(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 454 253**

(51) Int. CI.:

A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2006 E 10196705 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014 EP 2361638**

(54) Título: **Anticuerpos monoclonales específicos de beta A 1-42 con propiedades terapéuticas**

(30) Prioridad:

12.12.2005 EP 05027092
14.07.2006 EP 06014729
02.10.2006 EP 06020766

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.04.2014

(73) Titular/es:

AC IMMUNE S.A. (100.0%)
EPFL-PSE Building B
1015 Lausanne, CH

(72) Inventor/es:

GREFERATH, RUTH;
HICKMAN, DAVID;
MUHS, ANDREAS;
PFEIFER, ANDREA y
NICOLAU, CLAUDE

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales específicos de beta A 1-42 con propiedades terapéuticas

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para el uso terapéutico y de diagnóstico en el tratamiento de enfermedades y trastornos que son causados por, o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis, un grupo de trastornos y anomalías asociados con la proteína amiloide tales como la enfermedad de Alzheimer.

La amiloidosis no es un fenómeno patológico único, sino más bien un grupo diverso de procesos de enfermedad progresivos que se caracteriza por depósitos en el tejido extracelular de una proteína de tipo almidón, cérea denominada amiloide, que se acumula en uno o más órganos o sistemas del organismo. A medida que los depósitos de amiloide se acumulan, empiezan a interferir en el funcionamiento normal del órgano o sistema del organismo. Existen al menos 15 tipos diferentes de amiloidosis. Las formas principales son la amiloidosis primaria sin antecedente conocidos, la amiloidosis secundaria siguiente a alguna otra afección, y la amiloidosis hereditaria.

La amiloidosis secundaria se produce en personas que tienen una infección o una enfermedad inflamatoria crónicas, tales como tuberculosis, una infección bacteriana denominada Fiebre mediterránea familiar, infecciones de los huesos (osteomielitis), artritis reumatoide, inflamación del intestino delgado (ileítis granulomatosa), enfermedad de Hodgkin y lepra .

Los depósitos de amiloide contienen típicamente tres componentes. Las fibrillas de proteína amiloide, que representan aproximadamente 90% del material amiloide, comprenden uno de varios tipos diferentes de proteínas. Estas proteínas son capaces de plegarse en las denominadas fibrillas en lámina "beta-plegada", una configuración de proteína única que muestra sitios de unión para el rojo Congo que da como resultado las propiedades de tinción únicas de la proteína amiloide. Además, los depósitos de amiloide están estrechamente asociados con el componente amiloide P (pentagonal) (AP), una glicoproteína relacionada con amiloide P de suero normal (SAP), y con glicosaminoglicanos sulfatados (GAG), hidratos de carbono complejos de tejido conectivo.

Muchas enfermedades de envejecimiento se basan en o están asociadas con las proteínas de tipo amiloide y se caracterizan, en parte, por la acumulación de depósitos extracelulares de material amiloide o de tipo amiloide que contribuyen a la patogénesis, así como al progreso de la enfermedad.

Estas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), incluyendo enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Holandés); el complejo de Parkinson-demencia de Guam. Otras enfermedades que se basan en o están asociadas con las proteínas de tipo amiloide son la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Creutzfeld Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con el VIH, la ELA (esclerosis lateral amiotrófica), la miositis por cuerpos de inclusión (MCI), la diabetes de inicio en la edad adulta; la amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluyendo la degeneración macular.

Aunque la patogenia de estas enfermedades puede ser diversa, sus depósitos característicos a menudo contienen muchos componentes moleculares compartidos. En un grado significativo, esto puede ser atribuible a la activación local de las rutas de pro-inflamatorias que conducen de ese modo al depósito simultáneo de componentes activados del complemento, reaccionantes en fase aguda, moduladores inmunitarios, y otros mediadores de la inflamación (McGeer et al., 1994).

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurológico que se piensa principalmente que está causado por placas amiloides, una acumulación de depósito anómalo de proteínas en el cerebro. El tipo más frecuente de amiloide encontrado en el cerebro de los individuos afectados se compone principalmente de fibrillas Aβ. La evidencia científica demuestra que un aumento en la producción y acumulación de la proteína beta-amiloide en la placas conduce a la muerte de las células nerviosas, lo que contribuye al desarrollo y la progresión de la EA. La pérdida de células nerviosas en zonas estratégicas del cerebro, a su vez, ocasiona una reducción en los neurotransmisores y el deterioro de la memoria. Las proteínas principalmente responsables de la acumulación de placa incluyen la proteína precursora amiloide (PPA) y dos presenilinas (presenilina I y presenilina II). La escisión sucesiva de la proteína precursora amiloide (PPA), que es expresada constitutivamente y catabolizada en la mayoría de las células, por las enzimas β y γ secretasa, conduce a la liberación de un péptido Aβ de 39 a 43 aminoácidos. La degradación de las PPA probablemente aumenta su propensión a agregarse en placas. Es especialmente el fragmento Aβ (1-42) el que tiene una alta propensión a acumular agregados debido a dos residuos de aminoácidos muy hidrófobos en su extremo C. Por lo tanto, se cree que el fragmento Aβ (1-42) está principalmente involucrado y es responsable del inicio de la formación de la placa neurítica en la EA y tiene, por lo tanto, un alto potencial patológico. Por tanto, existe una necesidad de anticuerpos específicos que pueden dirigirse a y difundir la formación de la placa amiloide.

Los síntomas de la EA se manifiestan lentamente y el primer síntoma puede ser solamente un leve mala memoria. En esta etapa, los individuos pueden olvidar acontecimientos recientes, actividades, los nombres de personas o cosas conocidas y pueden no ser capaces de resolver problemas matemáticos sencillos. A medida que la enfermedad avanza, los síntomas son percibidos más fácilmente y se convierten lo suficientemente graves como para hacer que la persona con EA o sus familiares busquen ayuda médica. Los síntomas de la EA en la fase media incluyen el olvido cómo realizar tareas simples, tales como el aseo, y problemas desarrollados con el habla, la comprensión, la lectura o la escritura. Los pacientes con EA en fase tardía pueden volverse ansiosos o agresivos, pueden alejarse del hogar y, finalmente, necesitar atención total.

En la actualidad, la única manera definitiva para diagnosticar la EA consiste en identificar placas y ovillos en el tejido cerebral de una autopsia después de la muerte del individuo. Por lo tanto, los médicos solamente pueden realizar un diagnóstico de una EA "posible" o "probable" mientras la persona todavía está viva. Utilizando los métodos actuales, los médicos pueden diagnosticar la EA correctamente hasta el 90 por ciento de las veces utilizando de varias herramientas para diagnosticar la EA "probable". Los médicos realizan preguntas sobre la salud general de la persona, los problemas médicos anteriores, y el historial de cualquiera de las dificultades de la persona para llevar a cabo las actividades diarias. Las pruebas conductuales de memoria, resolución de problemas, atención, recuento y lenguaje proprocionan información sobre la degeneración cognitiva y pruebas médicas tales como análisis de sangre, orina o líquido cefalorraquídeo, y escáneres cerebrales pueden proporcionar cierta información adicional.

La gestión de la EA consiste en tratamientos basados en medicación y no basados en medicación. Los tratamientos dirigidos a cambiar el curso de la enfermedad subyacente (retrasar o revertir la progresión) hasta ahora no han tenido éxito en gran medida. Se ha demostrado que los medicamentos que restauran el déficit (defecto), o el mal funcionamiento, en los mensajeros químicos de las células nerviosas (neurotransmisores), en particular inhibidores de colinesterasa (ICE) tales como la tacrina y la rivastigmina, mejoran los síntomas. Los ICE impiden la degradación enzimática de los neurotransmisores aumentando de este modo la cantidad de mensajeros químicos disponibles para transmitir las señales nerviosas en el cerebro.

Para algunas personas en las etapas inicial e intermedia de la enfermedad, los medicamentos tacrina (COGNEX®, Morris Plains, NJ), donepezilo (Aricept®, Tokyo, JP), rivastigmina (Exelon®, East Hanover, NJ) o galantamina (Reminyl®, New Brunswick, NJ) pueden ayudar a evitar que algunos de los síntomas empeoren durante un tiempo limitado. Otro medicamento, la memantina (Namenda®, Nueva York, Nueva York), ha sido aprobado para el tratamiento de la EA moderada a grave. También están disponibles medicaciones para hacer frente a las manifestaciones psiquiátricas de la EA. Asimismo, algunos medicamentos pueden ayudar a controlar los síntomas conductuales de la EA tales como el insomnio, la agitación, la deambulación, la ansiedad y la depresión. El tratamiento de estos síntomas a menudo hace sentirse más cómodos a los pacientes y hace más fácil su cuidado para los cuidadores. Desafortunadamente, a pesar de los avances terapéuticos significativos que demuestran que esta clase de agentes es siempre mejor que un placebo, la enfermedad sigue avanzando, y el efecto medio sobre el funcionamiento mental solamente ha sido modesto. Muchos de los fármacos utilizados en la medicación para la EA tales como, por ejemplo, los ICE también tienen efectos secundarios que incluyen disfunción gastrointestinal, toxicidad hepática y pérdida de peso.

Otras enfermedades que se basan en o están asociadas con la acumulación y el depósito de proteína de tipo amiloide son el deterioro cognitivo leve, las demencia por cuerpos de Lewy (LBD), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la miositis por cuerpos de inclusión (MCI) y la degeneración macular, en particular la degeneración macular asociada a la edad (DMAE).

Deterioro cognitivo leve (DCL) es un término general más comúnmente definido como un trastorno de la memoria sutil pero medible. Una persona con DCL experimenta problemas de memoria mayores de los que normalmente se esperarían con el envejecimiento, pero no muestra otros síntomas de demencia, como deterioro del juicio o el razonamiento. El DCL es una afección que refleja con frecuencia una fase preclínica de la EA.

Se cree que el depósito de β-amiloide dentro de la corteza entorrinal (CE) juega un papel clave en el desarrollo del deterioro cognitivo leve (DCL) en los ancianos. Esto está en consonancia con la observación de que los niveles de CSF-A Aβ (1-42) disminuyen significativamente una vez que la EA se vuelve clínicamente evidente. En contraste con CSF-Aβ (1-42) los niveles CSF-tau incrementan significativamente en la fase de DCL, y estos valores siguen siendo elevados a partir de entonces, lo que indica que el aumento de los niveles de CSF-tau puede ayudar en la detección de sujetos con DCL que se prevé que desarrollen EA.

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

Los cuerpos de Lewy se forman a partir de proteínas neurofilamentosas fosforiladas y no fosforiladas; contienen la proteína sináptica alfa-sinucleína, así como ubicuitina, que está implicada en la eliminación de las proteínas dañadas o anormales. Además de los cuerpos de Lewy, también pueden estar presentes neuritas de Lewy, que son cuerpos de inclusión en los procesos celulares de las células nerviosas. Las placas amiloides se pueden formar en los cerebros de pacientes aquejados de DLB, sin embargo, tienden a tener un menor número que el observado en pacientes con enfermedad de Aizheimer. Los ovillos neurofibrilares, el otro rasgo distintivo micropatológico de la EA, no son una característica principal de la DLB, pero con frecuencia se encuentran presentes además de las placas amiloides.

Esclerosis lateral amiotrófica (ELA) se caracteriza por la degeneración de las neuronas motoras superiores e inferiores. En algunos pacientes con ELA, pueden estar presentes demencia o afasia (D-ELA). La demencia es muy comúnmente una demencia frontotemporal (DFT), y muchos de estos casos tienen inclusiones positivas para ubicuitina, negativas para tau en las neuronas del giro dentado y las capas superficiales de los lóbulos frontales y temporales.

La miositis por cuerpos de inclusión (MCI) es una enfermedad incapacitante que se encuentra normalmente en personas mayores de 50 años de edad, en la que las fibras musculares desarrollan inflamación y comienzan a atrofiarse, - pero en la que el cerebro está a salvo y los pacientes mantienen todo su intelecto. Se ha encontrado que dos enzimas que intervienen en la producción de la proteína β-amiloide aumentan en el interior de las células musculares de los pacientes con esta enfermedad muscular progresiva, muy común de las personas mayores, en la que también se incrementa el β-amiloide.

