticos, quelantes metálicos, inhibidores de la reparación de ADN tales como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3 APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3 PDS), activadores de secretasa, inhibidores de β y γ secretasa, proteínas tau, neurotransmisores, destructores de láminas β , moléculas antiinflamatorias, "antipsicóticos atípicos" tales como, por ejemplo clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina o inhibidores de colinesterasa (ChEI) tales como tacrina, rivastigmina, donepezilo y/o galantamina y otros fármacos y complementos 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 de acuerdo con la presente invención y, opcionalmente, un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable e instrucciones para el tratamiento de enfermedades.

Puede estar presente materia farmacéuticamente activa proteínica en cantidades entre 1 ng y 10 mg por dosis. Generalmente, el régimen de administración debería estar en el intervalo de entre 0,1 μ g y 10 mg del anticuerpo de acuerdo con la invención, particularmente en un intervalo de 1,0 μ g a 1,0 mg, y más particularmente en un intervalo de entre 1,0 μ g y 100 μ g, siendo también parte de la invención todos los números individuales que quedan dentro de estos intervalos. Si la administración se realiza mediante infusión continua una dosificación más apropiada puede

estar en el intervalo de entre 0,01 μg y 10 mg de unidades por kilogramo de peso corporal por hora siendo también parte de la invención todos los números individuales que quedan dentro de estos intervalos.

La administración generalmente será por vía parenteral, por ejemplo por vía intravenosa. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Los disolventes no acuosos incluyen, sin limitación, propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como etiloleato. Los disolventes acuosos pueden seleccionarse del grupo que consiste en agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas que incluyen solución salina y medio tamponado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer lactado o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen suministradores de fluidos y nutrientes, suministradores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y otros. También pueden estar presentes conservantes tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes, etc.

La composición farmacéutica puede comprender además vehículos proteicos tales como, por ejemplo, albúmina de suero o inmunoglobulina, particularmente de origen humano. Pueden estar presentes más agentes biológicamente activos en la composición farmacéutica de la invención dependiendo de su uso pretendido.

Cuando la diana de unión se localiza 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 con un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, de modo que el anticuerpo o fragmento activo del mismo puede introducirse fácilmente en el cerebro. Cuando la barrera hematoencefálica permanece intacta, existen varios enfoques conocidos en la técnica para transportar moléculas a través de ella, incluyendo, pero sin limitación, métodos físicos, métodos basados en lípidos y métodos basados en receptor y canal.

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 crear aperturas en la barrera hematoencefálica. Los métodos para evitarla incluyen, pero sin limitación, inyección directa en el cerebro (véase, por ejemplo, Papanastassiou *et al.*, Gene Therapy 9: 398-406 (2002)) e implantar un dispositivo de suministro en el cerebro (véase, por ejemplo, Gili *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, ultrasonidos (véase, por ejemplo, Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2002/0038086), presión osmótica (por ejemplo, mediante administración de manitol hipertónico (Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N. Y. (1989))), permeabilización por, por ejemplo, bradiquinina o permeabilizador A-7 (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 5.112.596, 5.268.164, 5.506.206 y 5.686.416), y transfección de neuronas que atraviesan la barrera hematoencefálica con vectores que contienen genes que codifican el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Publicación de Patente de Estados Unidos 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 estén acoplados con fragmentos activos del mismo que se unan a receptores en el endotelio vascular de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2002/0025313) y recubrir con el anticuerpo o fragmento activo del mismo partículas de lipoproteína de baja densidad (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2004/0204354) o apolipoproteína E (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2004/0131692).

Los métodos basados en receptor y canal de transporte del anticuerpo o fragmento activo del mismo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero sin limitación, el uso de bloqueadores de glucocorticoides para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2002/0065259, 2003/0162695 y 2005/0124533); activar canales de potasio (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2005/0089473), inhibir los transportadores de fármacos ABC (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2003/0073713); cubrir anticuerpo con una transferrina y modular la actividad del o los receptores de transferrina (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2003/0129186) y cationizar los anticuerpos (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.004.697).

En una realización adicional la presente invención proporciona métodos y kits para la detección y diagnóstico de enfermedades o afecciones asociadas con amiloide, incluyendo enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal. Las anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual, lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular. Por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio

óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular. Además, la presente invención proporciona métodos y kits para diagnosticar una predisposición a una enfermedad o afección asociada con amiloide, incluyendo enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal, que puede aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como la corteza visual lo que conduce a déficits visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico lo que conduce a glaucoma; el cristalino lo que conduce a cataratas debido a la deposición de beta amiloide; el humor vítreo lo que conduce a amiloidosis ocular; la retina lo que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad; el nervio óptico lo que conduce a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea lo que conduce a distrofia reticular, o para controlar la enfermedad residual mínima en un paciente o para predecir la sensibilidad de un paciente a un tratamiento con un anticuerpo o una composición de vacuna de acuerdo con la invención y como se describe en la presente memoria. Estos métodos incluyen métodos inmunológicos conocidos habitualmente usados para detectar o cuantificar sustancias en muestras biológicas o en una condición *in situ*.

El diagnóstico de una enfermedad o afección asociada con amiloide o de una predisposición a una enfermedad o afección asociada con amiloide en un sujeto que lo necesite, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano, incluyendo enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal, puede conseguirse detectando la unión inmuno-específica de un anticuerpo de la invención, particularmente un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo del mismo con un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ*, que incluye poner la muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica 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 con 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 proteína amiloide en la muestra o parte o área del cuerpo específica, opcionalmente comparar la cantidad del complejo inmunológico con un valor de control normal, en el que un aumento de la cantidad del complejo inmunológico en comparación con un valor de control normal indica que el sujeto padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o afección asociada con amiloide. La proteína amiloide puede estar en forma monomérica, de fibrilla y/o polimérica. El anticuerpo o parte activa del mismo puede ser específico para las formas monoméricas, de fibrilla y/o poliméricas de la proteína amiloide.

El control de la enfermedad residual mínima en un sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano, después de tratamiento con un anticuerpo o una composición de vacuna de acuerdo con la invención puede conseguirse detectando la unión inmuno-específica de un anticuerpo de la invención, particularmente un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo del mismo con un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ*, lo que incluye poner la muestra o parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha que contiene la proteína amiloide en contacto con un anticuerpo que se une con un epítipo de la proteína amiloide, permitir que el anticuerpo se una con 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 proteína amiloide en la muestra o parte o área del cuerpo específica, comparar opcionalmente la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal, en el que un aumento en la cantidad de dicho complejo inmunológico en comparación con un valor de control normal indica que el sujeto aún puede padecer una enfermedad residual mínima. La proteína amiloide puede estar en forma monomérica, de fibrilla y/o polimérica. El anticuerpo o parte activa del mismo puede ser específico para las formas monomérica, de fibrilla y/o polimérica de la proteína amiloide.

Puede conseguirse predicción de la sensibilidad de un sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano, a un tratamiento con una composición de vacuna de acuerdo con la invención detectando la unión inmuno-específica de un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo del mismo con un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ*, lo que incluye poner la muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha que contiene la proteína amiloide en contacto con un anticuerpo que se une con un epítipo de la proteína amiloide, lo que permite que el anticuerpo se una con 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 parte o área del cuerpo específica, comparar opcionalmente la cantidad de dicho complejo inmunológico antes y después del comienzo del tratamiento, en el que una reducción de la cantidad de dicho complejo inmunológico indica que dicho paciente tiene un alto potencial de ser sensible al tratamiento. La proteína amiloide puede estar en la forma monomérica, de fibrilla y/o polimérica. El anticuerpo o parte activa del mismo puede ser específico para las formas monomérica, de fibrilla y/o polimérica de la proteína amiloide.

Las muestras biológicas que pueden usarse en el diagnóstico de una enfermedad o afección asociada con amiloide, para diagnosticar una predisposición a una enfermedad o afección asociada con amiloide, incluyendo enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por

ejemplo, degradación neuronal, que puede aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, o para controlar la enfermedad residual mínima en un paciente o para predecir la sensibilidad de un paciente a un tratamiento con un anticuerpo o una composición de vacuna de acuerdo con la invención y como se describe en la presente memoria son, por ejemplo, fluidos tales como suero, plasma, saliva, secreciones gástricas, mucus, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático y similares o muestras tisulares o celulares obtenidas de un organismo tales como tejido neural, cerebral, cardíaco o vascular. Para determinar la presencia o ausencia de la proteína amiloide en una muestra puede usarse cualquier inmunoensayo conocido por los expertos habituales en la materia tales como, por ejemplo, ensayos que utilizan métodos de detección indirectos usando reactivos secundarios para la detección, ensayos de ELISA e inmunoprecipitación y aglutinación. Una descripción detallada de estos ensayos se proporciona, por ejemplo, en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York 1988 555-612, documento WO96/13590 de Maertens y Stuyver, Zrein *et al.* (1998) y documento WO96/29605.

Para diagnóstico *in situ*, el anticuerpo o cualquier parte activa y funcional del mismo puede administrarse al organismo para diagnosticar por métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, inyección intravenosa, intranasal, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial de modo que pueda producirse una unión específica entre un anticuerpo de acuerdo con la invención con una región epitópica en la proteína amiloide. El complejo de anticuerpo/antígeno puede detectarse convenientemente mediante un marcador unido al anticuerpo o un fragmento funcional del mismo o cualquier otro método de detección conocido en la técnica.

Los inmunoensayos usados en aplicaciones de diagnóstico o en aplicaciones para diagnosticar una predisposición a una enfermedad o afección asociada con amiloide, incluyendo enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal, que pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, o para controlar la enfermedad residual mínima en un paciente o para predecir la sensibilidad de un paciente a un tratamiento con un anticuerpo o una composición de vacuna de acuerdo con la invención y como se describe en la presente memoria típicamente se basan en antígenos marcados, anticuerpos o reactivos secundarios para detección. Estas proteínas o reactivos pueden marcarse con compuestos que se conocen generalmente por los expertos habituales en la materia incluyendo enzimas, radioisótopos y sustancias fluorescentes, luminiscentes y cromogénicas incluyendo, pero sin limitación partículas coloreadas tales como perlas de oro coloidal y de látex. De estos, el marcaje radiactivo puede usarse para casi todos los tipos de ensayos y con la mayoría de las variaciones. Los marcadores conjugados con enzimas son particularmente útiles cuando debe evitarse la radiactividad o cuando se necesitan resultados rápidos. Los fluorocromos, aunque requieren equipamiento 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 por afinidad.

Como alternativa, el anticuerpo puede marcarse indirectamente por reacción con sustancias marcadas que tienen una afinidad por la inmunoglobulina, tales como proteína A o G o anticuerpos secundarios. El anticuerpo puede conjugarse con una segunda sustancia y detectarse con una tercera sustancia marcada que tenga una afinidad por la segunda sustancia conjugada con el anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y el conjugado de anticuerpo-biotina detectarse usando avidina o estreptavidina marcada. De forma similar, el anticuerpo puede conjugarse con un hapteno y el conjugado de anticuerpo-hapteno detectarse usando anticuerpo anti hapteno marcado.

Los expertos habituales en la materia conocerán estos y otros marcadores adecuados que pueden emplearse de acuerdo con la presente invención. La unión de estos marcadores con anticuerpos o fragmentos de los mismos puede conseguirse usando técnicas convencionales habitualmente conocidas por los expertos habituales en la materia. Se describen técnicas típicas en 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). Son técnicas de acoplamiento mencionadas en este último el método de glutaraldehído, el método de peryodato, el método de dimaleimida y otros.

Los inmunoensayos actuales utilizan un método de doble anticuerpo para detectar la presencia de un analito, en el que el anticuerpo se marca directamente por reactividad con un segundo anticuerpo que se ha marcado con un marcador detectable. El segundo anticuerpo es preferentemente uno que se une a anticuerpos del animal del que deriva el anticuerpo monoclonal. En otras palabras, si el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo de ratón, entonces el segundo anticuerpo marcado es un anticuerpo anti ratón. Para que el anticuerpo se use en el ensayo descrito en la presente memoria, este marcador es preferentemente una perla recubierta con anticuerpo, particularmente una perla magnética. Para que el anticuerpo se emplee en el inmunoensayo descrito en la presente memoria, el marcador es preferentemente una molécula detectable tal como una sustancia radiactiva, fluorescente o una electroquimioluminiscente.

También puede emplearse un sistema de doble anticuerpo alternativo, con frecuencia denominado sistemas de formato rápido debido a que se adaptan a determinaciones rápidas de la presencia de un analito, dentro del alcance de la presente invención. El sistema requiere alta afinidad entre el anticuerpo y el analito. De acuerdo con una realización de la presente invención, la presencia de la proteína amiloide se determina usando un par de anticuerpos, cada uno específico para proteína amiloide. Uno de dichos pares de anticuerpos se denomina en la

presente memoria "anticuerpo detector" y el otro de dicho par de anticuerpos se denomina en la presente memoria "anticuerpo de captura". El anticuerpo monoclonal de la presente invención puede usarse como un anticuerpo de captura o un anticuerpo detector. El anticuerpo monoclonal de la presente invención también puede usarse como anticuerpo tanto de captura como detector, juntos en un único ensayo. Una realización de la presente invención usa de este modo el método de tipo sándwich de doble anticuerpo para detectar proteína amiloide en una muestra de fluido biológico. En este método, el analito (proteína amiloide) se intercala entre el anticuerpo detector y el anticuerpo de captura, estando el anticuerpo de captura inmovilizado de forma irreversible en un soporte sólido. El anticuerpo detector contendría un marcador detectable para identificar la presencia del sándwich de anticuerpo-analito y de este modo la presencia del analito.

Las sustancias de fase sólida ejemplares incluyen, pero sin limitación, placas de microtitulación, tubos de ensayo de poliestireno, perlas magnéticas, de plástico o de vidrio y portaobjetos que se conocen bien en el campo del radioinmunoensayo y el inmunoensayo enzimático. También se conocen bien por los expertos habituales en la materia métodos para acoplar anticuerpos a fases sólidas. Más recientemente, se han empleado varios materiales porosos tales como nylon, nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibra de vidrio y otros polímeros porosos como soportes sólidos.

La presente invención también se refiere a un kit de diagnóstico para detectar proteína amiloide en una muestra biológica que comprende una composición como se ha definido anteriormente. Además, la presente invención se refiere a este último kit de diagnóstico que, además de una composición como se ha definido anteriormente, también comprende un reactivo de detección como se ha definido anteriormente. La expresión "kit de diagnóstico" se refiere en general a cualquier kit de diagnóstico conocido en la técnica. Más específicamente, esta última expresión se refiere a un kit de diagnóstico como se describe en Zrein *et al.* (1998).

Es otro objeto de la presente invención proporcionar nuevas inmunosondas y kits de ensayo para detección y diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas con amiloide, incluyendo enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociados con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal, que puede aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, que comprenden anticuerpos de acuerdo con la presente invención. Para inmunosondas, los anticuerpos se unen directa o indirectamente a una molécula indicadora adecuada, por ejemplo, una enzima o un radionúclido. El kit de ensayo incluye un recipiente que contiene uno o más anticuerpos de acuerdo con la presente invención e instrucciones para usar los anticuerpos para el fin de unirlos con antígeno amiloide para formar un complejo inmunológico y detectar la formación del complejo inmunológico de modo que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de proteína amiloide.

Ejemplos

Ejemplo 1: Anticuerpo generado mediante inmunización con una construcción antigénica supramolecular de A β ₁₋₁₅ palmitoilado

Ejemplo 1.1 Métodos para realizar construcciones antigénicas supramoleculares de A β ₁₋₁₅ palmitoilado

1.1.1 Síntesis de antígeno peptídico tetra(palmitoil lisina)-A β 1-15

El péptido 1-15 amiloide palmitoilado se sintetizó siguiendo un método previamente presentado mejorado (Nicolau *et al.* 2002). Este nuevo enfoque implicaba el injerto en resina de ácido palmítico en los restos Lys terminales del péptido preformado en lugar de síntesis de fase sólida por etapas incorporando el aminoácido modificado 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc)-Lys(Pal)-OH. Este nuevo enfoque mejora la eficacia de acoplamiento y proporciona un producto de pureza considerablemente mayor. Por lo tanto, el aminoácido protegido ortogonalmente Fmoc-Lys(Mtt)-OH se unió a una resina Wang usando química de acoplamiento de [2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato] (HBTU). El grupo de Fmoc se retiró usando piperidina 20% en DMF y se acopló un segundo resto de Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Se usó después síntesis peptídica automática convencional usando química de Fmoc/tBu y grupos protectores de cadena lateral convencionales para acoplar en los siguientes 15 aminoácidos para producir una secuencia peptídica. Finalmente, los últimos dos aminoácidos acoplados fueron Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Los grupos Mtt se escindieron selectivamente después usando ácido trifluoroacético 1% (TFA) en diclorometano para liberar un fragmento peptídico y después se acoplaron a ácido palmítico usando HBTU. Después del lavado de la resina, el grupo de Fmoc se retiró con piperidina 20% en dimetilformamida (DMF) y finalmente se llevaron a cabo escisión de resina y desprotecciones de cadena lateral simultáneas usando TFA en condiciones convencionales. La trituración de dietil éter frío dio el producto como un sólido blanco. La espectrometría de masas por electronebulización confirmó la identidad del producto (m/z esperado: 1097,9 ([M]3+); hallado: 1096,8 ([M-3H]3+), sin ningún otro péptido tri-, di- o monopalmitoilado detectado.

Ejemplo 1.2: Anticuerpos inducidos por construcciones antigénicas supramoleculares**Preparación de mAb inducidos contra construcción antigénica supramolecular de A β ₁₋₁₅ palmitoilado**

Se usó antígeno palmitoilado (ACI-24, A β ₁₋₁₅) para la inmunización en ratones C57BL/6 en intervalos de 2 semanas. Se inmunizaron 10-12 animales con cada antígeno (volumen de inyección: 200 μ l que contienen 8 nmoles de péptido). La última inyección se realizó 4 días antes del sacrificio de los animales. Después de 5 refuerzos se seleccionaron los ratones con títulos terapéuticos (cuando una dilución de 1:5.000 del suero era positiva en ELISA) para una fusión. Se recogen células del bazo de los animales inmunizados e hibridomas generados fusionando células del bazo sensibilizadas con una línea celular de mieloma. La fusión de los linfocitos B de los ratones de los bazos se realizó con células de la línea celular de mieloma SP2-0. (ATCC, Manassas, VA) usando los procesos bien conocidos de Kohler y Milstein (Nature 256: 495-497 (1975)) y Harlow y Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York 1988)).

Se indujo que las células se fusionaran mediante la adición de polietilenglicol. Las células híbridas resultantes se cultivaron después durante 10 $\pm$ 14 días de la manera convencional para permitir el crecimiento clonal. Se realizó selección clonal inicial usando dilución limitante. Se seleccionaron clones de hibridoma productores de IgG y se ensayaron con respecto a su unión específica con el péptido A β ₁₋₄₂ por ELISA y se cultivaron los clones resultantes, que producían los anticuerpos monoclonales deseados.

Los hibridomas obtenidos de este modo se seleccionaron químicamente sembrando las células en un medio de selección que contenía hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT).

Los hibridomas se exploraron posteriormente con respecto a la capacidad para producir anticuerpos monoclonales contra enfermedades o trastornos asociados con amiloide específicos. Una vez que se hubo identificado el clon materno, este se subclonó cuatro veces para asegurar la monoclonalidad y permitir que se establezca el híbrido. Se clonaron los hibridomas que producían anticuerpos de interés, se expandieron y se almacenaron congelados para producción futura.

El anticuerpo se isotipó por un kit de isotipación monoclonal de ratón disponible en el mercado y el clon estable se adaptó a medio sin suero y se colocó en un biorreactor para producción de anticuerpos.

El hibridoma preferido produjo un anticuerpo monoclonal que tenía el isotipo IgG1.

Ejemplo 1.3: Determinación de la especificidad para el anticuerpo mACI-24-Ab3

Para analizar la especificidad del anticuerpo mACI-24-Ab3, se transfirieron diferentes concentraciones de fibrillas preformadas de Amiloide 1-42, 1-40 y 17-40, 1-28 en Membrana de Nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham Biosciences). Después de bloquear con leche en polvo 10% y Tween 20 0,7%, las membranas se incubaron con anticuerpo primario a 20 μ g/ml durante 2 h a TA. Después de lavar, las membranas se incubaron con anticuerpo de oveja anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (Amersham Biosciences) durante 1 h a TA, se lavaron y se incubaron con solución quimioluminiscente seguido de la exposición de la membrana a película de rayos X.

Para medir la unión del mAb mACI-24-Ab3 con β amiloide se preforman fibras 1-42, 1-40 y 17-40, 1-28 durante siete días a 37 °C y se transfieren a la membrana. Se usa anticuerpo 20 μ g/ml para medir la capacidad de unión y el anticuerpo unido se detecta por anticuerpo de oveja anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano rusticano durante 20 minutos de exposición.

Ejemplo 1.4: Ensayo fluorescente de tioflavina T (Th-T)

Para medir tanto la inhibición de la agregación como las propiedades de disgregación del mAb se usó el ensayo fluorescente de Tioflavina T (Th-T) que se une específicamente a moléculas A β ₁₋₄₂ fibrilares y posteriormente se correlaciona la intensidad de emisión fluorescente con la cantidad de filamentos A β ₁₋₄₂ presentes en la solución.

El polvo liofilizado A β ₁₋₄₂ se reconstituyó en hexafluoroisopropanol (HFIP) hasta 1 mM. La solución peptídica se sonicó durante 15 minutos a temperatura ambiente, se agitó durante una noche, y las alícuotas se prepararon en tubos de microcentrifuga sin silicona. El HFIP se evaporó después en una corriente de argón. La película peptídica resultante se secó al vacío durante 10 minutos y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

1.4.1 Ensayo de agregación de A β ₁₋₄₂

Para ensayar con respecto a la inhibición mediada por anticuerpo de la agregación de A β ₁₋₄₂ el anticuerpo se prediluyó en PBS y se preparó una solución de ensayo que contenía los siguientes componentes en un tubo de incubación sin silicona: anticuerpo prediluido 3,3 o 0,33 μ M, tioflavina T 10 μ M, A β ₁₋₄₂ 33 μ M y DMSO 8,2%. Por lo tanto las relaciones molares finales del anticuerpo y A β ₁₋₄₂ fueron de 1:10 y 1:100. También se prepararon

soluciones de control apropiadas. Las soluciones se incubaron después durante 24 horas a 37 °C, y la espectrofluorescencia (unidades de fluorescencia relativa; UFR) se leyó en seis repeticiones en placas negras de 384 pocillos (Perkin-Elmer) en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer FluoroCount. La inhibición de la agregación o disgregación se expresa como la media de % de inhibición o disgregación, respectivamente, de acuerdo con la siguiente ecuación en comparación con el control:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{UFR de control pos} - \text{UFR de control neg}) - (\text{UFR de muestra con } A\beta_{1-42} - \text{UFR de muestra sin } A\beta_{1-42})}{(\text{UFR de control pos} - \text{UFR de control neg})} \times 100\%$$

A una relación molar de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$ de 1:100 la inhibición tuvo una media de 26% (2 experimentos independientes), mientras que a una relación molar de 1:10 la inhibición fue de 51% (2 experimentos independientes).

1.4.2 Ensayo de disgregación de $A\beta_{1-42}$

Para medir las propiedades de disgregación del mAb se usó el ensayo fluorescente de Tioflavina T (ThT) que se une específicamente a moléculas $A\beta_{1-42}$ fibrilares y posteriormente la intensidad de emisión fluorescente se correlaciona con la cantidad de filamentos de $A\beta_{1-42}$ presentes en la solución.

Para ensayar con respecto a la disgregación mediada por anticuerpo de $A\beta_{1-42}$ preagregado, se compuso un $A\beta_{1-42}$ de bajo peso molecular, preparado como se ha descrito anteriormente, como una solución 110 μM en DMSO 27% y PBS 1X. Después se permitió que esta solución se agregara a 37 °C durante 24 horas después de lo cual se añadieron los siguientes: anticuerpo prediluido 3,3 o 0,33 μM y tioflavina T 10 μM . Esto dio como resultado una relación molar de 1:10 y 1:100 de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$, que contenía DMSO 8,2%. Esta solución se incubó después durante 24 horas adicionales a 37 °C. Después se midió la espectrofluorescencia y se calculó el % de disgregación como se ha descrito anteriormente.

El anticuerpo ACI-24-Ab-3 mostró una disgregación significativa de $A\beta_{1-42}$ preagregado en el ensayo de disgregación. A una relación molar de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$ de 1:100 la disgregación fue de una media de 12% (2 experimentos independientes), mientras que en una relación molar de 1:10 la disgregación fue de 20% (2 experimentos independientes).

A partir de los resultados anteriores resulta evidente que ACI-24-Ab-3 muestra bifuncionalidad en la interacción con filamentos de $A\beta_{1-42}$, porque es capaz de inhibir la agregación de $A\beta_{1-42}$ y la disgregación de fibras de $A\beta_{1-42}$ preformadas.

35 Ejemplo 1.5: Interacciones de ACI-24-Ab3- $A\beta_{1-42}$

Las interacciones entre el anticuerpo ACI-24-Ab-3 y el péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ se estudian usando resonancia de plasmón superficial. Se determina la unión del anticuerpo de ratón con monómeros o fibras de $A\beta_{1-42}$.

Todos los experimentos de SPR se llevan a cabo en un instrumento Biacore X (Biacore AB). Los reactivos para la inmovilización (EDC, NHS y etanolamina), microplacas sensoras CM5 y SA así como tampón de ejecución y de muestra HBS-EP se obtienen de Biacore AB. Se usa acetato sódico (10 mM, pH 5,0) como tampón de acoplamiento para aumentar el rendimiento de acoplamiento. Se prepara $A\beta_{1-42}$ fibrilar (Bachem) añadiendo tampón PBS a $A\beta_{1-42}$ hasta una concentración final de 3 mg/ml y dejando los frascos a 37 °C durante 7 días. El $A\beta_{1-42}$ fibrilar se acopla a una microplaca sensora CM5 que contiene una matriz de carboximetil dextrano unida a superficie. Se acopla $A\beta_{1-42}$ monomérico biotinilado (Bachem) a una microplaca Sensora SA que consiste en matriz de carboximetil dextrano con Estreptavidina unida covalentemente. Típicamente se ensayan cuatro o cinco concentraciones de mAb por diluciones en serie usando tampón de ejecución. Se realizan inyecciones comenzando desde la concentración más baja y se pasan sobre fc 1 y 2 a un caudal de 30 $\mu\text{l/min}$ durante 30 minutos. La celda de flujo 2 no está derivatizada y las respuestas se restan de fc 1 para corregir el ruido del instrumento y cambios refractarios de volumen. Después de terminarse la inyección, las superficies se lavan inmediatamente con tampón de ejecución durante 5 minutos. Para retirar el anticuerpo unido restante de las fibrillas de $A\beta_{1-42}$, se realiza regeneración de superficie inyectando pulsos de NaOH 10 mM. Se realiza análisis cinético usando algoritmos para la integración numérica y análisis global usando BIAevaluation 3.0. Las curvas obtenidas para inyecciones de analito a diferentes concentraciones se superponen y las líneas basales se ajustan a cero. Para ajuste de curvas, todos los datos se ajustan simultáneamente a un complejo homogéneo 1:1.

Se determina la unión del anticuerpo ACI-24-Ab-3 de ratón con amiloide.

Ejemplo 1.6: Unión de anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 con fibras amiloides

Par analizar el lado de unión molecular del anticuerpo ACI-24-Ab-3 en fibras preformadas se realiza microscopia electrónica de transmisión (TEM) con contraste negativo.

El anticuerpo ACI-24-Ab-3, se acopla con oro coloidal de 8 nm de acuerdo con Slot JW, Geuze HJ (1985). Para la coincubación de fibras amiloides 1-42 ($A\beta_{1-42}$) se incuban fibras de 6,65 μ M durante 24 horas a TA con el anticuerpo marcado con oro con la relación molar de 1:100. Posteriormente se incuban 5 μ l de muestra en la rejilla de Cu con descarga luminiscente nueva (malla 200) cubierta con película de parlodio/C durante 45 segundos, se lavan 3 veces con agua y una vez con acetato de uranilo nuevo diluido y filtrado 2%. Las muestras se tiñen en acetato de uranilo 2% durante 15-20 segundos. El exceso de tinción en las rejillas se absorbe y se seca posteriormente al aire. Se preparan tres rejillas de cada muestra. Las rejillas se analizan en microscopio electrónico de transmisión Hitachi 7000.

Ejemplo 1.7: Fraccionamiento por ultracentrifugación en gradiente de densidad

La propiedades del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 en la inhibición de la polimerización de fibras de $A\beta_{1-42}$ y disgregación de fibras de $A\beta_{1-42}$ se estudia por ultracentrifugación en gradiente de densidad (Rzepecki *et al.*, 2004) que se basa en el principio de distribuir entre fibras peptídicas resultantes de tamaños diferentes después de incubación con y sin anticuerpo seguido de un análisis de sedimentación de SDS-PAGE en un gradiente preformado (OptiPrep™). El análisis simultáneo de poblaciones de fibras de $A\beta$ preformadas, propiedades de disgregación e inhibición de la agregación de los anticuerpos coincubados, y unión de los anticuerpos con las fibras son ventajas obvias de estos métodos.

Para la inhibición de la agregación de $A\beta_{1-42}$, se incuban monómeros de $A\beta_{1-42}$ con mAb ACI-24-Ab-3 a dos relaciones molares diferentes (relación molar de $A\beta_{1-42}$ monomérico treinta o cien veces mayor que mAb) con la concentración final de $A\beta$ de 50 μ M. Después de 24 horas de incubación a 37 °C, las muestras se superponen sobre un gradiente discontinuo de Optiprep™ y los tubos se centrifugan a 259 000 g durante 3 h a 4 °C. Se recogen 15 fracciones (de 140 μ l cada una), la fracción 1 es la fracción menos densa de la parte superior del gradiente y la fracción 15 es la fracción más densa del fondo del gradiente. También se toma el sedimento. Las fracciones recogidas se analizan por SDS-PAGE con tinción de plata. La concentración de $A\beta_{1-42}$ para ensayos de inhibición es cinco veces menor que para ensayos de disgregación que reducen la cinética de agregación amiloide y aseguran la medición dentro de la fase lineal.

Para la disgregación de fibrillas de $A\beta_{1-42}$ preformadas por coincubación con mAb ACI-24-Ab-3 (a dos relaciones molares diferentes 1:30 y 1:100, mAb + Monómero $A\beta_{1-42}$ con la concentración final de $A\beta$ de 246 μ M), las muestras se incuban durante 24 horas a 37 °C. Después de 24 horas las muestras se fraccionan por ultracentrifugación y se sepan por SDS-PAGE como se ha descrito anteriormente y antes (Rzepecki *et al.*, 2004).

Ejemplo 1.8: Ensayo fluorescente para evaluar la inhibición de la agregación de filamentos de $A\beta_{1-42}$ y disgregación de filamentos de $A\beta_{1-42}$ preformados por coincubación con mAb ACI-24-Ab-3

Ensayo fluorescente de BIS-ANS

Para evaluar la propiedades de inhibición del mAb se usa el ensayo fluorescente de BIS-ANS (LeVine, 2002) que detecta específicamente la población monomérica o no fibrilosa de filamentos de $A\beta_{1-42}$. Antes de la medición de la fluorescencia, los monómeros de $A\beta_{1-42}$ se preincuban con tampón, que actúa como control, o mAb ACI-24-Ab-3 (relación molar 1:100, mAb frente a péptido $A\beta_{1-42}$) durante 14 horas a 37 °C. Las unidades de fluorescencia relativa se registran automáticamente y los resultados se expresan como cambios del control en porcentaje.

Ejemplo 1.9: RMN y caracterización de fluorescencia de la interacción del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 con péptido β amiloide $_{1-42}$ marcado con ^{13}C

Para evaluar el mecanismo potencial por el que el mAb solubiliza fibras preformadas o inhibe la formación de fibras, se realiza un experimento paralelo entre el ensayo fluorescente de Th-T y RMN de estado sólido de péptido β amiloide $_{1-42}$ marcado con Val12 y Tyr10 $\text{U-}^{13}\text{C}$. Por lo tanto el objetivo de esta investigación es seguir la transición de lámina β por espectroscopia de RMN de estado sólido en el péptido β amiloide y en presencia del anticuerpo monoclonal y comparar directamente esta con la capacidad de disgregación medida por el ensayo fluorescente de Th-T.

La espectroscopia de RMN de estado sólido no solamente detecta una transición en la estructura secundaria, sino que también permite localizar los dominios del péptido $A\beta_{1-42}$ que dominan la transición estructural. La RMN de estado sólido ha demostrado su aplicabilidad al problema ya que ha contribuido a la determinación estructural de las fibras $A\beta_{1-42}$ (Petkova *et al.*, 2004, Petkova *et al.*, 2002). En particular la correlación del cambio químico de $^{13}\text{C}_\alpha$ y $^{13}\text{C}_\beta$ con la estructura secundaria (Comilescu *et al.*, 1999, Luca *et al.*, 2001, Iwadata *et al.*, 1999) es una herramienta

valiosa para ensayar cambios de la estructura secundaria dentro de un péptido.

La síntesis del péptido marcado incluyendo una valina premarcada con ^{13}C en la posición 12 (^{12}Val) y una tirosina premarcada con ^{13}C en la posición 10 (^{10}Tyr) se realiza por un protocolo de síntesis de Fmoc. La identidad y pureza del péptido se confirman por espectroscopia de masas MALDI. El péptido β amiloide marcado (1-42) se usa para generar fibras incubando la solución peptídica en tampón de PBS durante 1 semana a 37°C . El principal problema, la escasa solubilidad del péptido β amiloide en tampón PBS, podría resolverse de la siguiente manera: el valor de pH del tampón de PBS se aumenta temporalmente por cantidades pequeñas de amoníaco para disolver el péptido β amiloide. El valor de pH original del tampón de PBS se vuelve a obtener incubando la muestra en presencia de un baño de PBS mayor usando el carácter volátil del amoníaco.

Para medir el efecto de los anticuerpos que rompen la lámina β , la solución de fibras se incuba con el anticuerpo durante 24 horas a 37°C para el ensayo tanto de RMN como de Th-T. Para la comparación en tiempo real se usa una alícuota de la misma solución para ensayo fluorescente de Th-T y la solución restante se liofiliza para las mediciones de RMN.

Las capacidades de disgregación de ACI-24-Ab-3 se analizan por coincubación con fibras β amiloides marcadas con ^{13}C preformadas usando ensayo fluorescente de Th-T.

Para investigar las diferencias entre la incubación con PBS (control) y mAb se desconvoluciona cada espectro usando PeakFit (www.systat.com/-products/PeakFit). Las líneas se ajustaron bien empleando un procedimiento de ajuste Lorenciano/Gaussiano mixto.

Ejemplo 1.10: Funcionalidad de ACI-24-Ab-3 en fibras amiloides

12.1 Modificación de la conformación de fibras de $\text{A}\beta_{1-42}$ e inicio de la disgregación después de unión del anticuerpo ACI-24-Ab-3.

Para evaluar el mecanismo por el que el anticuerpo es capaz de disgregar las fibras beta amiloides ($\text{A}\beta_{1-42}$) preformadas se realiza una comparación en paralelo del ensayo fluorescente de Tioflavina T (Th-T) midiendo la disgregación y la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de estado sólido de péptido $\text{A}\beta_{1-42}$ marcado con Valina 12 y Tirosina 10 $\text{U-}^{13}\text{C}$ analizando la conformación secundaria.

Ejemplo 1.11: Mapeo de epítomos del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3

El mapeo de epítomos del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 se realizó por ELISA usando una biblioteca de péptidos que comprende un total de 33 péptidos biotinilados que abarcan la secuencia de aminoácidos (aa) completa de $\text{A}\beta_{1-42}$ (producida por Mimotopes, Clayton Victoria, Australia y obtenida de ANAWA Trading SA, Wangen Suiza). Los péptidos en la biblioteca de péptidos estaban compuestos de péptidos de 8, 9 o 10 unidades de aminoácidos. Se usó un péptido $\text{A}\beta_{1-42}$ completo biotinilado (secuencia humana) como un control positivo (Bachem, Bubendorf, Suiza). Además, se usaron péptidos más largos que abarcaban $\text{A}\beta_{1-28}$, $\text{A}\beta_{17-40}$, $\text{A}\beta_{1-40}$ y $\text{A}\beta_{1-42}$ para definir la región más amplia a la que pueden unirse estos anticuerpos. Estos 4 péptidos también se biotinilaron (fabricados por Anaspec y obtenidos de ANAWA Trading SA, Suiza). El Mapeo de epítomos se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mimotopes). Brevemente, se bloquearon placas recubiertas con estreptavidina (NUNC, Roskilde, Dinamarca) con BSA 0,1% en PBS durante una noche a 4°C . Después de lavar con PBS-Tween 20 0,05%, las placas se recubrieron durante 1 hora a TA con los diferentes péptidos de la biblioteca, diluidos en BSA 0,1%, azida sódica 0,1% en PBS hasta una concentración final de $10\text{ }\mu\text{M}$. Después de lavar, las placas se incubaron durante 1 hora a TA con los diferentes anticuerpos, diluidos hasta $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ para ACI-24-Ab-3 en BSA 2%, Azida Sódica 0,1% en PBS. Las placas se lavaron de nuevo y se incubaron con IgG anti ratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson Immunresearch West Grove, PA, Estados Unidos) durante 1 h a TA. Después del lavado final, las placas se incubaron con sustrato de fosfatasa (pNPP, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos) y se leyeron después de 3 horas de incubación a 405 nm usando un lector de placas de ELISA.

Se descubrió sorprendentemente que el ACI-24-Ab-3 no se unía significativamente a $\text{A}\beta_{1-42}$ y tampoco mostraba ninguna unión con ninguno de los otros péptidos en la biblioteca, a pesar de su capacidad para inhibir la agregación de $\text{A}\beta_{1-42}$.

Para determinar si ACI-24-Ab-3 puede reconocer otros péptidos de $\text{A}\beta$, se evaluó la unión con $\text{A}\beta_{1-28}$, $\text{A}\beta_{17-40}$, $\text{A}\beta_{1-40}$ y $\text{A}\beta_{1-42}$. ACI-24-Ab-3 no mostró ninguna unión con $\text{A}\beta_{17-40}$, ninguna o baja unión con $\text{A}\beta_{1-28}$ y $\text{A}\beta_{1-42}$ pero mostró unión significativa con $\text{A}\beta_{1-40}$. Estos resultados sugieren que ACI-24-Ab-3 puede ser específico para $\text{A}\beta_{1-40}$.

Ejemplo 1.12: Influencia de la vacunación pasiva con ACI-24-Ab-3 en la carga amiloide del cerebro en ratones hAPP transgénicos sencillos

Para evaluar la capacidad *in vivo* del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 para unirse y eliminar amiloide soluble del cerebro, se usan ratones hAPP individuales de 6 meses de edad, de sexo y edad coincidentes, para un estudio de inmunización pasiva con diferente dosis. Se analiza la carga de Amiloide Soluble al final del estudio recogiendo el cerebro de los animales y realizando un ELISA específico de A β 1-40 y A β 1-42 (TGC, Alemania).

8-13 animales por grupo reciben dos inyecciones a un intervalo de una semana de 100, 300 y 1000 μ g de anticuerpo monoclonal en 200 μ l de PBS mientras que la inyección de PBS solamente actúa como un control. Un día después de la segunda inyección los animales se sacrifican para análisis bioquímico de la fracción de amiloides solubles. Para cuantificar la cantidad de A β 1-40 humano y A β 1-42 humano en la fracción soluble de los homogeneizados de cerebro y/o en el líquido cefalorraquídeo (LCR), se usan kits de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) disponibles en el mercado (ELISA altamente sensible de Amiloide β 40 o β 42 h, TGC, Suiza). El ELISA se realiza de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, se preparan patrones (una dilución de A β 1-40 o A β 1-42 sintéticos) y muestras en una placa de polipropileno de 96 pocillos sin capacidad de unión a proteína (Greiner, Alemania). Las diluciones convencionales con concentraciones finales de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3 y 15,6 pg/ml y las muestras se preparan en el diluyente de muestra, equipado en el kit de ELISA, hasta un volumen final de 60 μ l. Puesto que los niveles de amiloides aumentan con la edad del ratón y puesto que la evaluación real requiere que las lecturas de las muestras estén dentro de la parte lineal de la curva patrón, las muestras para análisis de A β 40 se diluyen 2:3, las muestras para análisis de A β 42 no se diluyen.

Las muestras, patrones y blancos (50 μ l) se añaden a la placa de poliestirol recubierto con anti A β (el anticuerpo de captura reconoce selectivamente el extremo C terminal del antígeno) además de con un conjugado de anticuerpo anti A β selectivo (anticuerpo de detección biotinilado) y se incuba durante una noche a 4 °C para permitir la formación del complejo de anticuerpo-amiloide-anticuerpo. Al día siguiente, se añade un conjugado de estreptavidina-peroxidasa, seguido 30 minutos después de la adición de una mezcla de TMB/peróxido, dando como resultado la conversión del sustrato en un producto coloreado y la intensidad del color se mide por medio de fotometría con un lector de ELISA con un filtro de 450 nm. Se obtiene cuantificación del contenido de A β de las muestras comparando la absorbancia con la curva patrón realizada con A β 1-40 o A β 1-42 sintético. Los datos se expresan como cambios individuales del valor de control medio (en porcentaje de control).

Ejemplo 1.13: Influencia de la administración pasiva crónica de ACI-24-Ab-3 en la carga de placas en ratones hAPPxPS1 dobles transgénicos

Para evaluar la capacidad *in vivo* del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 para unirse y reducir placas amiloides en el cerebro, se usan ratones hAPPxPS1 dobles transgénicos de 3,5 meses de edad, de sexo y edad coincidentes, para un estudio de inmunización pasiva crónica de cuatro meses de duración. Las placas amiloides se analizan al final del estudio por histoquímica del cerebro de los animales mediante unión de Tioflavina S.

15 animales transgénicos reciben 16 inyecciones semanales de 500 μ g de anticuerpo monoclonal en PBS. A 15 animales se les inyecta solamente PBS, actuando como controles. Todas las inyecciones se proporcionan por vía intraperitoneal. En el momento del sacrificio, los ratones se anestesian y se lavan de forma transcardiaca con suero fisiológico a 4 °C para retirar la sangre de los vasos cerebrales. Posteriormente, el cerebro se retira del cráneo y se separan el romboencéfalo y prosencéfalo con un corte en el plano coronal/frontal. El prosencéfalo se divide uniformemente en el hemisferio izquierdo y derecho usando un corte sagital de línea media. Un hemisferio se fija posteriormente durante una noche en paraformaldehído 4% para histología. Se cortan secciones sagitales de vibrátomo (40 μ m) para incubaciones en flotación libre y se almacenan a 4 °C hasta su tinción en PBS con azida sódica 0,1%. Se tiñen cinco secciones a diferentes niveles para placas densas con Tioflavina S. Las secciones de todos los animales usados se seleccionan aleatoriamente para tinción y cuantificación ciega. Se obtienen imágenes con un microscopio Leica DMR equipado con una cámara Sony DXC-9100P y se analizan con un ordenador usando software Leica Q-Win. La intensidad de la luz y los ajustes del condensador para el microscopio se mantienen constantes durante todo el proceso de adquisición de imágenes. Todas las imágenes adquiridas se someten a las mismas subrutinas informáticas para minimizar la parcialidad del investigador. El umbral del corte de densidad se aplica de forma uniforme en todo el análisis. El área del subículo se selecciona para cuantificación automática de la carga amiloide en la tinción con Tioflavina S.