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

La degeneración macular es una enfermedad ocular común que provoca el deterioro de la mácula, que es la zona central de la retina (el tejido fino como el papel en la parte posterior del ojo donde las células sensibles a la luz envían señales visuales al cerebro). La visión nítidas, claras, 'recta' es procesada por la mácula. La lesión de la mácula da como resultado el desarrollo de puntos ciegos y visión borrosa o distorsionada. La degeneración macular asociada con la edad (DMAE) es una causa principal de discapacidad visual en los Estados Unidos y para las personas mayores de 65 años, es la principal causa de ceguera legal entre los caucásicos. Aproximadamente 1,8 millones de estadounidenses de 40 años y más tienen DMAE avanzada, y otros 7,3 millones de personas con DMAE intermedia tienen un riesgo sustancial de pérdida de la visión. El gobierno estima que en 2020 habrá 2,9 millones de personas con DMAE avanzada. Las víctimas de DMAE a menudo se sorprenden y frustran al conocer qué poco se sabe sobre las causas y el tratamiento de esta afección de ceguera.

Hay dos formas de degeneración macular: la degeneración macular seca y la degeneración macular húmeda. La forma seca, en la que las células de la mácula comienzan lentamente a romperse, se diagnostica en 85 por ciento de los casos de degeneración macular. Ambos ojos resultan normalmente afectados por la DMAE seca, aunque un ojo puede perder la visión mientras que el otro ojo permanece sin afectar. Las drusas, que son depósitos de color amarillo debajo de la retina, son los primeros signos comunes de la DMAE seca. El riesgo de desarrollar DMAE seca o DMAE húmeda avanzadas aumenta a medida que aumenta número o tamaño de las drusas. Es posible que la DMAE seca avance y ocasione pérdida de visión sin convertirse en la forma húmeda de la enfermedad, sin embargo, también es posible que la DMAE seca en fase temprana se convierte de repente en la forma húmeda.

La forma húmeda, aunque solamente representa el 15 por ciento de los casos, da como resultado 90 por ciento de las cegueras, y se considera DMAE avanzada (no existe una fase temprana o intermedia de la DMAE húmeda). La DMAE húmeda siempre está precedida por la forma seca de la enfermedad. A medida que la forma seca empeora, algunas personas empiezan a tener vasos sanguíneos anormales que crecen detrás de la mácula. Estos vasos son muy frágiles y se producirán pérdidas de líquido y sangre (de ahí la degeneración macular "húmeda"), causando un daño rápido a la mácula.

La forma seca de la DMAE ocasionará inicialmente a menudo una visión ligeramente borrosa. El centro de la visión en particular, puede llegar a ser borrosa a continuación y esta región aumenta de tamaño a medida que la enfermedad progresa. Pueden no observarse síntomas si solamente está afectado un ojo. En la DMAE húmeda, las líneas rectas pueden parecer onduladas y se puede producir rápidamente la pérdida de la visión central.

El diagnóstico de la degeneración macular implica típicamente un examen con dilatación del ojo, una prueba de agudeza visual, y una revisión del fondo de ojo usando un procedimiento llamado fondoscopia para ayudar a diagnosticar la DMAE, y - si se sospecha que hay DMAE húmeda - también puede llevarse a cabo una angiografía con fluoresceína. Si la DMAE seca alcanza las fases avanzadas, no existe ningún tratamiento actual para prevenir la pérdida de visión. Sin embargo, una fórmula de alta dosis específica de antioxidantes y cinc puede retrasar o prevenir que la DMAE intermedia progrese a la fase avanzada. El Macugen® (inyección de pegaptanib sódico), la fotocoagulación con láser y la terapia fotodinámica pueden controlar el crecimiento anormal de los vasos sanguíneos y sangrado en la mácula, lo que resulta útil para algunas personas que tienen DMAE húmeda; sin embargo, la visión

que ya se ha perdido no será restaurada por medio de estas técnicas. Si la visión ya se ha perdido, existen ayudas de baja visión que puede ayudar a mejorar la calidad de vida.

Uno de los primeros signos de degeneración macular relacionada con la edad (DMAE) es la acumulación de depósitos extracelulares conocidos como drusas entre la lámina basal del epitelio pigmentario de la retina (EPR) y la membrana de Bruch (MB). 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 los estudios de exploración de factores ambientales, genéticos y dietéticos que pueden contribuir a la DMAE. También se están explorando nuevas estrategias de tratamiento, incluyendo los trasplantes de células de la retina, los fármacos que eviten o ralenticen el progreso de la enfermedad, la terapia de radiación, las terapias génicas, un chip informático implantado en la retina que puede ayudar a estimular la visión y agentes que impidan el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos debajo de la mácula.

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

Lo que se necesita son métodos y composiciones eficaces para la generación de anticuerpos altamente específicos y altamente eficaces, lo cual es un requisito previo si los anticuerpos deben ser proporcionados en una forma de dosificación oral. Preferiblemente, tales anticuerpos podrían reconocer epítopos específicos sobre diversos antígenos tales como la proteína amiloide.

Lo que también se necesita, por lo tanto, son composiciones y métodos eficaces para abordar las complicaciones asociadas con las enfermedades y trastornos que están causados por, o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide incluyendo la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad incluyendo, pero no limitados a, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), incluyendo enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); el complejo de Parklnson-demencia de Guam, así como otras enfermedades que se basan en o están asociadas con las proteínas de tipo amiloide, tales como la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (MCI), diabetes de Inicio en la edad adulta, amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluyendo la degeneración macular. En particular, lo que se necesita 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 de péptido amiloide o de tipo amiloide.

Se ha demostrado que los anticuerpos anti-amiloide provocados por la inoculación de $A\beta_{1-42}$ mezclado con coadyuvante completo o incompleto de Freund son capaces de reducir la carga amiloide en ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer humana (Schenk et al., 1999).

También se ha demostrado que la inoculación intraperitoneal de $A\beta_{1-16}$ tetrapalmitoilado reconstituido en liposomas en ratones transgénicos NORBA provocaron títulos significativos de anticuerpos anti-amiloide, es capaz de solubilizar fibras y placas de amiloide *in vitro* e *in vivo*. (Nicolau et al., 2002).

El documento US 2003/108551 A1 (Nicolau et al.) ilustra anticuerpos monoclonales producidos contra agregados de Aβ1-42 palmitoilado, cuyos anticuerpos solubilizan las fibras de Aβ1-42 como se determina por medio del análisis de Th-T. También se describen hibridomas que producen dichos anticuerpos. Nicolau et al. también ilustran el uso de dichos anticuerpos para el tratamiento de enfermedades asociadas con amiloide como la enfermedad de Alzheimer.

Otro artículo publicado por Hanan et al. (1996) abordó la cuestión de si los anticuerpos específicos de amiloide podrían inhibir la agregación del péptido beta-amiloide. Aquí, se describieron tres anticuerpos monoclonales que se originaron contra el péptido Ab1-28, que tiene efectos inhibidores de la agregación de Ab.

El documento WO 2007/064972 A2 (Abbott) describe dos anticuerpos aislados que tienen una unión preferente por los globulómeros de A beta (1-42) en comparación con los monómeros o las fibrillas. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal. Adicionalmente, se describe un método para diagnosticar, tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer en un paciente.

Un posible mecanismo por medio del cual se producía la disolución de placas y fibras amiloides fue sugerido por primera vez por Bard et al., (2000), que avanzó la conclusión, en base a sus datos, de que los anticuerpos opsonizaban las placas, que a continuación eran destruidas por los macrófagos de la microglia. De Mattos et al., (2001) indicaron que un MAb dirigido contra el dominio central del β-amiloide era capaz de unirse y secuestrar completamente el amiloide del plasma. Ellos argumentaron que la presencia de estos mAb en circulación desplazaba el equilibrio de Aβ entre el cerebro y el plasma, lo que favorece el aclaramiento periférico y catabolismo en lugar del depósito en el cerebro.

La presente invención proporciona nuevos métodos y composiciones que comprenden anticuerpos altamente específicos y altamente eficaces que tiene la capacidad de reconocer y unirse específicamente a epítopos específicos de una gama de antígenos β-amiloides. Los anticuerpos activados por la enseñanza de la presente invención son particularmente útiles para el tratamiento de enfermedades y trastornos que están causados por, o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placa amiloide incluyendo la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad incluyendo, pero no limitados a, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), incluyendo enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); complejo de Parkinson-demencia de Guam, así como otras enfermedades que están basadas en o asociadas con proteínas de tipo amiloide, tales como la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; la enfermedad de Creutzfeld Jacob, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis tipo holandés, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con el VIH, la ELA (esclerosis lateral amiotrófica), la miositis por cuerpos de inclusión (MCI), la Diabetes de Inicio en la Edad Adulta, la amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluyendo la degeneración macular, por nombrar solamente algunos.

Por otra parte, la presente invención proporciona nuevos métodos y composiciones para conservar o incrementar la capacidad de memoria cognitiva en un mamífero que muestra una enfermedad o afección asociada con el amiloide, que comprende administrar a un animal, concretamente un mamífero, más concretamente un ser humano que necesite tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención.

Breve descripción de las figuras y las secuencias

Figura 1: Péptidos derivados de secuencias de Aβ 1-15, 1-16 y 1-16(Δ14), 22-35, y 29-40

Figura 2: Unión del anticuerpo monoclonal MacI-01-Ab7 C2 a especies de amiloide en transferencia Western y transferencia puntual

Figura 3: Unión del anticuerpo monoclonal MacI-01-Ab7 C2 a fibras amiloides mediante microscopía electrónica de transmisión.

Figura 4: Resultados de experimento cabeza-cabeza entre el análisis fluorescente Th-T y la RMN de estado sólido del péptido β-amiloide 1-42 marcado con Tyr10 y Val12 U-C^{13}

SEC ID NO: 1: Péptido antigénico $A\beta_{1-15}$

SEC ID NO: 2: Péptido antigénico $A\beta_{1-16}$

SEC ID NO: 3: Péptido antigénico $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$

SEC ID NO: 4: Péptido antigénico $A\beta_{22-35}$

SEC ID NO: 5: Péptido antigénico $A\beta_{29-40}$

SEC ID NO: 6: Péptido antigénico $A\beta_{1-17}$

SEC ID NO: 7: Secuencia de aminoácidos de la Región Variable de la Cadena Ligera C2 de Ratón

SEC ID NO: 8: Secuencia de aminoácidos de la Región Variable de la Cadena Pesada C2 de Ratón

SEC ID NO: 9: Secuencia de nucleótidos de la Región Variable de la Cadena Ligera C2 de Ratón

SEC ID NO: 10: Secuencia de nucleótidos de la Región Variable de la Cadena Ligera C2 de Ratón incluyendo secuencias señal

SEC ID NO: 11: Secuencia de nucleótidos de la Región Variable de la Cadena Pesada C2 de Ratón

SEC ID NO: 12: Secuencia de nucleótidos de la Región Variable de la Cadena Pesada C2 de Ratón incluyendo secuencias de señal

SEC ID NO: 13-20: Variantes de la secuencia de aminoácidos de la región epitópica del péptido Aβ

SEC ID NO: 21: Secuencia de aminoácidos de la Cadena Ligera C2 de Ratón

SEC ID NO: 22: Secuencia de aminoácidos de la Cadena Pesada C2 de Ratón

La presente invención hace uso de presentaciones de antígenos que dan como resultado la exposición mejorada y la estabilización de una conformación preferida de antígeno, que finalmente da como resultado anticuerpos con propiedades únicas.

La presente invención se refiere a un anticuerpo o una parte funcional del mismo, capaz de reconocer y unirse a un epítopo específico de beta amiloide, en donde dicho anticuerpo o parte funcional del mismo comprende un fragmento de unión al epítopo de un anticuerpo monoclonal obtenible a partir de la línea celular de hibridoma FP 12H3-C2, depositada el 1 de Diciembre de 2005, como DSM ACC2750.