Ejemplo 1.14: Influencia de la vacunación pasiva con ACI-24-Ab-3 en la capacidad de memoria en ratones hAPP transgénicos sencillos

Para analizar la capacidad *in vivo* del anticuerpo ACI-24-Ab-3 para modificar o aumentar la funcionalidad cognitiva, se usan ratones hAPP sencillos de 9 meses de edad, de sexo y edad coincidentes, para estudio de inmunización pasiva. Se mide la cognición no espacial al final del periodo de inmunización evaluado por Ensayo de Reconocimiento de nuevo Objeto (ORT).

12 animales por grupo reciben dos inyecciones intraperitoneales de 400 µg de anticuerpo monoclonal en 200 µl de PBS mientras que la inyección de PBS solamente actúa como control. Un día después de la segunda inyección se estudia la capacidad cognitiva en una Tarea de Reconocimiento de nuevo Objeto (ORT)^{12,13}. Para inclusión en la ORT los ratones se colocan durante 10 minutos en una arena conductual y se enfrentan a un nuevo objeto desconocido. Se registra el tiempo de exploración. Tres horas después los mismos animales se vuelven a colocar en la misma arena para una segunda sesión pero se enfrentan con el viejo objeto, previamente explorado, y adicionalmente con uno nuevo. De nuevo, los tiempos de exploración para ambos objetos se registran y se calcula el índice de cognición resultante como la relación de tiempo de exploración para el nuevo objeto en relación con el tiempo de exploración total y se expresa como cambios proporcionales al control.

Ejemplo 1.15 - Unión preferente del anticuerpo monoclonal de ratón con preparación enriquecida con oligómero protofibrilar (PF) de alto peso molecular (APM) de péptido Aβ₁₋₄₂ sobre monómeros de bajo peso molecular (BPM)

La unión de los anticuerpos monoclonales de ratón anti beta amiloide con el péptido Aβ₁₋₄₂ monomérico de bajo peso molecular (BPM) y preparaciones enriquecidas con oligómero protofibrilar (PF) de mayor peso molecular de péptido Aβ₁₋₄₂ puede realizarse usando ELISA.

Se usó cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando 2 columnas de SEC, Superdex 75 HR 10/30 (Intervalo de 3-70 kDa) y Superosa 6 HR 10/30 (Intervalo de 5-5.000 kDa), para preparar fracciones peptídicas de Aβ₁₋₄₂ consistentes en preparaciones enriquecidas con oligómero protofibrilar (PF) de alto peso molecular (APM) y monoméricas de bajo peso molecular (BPM) de péptido Aβ₁₋₄₂. Los eluatos resultantes se tiñeron después con acetato de uranilo y se examinaron por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (TEM) a 100 kV para verificar la morfología estructural de las fracciones de Aβ₁₋₄₂ eluidas.

Después se realizó un ELISA recubriendo con las fracciones de Aβ₁₋₄₂ una placa de ensayo de alta unión a 2 µM durante una noche. La placa recubierta se bloqueó después con BSA 1,0% y se añade el anticuerpo ACI-24-Ab-3 (EJ1A9 de ratón) en una dilución en serie que comienza a 20 µg/ml. También se usó una dilución en serie de un anticuerpo convencional (6E10, Chemicon). Se usó anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina y 4-nitrofenil fosfato para la detección de la unión. Las placas se leyeron a 405 nm. Todas las condiciones se ensayaron por duplicado con coeficiente de variación (CV) < 0,2.

La unión del anticuerpo de ratón anti Aβ ACI-24-Ab-3 (EJ1A9 de ratón) y el anticuerpo de control 6E10 se midió por ELISA. La Tabla 1.4 y la Figura 5 muestran valores de densidad óptica (D.O.) para el anticuerpo ACI-24-Ab-3 (EJ1A9 de ratón) tras la unión con preparaciones enriquecidas con oligómero protofibrilar (PF) y monómero BPM del péptido Aβ₁₋₄₂ humano. La Tabla 1.5 y la Figura 6 muestran valores de densidad óptica (D.O.) para el anticuerpo de control anti Aβ₁₋₄₂ 6E10 tras la unión con preparaciones enriquecidas con oligómero protofibrilar (PF) y de monómeros BPM del péptido Aβ₁₋₄₂ humano.

Estos resultados indican que el anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 muestra unión más fuerte con péptidos Aβ₁₋₄₂ que tienen morfología de PF/oligo de orden superior que la del péptido monomérico BPM. Además, estos resultados sugieren que ACI-24-Ab-3 se une a un epítipo que se presenta preferentemente en fracciones enriquecidas con oligómero protofibrilar (PF) de Aβ₁₋₄₂.

Ejemplo 1.16: Unión del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 con monómeros y oligómeros del péptido amiloide Aβ₁₋₄₂

Se evaluó la unión del anticuerpo anti β amiloide ACI-24-Ab-3 (clon: EJ1A9) con monómeros y oligómeros del péptido Aβ₁₋₄₂. Antes de usarse en el estudio, el anticuerpo se almacenó a -80 °C. El péptido Aβ₁₋₄₂ (Instalación W. M. Keck, Universidad de Yale) se almacenó como polvo liofilizado hasta el día de uso. Todos los otros materiales fueron de Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) a no ser que se indique.

Para preparar monómeros y fracciones moleculares superiores con enriquecimiento oligomérico mejorado de péptido Aβ₁₋₄₂, se usó una metodología mejorada que empleaba cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Se usaron dos columnas de SEC, Supelco TSK G4000PW-XL (intervalo: 10-1500 kDa; Sigma) y Superosa 6 HR 10/30 (intervalo 5-5.000 kDa; GE Healthcare Bio-Sciences AB Uppsala, Suecia), para preparar fracciones peptídicas de Aβ₁₋₄₂ enriquecidas en monómero BPM y fracciones oligoméricas de mayor peso. Los eluatos de SEC resultantes se tiñeron después con acetato de uranilo y se examinaron por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (TEM) a 100 kV para verificar la morfología estructural de las fracciones de Aβ₁₋₄₂ (no mostrado). Para investigar la unión del anticuerpo con las fracciones de Aβ₁₋₄₂, se realizó un ELISA. Las fracciones de Aβ₁₋₄₂ se usaron para recubrir placas de ensayo de alta unión a 2,2 µM en PBS durante 2 horas. Las placas recubiertas se lavaron después cinco veces con Tween-20 0,05% en PBS y se bloquearon con BSA 1,0%. Se añadieron anticuerpos anti Aβ, incluyendo el anticuerpo de control (6E10) en una dilución en serie comenzando a las concentraciones indicadas. Se usó anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson

ImmunoResearch, Suffolk, Inglaterra) y 4-nitrofenil fosfato para la detección de unión. Las placas se leyeron a 405 nm después de una incubación de 14 horas a temperatura ambiente. El ensayo se repitió tres veces. La Figura 7 muestra la media ($\pm$ ETM) de los valores de densidad óptica (D.O.) obtenidos de los tres ensayos de ELISA separados. El anticuerpo ACI-24-Ab-3 demostró unión superior con la preparación de $A\beta_{1-42}$ enriquecida en oligómeros en comparación con la fracción no enriquecida en oligómeros, y consistente principalmente en monómeros de $A\beta_{1-42}$ (Figura 7A). En comparación, el anticuerpo de control 6E10 se unió igualmente bien a ambas fracciones de $A\beta_{1-42}$. Las Tablas 1.6 y 1.7 muestran los valores de D.O. obtenidos en ensayos de ELISA 1, 2 y 3, para los anticuerpos ACI-24-Ab-3 y 6E10, respectivamente.

Estos resultados indican que el anticuerpo ACI-24-Ab-3 (clon: EJ1A9) muestra una afinidad de unión superior por preparaciones enriquecidas con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ que por preparaciones monoméricas de $A\beta_{1-42}$.

Ejemplo 1.17: Efecto del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 en apoptosis de células ganglionares retinianas (RGC)

Para evaluar la capacidad *in vitro* del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 para reducir la muerte de células ganglionares retinianas (RGC) relacionada con enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal, se usan RGC cultivadas de ratas y ratones.

Para aislar las células, en el momento del sacrificio se anestesia a los animales, se retiran sus ojos y se disecciona la retina y se incuba en solución de papaína 2 mg/ml durante 25 minutos a 37 °C para descomponer la matriz extracelular. Al final del tratamiento, las células se lavan tres veces con medio RGC en presencia de un inhibidor de proteasa para parar la acción de la papaína. El tejido se tritura después pasándolo rápidamente arriba y abajo a través de una pipeta Pasteur hasta que las células se dispersan. Se usan un contador Coulter disponible en el mercado para determinar la densidad celular en la suspensión celular, antes de cultivar las células en aire 95%/CO₂ 5% a 37 °C.

Para imitar el daño de enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo degradación neuronal, y evaluar el efecto preventivo del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3, las células se incuban con L-glutamato durante tres días en presencia o ausencia del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3. Las células cultivadas en tampón solamente actúan como control.

Para determinar la supervivencia de RGC, al final del periodo de incubación las células se fijan con formaldehído 3,7% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a temperatura ambiente durante 30 minutos, se aclaran tres veces en PBS y se incuban durante 1 hora en PBS que contiene marcadores específicos de RGC Thy1.1 o anticuerpo NF-L. El anticuerpo se retira después lavando y las células se incubaron durante 30 minutos con los anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia IgG de cabra anti ratón, IgG de cabra anti conejo o IgG de conejo anti cabra. Al final de la incubación, las células se lavan, se tiñen durante 5 minutos con solución de DAPI y se aclaran. Las RGC supervivientes se cuentan por microscopía de fluorescencia y el número de células presente después de la incubación con el anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 se compara con el control.

Ejemplo 1.18: Efecto del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 en apoptosis de células ganglionares retinianas (RGC) *in vivo*

Para evaluar la capacidad *in vivo* del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 para reducir la muerte de células ganglionares retinianas (RGC) en individuos aquejados de enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal, se usan ratas y ratones durante un estudio de 2 a 16 semanas de duración de presión intraocular inducida (IOP). La muerte celular ganglional retiniana se mide al final del estudio tanto por formación de imágenes *in vivo* como por análisis de puntos finales histológico.

Para imitar el aumento de la presión intraocular asociado con ciertas enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo degradación neuronal, glaucoma en particular, los animales se anestesian en primer lugar con ketamina intraperitoneal (75 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg) y colirios de proparacaina tópica 1%. Se usan después dos métodos alternativos para elevar artificialmente la IOP en un ojo (unilateralmente) en ratas y ratones. En el primer método, los animales anestesiados reciben una inyección de tinta china en la cámara anterior seguido de fotocoagulación inducida por láser del colorante en la red trabecular con un láser de diodo de 532 nm en la lámpara de hendidura perpendicular a la trabécula y paralelo al iris. Los animales reciben un tratamiento inicial de 40 a 50 puntos de un tamaño de 50 μ m, 0,4 W y 0,6 segundos de duración. En el segundo método para aumentar artificialmente la IOP, los animales

anestesiados reciben una inyección de 50 µl de solución salina hipertónica en las venas episcleróticas en un ojo usando una microaguja con una fuerza suficiente para blanquear la vena.

Para medir la IOP, se usa un tonómetro manual disponible en el mercado (TonoLab). Las medidas se toman mientras los animales están bajo el efecto de la anestesia como la media de 12 lecturas inmediatamente antes del tratamiento con láser, 1, 4 y 7 días después del tratamiento y después semanalmente durante la duración del experimento. Si, en un intervalo de una semana, la diferencia de la IOP entre los dos ojos de los animales es menor de 0,80 kPa, los animales no se incluyen más en el estudio.

Para evaluar el efecto preventivo del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 en la apoptosis de RGC, la mitad de los animales que recibieron el tratamiento inductor de IOP reciben una inyección intravítrea o intravenosa del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 en el momento de la elevación de la IOP. La mitad de los animales actúan como control. Se capturan imágenes de las RGC funcionales en la retina completa de ojos con elevación de la IOP y se cuentan, y después se comparan con el número presente en los ojos contralaterales en los mismos animales. La diferencia en el número de RGC entre los dos ojos representa células que se han perdido como resultado de la elevación de la IOP en el ojo operado. El análisis de los cambios en este valor diferencial ayuda a la identificación de efectos protectores inducidos por el anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3.

El número de RGC se mide por análisis de puntos finales histológicos a las 2, 4, 8 y 16 semanas después de la elevación inducida de IOP. Las retinas de los animales se fijan en paraformaldehído 4% y se tiñen en secciones o montaje completo usando el marcador específico de RGC Brn3b. Múltiples estudios han demostrado que la pérdida de tinción de Brn3b se correlaciona con pérdida de función en RGC. Para confirmar la precisión del marcaje de RGC histológico, este método puede usarse junto con el retromarcaje del nervio óptico del SCN con DiASP o Fluorogold en un subconjunto de animales para identificar las RGC que mantienen un axón funcional intacto que no ha perdido conectividad con las dianas en el cerebro.

Como un segundo criterio de valoración, también se mide la apoptosis de RGC en un subconjunto de ojos. Se usa anexina V marcada con fluorescencia para marcar células apoptóticas por inyección intravítrea de la proteína una hora antes del sacrificio del animal. Las retinas se preparan como anteriormente y se realiza formación de imágenes de anexina V junto con la formación de imágenes de puntos finales histológicos.

Ejemplo 2: Anticuerpo generado mediante inmunización con una construcción antigénica supramolecular pegilada

Ejemplo 2.1: Métodos para realizar construcciones antigénicas supramoleculares

2.1.1 Síntesis de antígeno peptídico β amiloide pegilado

Para potenciar la respuesta inmunitaria, se ha aplicado un anclaje/espaciador para reconstituir el péptido en el liposoma, por ejemplo polietilenglicol (PEG). El PEG se unió covalentemente al resto de lisina unido en ambos extremos del péptido. En el otro extremo de la cadena (PEG n=70) se unió covalentemente fosfatidil etanolamina (PEA) para actuar como el elemento de anclaje en la bicapa liposómica. Por lo tanto, el liposoma aún actúa como un adyuvante y el péptido que está suficientemente lejos de la bicapa puede procesarse solo y de este modo aumenta su inmunogenicidad en comparación con el antígeno palmitoilado.

Las construcciones supramoleculares descritas en la presente memoria se sintetizaron de forma única usando protecciones de cadenas laterales de aminoácidos Fmoc/tBu convencionales. Típicamente, la pegilación de péptidos da como resultado mezclas de regioisómeros. En la presente memoria se demuestra un método conveniente para la unión específica de sitio de un conjugado de PEG-lípido tanto con el extremo C terminal como con el N terminal de Aβ usando péptidos parcialmente protegidos.

Para las secuencias peptídicas que contienen restos de Lys o His internos (22-35), se añadió una Lys(ivDde) protegida ortogonalmente en cada extremo. Se añadió una Gly adicional al extremo C terminal para facilitar la síntesis. El grupo Fmoc se retiró con piperidina 20% en DMF y se N acetiló usando anhídrido acético. Se consiguió escisión selectiva de los grupos de ivDde con hidrato de hidracina 3% en DMF durante una hora. Se favoreció la resina de 2-clorotritilo frente a la resina Wang más ampliamente usada puesto que la primera demostró ser mucho más resistente a hidracinolisis. Además, la resina de 2-clorotritilo es extremadamente sensible al ácido y por lo tanto, a diferencia de la resina de Wang, permite el aislamiento de péptidos protegidos. De hecho, fue necesario realizar la reacción de acoplamiento en la fase en solución ya que el acoplamiento del péptido unido a resina con el reactivo lipídico pegilado preactivado DSPE-PEG-SPA no dio lugar a ningún producto de acoplamiento. Por lo tanto la escisión selectiva de la resina en condiciones suaves (ácido acético/trifluoroetanol/diclorometano, 1:1:8, 1 h, ta) dio los péptidos protegidos internamente.

Se consiguieron acoplamientos en fase de solución con éxito con los péptidos derivados de la secuencia Aβ₃₂₋₃₅ y Aβ₂₉₋₄₀, respectivamente con DSPE-PEG-SPA en DMSO y base en exceso. Las reacciones se interrumpieron

después mediante la adición de etanolamina en exceso durante 2 h y la solución se liofilizó.

Para la secuencia 29-40, no se necesitó ninguna estrategia de protección especial.

- 5 La purificación por HPLC (columna C4 de fase inversa semipreparatoria) proporcionó entre 50 y 70% de pureza de los conjugados de lípido-PEG N y C terminal cuyas identidades se confirmaron por MALDI (desorción-ionización por láser asistida por matriz). Cada secuencia mostró variación considerable en la facilidad de la reacción de acoplamiento y las condiciones se ajustaron en consecuencia (temperatura, número de equivalentes molares de DSPE-PEG-SPA, tiempo). Para la separación de DSPE-PEG-SPA en exceso del producto deseado se aplica purificación por HPLC. Puede conseguirse separación de los productos mono y di acoplados antes de las desprotecciones de cadena lateral finales usando cromatografía de intercambio catiónico. Las desprotecciones de cadena lateral peptídica posteriores y separación del exceso de DSPE-PEG-SPA inactivado conducen al aislamiento de los conjugados deseados con una pureza aceptable.
- 10
- 15 Este enfoque de la síntesis de antígenos de β amiloide con PEG-lípido N y C terminal usando péptidos protegidos es aplicable a una amplia diversidad de secuencias peptídicas.

Ejemplo 2.2: Anticuerpos inducidos por construcciones antigénicas supramoleculares

20 Preparación de mAb inducidos contra construcciones antigénicas supramoleculares de $A\beta_{22-35}$ y $A\beta_{29-40}$ pegilado

Se prepararon antígenos liposómicos como se ha descrito (Nicolau *et al.*, 2002, PNAS, 99, 2332-37). Las secuencias PEG- $A\beta_{22-35}$ y $A\beta_{29-40}$ se reconstituyeron en una construcción consistente en liposomas compuestos de dimiristoil fosfatidil colina (DMPC), dimiristoil fosfatidil etanolamina (DMPEA), dimiristoil fosfatidil glicerol (DMPG) y colesterol (relaciones molares 0,9:0,1:0,1:0,7) que contenían monofosforil lípido A (40 mg/mM de fosfolípidos). Estos antígenos se usaron para la inmunización en ratones C57BL/6 en intervalos de 2 semanas. Se inmunizaron 10-12 animales con cada antígeno. Después de 3 a 6 refuerzos, se seleccionaron ratones con títulos terapéuticos (cuando una dilución 1:5.000 de los sueros era positiva en ELISA) para una fusión. Se recogieron células del bazo de animales inmunizados e hibridomas generados fusionando células del bazo sensibilizadas con una línea celular de mieloma. La fusión de los linfocitos B de los bazos de los ratones se realizó con células de la línea celular de mieloma SP2-0 (ATCC, Manassas, VA) usando los procesos bien conocidos de Kohler y Milstein (Nature 256: 495-497 (1975)) y Harlow y Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York 1988))

35 Se indujo que las células se fusionaran por la adición de polietilenglicol. Las células híbridas resultantes se clonaron después de la manera convencional, por ejemplo usando dilución limitante. Se seleccionaron clones de hibridoma productores de IgG y se ensayaron con respecto a su unión específica con el péptido $A\beta_{1-42}$ por ELISA y los clones resultantes, que producen los anticuerpos monoclonales deseados, se cultivaron.

40 Los hibridomas obtenidos de este modo se seleccionaron químicamente sembrando en placas las células en un medio de selección que contenía hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT).

Posteriormente se exploraron los hibridomas con respecto a la capacidad para producir anticuerpos monoclonales contra enfermedades o trastornos asociadas con amiloide específicos. Se clonaron hibridomas que producían anticuerpos de interés, se expandieron y se almacenaron congelados para producción futura. Los hibridomas preferidos producen anticuerpos monoclonales que tienen el isotipo IgG.

Ejemplo 2.3: Determinación de especificidad para los anticuerpos ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11

50 Para analizar la especificidad del anticuerpo ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11, se transfirieron diferentes concentraciones de fibrillas preformadas de Amiloide $1-42$, $1-40$ y $17-40$, $1-28$ en una Membrana de Nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham Biosciences). Después de bloquear con leche en polvo 10% y Tween 20 0,7%, las membranas se incuban con anticuerpo primario a 20 μ g/ml durante 2 h a TA. Después de lavar, las membranas se incuban con anticuerpo anti IgG de ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano rústico (Amersham Biosciences) durante 1 h a TA, se lavan y se incuban con solución quimioluminiscente seguido de la exposición de la membrana a película de rayos X.

60 Para medir la unión del mAb ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 con β amiloide $1-42$, $1-40$ y $17-40$, $1-28$ se preforman fibras durante siete días a 37 °C y se transfieren a la membrana. Se usa anticuerpo 20 μ g/ml para medir la capacidad de unión y el anticuerpo unido se detecta por anticuerpo anti IgG de ratón de oveja conjugado con peroxidasa de rábano rústico durante 20 minutos de exposición.

Ejemplo 2.4: Ensayo fluorescente de tioflavina T (Th-T)

65 Para medir tanto la inhibición de agregación como las propiedades de disgregación de los mAb se usó el ensayo fluorescente de Tioflavina T (Th-T) que se une específicamente a moléculas de $A\beta_{1-42}$ fibrilares y posteriormente la

intensidad de emisión fluorescente se correlaciona con la cantidad de filamentos $A\beta_{1-42}$ presentes en la solución.

El polvo liofilizado $A\beta_{1-42}$ se reconstituyó en hexafluoroisopropanol (HFIP) hasta 1 mM. La solución peptídica se sonicó durante 15 minutos a temperatura ambiente, se agitó durante una noche, y las alícuotas se prepararon en tubos de microcentrifuga sin silicona. El HFIP se evaporó después en una corriente de argón. La película peptídica resultante se secó al vacío durante 10 minutos y se almacenó a -80°C hasta su uso.