En particular, dicho anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo son producidos por la línea celular de hibridoma FP 12H3-C2, depositada el 1 de Diciembre de 2005, como DSM ACC2750.

En una realización específica de la presente invención, el anticuerpo de acuerdo con la invención o una parte funcional del mismo, es un anticuerpo monoclonal, o un anticuerpo quimérico.

En particular, se proporciona un anticuerpo humanizado, o una porción funcional del mismo, cuyo anticuerpo o porción funcional del mismo comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo monoclonal obtenible a partir de la línea celular de hibridoma FP 12H3-C2, depositada el 1 de Diciembre de 2005, como DSM ACC2750.

La presente invención se refiere adicionalmente a un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo o una porción funcional del mismo de acuerdo con la invención.

También están comprendidas por la presente invención una línea celular, en particular una línea de células de hibridoma, que produce un anticuerpo o porción funcional del mismo de acuerdo con la invención.

En una realización específica de la presente invención, dicha línea celular es la línea celular de hibridoma FP 12H3-C2, depositada el 1 de Diciembre de 2005, como DSM ACC2750.

También se proporciona mediante la presente invención un método para producir un anticuerpo o porción funcional del mismo de acuerdo con la invención, que comprende cultivar la línea celular, en particular, la línea celular de hibridoma FP 12H3-C2, depositada el 1 de Diciembre de 2005, como DSM ACC2750.

En una realización específica de la presente invención un anticuerpo o una porción funcional del mismo son proporcionados de acuerdo con la invención y producidos mediante dicho método.

Una realización de la invención se refiere a una composición que comprende el anticuerpo o porción funcional del mismo de acuerdo con la invención, y que comprende opcionalmente además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización de la presente invención se proporciona la composición para su uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos que están causados por, o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis.

En particular, la composición de acuerdo con la invención es para su uso en:

(a) la reducción de la carga de placa o la reducción de la cantidad de placas en el cerebro de un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con el amiloide; o

(b) la reducción de la cantidad de placas en el cerebro de un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con el amiloide; o

(c) la disminución de la cantidad total de Aβ soluble en el cerebro de un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con el amiloide; o

(d) la prevención, el tratamiento o el alivio de los efectos de la amiloidosis, incluyendo, pero no limitados a:

(i) trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA);

(ii) enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), y complejo de Parkinson-demencia de Guam; y

(iii) parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (MCI), Diabetes de Inicio en la Edad Adulta, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y degeneración macular; o

(e) retención o aumento de la capacidad de memoria cognitiva en un mamífero que presenta una enfermedad o afección asociada con el amiloide.

La presente invención se refiere adicionalmente a una mezcla que comprende un anticuerpo o porción funcional del mismo de acuerdo con la invención y, opcionalmente, una sustancia biológicamente activa adicional utilizada en la medicación de enfermedades y trastornos que están causados por, o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide y/o un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

En otra realización de la presente invención se proporciona el uso de un anticuerpo y/o una porción funcional del mismo de acuerdo con la invención o una composición o una mezcla de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para tratar o aliviar los efectos de la amiloidosis incluyendo, pero no limitados a:

(a) trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA);

(b) enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), y complejo de Parkinson-demencia de Guam; y

(c) parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (MCI), Diabetes de Inicio en la Edad Adulta, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y degeneración macular.

La presente invención se refiere adicionalmente a un método para la preparación de un anticuerpo o porción funcional del mismo de acuerdo con la invención o una composición o una mezcla de acuerdo con la invención, para su uso en el tratamiento o alivio de los efectos de la amiloidosis, incluyendo, pero no limitados a:

(a) trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA);

(b) enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), y complejo de Parkinson-demencia de Guam; y

(c) parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (MCI), Diabetes de Inicio en la Edad Adulta, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y degeneración macular.

En una realización, la presente invención proporciona un método de diagnóstico de una enfermedad o afección asociada con el amiloide en un paciente, que comprende detectar la unión inmunoespecífica de un anticuerpo o un fragmento activo del mismo a un epítopo de la proteína amiloide en una muestra que incluye las etapas de:

a) poner en contacto la muestra que se sospecha que contiene el antígeno amiloide con un anticuerpo o porción funcional del mismo de acuerdo con la invención, cuyo anticuerpo o porción funcional del mismo se unen a un epítopo de la proteína amiloide;

b) permitir que el anticuerpo o porción funcional del mismo se unan al antígeno amiloide para formar un complejo inmunológico;

c) detectar la formación del complejo inmunológico; y

d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia del antígeno amiloide en la muestra.

La presente invención proporciona adicionalmente un método para diagnosticar una predisposición a una enfermedad o afección asociada con el amiloide en un paciente que comprende detectar la unión inmunoespecífica de un anticuerpo o un fragmento activo del mismo a un epítopo de la proteína amiloide en una muestra que incluye las etapas de :

a) poner en contacto la muestra que se sospecha que contiene el antígeno amiloide con un anticuerpo o porción funcional del mismo de acuerdo con la invención, cuyo anticuerpo o porción funcional del mismo se unen a un epítopo de la proteína amiloide;

b) permitir que el anticuerpo o porción funcional del mismo se unan al 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 del antígeno amiloide en la muestra; y

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

en donde un aumento en la cantidad de dicho agregado en comparación con un valor de control normal indica que dicho paciente tiene riesgo de desarrollar una enfermedad o afección asociada con el amiloide.

En una realización específica la presente invención se refiere a un método para el seguimiento de la enfermedad residual mínima en un paciente después del tratamiento con un anticuerpo o porción funcional del mismo o una composición de acuerdo con la invención, en donde dicho método comprende:

a) poner en contacto la muestra que se sospecha que contiene el antígeno amiloide con un anticuerpo o porción funcional del mismo de acuerdo con la invención, cuyo anticuerpo o porción funcional del mismo se unen a un epítopo de la proteína amiloide;

b) permitir que el anticuerpo o porción funcional del mismo se unan al 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 del antígeno amiloide en la muestra; y

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

en donde un aumento en la cantidad de dicho agregado en comparación con un valor de control normal indica que dicho paciente todavía padece una enfermedad residual mínima.

En una realización de la presente invención se proporciona un método para predecir la capacidad de respuesta de un paciente que está siendo tratado con un anticuerpo o porción funcional del mismo o una composición de acuerdo con la invención:

a) poniendo en contacto la muestra que se sospecha que contiene el antígeno amiloide con un anticuerpo o porción funcional del mismo de acuerdo con la invención, cuyo anticuerpo o porción funcional del mismo se unen a un epítopo de la proteína amiloide;

b) permitiendo que el anticuerpo o porción funcional del mismo se unan al antígeno amiloide para formar un complejo inmunológico;

c) detectando la formación del complejo inmunológico;

d) correlacionando la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia del antígeno amiloide en la muestra; y

e) comparando la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal,

en donde una disminución en la cantidad de dicho agregado indica que dicho paciente tiene un alto potencial de ser sensible al tratamiento.

En otra realización de la presente invención se proporciona un kit de ensayo para la detección y el diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas con el amiloide que comprenden un anticuerpo o porción funcional del mismo de acuerdo con la invención.

En un aspecto se describe un anticuerpo que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, o, más particularmente, un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, que se ha generado contra un constructo antigénico supramolecular que comprende un péptido antigénico correspondiente a la secuencia de aminoácidos del péptido β-amiloide, particularmente del péptido β-amiloide $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-16}$ y $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$, modificado con un radical hidrófobo tal como, por ejemplo, ácido palmítico o un radical hidrófilo tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o una combinación de ambos, en donde dichos radicales hidrófobo e hidrófilo, respectivamente, están unidos covalentemente a cada uno de los extremos del péptido antigénico a través de al menos uno, en particular uno o dos aminoácidos, tales como, por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisteína o cualquier otro aminoácido adecuado o análogo de aminoácido capaz de servir como un dispositivo de conexión para acoplar los radicales hidrófobo e hidrófilo al fragmento peptídico. Cuando se utiliza un PEG como radical hidrófilo, los extremos libres de PEG se unen covalentemente a la fosfatidiletanolamina o cualquier otro compuesto adecuado para funcionar como elemento de anclaje, por ejemplo, para insertar el constructo antigénico en la bicapa de un liposoma.

En la presente invención se describe adicionalmente un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo que reconocen la conformación nativa del amiloide ya que éste se une específicamente a oligómeros y fibras de amiloide, pero no a especies de amiloide no linealizadas.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, cuyo anticuerpo o fragmento se unen a un monómero de Aβ con una afinidad de unión de al menos aproximadamente 1×10^{-6} a al menos aproximadamente 1×10^{-8}, concretamente de al menos aproximadamente 1×10^{-6} a al menos aproximadamente 1×10^{-7}, más concretamente de al menos aproximadamente 1×10^{-7} a al menos aproximadamente 1×10^{-8}, incluso más concretamente de al menos aproximadamente 1×10^{-7} a al menos aproximadamente 4×10^{-7} pero, preferiblemente, no muestran ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora de amiloide (PPA).

En otro aspecto, se describe un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, cuyo anticuerpo o fragmento se unen a una fibra, fibrilla o filamento de Aβ con una afinidad de unión de al menos aproximadamente 1×10^{-7} a al menos aproximadamente 1×10^{-9}, concretamente de al menos aproximadamente 1×10^{-7} a al menos aproximadamente 1×10^{-8}, más concretamente de al menos aproximadamente 1×10^{-8} a al menos aproximadamente 1×10^{-9}, incluso más concretamente de al menos aproximadamente 1×10^{-8} a al menos aproximadamente 5×10^{-8}, pero, preferiblemente, no muestran ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora de amiloide (PPA).

En otro aspecto, el anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo como se ha descrito anteriormente en la presente memoria exhiben una afinidad de unión a una fibra, fibrilla o filamiento de Aβ que es al menos 5 veces, concretamente al menos 10 veces, más concretamente al menos 15 veces, mayor que la afinidad de unión a un monómero de Aβ.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria son capaces de inhibir, *in vitro* e *in vivo*, la agregación de péptidos monoméricos amiloidogénicos, específicamente péptidos monoméricos β-amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aβ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$, en fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular.

En un aspecto específico se describe un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo, tras la incubación simultánea con péptidos monoméricos amiloides, concretamente péptidos monoméricos β-amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aβ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$, inhibe la agregación de los monómeros Aβ en fibrillas poliméricas de alto peso molecular.

En un aspecto adicional, se describe un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo, tras la incubación simultánea, concretamente tras la incubación simultánea a una razón de concentración molar de hasta 1:100, más concretamente en una razón de concentración molar entre 1:30 y 1:100, pero especialmente a una razón de concentración molar de 1:100, con péptidos monoméricos amiloides, concretamente péptidos monoméricos β-amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aβ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$, inhibe la agregación de los monómeros Aβ en fibrillas poliméricas de alto peso molecular. En particular, dicha inhibición representa al menos 50%, concretamente al menos 65%, más concretamente al menos 75%, incluso más concretamente al menos 80%, pero especialmente al menos 85% - 90%, o más, en comparación con los respectivos monómeros de péptido amiloide incubados en el tampón (control).

En particular, la incubación simultánea del anticuerpo como se describe en la presente memoria con péptidos monoméricos de amiloide se lleva a cabo durante 24 horas a 60 horas, concretamente durante 30 horas a 50 horas, más concretamente durante 48 horas a una temperatura entre 28°C y 40°C, concretamente entre 32°C y 38°C, más concretamente a 37°C.

Adicionalmente se describe en la presente memoria un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo, tras la incubación simultánea durante 48 horas a 37°C a una razón de concentración molar de 1:100 con un péptido monomérico amiloide, específicamente un péptido monomérico β-amiloide tal como, por ejemplo, péptido monomérico Aβ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, 1-43 o, pero especialmente un péptido monomérico $A\beta_{1-42}$, es capaz de inhibir la agregación de los monómeros de amiloide, concretamente la agregación de péptidos monoméricos β-amiloide tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aβ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente del péptido monomérico $A\beta_{1-42}$ en fibrillas o filamentos poliméricos de alto peso molecular en al menos 85%, concretamente al menos 89% y más concretamente al menos 95% en comparación con los respectivos monómeros de péptidos amiloides incubados en tampón (control).

En un aspecto específico se describe un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, que muestran una alta especificidad por los péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$ pero no muestran esencialmente ninguna o muestran solamente una reactividad cruzada mínima con péptidos monoméricos $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, y/o $A\beta_{1-41}$, concretamente un anticuerpo, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo es hasta 100 veces, concretamente de 50 a 100 veces, más concretamente de 80 a 100 veces, pero especialmente 100 veces más sensible al péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ en comparación con $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$ y hasta 1000 veces, concretamente de 500 a 1000 veces, más concretamente de 800 a 1000 veces, pero especialmente 1000 veces más sensible al péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ en comparación con $A\beta_{1-38}$, y de este modo es capaz de inhibir, *in vitro* e *in vivo*, la agregación de péptidos monoméricos amiloidogénicos, pero especialmente de péptido amiloide $A\beta_{1-42}$.

En otro aspecto específico se describe un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, que tienen una alta sensibilidad de unión al péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ y son capaces de detectar fibras de $A\beta_{1-42}$ en una concentración tan baja como al menos 0,001 µg, pero concretamente en un intervalo de concentración entre 0,5 µg y 0,001 µg, más concretamente entre 0,1 µg y 0,001 µg, pero especialmente a una concentración de 0,001 µg.

En un aspecto muy específico se describe un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo es capaz de detectar fibras de $A\beta_{1-42}$ hasta una concentración mínima de 0,001 µg y fibras de $A\beta_{1-40}$ hasta una concentración mínima de 0,1 µg y fibras de $A\beta_{1-38}$ hasta una concentración mínima de 1 µg de cantidad de fibras.

La unión de los anticuerpos descrita anteriormente en la presente memoria a péptidos monoméricos amiloidogénicos, pero, concretamente, a la forma amiloide (1-42) conduce a la inhibición de la agregación de los péptidos amiloidogénicos monoméricos en fibrillas o filamentos de alto peso molecular. A través de la inhibición de la agregación de los péptidos monoméricos amiloidogénicos los anticuerpos descritos en la presente memoria son capaces de prevenir o ralentizar la formación de placas amiloides, concretamente la forma amiloide (1-42), que se sabe que se convierte en insoluble mediante el cambio de la conformación secundaria y que es la parte principal de las placas amiloides en el cerebro de animales o seres humanos enfermos.

El potencial de inhibición de la agregación del anticuerpo descrito en la presente memoria se puede determinar mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, concretamente por ultracentrifugación en gradiente de densidad seguido de un análisis de sedimentación SDS-PAGE en un gradiente preformado y/o mediante un análisis de fluorescencia con tioflavina T (Th-T).

Adicionalmente se describen anticuerpos que, tras la incubación simultánea con fibrillas o filamentos de amiloide polimérico de elevado peso molecular preformados formados por agregación de péptidos monoméricos amiloides, específicamente péptidos monoméricos β-amiloide tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aβ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$, son capaces de desagregar dichas fibrillas o filamentos de amiloide polimérico de alto peso molecular.

En otro aspecto, se describe un anticuerpo, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo, tras la incubación simultánea a una razón de concentración molar de hasta 1:100, más concretamente, a una razón de concentración molar entre 1:30 y 1:100, pero especialmente a una razón de concentración molar de 1:100, con fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptidos monoméricos amiloides, concretamente péptidos monoméricos β-amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aβ 1-

39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en lo menos 35%, concretamente al menos 40%, más concretamente al menos 50%, incluso más concretamente al menos 60%, pero especialmente al menos 70% o más.

En particular, el anticuerpo descrito en la presente memoria se incuba simultáneamente con fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados de amiloide durante 12 horas a 36 horas, concretamente durante 18 horas a 30 horas, más concretamente durante 24 horas a una temperatura entre 28°C y 40°C, concretamente entre 32°C y 38°C, más concretamente, a 37°C.

En un aspecto específico se describe un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo, tras la incubación simultánea durante 24 horas a 37°C a una razón de concentración molar de 1:100 con fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptidos monoméricos amiloides, concretamente péptidos monoméricos β-amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aβ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$, es capaz de desagregar dichas fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados en al menos 35%, concretamente en al menos 40%, más concretamente en al menos 50%, incluso más concretamente en al menos 60%, pero especialmente en al menos 70% o más en comparación con las respectivas fibrillas o filamentos poliméricos de amiloide preformados incubadas con un vehículo de control (amiloide solo) (control).

El potencial de desagregación del anticuerpo descrito en la presente memoria se puede determinar mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, concretamente mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad seguido de un análisis de sedimentación SDS-PAGE en un gradiente preformado y/o mediante análisis fluorescente con tioflavina T (Th-T).

Adicionalmente se describen anticuerpos o porciones funcionales de los mismos que son conformacionalmente sensibles.

En un aspecto adicional, se describe un anticuerpo, pero especialmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo, tras la incubación simultánea con fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptidos monoméricos amiloides, concretamente péptidos monoméricos β-amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aβ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$, es capaz de inducir una transición de la conformación de lámina β a una conformación en hélice α y/o de espiral al azar, pero concretamente una conformación de espiral al azar, incluso más concretamente una conformación de espiral al azar en una ubicación dada en la molécula, especialmente en el entorno de Val12 de la proteína Aβ, lo que conduce a un aumento de la conformación de espiral al azar a expensas de la conformación de lámina β y una solubilización mejorada de las fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados. En particular, la disminución de la conformación de lámina β asciende a al menos 30%, concretamente a al menos 35%, y más concretamente a al menos 40% y más en comparación con las respectivas fibrillas o filamentos poliméricos de amiloide preformados incubados en tampón (control).

En particular, el anticuerpo descrito en la presente memoria se incuba simultáneamente con fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados de amiloide durante 12 horas a 36 horas, concretamente durante 18 horas a 30 horas, más concretamente durante 24 horas a una temperatura entre 28°C y 40°C, concretamente entre 32°C y 38°C, más concretamente a 37°C.

En particular, se describe un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo, tras la incubación simultánea durante 24 horas a 37°C a una razón de concentración molar de 1:100 con fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptidos monoméricos amiloides, concretamente péptidos monoméricos β-amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aβ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$, es capaz de inducir una transición de la conformación de lámina β a una conformación en hélice α y/o de espiral al azar, pero concretamente una conformación de espiral al azar, incluso más concretamente una conformación de espiral al azar en una ubicación dada en la molécula, especialmente en el entorno de Val12 de la proteína Aβ, lo que conduce a un aumento de la conformación de espiral al azar a expensas de la conformación de lámina β, reduciéndose la última en al menos 30%, concretamente en al menos 35%, y más concretamente en al menos 40% y más en comparación con las respectivas fibrillas o filamentos poliméricos de amiloide preformados incubados en tampón (control).

El potencial del anticuerpo en la inducción de una transición conformacional se puede determinar por medio de cualquier método adecuado conocido en la técnica, concretamente mediante espectroscopía de RMN 13C en estado sólido, pero, concretamente, mediante la medición de las intensidades integrales de las conformaciones de Val 12 Cβ en el péptido Aβ, concretamente en los péptidos Aβ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente en el péptido monomérico $A\beta_{1-42}$.

A través de la desagregación de las fibrillas o filamentos poliméricos amiloidogénicos, los anticuerpos descritos 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 a un retraso o reversión de su progresión.

En consecuencia, se describe adicionalmente en la presente memoria un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo como se ha descrito antes en la presente memoria, cuyo anticuerpo es capaz de disminuir la cantidad total de Aβ en el cerebro de un animal, concretamente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección que conduce a un aumento de la concentración de Aβ en el cerebro.

En otro aspecto, se describe un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo como se ha descrito anteriormente en la presente memoria cuyo anticuerpo es capaz de desorganizar las placas disminuyendo de ese modo la carga de placa en el cerebro de un animal, concretamente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección que conduce a un aumento de la carga de placas en el cerebro. El anticuerpo descrito en la presente memoria incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo disminuyen la carga de placas en el cerebro en al menos 20%, concretamente en al menos 25%, más concretamente en al menos 30%, incluso más concretamente más de 30%.

En otro aspecto adicional se describe un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, cuyo anticuerpo es capaz de solubilizar las placas conduciendo a una reducción de la cantidad de placas en el cerebro de un animal, concretamente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección que conduce a un aumento de la carga de placas en el cerebro. Dicho anticuerpo, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo reduce la cantidad de placas en el cerebro en al menos 10%, concretamente en al menos 95%, más concretamente en al menos 20%.

Se debe entender que el anticuerpo descrito en la presente memoria puede presentar una, dos o más propiedades específicas descritas en la presente memoria antes en varias combinaciones.

Por ejemplo, en un aspecto se describen anticuerpos, pero especialmente se describen anticuerpos monoclonales, que incluyen cualquier anticuerpo equivalente funcionalmente o porciones funcionales del mismo, cuyos anticuerpos son bifuncionales ya que exhiben tanto una propiedad de inhibición de la agregación, como una propiedad de desagregación como se ha definido antes en la presente memoria, concretamente unidas a un alto grado de sensibilidad conformacional.

En otro aspecto más se describe un anticuerpo bifuncional que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, pero especialmente un anticuerpo monoclonal bifuncional que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo, tras la incubación simultánea con péptidos monoméricos amiloides, concretamente péptidos monoméricos β-amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aβ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$, inhibe la agregación de los monómeros Aβ en fibrillas o filamentos poliméricos de alto peso molecular y, además, tras la incubación simultánea con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptidos monoméricos amiloides, concretamente péptidos monoméricos β-amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aβ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados.

En un aspecto específico la incubación simultánea del anticuerpo bifuncional, tal como se describe en la presente memoria, pero especialmente del anticuerpo monoclonal bifuncional tal como se describe en la presente memoria con péptidos monoméricos amiloides y fibrillas o filamentos poliméricos de amiloide de alto peso molecular preformados, respectivamente, tiene lugar a una razón de concentración molar de hasta 1:100, concretamente a una razón entre 1:30 y 1:100, y más concretamente a una razón de 1:100.

En particular, la incubación simultánea del anticuerpo descrito en la presente memoria con péptidos monoméricos amiloides se lleva a cabo durante 24 horas a 60 horas, concretamente durante 30 horas a 50 horas, más concretamente durante 48 horas a una temperatura entre 28°C y 40°C, concretamente entre 32°C y 38°C, más concretamente a 37°C, mientras que la incubación simultánea con fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados de amiloide se lleva a cabo durante 12 horas a 36 horas, concretamente durante 18 horas a 30 horas, más concretamente durante 24 horas a una temperatura entre 28°C y 40°C, concretamente entre 32°C y 38°C, más concretamente a 37°C.

En otro aspecto específico más el anticuerpo bifuncional descrito en la presente memoria, concretamente el anticuerpo monoclonal bifuncional descrito en la presente memoria, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos

preformados en al menos 10%, concretamente en al menos 25%, más concretamente en al menos 35%, incluso más concretamente en al menos 50%, pero especialmente en al menos 60 - 70% o más.

En otro aspecto específico más el anticuerpo bifuncional descrito en la presente memoria, concretamente el anticuerpo monoclonal bifuncional descrito en la presente memoria, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, inhibe la agregación de péptidos monoméricos amiloides, concretamente péptidos monoméricos β-amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aβ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$ en al menos 50%, concretamente en al menos 65%, más concretamente en al menos 75%, incluso más concretamente en al menos 80%, pero especialmente en al menos 85-90%, o más, en comparación con los respectivos monómeros de péptidos amiloides incubados en tampón (control).

En particular, se describe un anticuerpo, concretamente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, concretamente un anticuerpo monoclonal bifuncional, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo media la inhibición de la polimerización de péptidos monoméricos amiloides, específicamente péptidos monoméricos β-amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aβ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$ y/o induce la solubilización de las fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptidos monoméricos amiloides, concretamente los péptidos monoméricos β-amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aβ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$, por medio de la unión específica y directa del anticuerpo a las fibras de Aβ, lo que conduce a una transición de la conformación secundaria.