2.4.1 Ensayo de agregación de $A\beta_{1-42}$

Para ensayar con respecto a la inhibición mediada por anticuerpo de la agregación de $A\beta_{1-42}$ el anticuerpo se prediluyó en PBS y se preparó una solución de ensayo que contenía los siguientes componentes en un tubo de incubación sin silicona: anticuerpo prediluido 3,3 o 0,33 μM , tioflavina T 10 μM , $A\beta_{1-42}$ 33 μM y DMSO 8,2%. Por lo tanto las relaciones molares finales de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$ fueron 1:10 y 1:100. También se prepararon soluciones de control apropiadas. Las soluciones se incubaron después durante 24 horas a 37°C , y la espectrofluorescencia (unidades de fluorescencia relativas; UFR) se leyeron en seis repeticiones en placas negras de 384 pocillos (Perkin-Elmer) en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer FluoroCount. La inhibición de la agregación o disgregación se expresa como la media de % de inhibición o disgregación, respectivamente, de acuerdo con la siguiente ecuación en comparación con el control:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{UFR de control pos} - \text{UFR de control neg}) - (\text{UFR de muestra con } A\beta_{1-42} - \text{UFR de muestra sin } A\beta_{1-42})}{(\text{UFR de control pos} - \text{UFR de control neg})} \times 100\%$$

El anticuerpo ACI-11-Ab-9 mostró una inhibición significativa de la agregación de $A\beta_{1-42}$ en comparación con el control. A una relación molar de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$ de 1:100 la inhibición fue de una media de 34% (3 experimentos independientes), mientras que a una relación molar de 1:10 la inhibición fue de 69% (2 experimentos independientes).

El anticuerpo ACI-12-Ab-11 también mostró una inhibición significativa de la agregación de $A\beta_{1-42}$ en comparación con el control. A una relación molar de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$ de 1:100 la inhibición fue de una media de 30% (2 experimentos independientes), mientras que a una relación molar de 1:10 la inhibición fue de 66% (2 experimentos independientes).

2.4.2 Ensayo de disgregación de $A\beta_{1-42}$

Para medir las propiedades de disgregación del mAb se usó el ensayo fluorescente de Tioflavina T (ThT) que se une específicamente a moléculas de $A\beta_{1-42}$ fibrilares y posteriormente la intensidad de emisión fluorescente se correlaciona con la cantidad de filamentos de $A\beta_{1-42}$ presentes en la solución.

Para ensayar con respecto a disgregación mediada por anticuerpos de $A\beta_{1-42}$ preagregado, se preparó un $A\beta_{1-42}$ de bajo peso molecular, preparado como se ha descrito anteriormente, como una solución 110 μM en DMSO 27% y PBS 1X. Se permitió después que esta solución se agregara a 37°C durante 24 horas después de lo cual se añadió lo siguiente: anticuerpo prediluido 3,3 o 0,33 μM y tioflavina T 10 μM . Esto dio como resultado una relación molar de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$ de 1:10 y 1:100 de, que contiene DMSO 8,2%. Esta solución se incubó después durante 24 horas adicionales a 37°C . Después se midió la espectrofluorescencia y se calculó el % de disgregación como se ha descrito anteriormente.

El anticuerpo ACI-11-Ab-9 mostró una disgregación significativa de $A\beta_{1-42}$ preagregado en el ensayo de disgregación. A una relación molar de $A\beta_{1-42}$ de 1:100 la disgregación fue de una media de 22% (3 experimentos independientes), mientras que en una relación molar 1:10 la disgregación fue de 52% (3 experimentos independientes).

El anticuerpo ACI-12-Ab-11 también mostró una disgregación significativa de $A\beta_{1-42}$ preagregado en el ensayo de disgregación. A una relación molar de anticuerpo y $A\beta_{1-42}$ de 1:100 la disgregación fue de una media de 18% (2 experimentos independientes), mientras que a una relación molar de 1:10 la disgregación fue de 54% (2 experimentos independientes).

A partir de los resultados anteriores resulta evidente que los anticuerpos ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 muestran bifuncionalidad en la interacción con filamentos de $A\beta_{1-42}$, porque ambos anticuerpos son capaces de inhibir la agregación de $A\beta_{1-42}$ y disgregación de fibras de $A\beta_{1-42}$ preformadas.

Ejemplo 2.5: Interacciones de ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11

Las interacciones entre los anticuerpos ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 con péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ se estudian usando resonancia de plasmón superficial. Se determina la unión del anticuerpo de ratón con monómeros o fibras de $A\beta_{1-42}$.

Todos los experimentos de SPR se llevan a cabo en un instrumento Biacore X (Biacore AB). Los reactivos para inmovilización (EDC, NHS y etanolamina), microplacas sensoras CM5 y SA así como tampón de ejecución y de muestras HBS-EP se obtienen de Biacore AB. Se usa acetato sódico (10 mM, pH 5,0) como tampón de acoplamiento para aumentar el rendimiento de acoplamiento. Se prepara $A\beta_{1-42}$ fibrilar (Bachem) añadiendo tampón de PBS a $A\beta_{1-42}$ a una concentración final de 3 mg/ml y dejando los frascos a 37 °C durante 7 días. El $A\beta_{1-42}$ fibrilar se acopla a una microplaca sensora CM5 que contiene una matriz de dextrano de carboximetilo unido a superficie. Se acopla $A\beta_{1-42}$ monomérico biotinilado (Bachem) a una microplaca Sensora SA que consiste en una matriz de carboximetil dextrano con Estreptavidina unida covalentemente. Típicamente se ensayan cuatro o cinco concentraciones de mAb por diluciones en serie usando tampón de ejecución. Las inyecciones se realizan comenzando desde la concentración más baja y se pasan sobre fc tanto 1 como 2 a un caudal de 30 μ l/min durante 3 minutos. La celda de flujo 2 no está derivatizada y se restan las respuestas de fc 1 para corregir con respecto al ruido de instrumento y cambios refractarios de volumen. Después de terminarse la inyección, las superficies se lavan inmediatamente con tampón de ejecución durante 5 minutos. Para retirar el anticuerpo unido restante de las fibrillas de $A\beta_{1-42}$, se realiza regeneración en superficie inyectando pulsos de NaOH 10 mM. Se realiza análisis cinético usando algoritmos para integración numérica y análisis global usando BIAevaluation 3.0. Las curvas obtenidas para inyecciones de analito a diferentes concentraciones se superponen y las líneas basales se ajustan a cero. Para el ajuste de curva, todos los datos se ajustan simultáneamente a un complejo homogéneo 1:1.

Se determina la unión de los anticuerpos de ratón ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 con amiloide.

Ejemplo 2.6: Unión de anticuerpos monoclonales ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 con fibras amiloides

Para analizar el lado de unión molecular de los anticuerpos ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 en fibras preformadas se realiza microscopia electrónica de transmisión con contraste negativo (TEM).

Los anticuerpos ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 se acoplan con oro coloidal de 8 nm de acuerdo con Slot JW, Geuze HJ (1985). Para la coincubación de fibras de amiloides $A\beta_{1-42}$ ($A\beta_{1-42}$) se incuban fibras 6,65 μ M durante 24 horas a TA con el anticuerpo marcado con oro con la relación molar de 1:100. Posteriormente se incuban 5 μ l de la muestra en la rejilla de Cu con descarga luminiscente (malla 200) cubierta con película de parlodio/C durante 45 segundos, se lavan 3 veces con agua y una vez con acetato de uranilo diluido y filtrado nuevo 2%. Las muestras se tiñen en acetato de uranilo 2% durante 15-20 segundos. El exceso de tinción en las rejillas se absorbe y se seca posteriormente al aire. Se preparan tres rejillas de cada muestra. Las rejillas se analizan en microscopio electrónico de transmisión Hitachi 7000.

Ejemplo 2.7: Fraccionamiento por ultracentrifugación en gradiente de densidad

La propiedades de los anticuerpos monoclonales ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 en la inhibición de la polimerización de fibras de $A\beta_{1-42}$ y disgregación de fibras de $A\beta_{1-42}$ se estudian por ultracentrifugación en gradiente de densidad (Rzepecki *et al.*, 2004) que se basa en el principio de distribuir entre fibras peptídicas resultantes de tamaños diferentes después de incubación con y sin anticuerpos seguido de un análisis de sedimentación de SDS-PAGE en un gradiente preformado (OptiPrep™). El análisis simultáneo de poblaciones de fibras de $A\beta$ preformadas, disgregación e inhibición de propiedades de agregación de los anticuerpos coincubados, y la unión de los anticuerpos con las fibras son ventajas obvias de estos métodos.

Para la inhibición de la agregación de $A\beta_{1-42}$, se incuban monómeros de $A\beta_{1-42}$ con mAb ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11, respectivamente, a dos relaciones molares diferentes (relación molar de monómero $A\beta_{1-42}$ monomérico treinta o cien veces mayor que mAb) con la concentración final de $A\beta$ de 50 μ M. Después de 24 horas de incubación a 37 °C, las muestras se superponen sobre un gradiente discontinuo de Optiprep™ y los tubos se centrifugan a 259 000 g durante 3 h a 4 °C. Se recogen 15 fracciones (140 μ l cada una), la fracción 1 es la fracción menos densa de la parte superior del gradiente y la fracción 15 es la fracción más densa del fondo del gradiente. También se toma el sedimento. Las fracciones recogidas se analizan por SDS-PAGE con tinción de plata. La concentración de $A\beta_{1-42}$ para ensayos de inhibición es cinco veces menor que para los ensayos de disgregación lo que reduce la cinética de agregación de amiloides y asegura la medición dentro de la fase lineal.

Para la disgregación de fibrillas de $A\beta_{1-42}$ preformadas por coincubación con mAb ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 (a dos relaciones molares diferentes 1:30 y 1:100, mAb + Monómero $A\beta_{1-42}$ con la concentración final de $A\beta$ de 246 μ M), las muestras se incuban durante 24 horas a 37 °C. Después de 24 horas las muestras se fraccionan por ultracentrifugación y se separan por SDS-PAGE como se ha descrito anteriormente y antes (Rzepecki *et al.*, 2004).

Ejemplo 2.8: Ensayo de fluorescencia para evaluar la inhibición de la agregación de filamentos de $A\beta_{1-42}$ y disgregación de filamentos de $A\beta_{1-42}$ preformados por coincubación con mAb ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11, respectivamente

5 Ensayo fluorescente de BIS-ANS

Para evaluar las propiedades de inhibición del mAb se usa el ensayo fluorescente BIS-ANS (LeVine, 2002) que detecta específicamente el monómero o la población no fibrilosa de filamentos de $A\beta_{1-42}$. Antes de la medición de fluorescencia, los monómeros de $A\beta_{1-42}$ se preincuban con uno de los tampones, lo que actúa como control, o mAb ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 (relación molar 1:100, mAb frente a péptido $A\beta_{1-42}$) durante 14 horas a 37 °C. Las unidades fluorescentes relativas se registran automáticamente y los resultados se expresan como cambios del control en porcentaje.

Ejemplo 2.9: RMN y caracterización de fluorescencia de la interacción de anticuerpo monoclonal ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 con péptido β amiloide₁₋₄₂ marcado con ^{13}C

Para evaluar el mecanismo potencial por el que el mAb solubiliza fibras preformadas o inhibe la formación de fibras, se realiza un experimento en paralelo entre el ensayo fluorescente de Th-T y RMN de estado sólido de péptido β amiloide₁₋₄₂ marcado con Val12 y Tyr10 U- ^{13}C .

Por lo tanto el objetivo de la presente investigación es seguir la transición de la lámina β por espectroscopia de RMN de estado sólido en el péptido β amiloide y en presencia del anticuerpo monoclonal y comparar directamente esta con la capacidad de disgregación medida por ensayo fluorescente de Th-T.

La espectroscopia de RMN de estado sólido no solamente detecta una transición en la estructura secundaria, sino que también permite localizar los dominios del péptido $A\beta_{1-42}$ que dominan la transición estructural. La RMN de estado sólido ha demostrado su aplicabilidad al problema ya que ha contribuido a la determinación de la estructura de las fibras $A\beta_{1-42}$ (Petkova *et al.*, 2004, Petkova *et al.*, 2002). En particular la correlación del cambio químico de $^{13}C_{\alpha}$ y $^{13}C_{\beta}$ con la estructura secundaria (Comilescu *et al.*, 1999, Luca *et al.*, 2001, Iwadate *et al.*, 1999) es una herramienta valiosa para ensayar cambios de la estructura secundaria dentro de un péptido.

La síntesis del péptido marcado incluyendo una valina premarcada con ^{13}C en la posición 12 (^{12}Val) y una tirosina premarcada con ^{13}C en la posición 10 (^{10}Tyr) se realiza por un protocolo de síntesis de Fmoc. La identidad y pureza del péptido se confirman por espectroscopia de masas MALDI. El péptido β amiloide marcado (1-42) se usa para generar fibras incubando la solución peptídica en tampón de PBS durante 1 semana a 37 °C. El principal problema, la escasa solubilidad del péptido β amiloide en tampón PBS, pudo resolverse de la siguiente manera: el valor de pH del tampón de PBS aumenta temporalmente en pequeñas cantidades de amoníaco hasta disolver el péptido β amiloide. El valor de pH original del tampón de PBS se vuelve a obtener incubando la muestra en presencia de un baño de PBS mayor usando el carácter volátil del amoníaco.

Para medir el efecto de los anticuerpos de rotura de láminas β , la solución de fibras se incuba con el anticuerpo durante 24 horas a 37 °C para ensayo tanto de RMN como de Th-T. Para comparación en tiempo real se usa una alícuota de la misma solución para ensayo fluorescente de Th-T y la solución restante se liofiliza para las mediciones de RMN.

Las capacidades de disgregación de ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 se analizan por coincubación con fibras de β amiloides marcadas con ^{13}C preformadas usando ensayo fluorescente de Th-T.

Para investigar las diferencias entre el PBS (control) y la incubación con mAb se desconvoluciona cada espectro usando PeakFit (www.systat.com/-products/PeakFit). Las líneas se ajustan bien empleando un procedimiento de ajuste Lorenciano/Gaussiano mixto.

Ejemplo 2.10: Funcionalidad de ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 en fibras amiloides

12.1 Modificación de la conformación de fibras de $A\beta_{1-42}$ e inicio de la disgregación después de unión del anticuerpo ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11.

Para evaluar el mecanismo por el que los anticuerpos son capaces de disgregar fibras beta amiloides ($A\beta_{1-42}$) preformadas se realiza una comparación en paralelo del ensayo fluorescente de Tioflavina T (Th-T) que mide la disgregación y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de estado sólido del péptido $A\beta_{1-42}$ marcado con Valina 12 y Tirosina 10 U- ^{13}C que analiza la conformación secundaria.

Ejemplo 2.11: Mapeo de epítomos de anticuerpos monoclonales ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11

Se realizó mapeo de epítomos de los anticuerpos monoclonales ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 por ELISA usando una biblioteca peptídica que comprende un total de 33 péptidos biotinilados que abarcan la secuencia de aminoácidos (aa) completa de A β ₁₋₄₂ (producida por Mimotopes, Clayton Victoria, Australia y obtenida de ANAWA Trading SA, Wangen Suiza). Los péptidos en la biblioteca peptídica estaban compuestos por péptidos de 8, 9 o 10 unidades de aminoácidos. Se usó un péptido A β ₁₋₄₂ completo biotinilado (secuencia humana) como un control positivo (Bachem, Bubendorf, Suiza). Además, se usaron péptidos más largos que abarcaban A β ₁₋₂₈, A β ₁₇₋₄₀, A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ para definir la región más amplia a la que pueden unirse estos anticuerpos. Estos 4 péptidos también estaban biotinilados (fabricados por Anaspec y obtenidos de ANAWA Trading SA, Suiza). El mapeo de epítomos se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mimotopes). Brevemente, se bloquearon placas recubiertas con estreptavidina (NUNC, Roskilde, Dinamarca) con BSA 0,1% en PBS durante una noche a 4 °C. Después de lavar con PBS-Tween 20 0,05%, las placas se recubrieron durante 1 hora a TA con los diferentes péptidos de la biblioteca, diluidos en BSA 0,1%, azida sódica 0,1% en PBS hasta una concentración final de 10 μ M. Después de lavar, las placas se incubaron durante 1 hora a TA con los diferentes anticuerpos, diluidos a 10 μ g/ml para los anticuerpos ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 en BSA 2%, Azida Sódica 0,1% en PBS. Las placas se lavaron de nuevo y se incubaron con IgG anti ratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson Immunresearch West Grove, PA, Estados Unidos) durante 1 h a TA. Después del lavado final, las placas se incubaron con sustrato de fosfatasa (pNPP, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos) y se leyeron después de 3 horas de incubación a 405 nm usando un lector de placas de ELISA.

Se mostró que ACI-11-Ab-9 se unía significativamente a A β ₁₋₄₂, pero era incapaz de unirse a ninguno de los péptidos cortos en la biblioteca peptídica. Se concluyó por lo tanto que el anticuerpo necesita más de 8 aminoácidos para unirse al epítipo y/o que ACI-11-Ab-9 puede reconocer un epítipo conformacional que está presente solamente en el A β ₁₋₄₂ de longitud completa.

ACI-12-Ab-11 también mostró unión significativa con A β ₁₋₄₂, pero de forma similar a ACI-11-Ab-9, ACI-12-Ab-11 no se unía a ninguno de los péptidos cortos en la biblioteca peptídica.

Para determinar si los anticuerpos ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 pueden reconocer otros péptidos A β se evaluó la unión con A β ₁₋₂₈, A β ₁₇₋₄₀, A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂.

ACI-11-Ab-9 mostró unión considerable con A β ₁₋₂₈, A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂, pero no mostró ninguna unión con A β ₁₇₋₄₀.

Tomados juntos, estos resultados sugieren que el epítipo de ACI-11-Ab-9 está en la región 1-28 de A β y que el epítipo es de más de 8 aminoácidos de largo y/o que la unión con A β depende de la conformación de A β .

ACI-12-Ab-11 mostró unión significativa con A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ pero no mostró ninguna unión con A β ₁₋₂₈ o con A β ₁₇₋₄₀. Por lo tanto, ACI-12-Ab-11 solamente podía unirse con A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ de longitud completa y no con ningún péptido más corto de A β . Estos resultados sugieren que el epítipo reconocido por ACI-12-Ab-11 depende de la conformación de A β ya que incluso 24 o 28 unidades de A β eran insuficientes para la unión del anticuerpo.

Ejemplo 2.12: Influencia de la vacunación pasiva con ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 en la carga amiloide del cerebro en ratones hAPP transgénicos sencillos

Para evaluar la capacidad *in vivo* de los anticuerpos monoclonales ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 para unirse a y eliminar amiloide soluble del cerebro, se usan ratones hAPP sencillos de 6 meses de edad, de sexo y edad coincidentes, para un estudio de inmunización pasiva con dosis diferente. La carga de Amiloide Soluble se analiza al final del estudio recogiendo el cerebro de los animales y realizando un ELISA específico de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ (TGC, Alemania).

8-13 animales por grupo reciben dos inyecciones a un intervalo de una semana de 100, 300 y 1000 μ g de anticuerpo monoclonal en 200 μ l de PBS mientras que la inyección de PBS solamente actúa como un control. Un día después de la segunda inyección los animales se sacrifican para análisis bioquímico de la fracción de amiloide soluble. Para cuantificar la cantidad de A β ₁₋₄₀ humano y A β ₁₋₄₂ humano en la fracción soluble de los homogeneizados de cerebro y/o en el líquido cefalorraquídeo (LCR), se usan kits de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) disponibles en el mercado (ELISA de alta sensibilidad de Amiloide β 40 o β 42 h, TGC, Suiza). El ELISA se realiza de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, se preparan patrones (una dilución de A β ₁₋₄₀ o A β ₁₋₄₂ sintéticos) y muestras en una placa de polipropileno de 96 pocillos sin capacidad de unión de proteína (Greiner, Alemania). Las diluciones convencionales con concentraciones finales de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3 y 15,6 pg/ml y las muestras se preparan en el diluyente de muestra, proporcionado con el kit de ELISA, hasta un volumen final de 60 μ l. Puesto que los niveles de amiloides aumentan con la edad del ratón y puesto que la evaluación real requiere que las lecturas de las muestras estén dentro de la parte lineal de la curva patrón, las muestras para análisis de A β ₄₀ se diluyen 2:3, las muestras para análisis de A β ₄₂ no se diluyen.

Se añaden las muestras, patrones y blancos (50 μ l) a la placa de poliestirol recubierta con anti A β (el anticuerpo de captura reconoce selectivamente el extremo C terminal del antígeno) además de un conjugado de anticuerpo anti A β selectivo (anticuerpo de detección biotinilado) y se incuba durante una noche a 4 °C para permitir la formación del complejo de anticuerpo-amiloide-anticuerpo. Al día siguiente, se añade conjugado de estreptavidina-peroxidasa, seguido 30 minutos después de la adición de una mezcla de TMB/peróxido, dando como resultado la conversión del sustrato a un producto coloreado y la intensidad del color se mide por medio de fotometría con un lector de ELISA con un filtro de 450 nm. Se obtiene cuantificación del contenido de A β de las muestras comparando la absorbancia con la curva patrón realizada con A β 1-40 o A β 1-42 sintético. Los datos se expresan como cambios individuales del valor de control medio (en porcentaje de control).

Ejemplo 2.13: Influencia de la administración pasiva crónica de ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 en la carga de placas en ratones hAPPxPS1 transgénicos dobles

Para evaluar la capacidad *in vivo* de los anticuerpos monoclonales ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 para unirse a y reducir las placas amiloides en el cerebro, se usan ratones hAPPxPS1 transgénicos dobles de 3,5 meses de edad, de sexo y edad coincidentes, durante un estudio de inmunización pasivo crónico de cuatro meses de duración. Se analizan placas amiloides al final del estudio por histoquímica del cerebro de los animales mediante unión de Tioflavina S.

15 animales transgénicos reciben 16 inyecciones semanales de 500 μ g de anticuerpo monoclonal en PBS. A 15 animales se les inyecta PBS solamente, actuando como controles. Todas las inyecciones se proporcionan por vía intraperitoneal. En el momento del sacrificio, los ratones se anestesian y se lavan de forma transcardiaca con suero fisiológico a 4 °C para retirar la sangre de los vasos cerebrales. Posteriormente, el cerebro se retira del cráneo y se separan el romboencéfalo y prosencéfalo con un corte en el plano coronal/frontal. El prosencéfalo se divide uniformemente en el hemisferio izquierdo y derecho usando un corte sagital de línea media. Un hemisferio se fija posteriormente durante una noche en paraformaldehído 4% para histología. Se cortan secciones de vibrátomo sagital (40 μ m) para incubaciones en flotación libre y se almacenan a 4 °C hasta su tinción en PBS con azida sódica 0,1%. Se tiñen cinco secciones a niveles diferentes para placas densas con Tioflavina S. Se seleccionan aleatoriamente secciones de todos los animales usados para tinción y cuantificación ciega. Se obtienen imágenes con un microscopio Leica DMR equipado con una cámara Sony DXC-9100P y se analizan con un ordenador usando software Leica Q-Win. La intensidad de la luz y los ajustes del condensador para el microscopio se mantienen constantes a lo largo del proceso de adquisición de las imágenes. Todas las imágenes adquiridas se someten a las mismas subrutinas informáticas para minimizar la parcialidad del investigador. El umbral de densidad de los cortes se aplica uniformemente en todo el análisis. El área del subículo se selecciona para cuantificación automática de la carga amiloide en la tinción con Tioflavina S.

Ejemplo 2.14: Influencia de la vacunación pasiva con ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 en la capacidad de memoria en ratones hAPP transgénicos sencillos

Para analizar la capacidad *in vivo* de los anticuerpos ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 para modificar o aumentar la funcionalidad cognitiva, se usan ratones hAPP sencillos de 9 meses de edad, de sexo y edad coincidente, para el estudio de inmunización pasiva. Se mide la cognición no espacial al final del periodo de inmunización evaluada por Tarea de Reconocimiento de nuevo Objeto (ORT).

12 animales por grupo reciben dos inyecciones intraperitoneales de 400 μ g de anticuerpo monoclonal en 200 μ l de PBS mientras que la inyección de PBS solamente actúa como un control. Un día después de la segunda inyección se estudia la capacidad cognitiva en una Tarea de Reconocimiento de nuevo Objeto (ORT)^{12,13}. Para la inclusión en ORT los ratones se colocan durante 10 minutos en una arena conductual y se enfrentan a un nuevo objeto desconocido. Se registra el tiempo de exploración. Tres horas después los mismos animales se vuelven a colocar en la misma arena para una segunda sesión pero se enfrentan al viejo objeto previamente explorado, y adicionalmente a uno nuevo. De nuevo, se registran los tiempos de exploración para ambos objetos y se calcula el índice de cognición resultante como la relación de tiempo de exploración para el nuevo objeto en relación con el tiempo de exploración total y se expresa como cambios proporcionales con respecto al control.

Ejemplo 2.15 - Unión preferente del anticuerpo monoclonal de ratón con fracciones enriquecidas con oligómero protofibrilar (PF) de alto peso molecular (APM) de péptido A β 1-42 frente a monómeros de bajo peso molecular (BPM)

La unión de anticuerpos monoclonales anti beta amiloide de ratón con A β 1-42 monomérico de bajo peso molecular (BPM) y preparaciones enriquecidas con oligómeros protofibrilares (PF) de mayor peso molecular de péptido A β 1-42 puede realizarse usando ELISA.

Se usa cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando 2 columnas de SEC, Superdex 75 HR 10/30 (Intervalo 3-70 kDa) y Superosa 6 HR 10/30 (Intervalo de 5-5.000 kDa) para preparar fracciones peptídicas de A β 1-42 consistentes en preparaciones de monómeros de bajo peso molecular (BPM) y enriquecidas con oligómeros

protofibrilares (PF) de mayor peso molecular (APM) de péptido A β ₁₋₄₂. Los eluatos resultantes se tiñen después con acetato de uranilo y se examinan por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (TEM) a 100 kV para verificar la morfología estructural de las fracciones de A β ₁₋₄₂ eluidas.

Se realiza después un ELISA recubriendo con las fracciones de A β ₁₋₄₂ una placa de ensayo de alta unión a 2 μ M durante una noche. La placa recubierta se bloquea después con BSA 1,0% y se añade el anticuerpo ACI-24-Ab-3 (EJ1A9 de ratón) en una dilución en serie comenzando a 20 μ g/ml. También se usa una dilución en serie de un anticuerpo convencional (6E10, Chemicon). Se usa anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina y 4-nitrofenil fosfato para la detección de la unión. Las placas se leen a 405 nm. Todas las condiciones se ensayan por duplicado con coeficiente de variación (CV) < 0,2.

Ejemplo 2.16: Unión del anticuerpo monoclonal ACI-12-Ab-11 (clon FK2A6A6) con fracciones enriquecidas con oligómeros y monómeros del péptido A β ₁₋₄₂

Se evaluó la unión del anticuerpo de seguimiento anti A β ACI-12-Ab-11 (clon: FK2A6A6) con monómeros y oligómeros del péptido A β ₁₋₄₂. Antes de usarse en el estudio, el anticuerpo se almacenó a -80 °C. El péptido A β ₁₋₄₂ (Instalación W. M. Keck, Universidad de Yale) se almacenó como polvo liofilizado hasta el día de uso. Todos los otros materiales eran de Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) a no ser que se indique de otro modo.

Para preparar monómeros y fracciones de mayor peso molecular con enriquecimiento de oligómeros mejorado del péptido A β ₁₋₄₂, se usó una metodología mejorada que empleaba cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Se usaron dos columnas de SEC, Supelco TSK G4000PW-XL (intervalo: 10-1500 kDa; Sigma) y Superosa 6 HR 10/30 (intervalo 5-5.000 kDa; GE Healthcare Bio-Sciences AB Uppsala, Suecia), para preparar fracciones peptídicas de A β ₁₋₄₂ enriquecidas en monómero BPM y fracciones oligoméricas de mayor peso. Los eluatos de SEC resultantes se tiñeron después con acetato de uranilo y se examinaron por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (TEM) a 100 kV para verificar la morfología estructural de las fracciones de A β ₁₋₄₂ (no mostrado). Para investigar la unión del anticuerpo con las fracciones de A β ₁₋₄₂, se realizó un ELISA. Se recubrieron placas de ensayo de alta unión con fracciones de A β ₁₋₄₂ a 2,2 μ M en PBS durante 2 horas. Las placas recubiertas se lavaron después cinco veces con Tween-20 0,05% en PBS y se bloquearon con BSA 1,0%. Se añadieron anticuerpos anti A β , incluyendo el anticuerpo de control (6E10) en una dilución en serie comenzando a las concentraciones indicadas. Se usó anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Inglaterra) y 4-nitrofenil fosfato para la detección de unión. Las placas se leyeron a 405 nm después de una incubación de 14 horas a temperatura ambiente. El ensayo se repitió tres veces.

La Figura 16 muestra la media ($\pm$ ETM) de los valores de densidad óptica (D.O.) obtenidos de los tres ensayos de ELISA separados. El anticuerpo ACI-12-Ab-11 demostró unión superior con la fracción de A β ₁₋₄₂ enriquecida en oligómeros en comparación con la fracción no enriquecida en oligómeros, y consistente principalmente en monómeros de A β ₁₋₄₂ (Figura 16A). En comparación, el anticuerpo de control 6E10 se unió igualmente bien a ambas fracciones de A β ₁₋₄₂ (Figura 16B). Las Tablas 2.4 y 2.5 muestran los valores de D.O. obtenidos en ensayos de ELISA 1, 2 y 3, para los anticuerpos ACI-12-Ab-11 y 6E10, respectivamente.

Estos resultados indican que el anticuerpo ACI-12-Ab-11 (clon: FK2A6A6) muestra afinidad de unión superior por fracciones enriquecidas con oligómeros de A β ₁₋₄₂ que por A β ₁₋₄₂ monomérico.

Ejemplo 2.17: Efecto de ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 en la apoptosis de células ganglionares retinianas (RGC)

Para evaluar la capacidad *in vitro* de los anticuerpos monoclonales ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 para reducir la muerte de células ganglionares retinianas (RGC) relacionada con enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal, se usan RGC cultivadas de ratas y ratones.

Para aislar las células, en el momento del sacrificio los animales se anestesian, se retiran sus ojos y la retina se disecciona y se incuba en solución de papaína 2 mg/ml durante 25 minutos a 37 °C para descomponer la matriz extracelular. Al final del tratamiento, las células se lavan tres veces con medio RGC en presencia de un inhibidor de proteasa para detener la acción de la papaína. El tejido se tritura después pasándolo rápidamente arriba y abajo a través de una pipeta Pasteur hasta que las células se dispersan. Se usa un contador Coulter disponible en el mercado para determinar la densidad celular en la suspensión celular, antes de cultivar las células en aire 95%/CO₂ 5% a 37 °C.

Para imitar el daño de enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo degradación neuronal, y evaluar el efecto preventivo de los anticuerpos monoclonales ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11, las células de incuban con L-glutamato durante tres días en

presencia o ausencia del anticuerpo monoclonal ACI-11-Ab-9 o ACI-12-Ab-11. Las células cultivadas en el tampón solamente actúan como control.

Para determinar la supervivencia de RGC, al final del periodo de incubación las células se fijan con formaldehído 3,7% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a temperatura ambiente durante 30 minutos, se aclaran tres veces en PBS y se incuban durante 1 hora en PBS que contiene marcadores específicos de RGC Thy1.1 o anticuerpo NF-L. El anticuerpo se retira después lavando y las células se incuban durante 30 minutos con los anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia de cabra anti IgG de ratón, de cabra anti IgG de conejo o de conejo anti IgG de cabra. Al final de la incubación, las células se lavan, se tiñen durante 5 minutos con solución de DAPI y se aclaran. Las RGC supervivientes se cuentan por microscopía de fluorescencia y el número de células presentes después de la incubación con el anticuerpo monoclonal ACI-11-Ab-9 o ACI-12-Ab-11 se compara con el control.

Ejemplo 2.18: Efecto de ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 en la apoptosis de células ganglionares retinianas (RGC) *in vivo*

Para evaluar la capacidad *in vivo* de los anticuerpos monoclonales ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 para reducir la muerte de células ganglionares retinianas (RGC) en individuos aquejados de enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo, degradación neuronal, se usan ratas y ratones para un estudio de 2 a 16 semanas de duración de presión intraocular inducida (IOP). La muerte de las células ganglionares retinianas se mide al final del estudio tanto por formación de imágenes *in vivo* como por análisis de puntos finales histológicos.

Para imitar el aumento de la presión intraocular asociado con ciertas enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tales como, por ejemplo degradación neuronal, glaucoma en particular, los animales se anestesian en primer lugar con ketamina intraperitoneal (75 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg) y colirio de proparacaina tópica 1%. Se usan después dos métodos alternativos para elevar artificialmente la IOP en un ojo (unilateralmente) en ratones y ratas. En el primer método, los animales anestesiados reciben una inyección de tinta china en la cámara anterior seguido de fotocoagulación inducida por láser del colorante en la red trabecular con un láser de diodo de 532 nm en la lámpara de hendidura perpendicular a las trabéculas y paralela al iris. Los animales reciben un tratamiento inicial de 40 a 50 puntos de 50 μ m de tamaño, 0,4 W y 0,6 segundos de duración. En el segundo método para aumentar artificialmente la IOP, los animales anestesiados reciben una inyección de 50 μ l de solución salina hipertónica en las venas episcleróticas en un ojo usando una microaguja con una fuerza suficiente para blanquear la vena.

Para medir la IOP, se usa un tonómetro manual disponible en el mercado (TonoLab). Las mediciones se toman mientras los animales están bajo el efecto de la anestesia como la media de 12 lecturas inmediatamente antes del tratamiento con láser, 1, 4 y 7 días después del tratamiento, y después semanalmente durante el transcurso del experimento. Si, en un intervalo de una semana, la diferencia de la IOP entre los dos ojos de los animales es menor de 0,8 kPa, los animales no se incluyen más en el estudio.

Para evaluar el efecto preventivo de los anticuerpos monoclonales ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 en la apoptosis de RGC, la mitad de los animales que recibieron el tratamiento inductor de IOP reciben una inyección intravítrea o intravenosa del anticuerpo monoclonal ACI-11-Ab-9 o ACI-12-Ab-11 en el momento de la elevación de la IOP. La mitad de los animales actúan como un control. Se forman imágenes de las RGC funcionales en la retina completa de ojos con elevación de IOP y se cuentan, y después se comparan con el número presente en los ojos contralaterales en los mismos animales. La diferencia en el número de RGC entre los dos ojos representa células que se han perdido como resultado de la elevación de la IOP en el ojo operado. El análisis de los cambios en este valor diferencial ayuda a la identificación de efectos protectores inducidos por el anticuerpo monoclonal ACI-11-Ab-9 o ACI-12-Ab-11.

El número de RGC se mide por análisis de puntos finales histológicos a las 2, 4, 8 y 16 semanas después de elevación inducida de IOP. Las retinas de los animales se fijan en paraformaldehído 4% y se tiñen en secciones o montaje completo usando el marcador específico de RGC Brn3b. Múltiples estudios han demostrado que la pérdida de tinción de Brn3b se correlaciona con la pérdida de función de las RGC. Para confirmar la precisión del marcaje de RGC histológico, este método puede usarse junto con retromarcaje del nervio óptico del SCN con DiASP o Fluorogold en un subconjunto de animales para identificar las RGC que mantienen un axón funcional intacto que no ha perdido conectividad con las dianas en el cerebro.

Como un criterio de evaluación secundario, también se mide la apoptosis de RGC en un subconjunto de ojos. Se usa anexina V marcada con fluorescencia para marcar células apoptóticas mediante inyección intravítrea de la proteína una hora antes del sacrificio del animal. Las retinas se preparan como anteriormente y se realiza captura de imágenes de anexina V junto con captura de imágenes de puntos finales histológicos.

Ejemplo 3: Inhibición de la unión de A β ₄₂-ApoE4

Se evalúan la unión de ApoE4 con amiloide y la capacidad de los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención para inhibir la interacción entre ApoE4 y péptido A β ₄₂.

Se diluye ApoE4 recombinante humano a 200 nM con PBS, y se almacena en alícuotas de 0,5 ml a -80 °C. Se resuspende 1 mg de péptido A β ₄₂-biotina en 20 μ l de DMSO y después en 1980 μ l de PBS/BSA 0,1%/azida sódica 0,1% para obtener una solución final de 0,5 mg/ml. Se usa un ensayo de ELISA para determinar la unión de rhApoE4 con A β ₄₂. Se incuba rhApoE4 (100 nM) durante 3 horas a 37 °C con A β ₄₂-biotina (1 μ M) para permitir la unión de la proteína con el péptido. La mezcla se aplica en una placa recubierta de estreptavidina previamente lavada 3 veces con PBST (PBS + Tween 20 0,05%). Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente (TA) la placa se lava 3 veces con PBST y se bloquea durante una noche a 4 °C con PBS que contiene BSA 0,1%. Se detecta ApoE4 unida con un anticuerpo IgG1 de ratón anti ApoE humana usado a una dilución de 1:3000 en PBS y aplicado en la placa durante 2,5 horas a TA. La placa se lava 4 veces con PBST y después se incuba durante 1 hora a TA con el anticuerpo de detección, un anti IgG de ratón acoplado a Fosfatasa Alcalina (AP) a una dilución de 1:5000 en PBS. Después de un lavado final con PBST 4x, las placas se incuban durante 5,5 horas con el sustrato de AP pNPP (sustrato de Fosfatasa, sal Disódica de 4-nitrofenil fosfato Hexahidrato) y se leen a 405 nm usando un lector de placas de ELISA. La Figura 17 resume el experimento.

El ensayo de ELISA se desarrolla haciendo 8 veces diluciones dobles de una mezcla de rhApoE4 (150 nM) y A β ₄₂-biotina (1,5 μ M). Se añaden los siguientes controles negativos: (1) solamente rhApoE4; (2) A β ₄₂-biotina; y (3) rhApoE4-A β ₄₂-biotina (protocolo sin anticuerpo de ratón anti ApoE4). La Figura 18 muestra que se obtiene una señal positiva solamente cuando están presentes tanto rhApoE4 como A β ₄₂-biotina y se sigue el protocolo de ELISA completo.

Para optimizar las concentraciones de rhApoE4 y A β ₄₂-biotina en el ensayo, se ensayan diluciones de rhApoE4 (por ejemplo, 150 nM) con una concentración constante de A β ₄₂-biotina (por ejemplo, normal: 1,5 μ M o exceso: 15 μ M). La Figura 19 muestra que un exceso de A β ₄₂-biotina diluye la señal del ensayo de ELISA ya que se une menos A β ₄₂-biotina en complejo con rhApoE4 a la placa. Basándose en este ensayo se selecciona una concentración óptima de rhApoE4.

La concentración de A β ₄₂-biotina en el ensayo se optimiza usando una concentración constante de rhApoE4 de 100 nM. Se ensayan diluciones de A β ₄₂-biotina (por ejemplo, con una concentración de partida de 1,5 μ M (diluida a concentraciones menores, por ejemplo tan bajas como 1500 nM)) en la preparación de ELISA. Basándose en los resultados mostrados en la Figura 20, se selecciona una concentración óptima de 1 μ M de A β ₄₂-biotina para determinar el efecto de los anticuerpos monoclonales en la unión de rhApoE4 con A β ₄₂-biotina.

El efecto de uno o más de los anticuerpos de la invención en la unión de rhApoE4 con A β ₄₂-biotina se evalúa usando el ensayo de ELISA anteriormente descrito, pero incluyendo además el anticuerpo de la invención en la mezcla de unión antes de sembrar en placas. Por ejemplo, pueden usarse diluciones dobles del anticuerpo, comenzando a una concentración de 50 μ g/ml. La inclusión del anticuerpo puede ser en el momento en que se combinan por primera vez ApoE4 y A β ₄₂-biotina o puede ser después (por ejemplo, varias horas después) de combinarse por primera vez ApoE4 y A β ₄₂-biotina. En el primer caso, se evalúa la capacidad del anticuerpo de la invención para prevenir o inhibir la interacción de ApoE4 y A β ₄₂-biotina, mientras que en el segundo caso, se evalúa la capacidad del anticuerpo de la invención para romper un complejo preexistente entre ApoE4 y A β ₄₂-biotina.

Tablas

Tabla 1.1 Anticuerpos y construcciones antigénicas usadas para inducir dichos anticuerpos

mAb de ratón	Clon	Isotipo	Antígeno/Secuencia	Enlazador	Anclaje	Adyuvante
mACI-24-Ab3	EJ1A9	IgG1	A β ₁₋₁₅	-	Palma	Lípido A

Tabla 1.2. Unión de péptidos A β con ACI-24-Ab-3. Los resultados se expresan como D.O. después de restar el fondo.

Péptido	Anticuerpo	
	ACI-24-Ab-3	
1-28 ¹	Media	0,13
	DT	0,08
	ETM	0,06
17-40 ¹	Media	-0,23
	DT	0,07
	ETM	0,05
1-40 ¹	Media	0,90
	DT	0,22
	ETM	0,16
1-42A ¹	Media	0,31
	DT	0,35
	ETM	0,24
1-42B ²	Media	0,27
	DT	0,07
	ETM	0,05

¹ Péptido de Anaspec

² Péptido de Bachem

Tabla 1.3. Unión de ACI-24-Ab-3 con 33 péptidos solapantes de A β ₁₋₄₂ como se analiza por ELISA.

Epítipo	Anticuerpo	
	ACI-24-Ab-3	
1	0,32	
2	0,26	
3	0,37	
4	0,36	
5	0,32	
6	0,34	
7	0,30	
8	0,21	
9	0,19	
10	0,20	
11	0,23	
12	0,34	
13	0,23	
14	0,30	
15	0,32	
16	0,34	
17	0,31	
18	0,30	
19	0,30	
20	0,22	
21	0,21	
22	0,21	
23	0,20	
24	0,18	
25	0,23	
26	0,25	
27	0,26	
28	0,26	
29	0,27	
30	0,29	
31	0,31	
32	0,31	
33	0,26	
A β ₁₋₄₂	0,36	
A β ₁₋₄₂	0,36	
A β ₁₋₄₂	0,35	

Tabla 1.4. Unión del anticuerpo ACI-24-Ab-3 (EJ1A9 de ratón) con preparaciones protofibrilares de alto peso molecular (APM) y monoméricas de BPM del péptido A β ₁₋₄₂.

ACI-24-Ab-3 (μ g/ml)	Preparación de A β ₁₋₄₂		Diferencia de D.O.
	Protofibrillas (D.O.)	Monómeros de APM (D.O.)	
20	3,765	1,946	1,82
10	2,546	0,836	1,71
5	1,629	0,619	1,01
2,5	1,101	0,331	0,77
1,25	0,642	0,295	0,35
0,6250	0,457	0,177	0,28
0,3125	0,253	0,143	0,11
0,1563	0,167	0,115	0,05

5 Tabla 1.5. Unión del anticuerpo de control 6E10 con preparaciones protofibrilares de alto peso molecular (APM) y monoméricas de BPM del péptido A β ₁₋₄₂.

6E10 (μ g/ml)	Preparación de A β ₁₋₄₂		Diferencia de D.O.
	Protofibrillas (D.O.)	Monómeros de APM (D.O.)	
1	2,550	2,677	0,13
0,5	1,998	2,126	0,13
0,25	1,442	1,563	0,12
0,125	0,863	0,999	0,14
0,0625	0,544	0,574	0,03
0,0313	0,286	0,329	0,04
0,0156	0,201	0,207	0,01
0,0078	0,116	0,133	0,02

Tabla 1.6. Unión del anticuerpo ACI-24-Ab-3 (EJ1A9 de ratón) con preparaciones enriquecidas con oligómeros y monómeros del péptido A β ₁₋₄₂.

Dilución de anticuerpo ^b	Monómeros (D.O.)					Oligómeros (D.O.)				
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Media	ETM	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Media	ETM
1:1	2,03	0,95	1,82	1,60	0,33	2,74	3,65	3,13	3,17	0,26
1:2	1,17	0,57	1,16	0,97	0,20	1,84	3,26	2,25	2,45	0,42
1:4	0,83	0,37	0,86	0,69	0,16	1,16	2,62	1,57	1,79	0,43
1:8	0,55	0,24	0,56	0,45	0,10	0,84	1,87	1,10	1,27	0,31
1:16	0,39	0,15	0,34	0,29	0,07	0,59	1,22	0,69	0,83	0,20
1:32	0,28	0,10	0,23	0,20	0,05	0,31	0,73	0,42	0,49	0,13
1:64	0,22	0,10	0,18	0,17	0,04	0,27	0,41	0,32	0,33	0,04
1:128	0,18	0,10	0,18	0,15	0,03	0,21	0,24	0,28	0,24	0,02

^a D.O.: densidad óptica a 405 nm

^b La dilución de partida para ACI-24-Ab-3 (clon: EJ1A9) fue de 30 μ g/ml

10 Tabla 1.7. Unión del anticuerpo de control 6E10 con preparaciones enriquecidas con oligómeros y monómeros del péptido A β ₁₋₄₂.