Adicionalmente se describe en la presente memoria un anticuerpo, concretamente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, concretamente un anticuerpo monoclonal bifuncional, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une directa y específicamente a fibras de β-amiloide tales como, por ejemplo, fibras que comprenden péptidos monoméricos Aβ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente a fibras que comprenden péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$ y/o induce la solubilización de las fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptidos monoméricos amiloides, concretamente péptidos monoméricos β-amiloide tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aβ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$, dirigiéndose y uniéndose específicamente a un epítopo dentro de una región epitópica de la proteína β-amiloide, concretamente una región epitópica del polipéptido Aβ confinado por los residuos de aminoácidos aa_n-aa_m siendo n un número entero entre 2 y 16, concretamente entre 5 y 16, más concretamente entre 8 y 16, incluso más concretamente entre 10 y 16 y siendo m un número entero entre 3 y 25, concretamente entre 3 y 23, concretamente entre 3 y 20, concretamente entre 3 y 17, concretamente entre 6 y 17, más concretamente entre 9 y 17, incluso más concretamente entre 11 y 17, en donde n y m no pueden ser números idénticos y n debe ser siempre un número menor que m, siendo la diferencia entre n y m ≥ 2.

En un aspecto específico, n es un número entero entre 13 y 15, pero especialmente 14 y m es un número entero entre 22 y 24, pero especialmente 23.

La unión del anticuerpo como se describe en la presente memoria puede inducir una transición conformacional en dicha proteína, concretamente una transición de la conformación en lámina β a una conformación en hélice α y/o de espiral al azar, pero concretamente una conformación de espiral al azar, incluso más concretamente un conformación de espiral al azar en una ubicación dada en la molécula, concretamente en el entorno de Val12 en la proteína Aβ.

Adicionalmente se describe en la presente memoria un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo incorpora al menos una de las propiedades mencionadas en la presente memoria anteriormente y seleccionadas del grupo que consiste en inhibición de la agregación, desagregación, inducción de la transición conformacional, reconocimiento de y unión directa a un epítopo, concretamente un epítopo discontinuo conformacional en la región 14-23, concretamente en 14-20, prevención o ralentización de la formación de placas amiloides, disminución de la cantidad total de Aβ soluble en el cerebro, disminución de la carga de placas en el cerebro, reducción de la cantidad de placas en el cerebro, conservación o aumento de la capacidad de memoria cognitiva, pero especialmente una combinación de dos o más de dichas propiedades.

También se describe en la presente memoria un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo incorpora al menos 2, concretamente al menos 3, más concretamente al menos 4, aún más concretamente al menos 5, 6, 7 o 8, pero especialmente todas las propiedades mencionadas anteriormente.

Adicionalmente se describe en la presente memoria un anticuerpo, concretamente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, concretamente un anticuerpo monoclonal bifuncional, incluyendo cualquier

anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, que exhibe una alta especificidad para péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$ pero que no muestra esencialmente ninguna reactividad cruzada o solamente una reactividad cruzada mínima con los péptidos monoméricos $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$ y/o $A\beta_{1-41}$, concretamente un anticuerpo, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo es hasta 100 veces, concretamente 50 a 100 veces, más concretamente de 80 a 100 veces, pero especialmente 100 veces más sensible al péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ en comparación con $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$ y hasta 1000 veces, concretamente de 500 a 1000 veces, más concretamente de 800 a 1000 veces, pero especialmente 1000 veces más sensible al péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ en comparación con $A\beta_{1-38}$, y por lo tanto capaz de inhibir, *in vitro* e *in vivo*, la agregación de péptidos monoméricos amiloidogénicos, pero especialmente del péptido amiloide $A\beta_{1-42}$.

En otro aspecto, se describe un anticuerpo, concretamente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, concretamente un anticuerpo monoclonal bifuncional, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, que tiene una alta afinidad de unión al péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ y es capaz de detectar fibras de $A\beta_{1-42}$ a una concentración de hasta al menos 0,001 µg, pero concretamente a un intervalo de concentración entre 0,5 µg y 0,001 µg, más concretamente entre 0,1 µg y 0,001 µg, pero especialmente a una concentración de 0,001 µg.

En un aspecto muy específico se describe un anticuerpo, concretamente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, concretamente un anticuerpo monoclonal bifuncional, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo es capaz de detectar fibras de $A\beta_{1-42}$ hasta una concentración mínima de 0,001 µg y fibras de $A\beta_{1-40}$ hasta una concentración mínima de 0,1 µg y fibras de $A\beta_{1-38}$ hasta una concentración mínima de 1 µg de cantidad de fibras.

En un aspecto específico, se describe un anticuerpo o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos un sitio de unión distinto, concretamente a al menos dos sitios de unión distintos sobre la proteína β-amiloide.

En un aspecto específico, se describe un anticuerpo incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo reconoce y se une a al menos un sitio de unión distinto, concretamente a al menos dos sitios de unión distintos sobre la proteína β-amiloide, en donde dicho al menos uno o dichos al menos dos sitios de unión distintos comprenden al menos un residuo de aminoácido y al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, respectivamente, que participan predominantemente en la unión del anticuerpo, en donde, en un aspecto específico, el al menos un residuo que comprende el primer sitio de unión distinto es Leu y los al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, que comprenden el segundo sitio de unión distinto, son -Phe-Phe- incluidos en la siguiente secuencia núcleo:

- Xaa_1 - Xaa_2 - Xaa_3 - Leu - Xaa_4 - Phe - Phe - Xaa_5 - Xaa_6 - Xaa_7 -
en donde

Xaa_1 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende His, Asn, Gln, Lys y Arg;
Xaa_2 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Asn y Gln;
Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Lys, His, Asn, Gln y Arg;
Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;
Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Ala, Val, Leu, Ser e Ile;
Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp;
Xaa_7 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp.

En particular, se describe un anticuerpo o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos un sitio de unión distinto, concretamente a al menos dos sitios de unión distintos sobre la proteína β-amiloide en donde dicho al menos uno o dichos al menos dos sitios de unión distintos comprenden al menos un residuo de aminoácido y al menos dos residuos de aminoácido consecutivos, respectivamente, que participan predominantemente en la unión del anticuerpo, en donde, en un aspecto específico, el al menos un residuo que constituye el primer sitio de unión distinto es Leu y los al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, que constituyen el segundo sitio de unión distinto, son -Phe-Phe- incluidos dentro de la siguiente secuencia núcleo:

- Xaa_1 - Xaa_2 - Xaa_3 - Leu - Xaa_4 - Phe - Phe - Xaa_5 - Xaa_6 - Xaa_7 -
en donde

Xaa_1 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende His, Asn, Gln, Lys y Arg;
Xaa_2 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Asn y Gln;
Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Lys, His, Asn, Gln y Arg;
Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;
Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Ala, Val, Leu, Ser e Ile;
Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp;

Xaa_7 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp.

En otro aspecto, se describe un anticuerpo o un fragmento del mismo, en donde

Xaa_1 es His o Arg, pero concretamente His;
Xaa_2 es Gln o Asn, pero concretamente Gln;
Xaa_3 es Lys o Arg, pero concretamente Lys;
Xaa_4 es Val o Leu, pero concretamente Val;
Xaa_5 es Ala o Val, pero concretamente Ala;
Xaa_6 es Glu o Asp, pero concretamente Glu; y
Xaa_7 es Asp o Glu, pero concretamente Asp.

En otro aspecto, se describe un anticuerpo o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos un sitio de unión distinto, concretamente a al menos dos sitios de unión distintos, más concretamente a al menos tres sitios de unión distintos sobre la proteína β-amiloide, en donde dicho uno o al menos dos o al menos tres sitios de unión distintos comprenden cada uno al menos uno, concretamente al menos dos residuos de aminoácido consecutivos implicados predominantemente en la unión del anticuerpo.

En particular, el anticuerpo o un fragmento del mismo como se describe en la presente memoria se une a al menos dos sitios de unión distintos sobre la proteína β-amiloide, en donde dichos al menos dos sitios de unión distintos comprenden cada uno al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos implicados predominantemente en la unión del anticuerpo, en donde dichos al menos dos sitios de unión distintos se localizan en estrecha proximidad entre sí sobre el antígeno, separados por al menos un residuo de aminoácido que no participa en la unión del anticuerpo o participa en un grado significativamente menor en comparación con dichos al menos dos residuos de aminoácido consecutivos, formando de este modo un epítopo conformacional discontinuo.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos un sitio de unión distinto, concretamente a al menos dos sitios de unión distintos, más concretamente a al menos tres sitios de unión distintos sobre la proteína β-amiloide en donde dichos sitios de unión distintos comprenden al menos uno y al menos dos residuos de aminoácido consecutivos, respectivamente, que participan predominantemente en la unión del anticuerpo, en donde el al menos uno y los al menos dos aminoácidos consecutivos, que están separados por al menos un residuo de aminoácido que no participan en la unión del anticuerpo o participan en un grado significativamente menor en comparación con los residuos de aminoácidos que participan predominantemente en la unión del anticuerpo, son -His- e -Lys-Leu-, respectivamente, incluidos en la siguiente secuencia núcleo:

- His - Xaa_2 - Lys - Leu - Xaa_3 - Xaa_4 - Xaa_5 - Xaa_6 - Xaa_7 - Xaa_8 - en donde

Xaa_2 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Asn y Gln;
Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;
Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;
Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;
Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Ala, Val, Leu, Ser e Ile;
Xaa_7 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp;
Xaa_8 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp

y en donde dichos residuos de aminoácidos Xaa_2, Xaa_3, Xaa_6, Xaa_7, Xaa_8, no participan en la unión del anticuerpo o participan en un grado significativamente menor en comparación con el sitio de unión -His- y -Lys-Leu-.

En otro aspecto, se describe un anticuerpo o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos un sitio de unión distinto, concretamente a al menos dos sitios de unión distintos, más concretamente a al menos tres sitios de unión distintos sobre la proteína β-amiloide en donde dichos sitios de unión distintos comprenden al menos uno y al menos dos residuos de aminoácido consecutivos, respectivamente, que participan predominantemente en la unión del anticuerpo, en donde los al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos que representan un primer sitio de unión son -Phe-Phe- y el al menos un residuo de aminoácido es -Hys- incluido dentro de la siguiente secuencia núcleo:

- Xaa_1 - His - Xaa_3 - Xaa_4 - Xaa_5 - Xaa_6 - Phe - Phe - Xaa_7 - Xaa_8 - Xaa_9 -,
en donde

Xaa_1 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende His, Asn, Gln, Lys y Arg;
Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Asn y Gln;

Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Su, Asn, Gln, Lys y Arg;
Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Ala, Val, Leu, Ser e Ile;
Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Ala, Val, Leu e Ile;
Xaa_7 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Ala, Val, Leu e Ile;
Xaa_8 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp;
Xaa_9 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp, y en donde dichos residuos de aminoácido Xaa_1, Xaa_3, Xaa_6, Xaa_7, Xaa_8 y Xaa_9 no participan en la unión del anticuerpo o participan en un grado significativamente menor en comparación con el sitio de unión Hys y -Phe-Phe-.

En un aspecto específico, el primero de los al menos dos residuos de aminoácido consecutivos que participan predominantemente en la unión del anticuerpo implican -Lys- y -Leu-, y el segundo de los al menos dos residuos de aminoácido consecutivos implican -Phe-Phe- incluidos en la siguiente secuencia núcleo:

- Xaa_1 - Xaa_2 - Lys - Leu - Xaa_4 - Phe - Phe - Xaa_5 - Xaa_6 - Xaa_7 -
en donde

Xaa_1 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende His, Asn, Gln Lys y Arg;
Xaa_2 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Asn y Gln;
Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;
Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Ala, Val, Leu, Ser e Ile;
Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp;
Xaa_7 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp, y en donde dichos residuos de aminoácido Xaa_2, Xaa_3, Xaa_4, Xaa_5, Xaa_6, Xaa_7 no participan en la unión del anticuerpo o participan en un grado significativamente menor en comparación con el sitio de unión - Lys-Leu y -Phe-Phe-.

En otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo,
en donde

Xaa_1 es His o Arg, pero concretamente His;
Xaa_2 es Gln o Asn, pero concretamente Gln;
Xaa_4 es Val o Leu, pero concretamente Val;
Xaa_5 es Ala o Val, pero concretamente Ala;
Xaa_6 es Glu o Asp, pero concretamente Glu; y
Xaa_7 es Asp o Glu, pero concretamente Asp.

En un aspecto adicional, el anticuerpo o un fragmento del mismo como se describe en la presente memoria se unen a al menos tres sitios de unión distintos sobre la proteína β-amiloide en donde dichos al menos tres sitios de unión distintos comprenden al menos un residuo de aminoácido y al menos dos residuos aminoácidos consecutivos, respectivamente, cuyos residuos están implicados predominantemente en la unión del anticuerpo, en donde dichos al menos tres sitios de unión distintos se encuentran en estrecha proximidad entre sí sobre el antígeno, separados por al menos un residuo de aminoácido que no participa en la unión del anticuerpo o participa en un grado significativamente menor en comparación con dicho al menos un residuo de aminoácido y dichos al menos dos residuos de aminoácido consecutivos, respectivamente, formando de este modo epítopo conformacional discontinuo.

En un aspecto específico, el primero de los al menos dos residuos de aminoácido consecutivos que participan predominantemente en la unión del anticuerpo implica -Lys-Leu-, y el segundo de los al menos dos residuos de aminoácido consecutivos implica -Phe-Phe-, y el tercero del al menos un residuo de aminoácido implica -Hys- incluidos dentro de la siguiente secuencia núcleo:

-His- Xaa_2 - Lys - Leu - Xaa_4 - Phe - Phe - Xaa_5 - Xaa_6 - Xaa_7 -
en donde

Xaa_2 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Asn y Gln;
Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;
Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Ala, Val, Leu, Ser e Ile;
Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp;
Xaa_7 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp, y
en donde dichos residuos de aminoácidos Xaa_2, Xaa_3, Xaa_4, Xaa_5, Xaa_6, Xaa_7 no participan en la unión del anticuerpo o participan en un grado significativamente menor en comparación con el sitio de unión -His-, -Lys-Leu, y -Phe-Phe-.

En otro aspecto, se describe un anticuerpo o un fragmento del mismo,

en donde

Xaa_2 es Gln o Asn, pero concretamente Gln;
Xaa_4 es Val o Leu, pero concretamente Val;
Xaa_5 es Ala o Val, pero concretamente Ala;
Xaa_6 es Glu o Asp, pero concretamente Glu; y
Xaa_7 es Glu o Asp, pero concretamente Asp.

En un aspecto específico, el primero de los al menos dos residuos de aminoácido consecutivos que participan predominantemente en la unión del anticuerpo implica -Lys-Leu-, y el segundo de los al menos dos residuos de aminoácido consecutivos implica -Phe-Phe-, y el tercero de los al menos un residuo de amino implica -Asp- incluidos dentro de la siguiente secuencia núcleo:

- Xaa_1 - Xaa_2 - Lys - Leu - Xaa_4 - Phe - Phe - Xaa_5 - Xaa_6 - Asp -
en donde

Xaa_1 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende His, Asn, Gln Lys y Arg;
Xaa_2 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Asn y Gln;
Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;
Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Ala, Val, Leu, Ser e Ile;
Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp, y
en donde dichos residuos de aminoácidos Xaa_2, Xaa_3, Xaa_4, Xaa_5, Xaa_6, Xaa_7 no participan en la unión del anticuerpo o participan en un grado significativamente menor en comparación con el sitio de unión -Asp-,-Lys-Leu, y -Phe-Phe-.

También se describe en la presente memoria, un anticuerpo o un fragmento del mismo,
en donde

Xaa_1 es His o Arg, pero concretamente His;
Xaa_2 es Gln o Asn, pero concretamente Gln;
Xaa_4 es Val o Leu, pero concretamente Val;
Xaa_5 es Ala o Val, pero concretamente Ala; y
Xaa_6 es Glu o Asp, pero concretamente Glu.

En un aspecto específico adicional, se describe un anticuerpo o un fragmento del mismo como se describe en la presente memoria que se une a 4 sitios de unión distintos sobre la proteína β-amiloide en donde dichos 4 sitios de unión distintos comprenden un residuo de aminoácido y dos residuos de aminoácidos consecutivos, respectivamente, cuyos residuos participan predominantemente en la unión del anticuerpo, en donde dichos 4 sitios de unión distintos se encuentran en estrecha proximidad entre sí sobre el antígeno, separados por al menos un residuo de aminoácido que no participa en la unión del anticuerpo o participa en un grado significativamente menor en comparación con dicho un residuo de aminoácido y dichos dos residuos de aminoácidos consecutivos de los 4 sitios de unión distintos formando de este modo un epítopo conformacional discontinuo.

En particular, el primero de los dos residuos de aminoácido consecutivos que participan predominantemente en la unión del anticuerpo es -Lys-Leu-, y el segundo de los al menos dos residuos de aminoácido consecutivos es -Phe-Phe-, el primero de los residuos de aminoácido individuales es -His- y el segundo de los residuos de aminoácido individuales es -Asp- incluidos dentro de la siguiente secuencia núcleo:

- His - Xaa_2 - Lys - Leu - Xaa_4 - Phe - Phe - Xaa_5 -Xaa_6 - Asp -
en donde

Xaa_2 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Asn y Gln;
Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;
Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Ala, Val, Leu, Ser e Ile;
Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp, y en donde dichos residuos de aminoácido Xaa_2, Xaa_3, Xaa_4, Xaa_5, Xaa_6, Xaa_7 no participan en la unión del anticuerpo o participan a un grado significativamente menor en comparación con el sitio de unión -His-, - Asp-, -Lys-Leu, y -Phe-Phe-.

Adicionalmente se describen en la presente memoria que los sitios de reconocimiento y unión definidos antes en la presente memoria están formando un epítopo conformacional discontinuo localizado en una región de la proteína β-amiloide entre los residuos de aminoácidos 12 a 24, concretamente entre los residuos 14 a 23, más concretamente entre los residuos de aminoácido 14 y 20, en donde los tres sitios de reconocimiento y unión distintos que

comprenden 1 y 2 residuos de aminoácidos, respectivamente, están localizados en la posición 16, 17, y en la posición 19 y 20, y en la posición 14, respectivamente, cuyos residuos participan predominantemente en la unión de la proteína β-amiloide y en donde dichos tres sitios de reconocimiento y unión distintos están separados por un residuo de aminoácido localizado en la posición 15 y 18, respectivamente, cuyos aminoácidos no participan en la unión del antígeno o, al menos, participan en un grado sustancialmente menor.

En un aspecto específico, dichos residuos de aminoácido consecutivos, concretamente -Lys-Leu- de la posición 16 y 17 y -Phe-Phe- de la posición 19 y 20, que participan predominantemente en la unión de la proteína β-amiloide, están incluidos en la siguiente región núcleo:

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

En un aspecto específico adicional, dichos residuos de aminoácidos consecutivos, concretamente - Lys- en la posición 16, -Leu- en la posición 17 y -Phe-Phe- en la posición 19 y 20, e -His- en la posición 14, que participan predominantemente en la unión de la proteína β-amiloide están incluidos en la siguiente región núcleo:

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

En un aspecto específico, el anticuerpo descrito en la presente memoria se origina contra un fragmento de antígeno que no contiene dicho sitio de unión distinto.

Este desplazamiento en la región epitópica puede haber sido causado al menos parcialmente por el uso de un constructo antigénico supramolecular que comprende un péptido antigénico correspondiente a la secuencia de aminoácidos del péptido β-amiloide, concretamente del péptido β-amiloide $A\beta_1 16$, modificado con un radical hidrófilo tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), en donde dicho radical hidrófilo está unido covalentemente a cada uno de los extremos del péptido antigénico a través de al menos uno, concretamente uno o dos aminoácidos, tales como, por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisteína o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuados capaces de servir como un dispositivo de conexión para el acoplamiento del radical hidrófilo al fragmento peptídico, como se describe en la presente memoria a continuación en el proceso de inmunización. Cuando se utiliza un PEG como radical hidrófilo, los extremos libres de PEG están unidos covalentemente a fosfatidiletanolamina o cualquier otro compuesto adecuado para funcionar como elemento de anclaje por ejemplo, para insertar el constructo antigénico en la bicapa de un liposoma como se describe en la presente memoria.

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

En un aspecto específico, se describe un anticuerpo, que comprende la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) del SEQ ID NO: 7.

En otro aspecto específico se describe la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) del SEQ ID NO: 7.

En otro aspecto específico más, se describe un anticuerpo, que comprende la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) del SEQ ID NO: 8.

En un aspecto específico adicional se describe la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) del SEQ ID NO: 8.

En un aspecto se describe un anticuerpo, que comprende tanto la región variable de la cadena pesada del SEC ID NO: 8 como la región variable de la cadena ligera del SEQ ID NO: 7.

Adicionalmente se describe un anticuerpo que comprende una Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) o una Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) o ambas, una Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) y una Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) que es homóloga a cualquiera de los péptidos proporcionados en los SEQ ID NO: 7 y 8, respectivamente.

Adicionalmente se describe en la presente memoria es un anticuerpo o un fragmento del mismo, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria en donde la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% o 99% a la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 7.

Adicionalmente, se describe un anticuerpo o un fragmento del mismo, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria en donde la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% o 99% a la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 8.

Adicionalmente, se describe un anticuerpo o un fragmento del mismo, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria en donde la Región variable de la Cadena Ligera (LCVR) y la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) tienen en conjunto una secuencia de aminoácidos que es idéntica en 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a las secuencias proporcionadas en los SEQ ID NO: 7 y 8.

En otro aspecto específico se describe la región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 7.

En un aspecto específico adicional se describe la región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 8.

En otro aspecto, se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo descrito anteriormente en la presente memoria.

En particular, se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo descrito anteriormente en la presente memoria que comprende:

a) al menos la secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera del SEC ID NO: 9
b) una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos de (a) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético
c) la secuencia complementaria a (a) y (b) o
d) un fragmento de una secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c) que comprende un tramo contiguo de nucleótidos seleccionado del grupo que consiste en al menos 20 nucleótidos contiguos, al menos 25 nucleótidos contiguos, al menos 30 nucleótidos contiguos, al menos 35 nucleótidos contiguos, al menos 40 nucleótidos contiguos, al menos 45 nucleótidos contiguos, y al menos 50 nucleótidos contiguos.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo descrito en la presente memoria que comprende

a) al menos la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del SEC ID NO: 10
b) una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos de (a) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético
c) la secuencia complementaria a (a) y (b) o
d) un fragmento de una secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c) que comprende un tramo contiguo de nucleótidos seleccionado del grupo que consiste en al menos 20 nucleótidos contiguos, al menos 25 nucleótidos contiguos, al menos 30 nucleótidos contiguos, al menos 35 nucleótidos contiguos, al menos 40 nucleótidos contiguos, al menos 45 nucleótidos contiguos, y al menos 50 nucleótidos contiguos.

En otro aspecto más, se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo descrito en la presente memoria que comprende

a) al menos la secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada del SEC ID NO: 11
b) una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos de (a) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético
c) la secuencia complementaria a (a) y (b) o
d) un fragmento de una secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c) que comprende un tramo contiguo de nucleótidos seleccionado del grupo que consiste en al menos 20 nucleótidos contiguos, al menos 25 nucleótidos contiguos, al menos 30 nucleótidos contiguos, al menos 35 nucleótidos contiguos, al menos 40 nucleótidos contiguos, al menos 45 nucleótidos contiguos, y al menos 50 nucleótidos contiguos.

En otro aspecto más, se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo descrito en la presente memoria que comprende

a) al menos la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del SEC ID NO: 12 o la secuencia complementaria
b) una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos de (a) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético
c) la secuencia complementaria a (a) y (b) o
d) un fragmento de una secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c) que comprende un tramo contiguo de nucleótidos seleccionado del grupo que consiste en al menos 20 nucleótidos contiguos, al menos 25 nucleótidos contiguos, al menos 30 nucleótidos contiguos, al menos 35 nucleótidos contiguos, al menos 40 nucleótidos contiguos, al menos 45 nucleótidos contiguos, y al menos 50 nucleótidos contiguos.