Dilución de anticuerpo ^b	Monómeros (D.O.)					Oligómeros (D.O.)				
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Media	ETM	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Media	ETM
1:1	3,67	3,77	4,04	3,83	0,11	3,36	3,67	3,89	3,64	0,15
1:2	3,30	3,48	4,00	3,59	0,21	3,39	3,55	3,83	3,59	0,13
1:4	3,00	3,29	3,52	3,27	0,15	3,10	3,37	3,64	3,37	0,16
1:8	2,67	3,00	2,80	2,82	0,10	2,73	2,99	3,23	2,98	0,15
1:16	1,78	1,94	2,23	1,98	0,13	1,78	1,92	2,07	1,92	0,08
1:32	1,18	1,34	1,54	1,36	0,10	1,27	1,30	1,40	1,32	0,04
1:64	0,81	0,94	1,08	0,94	0,08	0,93	0,88	0,95	0,92	0,02
1:128	0,64	0,75	0,86	0,75	0,06	0,62	0,61	0,66	0,63	0,02

^a D.O.: densidad óptica a 405 nm

^b La dilución de partida para 6E10 fue de 0,5 μ g/ml

Tabla 2.1. Anticuerpos y construcciones antigénicas usadas para inducir dichos anticuerpos

mAb de ratón	Clon	Antígeno Secuencia	/ Enlazador	Anclaje	Adyuvante
ACI-11-Ab-9	FG1F9E4	A β ₂₂₋₃₅	PEG	DSPE	Lípido A
ACI-12-Ab-11	FK2A6A6	A β ₂₉₋₄₀	PEG	DSPE	Lípido A

Tabla 2.2. Unión de péptidos A β con ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11. Los resultados se expresan como D.O. después de restar el fondo.

Péptido		Anticuerpo ACI-11-Ab-9	Anticuerpo ACI-12-Ab-11
1-28 ¹	Media	0,53	-0,02
	DT	0,06	0,00
	ETM	0,04	0,00
17-40 ¹	Media	0,02	-0,02
	DT	0,04	0,01
	ETM	0,03	0,00
1-40 ¹	Media	1,02	0,62
	DT	0,39	0,18
	ETM	0,27	0,13
1-42A ¹	Media	0,78	0,44
	DT	0,12	0,15
	ETM	0,08	0,11
1-42B ²	Media	1,54	1,07
	DT	0,38	0,20
	ETM	0,27	0,14

¹ Péptido de Anaspec

² Péptido de Bachem

Tabla 2.3. Unión de ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 con 33 péptidos solapantes de A β ₁₋₄₂ como se analiza por ELISA.

Péptido	Anticuerpo	
	ACI-11-Ab-9	ACI-12-Ab-11
1	0,10	0,10
2	0,10	0,10
3	0,12	0,11
4	0,11	0,10
5	0,11	0,10
6	0,11	0,10
7	0,11	0,10
8	0,11	0,10
9	0,11	0,10
10	0,13	0,10
11	0,11	0,11
12	0,24	0,21
13	0,17	0,15
14	0,16	0,12
15	0,14	0,10
16	0,14	0,14
17	0,13	0,12
18	0,11	0,10
19	0,10	0,10
20	0,10	0,10
21	0,10	0,09
22	0,10	0,10
23	0,11	0,10
24	0,10	0,10
25	0,11	0,11
26	0,12	0,12
27	0,13	0,12
28	0,12	0,11
29	0,20	0,11
30	0,11	0,11
31	0,12	0,11
32	0,12	0,11
33	0,11	0,11
A β ₁₋₄₂	0,80	0,69
A β ₁₋₄₂	0,81	0,69
A β ₁₋₄₂	0,80	0,69

Tabla 2.4. Unión de ACI-12-Ab-1 (clon: FK2A6A6) con preparaciones enriquecidas con monómeros y oligómeros del péptido A β ₁₋₄₂

Dilución de anticuerpo ^b	Monómeros (D.O.)					Oligómeros (D.O.)				
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Media	ETM	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Media	ETM
1:1	1,60	1,04	1,37	1,34	0,16	2,24	1,85	2,27	2,12	0,14
1:2	0,85	0,51	0,75	0,70	0,10	1,33	1,04	1,32	1,23	0,10
1:4	0,53	0,30	0,45	0,43	0,07	0,70	0,64	0,80	0,71	0,05
1:8	0,29	0,18	0,25	0,24	0,03	0,44	0,42	0,47	0,44	0,02
1:16	0,25	0,12	0,18	0,18	0,04	0,30	0,25	0,28	0,28	0,01
1:32	0,19	0,10	0,14	0,14	0,03	0,20	0,16	0,20	0,18	0,01
1:64	0,15	0,09	0,13	0,12	0,02	0,19	0,14	0,16	0,16	0,01
1:128	0,14	0,09	0,12	0,12	0,02	0,16	0,14	0,15	0,15	0,01

^a D.O.: densidad óptica a 405 nm

^b La dilución de partida para ACI-12-Ab-12 (clon: FK2A6A6) fue de 40 μ g/ml

Tabla 2.5. Unión del anticuerpo de control 6E10 con preparaciones enriquecidas con monómeros y oligómeros del péptido A β ₁₋₄₂

Dilución de anticuerpo ^b	Monómeros (D.O.)					Oligómeros (D.O.)				
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Media	ETM	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Media	ETM
1:1	3,67	3,77	4,04	3,83	0,11	3,36	3,67	3,89	3,64	0,15
1:2	3,30	3,48	4,00	3,59	0,21	3,39	3,55	3,83	3,59	0,13
1:4	3,00	3,29	3,52	3,27	0,15	3,10	3,37	3,64	3,37	0,16
1:8	2,67	3,00	2,80	2,82	0,10	2,73	2,99	3,23	2,98	0,15
1:16	1,78	1,94	2,23	1,98	0,13	1,78	1,92	2,07	1,92	0,08
1:32	1,18	1,34	1,54	1,36	0,10	1,27	1,30	1,40	1,32	0,04
1:64	0,81	0,94	1,08	0,94	0,08	0,93	0,88	0,95	0,92	0,02
1:128	0,64	0,75	0,86	0,75	0,06	0,62	0,61	0,66	0,63	0,02

^a D.O.: densidad óptica a 405 nm

^b La dilución de partida para 6E10 fue de 0,5 µg/ml

Depósitos

Las siguientes líneas celulares de hibridoma se depositaron en el "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, según las cláusulas del Tratado de Budapest:

Designación de la línea de hibridoma	Designación de anticuerpo	Fecha de deposición	Nº de referencia
EJ1A9	ACI-24-Ab-3	25 de mayo de 2007	DSM ACC2844
FG1F9E4	ACI-11-Ab-9	25 de mayo de 2007	DSM ACC2845
FK2A6A6	ACI-12-Ab-11	25 de mayo de 2007	DSM ACC2846

Referencias

Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T. (2000). *Nature Med.* 6, 916-919.

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.

Baschong W, Wrigley NG (1990) Small colloidal gold conjugated to Fab fragments or to immunoglobulin G as high-resolution labels for electron microscopy: a technical overview. *J Electron Microscop Tech* 14: 313-323.

Blond y Goldberg, 1987, *PNAS* 1 de marzo de 1987 Vol. 84 | nº 5 | 1147-1151

Cornilescu G, Delaglio F, Bax A. (1999) *J.Biomol.NMR*; 13: 289-302.

Burdick, D. *et al.* Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J. Biol. Chem.* 267, 546-554 (1992).

DeMattos, Bales, KR, Cummins, DJ, Dodart, JC, Paul, SM, Holtzman, D. M (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8850-8855.

Dewachter I, Van DJ, Smeijers L, Gilis M, Kuiperi C, Laenen I, Caluwaerts N, Moechars D, Checler F, Vanderstichele H, Van LF (2000) Aging increased amyloid peptide and caused amyloid plaques in brain of old APP/V717I transgenic mice by a different mechanism than mutant presenilin 1. *J Neurosci* 20: 6452-6458.

Dewachter I, Reverse D, Caluwaerts N, Ris L, Kuiperi C, Van den HC, Spittaels K, Umans L, Serneels L, Thiry E, Moechars D, Mercken M, Godaux E, Van Leuven F (2002) Neuronal deficiency of presenilin 1 inhibits amyloid plaque formation and corrects hippocampal long-term potentiation but not a cognitive defect of amyloid precursor protein [V717I] transgenic mice. *J Neurosci* 22: 3445-3453.

Glenner y Wong, *Biochem Biophys Res Comm* 129, 885-890 (1984)

Harlow y Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York 1988))

Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Dewachter I, Walter J, Klockgether T, Van LF (2005) Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I]

- transgenic mice. J Neuroinflammation 2: 22.
- Hodgson *et al.*, Bio/Technology, 9: 421 (1991)
- 5 Iwade M, Asakura T, Williamson MP. (1999) J.Biomol.NMR; 13: 199-211.
- Kirschner, D. A., Abraham.C, y Selkoe, D.J. X-ray diffraction from intraneuronal paired helical filaments and extraneuronal amyloid fibers in Alzheimer disease indicates cross-beta conformation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 83, 503-507 (1986).
- 10 Khaw, B. A. *et al.* J. Nucl. Med. 23: 1011-1019 (1982)
- Kennedy, J. H., *et al.*, 1976 (Clin. Chim. Acta 70: 1-31)
- 15 Klein WL (2002) Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. Neurochem Int 41(5): 345-352.
- Kohler y Milstein (Nature 256: 495-497 (1975))
- 20 Le Vine, H. III, (2002). Arch Biochem Biophys 404,106-115.
- Luca *et al.*, 2001
- McGeer *et al.*, 1994
- 25 Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, Van LF (1999) Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. J Biol Chem 274: 6483-6492.
- 30 Nelson, R. y Eisenberg, D. Recent atomic models of amyloid fibril structure. Curr. Opin. Struct. Biol. (2006).
- Nicolau, C, Greferath, R., Balaban, T. S., Lazarte, J. E., and Hopkins, R. J. (2002). Proc Nati Acad Sci U S A 99, 2332-2337.
- 35 Queen *et al.*, Proc. Nati Acad Sci USA, 86: 10029-10032 (1989)
- Pearson W. R. (1990), Methods in Enzymology 183, 63-98
- Petkova AT, Buntkowsky G, Dyda F, Leapman RD, Yau WM, Tycko R. J. Mol. Biol. 2004; 335: 247-260.
- 40 Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, Antzutkin ON, Leapman RD, Delaglio F, Tycko R. (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A; 99: 16742-16747.
- Rousseaux *et al.* Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986
- 45 Rzepecki, P., Nagel-Steger, L., Feuerstein, S., Linne, U., Molt, O., Zadmard, R., Aschermann, K., Wehner, M., Schrader.T. y Riesner, D. (2004). J Biol Chem 279,47497-47505.
- Sambrook *et al.* Molecular Biology: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989
- 50 Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Smith, S. O., y Bormann, B. J. (1995). Proc Nati Acad Sci U S A 92,488-491.
- 55 Schenk *et al.*, 1999
- Schurs, A. H. W. M., *et al.* 1977 (Clin. Chim Acta 81: 1-40)
- Selkoe DJ. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2000,924: 17-25.
- 60 Slot JW, Geuze HJ (1985) A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. Eur J Cell Biol 38: 87-93.
- 65 Smith y Waterman, Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489

Van dA, I, Wera S, Van LF, Henderson ST (2005) A ketogenic diet reduces amyloid beta 40 and 42 in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nutr Metab (Lond)* 2: 28.

Wagner *et al* (2002) *Journal of Liposome Research* Vol 12(3), pp 259 – 270

Ye, J., Dave, U. P., Grishin, N. V., Goldstein, J. L., y Brown, M. S. (2000). *Proc Nati Acad Sci USA* 97, 5123-5128.
Zrein *et al.* (1998), *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5(1): 45-49.

Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256

Documento WO 2004/058258

Documento WO96/1359

Documento WO96/29605

Se describe en la presente memoria una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los sistemas del tejido visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como degradación neuronal, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3.

Esta composición farmacéutica puede usarse particularmente para el tratamiento de enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como degradación neuronal, que se selecciona del grupo que consiste en déficits visuales corticales, glaucoma, degeneración retiniana primaria, incluyendo degeneración macular, drusas del nervio óptico, neuropatía óptica, neuritis óptica, cataratas, amiloidosis ocular y distrofia reticular, pero es particularmente glaucoma, especialmente glaucoma seleccionado del grupo que consiste en glaucoma de ángulo abierto crónico (COAG), glaucoma de ángulo cerrado agudo (AACG), glaucoma de mecanismo mixto o combinado, glaucoma de tensión normal, glaucoma congénito, glaucoma secundario, glaucoma pigmentario y glaucoma exfoliante.

Se describe además en la presente memoria un método para reducir la carga de placas en la capa de células ganglionares retinianas de un sujeto, particularmente un mamífero, especialmente un ser humano, que padece una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como degradación neuronal, que comprende administrar al sujeto la composición farmacéutica como se ha desvelado anteriormente en la presente memoria.

Se describe además en la presente memoria un método para reducir la cantidad de placas en la capa de células ganglionares retinianas de un sujeto, particularmente un mamífero, especialmente un ser humano, que padece una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como degradación neuronal, que comprende administrar al sujeto la composición farmacéutica como se ha desvelado anteriormente en la presente memoria.

Se describe además en la presente memoria un método para reducir la cantidad total de amiloide β soluble en la capa de células ganglionares retinianas de un sujeto, particularmente un mamífero, especialmente un ser humano, que comprende administrar al sujeto la composición farmacéutica como se ha desvelado anteriormente en la presente memoria.

Se describe además en la presente memoria un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de la enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como degradación neuronal, en un sujeto, particularmente un mamífero, especialmente un ser humano, que comprende administrar al sujeto la composición farmacéutica como se ha desvelado anteriormente en la presente memoria.

Se describe además en la presente memoria un método para diagnosticar una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como degradación neuronal, en un sujeto, particularmente un mamífero, especialmente un ser humano, que comprende detectar la unión inmuno-específica del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3, un anticuerpo funcionalmente equivalente del mismo o partes funcionales del mismo, con un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ* que incluye las etapas de

(a) poner la muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha que

contiene la proteína amiloide en contacto con el anticuerpo, uniéndose dicho anticuerpo con un epítipo de la proteína amiloide;

- (b) permitir que el anticuerpo se una con la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;
- (c) detectar la formación del complejo inmunológico, particularmente de modo que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de proteína amiloide; y
- (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra o parte o área del cuerpo específica.

Se describe además en la presente memoria un método para diagnosticar una predisposición a una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como degradación neuronal, en un sujeto, particularmente un mamífero, especialmente un ser humano, que comprende detectar la unión específica del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3, un anticuerpo funcionalmente equivalente del mismo o partes funcionales del mismo, con un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ* que incluye las etapas de

- (a) poner la muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha que contiene la proteína amiloide en contacto con el anticuerpo, en el que el anticuerpo se une con un epítipo conformacional de la proteína amiloide;
- (b) permitir que el anticuerpo se una con cualquier proteína amiloide en la muestra para formar un complejo inmunológico;
- (c) detectar la formación del complejo inmunológico;
- (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra o parte o área del cuerpo específica; y
- (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal,

en el que un aumento en la cantidad de dicho complejo en comparación con un valor de control normal indica que el sujeto padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual.

Se describe además en la presente memoria un método para controlar la enfermedad ocular residual mínima asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como degradación neuronal, en un sujeto, particularmente un mamífero, especialmente un ser humano, después del tratamiento con la composición farmacéutica de la realización 1, en el que dicho método comprende:

- (a) poner una muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha que contiene la proteína amiloide en contacto con el anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3, un anticuerpo funcionalmente equivalente del mismo o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo monoclonal con un epítipo de la proteína amiloide;
- (b) permitir que el anticuerpo monoclonal se una con la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;
- (c) detectar la formación del complejo inmunológico;
- (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra o parte o área del cuerpo específica; y
- (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal,

en el que un aumento en la cantidad de dicho complejo en comparación con un valor de control normal indica que el sujeto aún padece una enfermedad ocular residual mínima asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual.

Se describe además en la presente memoria un método para predecir la sensibilidad de un sujeto, particularmente un mamífero, especialmente un ser humano, que se trata con la composición farmacéutica como se ha desvelado anteriormente en la presente memoria que comprende las etapas de:

- (a) poner una muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha que contiene una proteína amiloide en contacto con el anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3, un anticuerpo funcionalmente equivalente del mismo o partes funcionales del mismo, uniéndose dicho anticuerpo monoclonal con un epítipo de la proteína amiloide;
- (b) permitir que el anticuerpo monoclonal se una con la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;
- (c) detectar la formación del complejo inmunológico;
- (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra o parte o área del cuerpo específica; y

(e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico antes y después del comienzo del tratamiento,

en el que una reducción en la cantidad de dicho complejo inmunológico indica que el sujeto tiene un alto potencial de ser sensible al tratamiento.

Se describe además en la presente memoria un método para mantener o reducir la presión ocular en los ojos de un sujeto, particularmente un mamífero, especialmente un ser humano, que padece una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como degradación neuronal, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica como se ha desvelado anteriormente en la presente memoria.

Se describe además en la presente memoria una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como degradación neuronal, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11.

Esta composición farmacéutica puede usarse particularmente para el tratamiento de enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como degradación neuronal, que se selecciona del grupo que consiste en déficits visuales corticales, glaucoma, degeneración retiniana primaria, incluyendo degeneración macular, drusas del nervio óptico, neuropatía óptica, neuritis óptica, cataratas, amiloidosis ocular y distrofia reticular, pero es particularmente glaucoma, especialmente glaucoma seleccionado del grupo que consiste en glaucoma de ángulo abierto crónico (COAG), glaucoma de ángulo cerrado agudo (AACG), glaucoma de mecanismo mixto o combinado, glaucoma de tensión normal, glaucoma congénito, glaucoma secundario, glaucoma pigmentario y glaucoma exfoliante.

Se describe en la presente memoria además un método para reducir la carga de placas en la capa de células ganglionares retinianas de un sujeto, particularmente un mamífero, especialmente un ser humano, que padece una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como degradación neuronal, que comprende administrar al sujeto la composición farmacéutica como se ha desvelado anteriormente en la presente memoria.

Se describe además en la presente memoria un método para reducir la cantidad de placas en la capa de células ganglionares retinianas de un sujeto, particularmente un mamífero, especialmente un ser humano, que padece una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como degradación neuronal, que comprende administrar al sujeto la composición farmacéutica como se ha desvelado anteriormente en la presente memoria.

Se describe además en la presente memoria un método para reducir la cantidad total de beta amiloide soluble en la capa de células ganglionares retinianas de un sujeto, particularmente un mamífero, especialmente un ser humano, que comprende administrar al animal la composición farmacéutica como se ha desvelado anteriormente en la presente memoria.

Se describe además en la presente memoria un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como degradación neuronal, en un sujeto, particularmente un mamífero, especialmente un ser humano, que comprende administrar al animal la composición farmacéutica como se ha desvelado anteriormente en la presente memoria.

Se describe además en la presente memoria un método para diagnosticar una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como degradación neuronal, en un sujeto, particularmente un mamífero, especialmente un ser humano, que comprende detectar la unión inmuno-específica de un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en ACI-11-Ab-9, ACI-12-Ab-11, anticuerpos funcionalmente equivalentes de los mismos y partes funcionales de los mismos, con un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ* que incluye las etapas de

(a) poner la muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha que contiene la proteína amiloide en contacto con el anticuerpo, uniéndose dicho anticuerpo con un epítipo de la proteína amiloide;

(b) permitir que el anticuerpo se una con la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;

- (c) detectar la formación del complejo inmunológico, particularmente de modo que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de proteína amiloide; y
- (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra o parte o área del cuerpo específica.

Se describe además en la presente memoria un método para diagnosticar una predisposición a una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como degradación neuronal, en un sujeto, particularmente un mamífero, especialmente un ser humano, que comprende detectar la unión específica de un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en ACI-11-Ab-9, ACI-12-Ab-11, anticuerpos funcionalmente equivalentes de los mismos y partes funcionales de los mismos, con un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ* que incluye las etapas de

- (a) poner la muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha que contiene la proteína amiloide en contacto con el anticuerpo, en el que el anticuerpo se une con un epítipo conformacional de la proteína amiloide;
- (b) permitir que el anticuerpo se una con cualquier proteína amiloide en la muestra para formar un complejo inmunológico;
- (c) detectar la formación del complejo inmunológico;
- (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra o parte o área del cuerpo específica; y
- (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal,

en el que un aumento en la cantidad de dicho complejo en comparación con un valor de control normal indica que el sujeto padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual.

Se describe además en la presente memoria un método para controlar la enfermedad ocular residual mínima asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como degradación neuronal, en un sujeto, particularmente un mamífero, especialmente un ser humano, después del tratamiento con la composición farmacéutica de la realización 32, comprendiendo dicho método:

- (a) poner una muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha que contiene la proteína amiloide en contacto con un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en ACI-11-Ab-9, ACI-12-Ab-11, anticuerpos funcionalmente equivalentes de los mismos, y partes funcionales de los mismos, uniéndose dicho anticuerpo monoclonal con un epítipo de la proteína amiloide;
- (b) permitir que el anticuerpo monoclonal se una con la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;
- (c) detectar la formación del complejo inmunológico;
- (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra o parte o área del cuerpo específica; y
- (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal,

en el que un aumento en la cantidad de dicho complejo en comparación con un valor de control normal indica que el sujeto aún padece una enfermedad ocular residual mínima asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual.