También está incluido un polinucleótido que comprende

a) la secuencia de nucleótidos del SEC ID NO: 9 que codifica la región variable de la cadena ligera
b) una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos de (a) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético
c) la secuencia complementaria a (a) y (b) o
d) un fragmento de una secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c) que comprende un tramo contiguo de nucleótidos seleccionado del grupo que consiste en al menos 20 nucleótidos contiguos, al menos 25 nucleótidos contiguos, al menos 30 nucleótidos contiguos, al menos 35 nucleótidos contiguos, al menos 40 nucleótidos contiguos, al menos 45 nucleótidos contiguos, y al menos 50 nucleótidos contiguos.

También está incluido un polinucleótido que comprende

a) la secuencia de nucleótidos del SEC ID NO: 10 que codifica la cadena ligera
b) una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos de (a) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético
c) la secuencia complementaria a (a) y (b) o
d) un fragmento de una secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c) que comprende un tramo contiguo de nucleótidos seleccionado del grupo que consiste en al menos 20 nucleótidos contiguos, al menos 25 nucleótidos contiguos, al menos 30 nucleótidos contiguos, al menos 35 nucleótidos contiguos, al menos 40 nucleótidos contiguos, al menos 45 nucleótidos contiguos, y al menos 50 nucleótidos contiguos.

También está incluido un polinucleótido que comprende

a) la secuencia de nucleótidos del SEC ID NO: 11 que codifica la región variable de la cadena pesada
b) una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos de (a) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético
c) la secuencia complementaria a (a) y (b) o
d) un fragmento de una secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c) que comprende un tramo contiguo de nucleótidos seleccionado del grupo que consiste en al menos 20 nucleótidos contiguos, al menos 25 nucleótidos contiguos, al menos 30 nucleótidos contiguos, al menos 35 nucleótidos contiguos, al menos 40 nucleótidos contiguos, al menos 45 nucleótidos contiguos, y al menos 50 nucleótidos contiguos.

También está incluido un polinucleótido que comprende

a) la secuencia de nucleótidos del SEC ID NO: 12 que codifica la cadena pesada
b) una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos de (a) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético
c) la secuencia complementaria a (a) y (b) o
d) un fragmento de una secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c) que comprende un tramo contiguo de nucleótidos seleccionado del grupo que consiste en al menos 20 nucleótidos contiguos, al menos 25 nucleótidos contiguos, al menos 30 nucleótidos contiguos, al menos 35 nucleótidos contiguos, al menos 40 nucleótidos contiguos, al menos 45 nucleótidos contiguos, y al menos 50 nucleótidos contiguos.

Adicionalmente se describe cualquier secuencia de nucleótidos que hibride con

a. una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención y proporcionada en los SEC ID NO: 9, 10, 11 y 12, respectivamente,
b. una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos de (a) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético
c. la secuencia complementaria a (a) y (b) o
d. un fragmento de una secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c) que comprende un tramo contiguo de nucleótidos seleccionado del grupo que consiste en al menos 20 nucleótidos contiguos, al menos 25 nucleótidos contiguos, al menos 30 nucleótidos contiguos, al menos 35 nucleótidos contiguos, al menos 40 nucleótidos contiguos, al menos 45 nucleótidos contiguos, y al menos 50 nucleótidos contiguos.

En particular, se describe cualquier secuencia de nucleótidos que hibride en condiciones de hibridación convencionales, particularmente en condiciones de hibridación rigurosas, con una secuencia de nucleótidos descrita en la presente memoria y proporcionada en los SEC ID NO: 9, 10, 11 y 12, respectivamente, concretamente, con la hebra complementaria de la misma.

En un aspecto adicional, se describe cualquier secuencia de nucleótidos que hibride con una secuencia de nucleótidos descrita en la presente memoria y proporcionada en SEQ ID NO: 9, 10, 11 y 12, respectivamente, concretamente con la hebra complementaria de la misma; en condiciones de hibridación convencionales en las que se utiliza como solución 5xSSPE, SDS al 1%, 1x solución de Denhardt y/o las temperaturas de hibridación están entre 35°C y 70°C, preferiblemente 65°C. Después de la hibridación, el lavado se lleva a cabo preferiblemente

primero con 2 x SSC, SDS al 1% y posteriormente con 0,2 x SSC a temperaturas entre 35°C y 70°C, preferiblemente a 65°C (con respecto a la definición de SSPE, SSC y solución de Denhardt (véase Sambrook et al. loc. cit.).

En particular, se describe cualquier secuencia de nucleótidos que hibride con una secuencia de nucleótidos descrita en la presente memoria y proporcionada en los SEQ ID NO: 9, 10, 11 y 12, respectivamente, concretamente con la hebra complementaria de la misma, en condiciones de hibridación rigurosas como por ejemplo las descritas por Sambrook et al, supra, más concretamente en condiciones de hibridación rigurosas, en las que la hibridación y el lavado se producen a 65°C como se ha indicado anteriormente.

En un aspecto específico se describe un anticuerpo, concretamente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, concretamente un anticuerpo monoclonal bifuncional, incluyendo, cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por una línea celular de hibridoma seleccionada del grupo que consiste en FP 12H3, FP 12H3-C2, y FP 12H3-G2 depositadas el 1 de Diciembre de 2005 y 9 de Diciembre de 2005, respectivamente, como DSM ACC2752, DSM ACC 2750 y DSM ACC2751, respectivamente.

Más concretamente, en un aspecto, se describe un anticuerpo que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo producidos por la línea celular de hibridoma FP 12H3, depositada el 1 de Diciembre 2005 y el 9 de Diciembre de 2005, respectivamente, como DSM ACC2752.

Más concretamente, se describe un anticuerpo monoclonal que incluyen cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo producidos por la línea celular de hibridoma FP 12H3-C2, depositada el 1 de Diciembre 2005 y el 9 de Diciembre de 2005, respectivamente, como DSM ACC2750.

Más concretamente, se describe un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo producidos por la línea celular de hibridoma FP 12H3-G2, depositada el 1 de Diciembre 2005 y el 9 de Diciembre de 2005, respectivamente, como DSM ACC2751.

En otro aspecto específico se describe un anticuerpo, concretamente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, concretamente un anticuerpo monoclonal bifuncional, que incluyen cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma ET 7E3 depositada el 8 de Diciembre de 2005, como DSM ACC2755.

Más concretamente, se describe un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo producidos por la línea celular de hibridoma ET 7E3, depositada el 8 de Diciembre de 2005 como DSM ACC2755.

En otro aspecto específico se describe un anticuerpo, concretamente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, concretamente un anticuerpo monoclonal bifuncional, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma EJ 7H3 depositada el 8 de Diciembre de 2005, como DSM ACC2756.

Más concretamente, se describe un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo producidos por la línea celular de hibridoma EJ 7H3, depositada el 8 de Diciembre 2005 como DSM ACC2756.

Otro objeto es describir métodos y composiciones que comprenden un anticuerpo descrito anteriormente en la presente memoria para la prevención y/o el tratamiento terapéutico y/o alivio de los efectos de las enfermedades y trastornos que están causados por, o asociados con las proteínas amiloides o de tipo amiloide, incluyendo la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide incluyendo la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad tales como enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), incluidas las enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), incluyendo enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia hereditaria cerebral con amiloidosis (tipo holandés); el complejo de Parkinson-demencia de Guam, así como otras enfermedades y afecciones que están basadas en o asociadas con proteínas de tipo amiloide, tales como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Creutzfeld Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con el VIH, la ELA (esclerosis lateral amiotrófica), la miositis por cuerpos de inclusión (MCI), la diabetes de comienzo en la edad adulta; la amiloidosis cardíaca senil; los tumores endocrinos, y otros, incluyendo la degeneración macular, por ejemplo, por inmunización pasiva de un ser humano o animal con un anticuerpo como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

Otro objeto es un método de uso de un anticuerpo monoclonal y/o una porción funcional del mismo como se describe en la presente memoria y composiciones que comprenden un anticuerpo como se ha descrito anteriormente en la presente memoria para el diagnóstico y la intervención terapéutica de enfermedades y trastornos que están causados por, o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide, incluyendo la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide incluyendo la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad tales como enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), incluidas las enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), incluyendo enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia hereditaria cerebral con amiloidosis (tipo holandés); el complejo de Parkinson-demencia de Guam, así como otras enfermedades que están basadas en o asociadas con proteínas de tipo amiloide, tales como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple; la enfermedad de Creutzfeld Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con el VIH, la ELA (esclerosis lateral amiotrófica), la miositis por cuerpos de inclusión (MCI), la diabetes de comienzo en la edad adulta; la amiloidosis cardíaca senil; los tumores endocrinos, y otros, incluyendo la degeneración macular.

En particular, se describe un método de uso de un anticuerpo monoclonal y/o una porción funcional del mismo como composiciones descritas en la presente memoria que comprenden un anticuerpo, particularmente un anticuerpo biespecífico o bi-efectivo, pero especialmente un anticuerpo monoclonal biespecífico o bi-efectivo como se ha descrito anteriormente en la presente memoria para reducir y prevenir la aparición de trastornos neurológicos, incluyendo pero no limitados a la enfermedad de Alzheimer.

Las composiciones descritas en la presente memoria comprenden un anticuerpo, concretamente un anticuerpo biespecífico o bi-efectivo, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, concretamente en una cantidad terapéuticamente eficaz o, más concretamente, un anticuerpo monoclonal, especialmente un anticuerpo monoclonal biespecífico o bi-efectivo, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, concretamente en una cantidad terapéuticamente eficaz y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables. Concretamente, la composición descrita en la presente memoria comprende un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo es capaz de inhibir la agregación de péptidos monoméricos amiloides, específicamente péptidos monoméricos β-amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aß 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $Aß_{1-42}$, en fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto adicional, se describe una composición que comprende un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo, tras la incubación simultánea, concretamente, tras la incubación simultánea a una razón de concentración molar de hasta 1:100, más concretamente a una razón de concentración molar entre 1:30 y 1:100, pero especialmente a una razón de concentración molar de 1:100, con péptidos monoméricos amiloides, concretamente péptidos monoméricos β-amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aß 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $Aß_{1-42}$, inhibe la agregación de los monómeros Aß en fibrillas o filamentos poliméricos de alto peso molecular. En particular, dicha inhibición representa al menos 50%, concretamente al menos 65%, más concretamente al menos 75%, incluso más concretamente al menos 80%, pero especialmente al menos 85%-90%, o más, en comparación con los respectivos monómeros de péptidos amiloides incubados en tampón (control) y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables

En particular, la incubación simultánea del anticuerpo descrito en la presente memoria con péptidos monoméricos amiloides se lleva a cabo durante 48 horas a una temperatura de 37°C.

El potencial de inhibición de la agregación del anticuerpo descrito en la presente memoria se puede determinarse mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad seguido de un análisis de sedimentación SDS-PAGE en un gradiente preformado y/o mediante un análisis de fluorescencia con tioflavina T (Th-T).

Adicionalmente se describe en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo que es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular formados por la agregación de péptidos monoméricos amiloides, específicamente péptidos monoméricos β-amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aß 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $Aß_{1-42}$ y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

A través de la desagregación de las fibrillas o filamentos poliméricos amiloidogénicos, los anticuerpos descritos 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 a un retraso o reversión de su progresión.

Adicionalmente, se describe una composición que comprende un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo, tras la incubación simultánea a una razón de concentración molar entre 1:30 y 1:100, concretamente a una razón de 1:100, con fibrillas o filamentos de amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptidos monoméricos amiloides, concretamente péptidos monoméricos β-amiloide tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aß 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $Aß_{1-42}$, concretamente tras la incubación simultánea durante 24 horas a una temperatura de 37°C, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en al menos 35%, concretamente en al menos 40%, más concretamente en al menos 50%, incluso más concretamente, en al menos 60%, pero especialmente en al menos 70% o más y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

El potencial de desagregación del anticuerpo descrito en la presente memoria se puede determinar mediante ultracentrifugación en un gradiente de densidad seguido de un análisis de sedimentación SDS-PAGE en un gradiente preformado y/o mediante un análisis de fluorescencia con tioflavina T (Th-T).