Se describe además en la presente memoria un método para predecir la sensibilidad de un sujeto, particularmente un mamífero, especialmente un ser humano, que se trata con la composición farmacéutica como se ha desvelado anteriormente en la presente memoria que comprende las etapas de:

- (a) poner una muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha que contiene una proteína amiloide en contacto con un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en ACI-11-Ab-9, ACI-12-Ab-11, anticuerpos funcionalmente equivalentes de los mismos y partes funcionales de los mismos, uniéndose dicho anticuerpo monoclonal con un epítipo de la proteína amiloide;
- (b) permitir que el anticuerpo monoclonal se una con la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;
- (c) detectar la formación del complejo inmunológico;
- (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra o parte o área del cuerpo específica; y
- (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico antes y después del comienzo del tratamiento,

en el que una reducción en la cantidad de dicho complejo inmunológico indica que el sujeto tiene un alto potencial de ser sensible al tratamiento.

Se describe además en la presente memoria un método para mantener o reducir la presión ocular en los ojos de un sujeto, particularmente un mamífero, especialmente un ser humano, que padece una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como degradación neuronal, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica como se ha desvelado anteriormente en la presente memoria.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AC Immune S.A.

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES

<130> 089667-0154

<141> 03-10-2008

<150> US 60/960.614 y US 60/960.615

<151> 05-10-2007

<160> 30

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<223> péptido antigénico AB 22-35

<400> 1

Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met
1 5 10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<223> péptido antigénico AB 29-40

<400> 2

Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
1 5 10

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<223> Fragmento peptídico de A-beta AB 1-28

<400> 3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
20 25

5
 <210> 4
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> Fragmento peptídico de A-beta AB 17-40

15
 <400> 4

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
1 5 10 15

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
20

20
 <210> 5
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> Fragmento peptídico de A-beta AB 1-40

<400> 5

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
35 40

30
 <210> 6
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> Fragmento peptídico de A-beta AB 1-42

40
 <400> 6

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

<210> 7
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 5
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> Dominio variable de cadena ligera de ACI-24-Ab-3
 10
 <400> 7

 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Leu Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Ala Thr Asn
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105
 15
 <210> 8
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 20
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> Dominio variable de cadena pesada de ACI-24-Ab-3
 X puede ser cualquier aminoácido
 25
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (52)..(52)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 30
 <400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Arg Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Xaa Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Val Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Ile Tyr Tyr Gly Arg Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> CDR1 de cadena ligera

15 <400> 9
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Ala Thr Asn Val Ala
 1 5 10

20 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> CDR2 de cadena ligera

<400> 10
 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
 1 5

30 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> CDR3 de cadena ligera

40 <400> 11

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

5
 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> CDR1 de cadena pesada

<400> 12

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Arg
1 5 10

15
 <210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20
 <220>
 <221>CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> CDR2 de cadena pesada

25
 X puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (3).. (3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

30
 <400> 13

Glu Ile Xaa Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

35
 <210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

40
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> CDR3 de cadena pesada

45
 <400> 14

Ser Ile Tyr Tyr Gly Arg Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

50
 <210> 15
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

55
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> Secuencia codificante de región variable de cadena ligera de ACI-24-Ab-3

<400> 15

ES 2 445 590 T3

	gatatcgtga tgaccagtc tcaactcttc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc	60
	gtcacctgca aggccagtc gaatgtggct actaatgtag cctgggtatca acagaaacca	120
	gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcctccctacc ggtacagtgg agtccctgat	180
	cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgcagtct	240
	gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atccgctcac gttcgggtgct	300
	gggaccaagc tggagctgaa a	321
5	<210> 16 <211> 363 <212> ADN <213> Mus musculus	
10	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <223> Secuencia codificante de región variable de cadena pesada de ACI-24-Ab-3	
	<400> 16	
	caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctggcgaggc ctggggcttc agtgaagctg	60
	tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca agctatggta taagggtgggt gaagcagaga	120
	actggacagg gccttgagtg gattggagag atttgctcta gaagtggcaa tacttactac	180
	aatgagaagt tcaagggcaa ggccacagtg actgcagaca aatcctccag cacagcgtac	240
	atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcgggtct atttctgtgc aagatcgatt	300
	tactacggta gaccetacta ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc	360
15	tca	363
20	<210> 17 <211> 109 <212> PRT <213> Mus musculus	
25	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <223> Dominio variable de cadena ligera de ACI-11-Ab-9	
	<400> 17	

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

<210> 18
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> Dominio variable de cadena pesada de ACI-11-Ab-9

<400> 18

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
 20 25 30
 Thr Ile His Trp Met Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Tyr Gly Tyr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 19
 <211> 109
 <212> ERT
 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<223> Dominio variable de cadena ligera de ACI-12-Ab-11

<400> 19

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

<210> 20

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<223> Dominio variable de cadena pesada de ACI-12-Ab-11

<400> 20

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
20 25 30
Thr Ile His Trp Met Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Tyr Gly Tyr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110
Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 21

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> CDR1 de cadena ligera
 <400> 21
 10 **Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn**
1 5 10
 <210> 22
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 20 <223> CDR2 de cadena ligera
 <400> 22
Gly Thr Ser Asn Arg Ala Pro
1 5
 25 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> CDR3 de cadena ligera
 <400> 23
 35 **Ala Leu Trp Tyr Ser Thr His Tyr Val**
1 5
 <210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 40 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> CDR1 de cadena pesada
 45 <400> 24
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Thr Ile His
1 5 10
 50 <210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 55 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> CDR2 de cadena pesada
 <400> 25

Tyr Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

5
<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

10
<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<223> CDR3 de cadena pesada

<400> 26

Asp Tyr Gly Tyr Ala Phe Asp Tyr

15
1 5

<210> 27
<211> 327
<212> ADN
20 <213> Mus musculus

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<223> Secuencia codificante de dominio variable de cadena ligera de ACI-11-Ab-9

25 <400> 27

```
caggcagttg tgactcagga atctgcactc accacgtcac ctggtggaac agtcatactc 60
acttgtogct caagtactgg ggctgttaca actagtaact atgccaactg ggtccaagaa 120
aaaccagatc atttattcac tggcttaata ggtggtacca gcaacccagc tccaggtgtt 180
octgtcagat tctcaggctc octgattgga gacaaggctg cctcaccat cacaggggca 240
cagactgagg atgatgcaat gtattttctgt gctctatggt acagcaccca ttatgttttc 300
ggcgttgaa ccaaggtcac tgtccta 327
```

30 <210> 28
<211> 351
<212> ADN
<213> Mus musculus

35 <220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<223> Secuencia codificante de dominio variable de cadena pesada de ACI-11-Ab-9

40 <400> 28

```
caggttcagc tgcagcagtc tgacgtgag ttggtgaaac ctggagcttc agtgaagata 60
tcttgaagg ttcttgcta caccttact gaccatacta ttactggat gaagcagagg 120
cctgaacagg gcttggaaat gattggatat atttatcta gagatggtag tactaagtac 180
aatgagaagt tcaagggcaa ggcacattg actgcagaca aatctccag cacagcctac 240
atgcagctca acagcctgac atctgaggac tctgcagctc atttctgtgc aagagactat 300
ggttacgoot ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctctc a 351
```

<210> 29
<211> 327

<212> ADN
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> Secuencia codificante de dominio variable de cadena ligera de ACI-12-Ab-11

<400> 29

10 caggcogttg tgactcagga atctgcactc accaogtcc ctggtggaac agtcatactc 60
 acttgtogct caagtactgg ggtgttaca actagtaact atgccaactg ggtccaagaa 120
 aaaccagatc atttattcac tggcttaata ggtggtacca gcaaccgagc tccaggtgtt 180
 octgtcagat tctcaggtc octgattgga gacaaggctg cctcaccat cacaggggca 240
 cagactgagg atgatgcaat gtattttctgt gctctatggt acagcaocca ttatgttttc 300
 ggcgggtgaa ccaaggtcac tgtctca 327

<210> 30
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> Secuencia codificante de dominio variable de cadena pesada de ACI-12-Ab-11

<400> 30

20 caggttcagc tgcagcagtc tgacgtgag ttggtgaaac ctggagcttc agtgaagata 60
 tctgcaagg tttctggcta caccttcaact gaocatata ttcaactggat gaagcagagg 120
 octgaacagg gcttggaaat gattggatat atttatocta gagatggtag tactaagtac 180
 aatgagaagt tcaagggcaa ggocacattg actgcagaca aatctctccag cacagctac 240
 atgcagctca acagctgac atctgaggac tctgcagtct atttctgtgc aagagactat 300
 ggttacgct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctctc a 351

25

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de glaucoma, neuritis óptica, o distrofia reticular que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, que reconoce y se une a una proteína β amiloide que comprende una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9; una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10; una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11; una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12; una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 13; y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14.
2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho tratamiento es tratamiento de glaucoma.
3. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de glaucoma de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el glaucoma se selecciona del grupo que consiste en glaucoma de ángulo abierto crónico (COAG), glaucoma de cierre de ángulo agudo (AACG), glaucoma de mecanismo mixto o combinado, glaucoma de tensión normal, glaucoma congénito, glaucoma secundario y glaucoma exfoliante.
4. Un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, que reconoce y se une a proteína β amiloide, que comprende una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9; una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10; una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11; una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12; una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 13; y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14 para su uso en la prevención, tratamiento o alivio de los efectos de glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular.
5. El anticuerpo o parte funcional del mismo de acuerdo con la reivindicación 4 para uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 4 para reducir la carga de placas en la capa de células ganglionares retinianas de un sujeto que padece glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular.
6. El anticuerpo o parte funcional del mismo de acuerdo con la reivindicación 4 para uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 4 para reducir la cantidad de placas en la capa de células ganglionares retinianas de un sujeto que padece glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular.
7. El anticuerpo o parte funcional del mismo de acuerdo con la reivindicación 4 para uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 4 para reducir la cantidad total de β amiloide soluble en la capa de células ganglionares retinianas de un sujeto que padece glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular.
8. El anticuerpo o parte funcional del mismo de acuerdo con la reivindicación 4 para uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 4 para mantener o reducir la presión ocular en los ojos de un sujeto que padece glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular.
9. El anticuerpo o parte funcional del mismo de acuerdo con la reivindicación 4 para uso en el tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 - 8, en el que el sujeto es un mamífero.
10. El anticuerpo o parte funcional del mismo de acuerdo con la reivindicación 4 para uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el mamífero es un ser humano.
11. Un método para diagnosticar glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular en un sujeto que comprende detectar la unión inmuno-específica de un anticuerpo monoclonal que comprende una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9; una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10; una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11; una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12; una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 13; y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14, o una parte funcional del mismo, con un epítipo de la proteína amiloide en una muestra del sujeto que incluye las etapas de
 - (a) poner la muestra que se sospecha que contiene la proteína amiloide en contacto con el anticuerpo uniéndose dicho anticuerpo con un epítipo de la proteína amiloide;
 - (b) permitir que el anticuerpo se una con la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;
 - (c) detectar la formación del complejo inmunológico, particularmente de modo que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de proteína amiloide; y
 - (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra.

12. Un método para diagnosticar una predisposición a glaucoma, neuritis óptica, o distrofia reticular en un sujeto que comprende detectar la unión específica de un anticuerpo monoclonal que comprende una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9; una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10; una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11; una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12; una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 13; y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14, o una parte funcional del mismo, con un epítipo de la proteína amiloide en una muestra del sujeto que incluye las etapas de

- (a) poner la muestra que se sospecha que contiene la proteína amiloide en contacto con el anticuerpo, en el que el anticuerpo se une a un epítipo conformacional de la proteína amiloide;
- (b) permitir que el anticuerpo se una con cualquier proteína amiloide en la muestra para formar un complejo inmunológico;
- (c) detectar la formación del complejo inmunológico;
- (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra; y
- (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal,

en el que un aumento en la cantidad de dicho complejo en comparación con un valor de control normal indica que el sujeto padece o está en riesgo de desarrollar glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular.

13. Un método para controlar el glaucoma, la neuritis óptica o la distrofia reticular residual mínimo en un sujeto después del tratamiento con la composición farmacéutica de la reivindicación 1, en el dicho método comprende:

- (a) poner una muestra del sujeto que se sospecha que contienen la proteína amiloide en contacto con un anticuerpo monoclonal que comprende una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9; una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10; una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11; una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12; una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 13; y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14, o una parte funcional del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con un epítipo de la proteína amiloide;
- (b) permitir que el anticuerpo se una con la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;
- (c) detectar la formación del complejo inmunológico;
- (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra; y
- (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal,

en el que un aumento en la cantidad de dicho complejo en comparación con un valor de control normal indica que el sujeto aún padece glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular residual mínimo.

14. Un método para predecir la sensibilidad de un sujeto que se trata con la composición farmacéutica de la reivindicación 1 que comprende las etapas de:

- (a) poner una muestra del sujeto que se sospecha que contienen una proteína amiloide en contacto con un anticuerpo monoclonal que comprende una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9; una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10; una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11; una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12; una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 13; y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14, o una parte funcional del mismo, uniéndose dicho anticuerpo con un epítipo de la proteína amiloide;
- (b) permitir que el anticuerpo se una con la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;
- (c) detectar la formación del complejo inmunológico;
- (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra; y
- (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico antes y después del comienzo del tratamiento,

en el que una reducción en la cantidad de dicho complejo inmunológico indica que el sujeto tiene un alto potencial de ser sensible al tratamiento.

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en el que el sujeto es un mamífero.

16. El método de la reivindicación 15, en el que mamífero es un ser humano.

17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en el que el anticuerpo es:

- (a) un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-10;
- (b) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7; un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8; o tanto el dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7 como el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8;
- (c) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7; un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8; o tanto el dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7 como el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8, en el que el aminoácido en la posición 52 de SEC ID N°:8 es cisteína; o
- (d) un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma EJ1A9 depositada el 25 de mayo de 2007 y a la que se dio el número de depósito DSM ACC2844.
18. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el anticuerpo se selecciona del grupo de un anticuerpo quimérico, monocatenario, simianizado, humano y humanizado o es un fragmento activo del mismo.
19. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 18, en la que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
20. El anticuerpo o parte funcional del mismo de acuerdo con la reivindicación 4 para uso en el tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-10, en la que el anticuerpo se selecciona del grupo de un anticuerpo quimérico, monocatenario, simianizado, humano y humanizado o es un fragmento activo del mismo.
21. El anticuerpo monoclonal o parte funcional del mismo de acuerdo con la reivindicación 4 para uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 20, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11-17, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo de un anticuerpo quimérico, monocatenario, simianizado, humano y humanizado, o es un fragmento activo del mismo.
23. El método de la reivindicación 22, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
24. Uso de un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, que reconoce y se une a proteína β amiloide, que comprende una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9; una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10; una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11; una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12; una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 13; y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14 para la preparación de un medicamento para
- a) prevenir, tratar o aliviar los efectos de glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular;
- b) reducir la carga de placas en la capa de células ganglionares retinianas de un sujeto que padece glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular;
- c) reducir la cantidad de placas en la capa de células ganglionares retinianas de un sujeto que padece glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular;
- d) reducir la cantidad total de amiloide β soluble en la capa de células ganglionares retinianas de un sujeto que padece glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular; o
- e) mantener o reducir la presión ocular en los ojos de un sujeto que padece glaucoma, neuritis óptica o distrofia reticular.
25. Uso de la reivindicación 24, en el que anticuerpo es:
- (a) un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-10, 20 o 21;
- (b) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7; un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8; o tanto el dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7 como el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8;
- (c) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7; un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8; o tanto el dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7 como el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8, en el que el aminoácido en la posición 52 de SEC ID N°:8 es cisteína; o
- (d) un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma EJ1A9 depositada el 25 de mayo de 2007 y a la que se dio el número de depósito DSM ACC2844.

26. La composición farmacéutica para uso en el tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o el anticuerpo o parte funcional del mismo para uso en el tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-10, en la que el anticuerpo es:

- 5 (a) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7; un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8; o tanto el dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7 como el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8;
- 10 (b) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7; un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8; o tanto el dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7 como el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 8, en el que el aminoácido en la posición 52 de SEC ID N°: 8 es cisteína; o
- 15 (c) un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma EJ1A9 depositada el 25 de mayo de 2007 y a la que se dio el número de depósito DSM ACC2844.

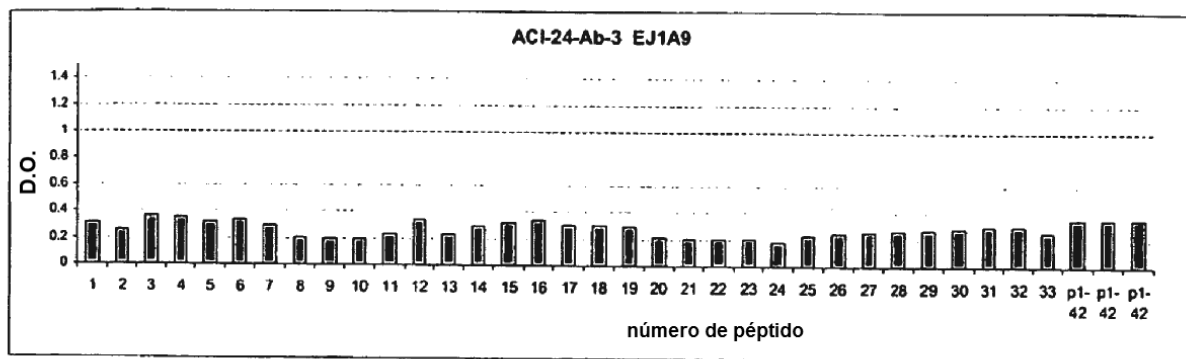


Figura 1

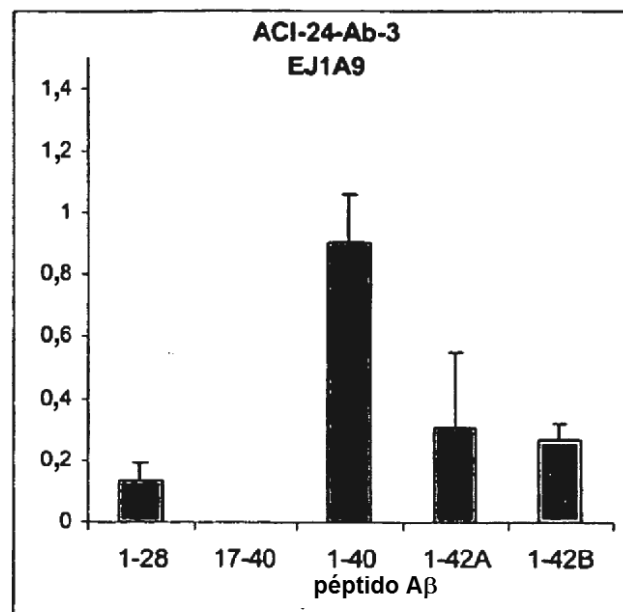


Figura 2.

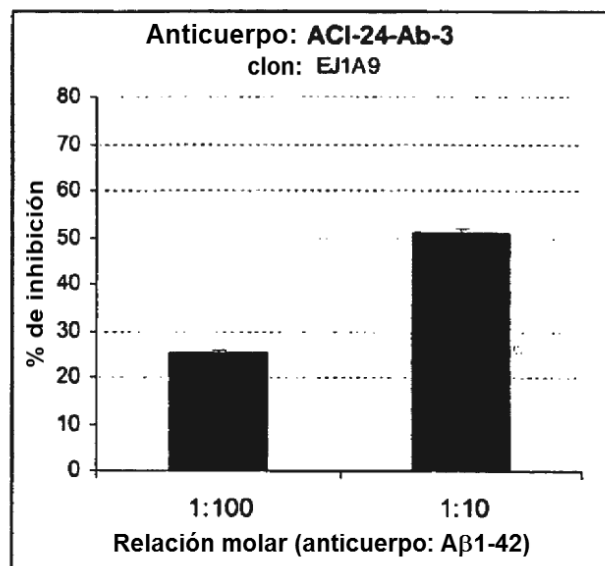


Figura 3.

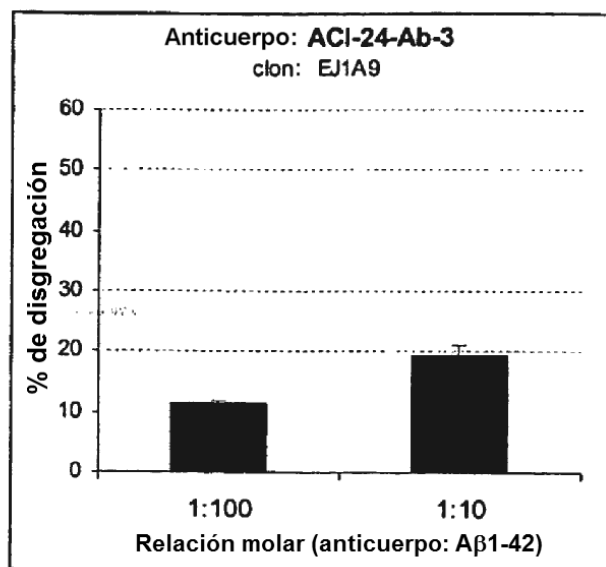


Figura 4.

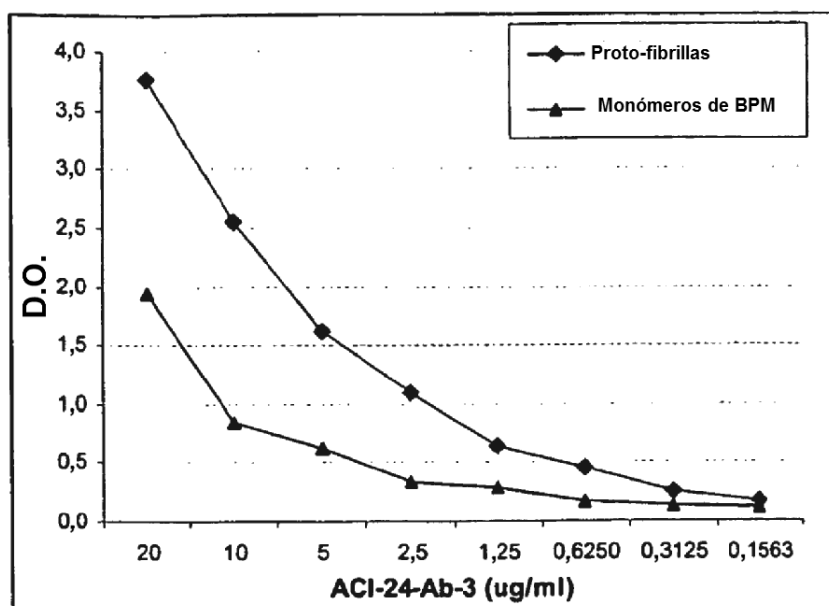


Figura 5.

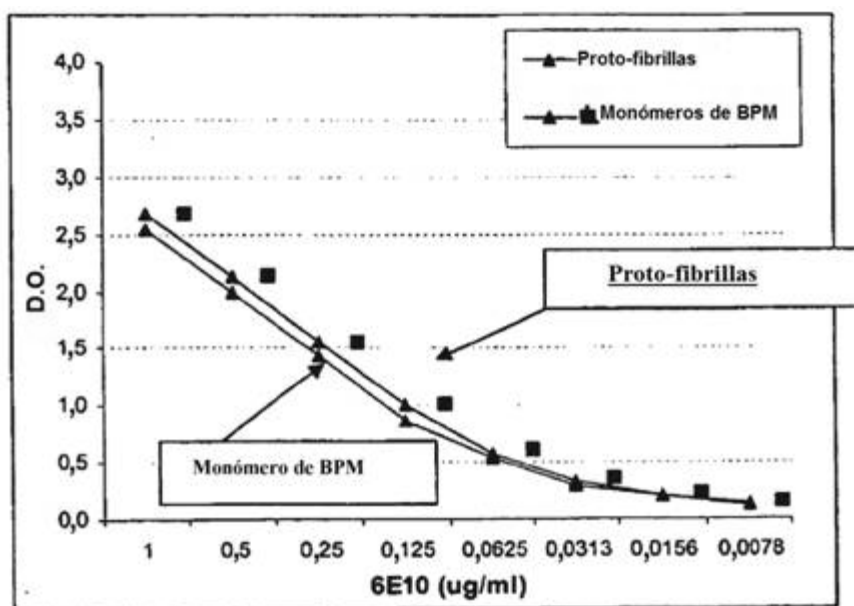


Figura 6.

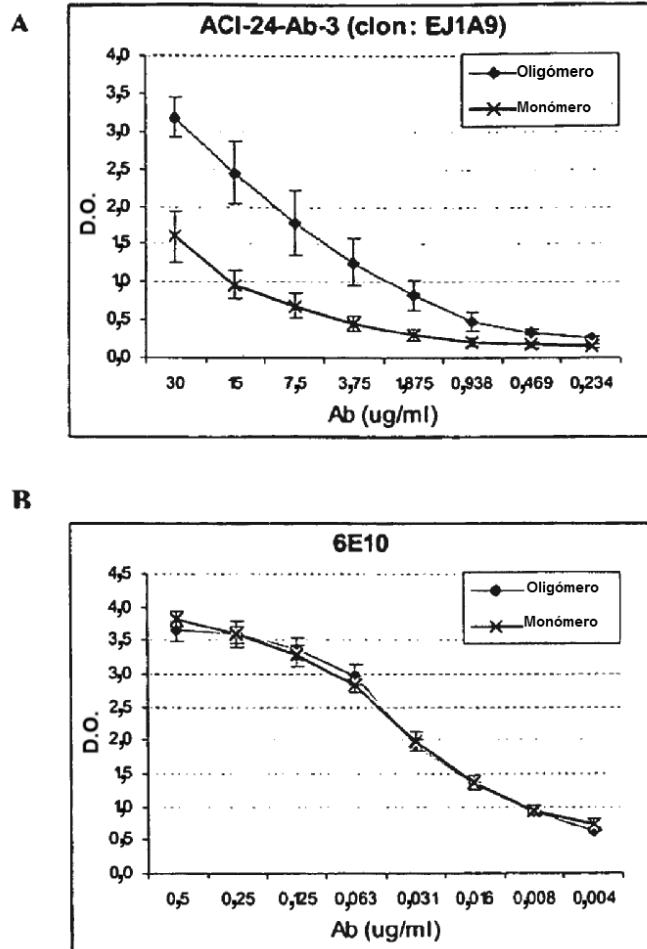


Figura 7.

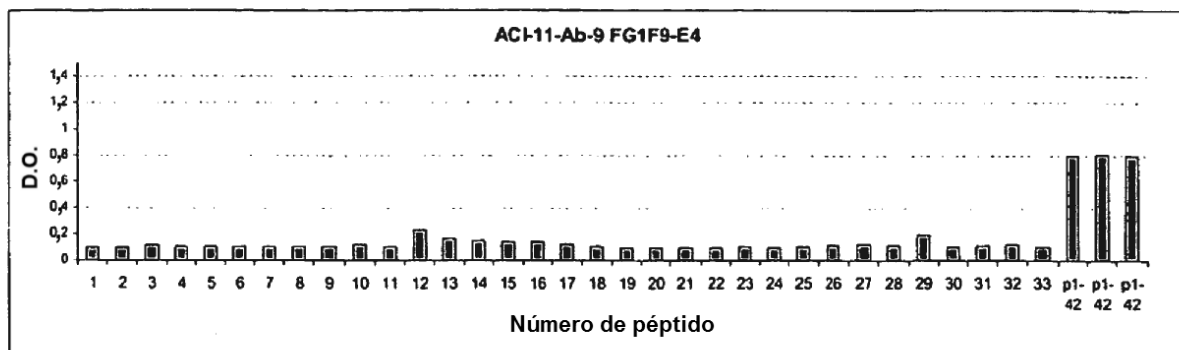


Figura 8.

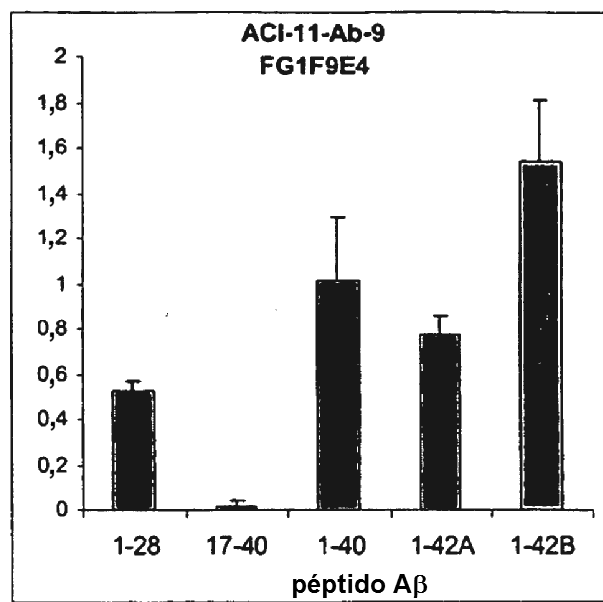


Figura 9.

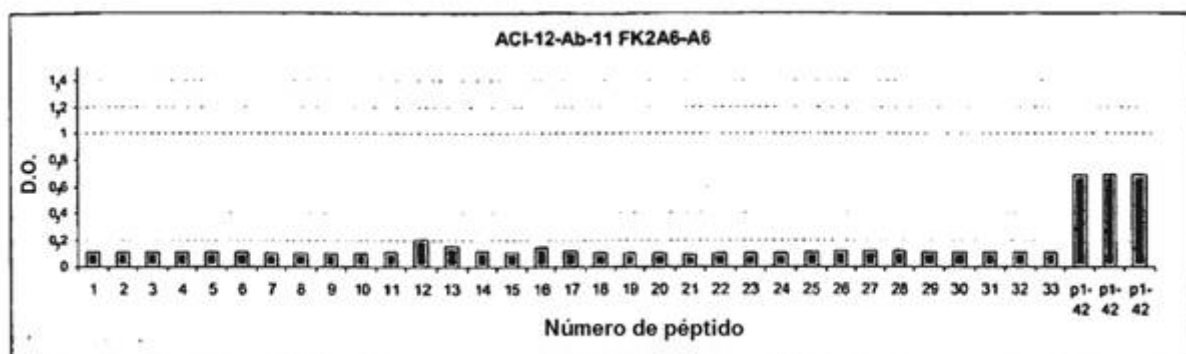


Figura 10.

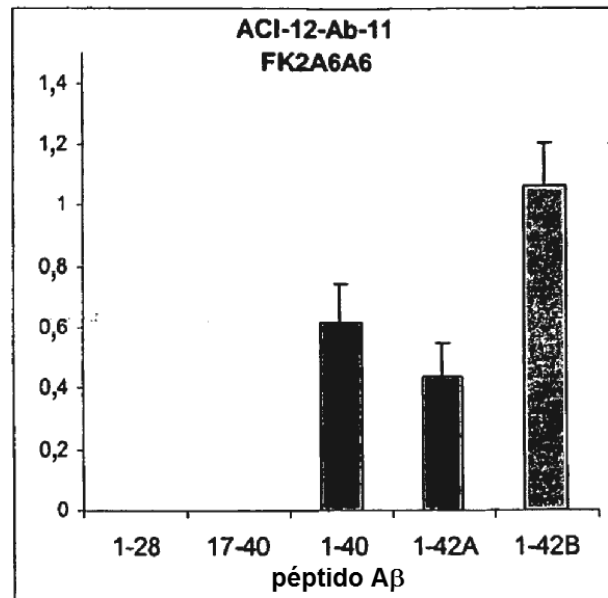


Figura 11.

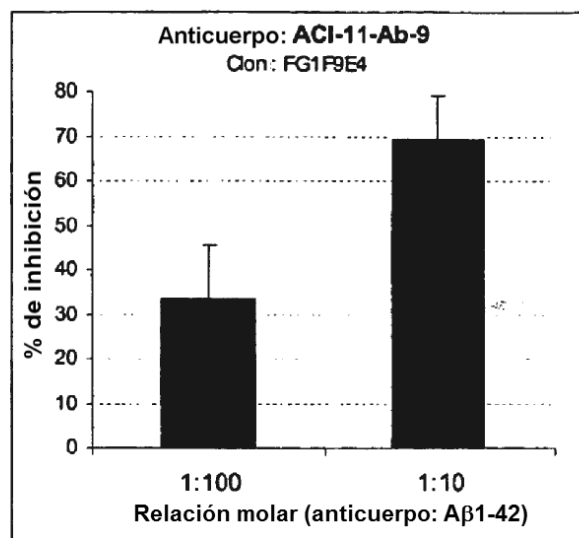


Figura 12.

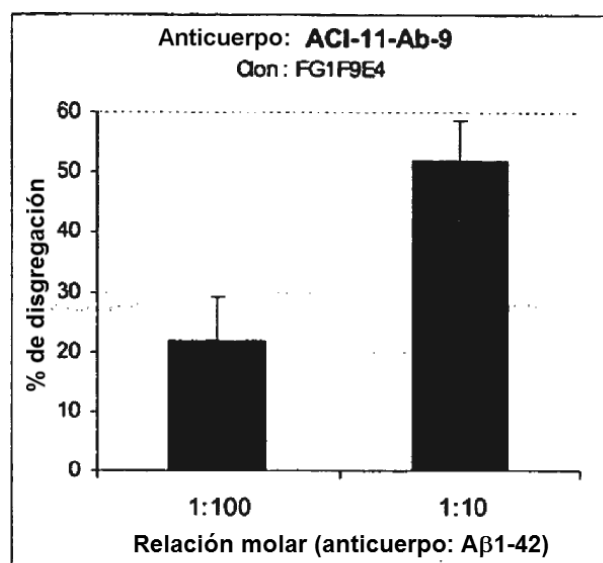


Figura 13.

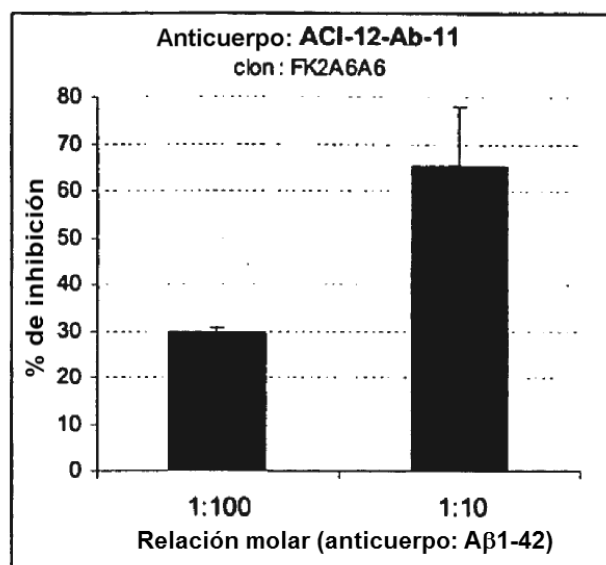


Figura 14.

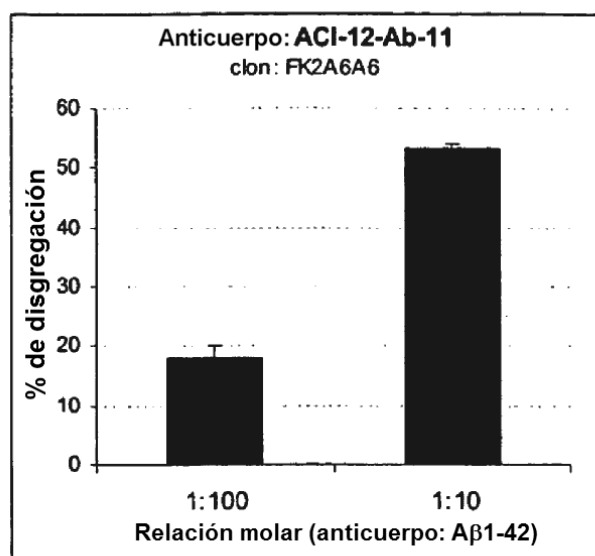
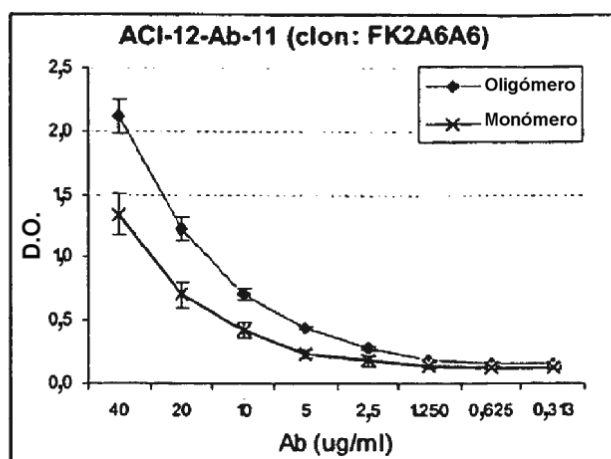


Figura 15.

A



B

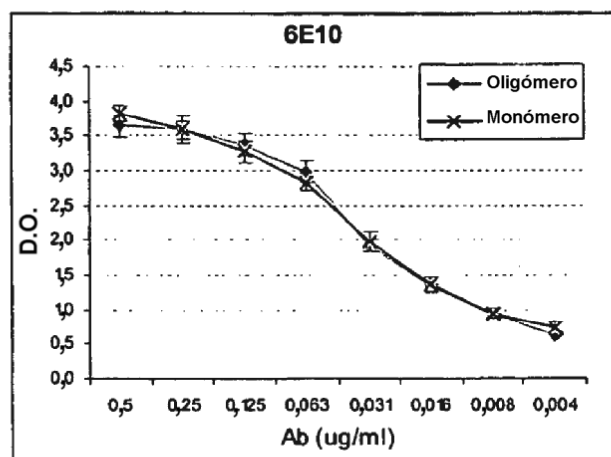


Figura 16.

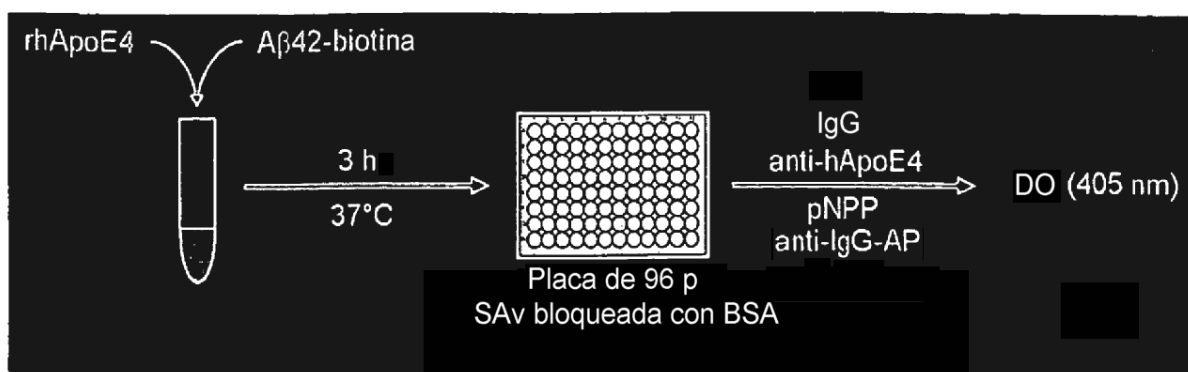


Figura 17.

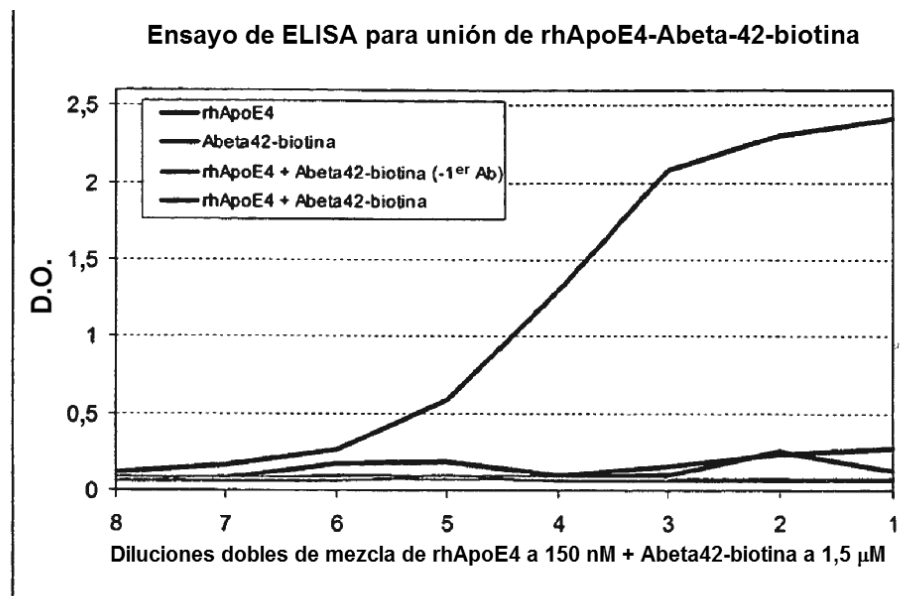


Figura 18.

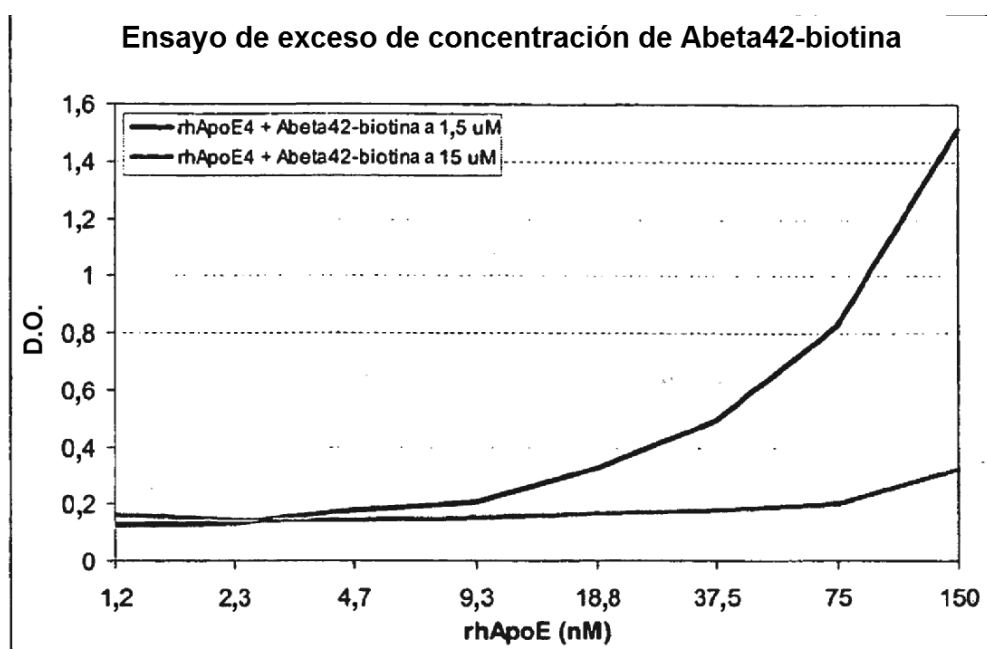


Figura 19.

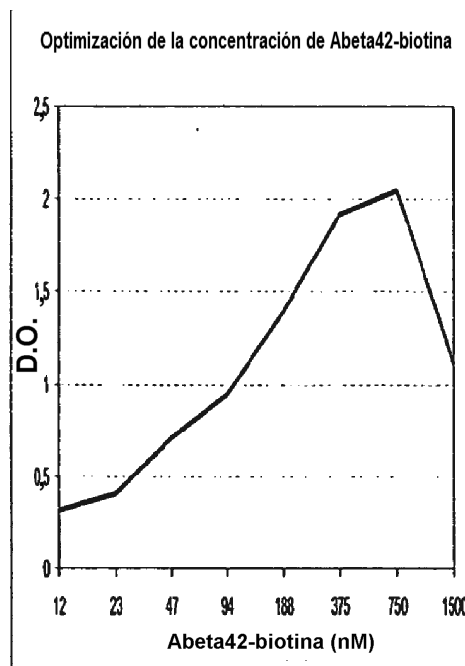


Figura 20.