Adicionalmente se describe en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo es conformacionalmente sensible, concretamente en una cantidad eficaz, más concretamente en una cantidad terapéuticamente eficaz.

En un aspecto adicional, se describe una composición que comprende un anticuerpo, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo, tras la incubación simultánea con fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptidos monoméricos amiloides, concretamente péptidos monoméricos β-amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aß 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $Aß_{1-42}$, concretamente tras la incubación simultánea durante 24 horas a una temperatura de 37°C, es capaz de inducir una transición de la conformación en lámina β a conformación en hélice α y/o de espiral al azar, pero concretamente una conformación de espiral al azar, incluso más concretamente una conformación de espiral al azar en una ubicación dada de la molécula, especialmente en el entorno de Val12 de la proteína Aß, lo que conduce a un aumento de la conformación de espiral al azar a expensas de la conformación en lámina β y una mejora de la solubilización de las fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables. En particular, la disminución de la conformación en lámina β representa al menos 30%, concretamente al menos 35%, y más concretamente al menos 40% y más en comparación con las respectivas fibrillas o filamentos poliméricos de amiloide preformados incubados en tampón (control).

El potencial del anticuerpo para inducir una transición en la estructura secundaria se determina mediante espectroscopía de RMN C13 en estado sólido, pero, concretamente, mediante la medición de las intensidades integrales de las conformaciones de Val 12 Cβ en el péptido $Aß_{1-42}$.

También se describe en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, concretamente en una cantidad terapéuticamente eficaz, cuyo anticuerpo es bifuncional ya que muestra tanto una propiedad de inhibición de la agregación como una propiedad de desagregación como se ha definido anteriormente en la presente memoria, preferiblemente asociada con un alto grado de sensibilidad conformacional y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto más se describe una composición que comprende un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal bifuncional, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo, tras la incubación simultánea con péptidos monoméricos amiloides, concretamente péptidos monoméricos β-amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aß 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $Aß_{1-42}$, inhibe la agregación de los monómeros Aß en fibrillas poliméricas de alto peso molecular y, además, tras la incubación simultánea con fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptidos monoméricos amiloides, concretamente péptidos monoméricos β-amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aß 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $Aß_{1-42}$, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto específico de la incubación simultánea del anticuerpo bifuncional descrito en la presente memoria, pero especialmente del anticuerpo monoclonal bifuncional descrito en la presente memoria con péptidos monoméricos amiloides y fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados,

respectivamente, tiene lugar a una razón de concentración molar de hasta 1:100, particularmente a una razón de entre 1:30 y 1:100, y más concretamente a una razón de 1:100.

En un aspecto específico adicional la incubación simultánea con péptidos monoméricos amiloides y fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados se lleva a cabo durante 48 horas y 24 horas, respectivamente, a una temperatura de 37°C.

En otro aspecto específico más se describe una composición que comprende un anticuerpo bifuncional como se describe en la presente memoria, pero especialmente un anticuerpo monoclonal bifuncional como se describe en la presente memoria que es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en al menos 10%, concretamente en al menos 25%, más concretamente en al menos 35%, incluso más concretamente en al menos 50%, pero especialmente en al menos 60 - 70% o más y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto específico más se describe una composición que comprende un anticuerpo bifuncional como se describe en la presente memoria, pero especialmente un anticuerpo monoclonal bifuncional como se describe en la presente memoria que inhibe la agregación de péptidos monoméricos amiloides, concretamente péptidos monoméricos β-amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aß 1 -39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $Aß_{1-42}$ en al menos 50%, concretamente en al menos 65%, más concretamente en al menos 75%, incluso más concretamente en al menos 80%, pero especialmente en al menos 85-90%, o más, en comparación con los respectivos monómeros de péptido amiloide incubados en tampón (control) y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

En particular, se describe una composición que comprende un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo media la inhibición de la polimerización de los péptidos monoméricos amiloides, específicamente péptidos monoméricos β-amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aß 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $Aß_{1-42}$ y/o induce la solubilización de las fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptidos monoméricos amiloides, concretamente péptidos monoméricos β-amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aß 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $Aß_{1-42}$, por medio de la unión específica y directa del anticuerpo a las fibras de Aß, lo que conduce a una transición de la conformación secundaria y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

Adicionalmente se describe en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une directamente y específicamente a fibras de β-amiloide tales como, por ejemplo, fibras que comprenden péptidos monoméricos Aß 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente a fibras que comprenden péptidos monoméricos $Aß_{1-42}$ y/o induce la solubilización de las fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptidos monoméricos amiloides, concretamente péptidos monoméricos β-amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos Aß 1-39; 1-40, 1 - 41, 1-42, o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $Aß_{1-42}$, dirigiéndose y uniéndose específicamente a una región epitópica de la proteína β-amiloide, concretamente una región epitópica del polipéptido Aß confinada por los residuos de aminoácidos aa_n-aa_m siendo n un número entero entre 2 y 15, concretamente entre 5 y 15, más concretamente entre 8 y 15, incluso más concretamente entre 10 y 15 y siendo m un número entero entre 3 y 17, concretamente entre 6 y 17, más concretamente entre 9 y 17, incluso más concretamente entre 11 y 17, en donde n y m no pueden ser números idénticos y n deben ser siempre un número menor que m, siendo la diferencia entre n y m ≥ 2 y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

La unión del anticuerpo tal como se describe en la presente memoria puede inducir una transición conformacional en dicha proteína, concretamente una transición de la conformación en lámina β a una conformación en hélice α y/o de espiral al azar, pero concretamente una conformación de espiral al azar, incluso más concretamente un conformación de espiral al azar en una ubicación dada en la molécula, especialmente en el entorno de Val12 de la proteína Aß.

En un aspecto adicional, se describe una composición que comprende un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo incorpora al menos una de las propiedades mencionadas en la presente memoria anteriormente, esto es inhibición de la agregación, desagregación, inducción de la transición conformacional, el reconocimiento de y unión directa a la región epitópica 4-16 y/o 14 a 23, pero concretamente 14 al 20, pero especialmente una combinación de dos o más de dichas propiedades y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto específico se describe una composición que comprende un anticuerpo, concretamente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, concretamente un anticuerpo monoclonal bifuncional,

incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, que exhibe una alta especificidad hacia péptidos monoméricos $Aß_{1-42}$ pero no muestra esencialmente ninguna o sólo muestra una reactividad cruzada mínima con los péptidos monoméricos $Aß_{1-38}$, $Aß_{1-39}$, $Aß_{1-40}$, y/o $Aß_{1-41}$, concretamente un anticuerpo, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo es hasta 100 veces, concretamente 50 a 100 veces, más concretamente de 80 a 100 veces, pero especialmente 100 veces más sensible al péptido amiloide $Aß_{1-42}$ en comparación con $Aß_{1-38}$, $Aß_{1-39}$, $Aß_{1-40}$, $Aß_{1-41}$ y hasta 1000 veces, concretamente de 500 a 1000 veces, más concretamente 800 a 1000 veces, pero especialmente 1000 veces más sensible al péptido amiloide $Aß_{1-42}$ en comparación con $Aß_{1-38}$, y de este modo capaz de inhibir, *in vitro* e *in vivo*, la agregación de péptidos monoméricos amiloidogénicos, pero especialmente del péptido amiloide $Aß_{1-42}$ y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto específico se describe una composición que comprende un anticuerpo, concretamente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, concretamente un anticuerpo monoclonal bifuncional, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, que tienen una alta sensibilidad de unión al péptido amiloide $Aß_{1-42}$ y son capaces de detectar fibras de $Aß_{1-42}$ a una concentración de hasta al menos 0,001 µg, pero concretamente en un intervalo de concentración entre 0,5 µg y 0,001 µg, más concretamente entre 0,1 µg y 0,001 µg, pero especialmente a una concentración de 0,001 µg y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto muy específico se describe una composición que comprende un anticuerpo, concretamente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, concretamente un anticuerpo monoclonal bifuncional, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo es capaz de detectar fibras de $Aß_{1-42}$ a una concentración mínima de 0,001 µg y fibras de $Aß_{1-40}$ a una concentración mínima de 0,1 µg y fibras de $Aß_{1-38}$ a una concentración mínima de 1 µg de cantidad de fibras y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

También se describe en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por una línea celular de hibridoma seleccionada entre el grupo que consiste de FP 12H3, FP 12H3-C2, y FP 12H3-G2 depositadas el 1 de Diciembre de 2005 y el 9 de Diciembre de 2005, respectivamente, como DSM ACC2752, DSM ACC2750 y DSM ACC2751, y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

Más concretamente, se describe una composición que comprende un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo producidos por la línea celular de hibridoma FP 12H3, depositada el 1 de Diciembre de 2005 y el 9 de Diciembre de 2005, respectivamente, como DSM ACC2752 y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

Más concretamente, se describe una composición que comprende un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo producidos por la línea celular de hibridoma FP 12H3-C2, depositada el 1 de Diciembre de 2005 y el 9 de Diciembre de 2005, respectivamente, como DSM ACC2750 y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

Adicionalmente se describe una composición que comprende un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo producidos por la línea celular de hibridoma FP 12H3-G2, depositada el 1 de Diciembre de 2005 y el 9 de Diciembre de 2005, respectivamente, como DSM ACC2751 y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto específico se describe una composición que comprende un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma ET 7E3 depositada el 8 de Diciembre de 2005 como DSM ACC2755 y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

Adicionalmente se describe en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo producidos por la línea celular de hibridoma ET 7E3, depositada el 8 de Diciembre 2005, como DSM ACC2755 y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto específico se describe una composición que comprende un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, cuyo anticuerpo tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma EJ 7H3 depositada el 8 de Diciembre de 2005, como DSM ACC2756 y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

También se describe en la presente memoria una composición que comprende un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo producidos por la línea celular de hibridoma EJ 7H3, depositada el 8 de Diciembre de 2005, como DSM ACC2756 y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

El anticuerpo, concretamente el anticuerpo monoclonal descrito en la presente memoria, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, se pueden administrar combinados con otras sustancias biológicamente activas y procedimientos para el tratamiento de enfermedades. Las otras sustancias biológicamente activas pueden ser parte de la misma composición que ya comprende el anticuerpo como se describe en la presente memoria, en forma de una mezcla, en donde el anticuerpo y la otra sustancia biológicamente activa se entremezclan en o con el mismo disolvente y/o vehículo farmacéuticamente aceptables, o pueden proporcionarse por separado como parte de una composición separada, que puede ser ofrecida por separado, o juntos en forma de un kit de partes.

El anticuerpo, concretamente el anticuerpo monoclonal descrito en la presente memoria, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, se pueden administrar al mismo tiempo con la otra sustancia o sustancias biológicamente activas, de forma intermitente o de forma secuencial. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal descrito en la presente memoria, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, se pueden administrar simultáneamente con una primera sustancia biológicamente activa adicional o de forma secuencial después o antes de la administración del anticuerpo. Si se elige un esquema de aplicación en el que se administran más de una sustancia biológicamente activa adicional junto con al menos un anticuerpo como se describe en la presente memoria, los compuestos o las sustancias se pueden administrar parcialmente de manera simultánea, parcialmente de manera secuencial en varias combinaciones.

Otro objeto es describir las mezclas de anticuerpos que comprenden al menos un anticuerpo como se describe en la presente memoria y, opcionalmente, una o más sustancias biológicamente activas adicionales, así como métodos de uso de anticuerpos individuales, o mezclas de los mismos incluyendo composiciones que comprenden dichos anticuerpos o mezclas de anticuerpos para la prevención y/o tratamiento terapéutico y/o alivio de los efectos de las enfermedades y trastornos que están causados por, o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placa amiloide incluyendo la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, tales como enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), incluyendo enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); complejo de Parkinson-demencia de Guam, así como otras enfermedades que se basan en o están asociadas con las proteínas de tipo amiloide, tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (MCI), diabetes de comienzo en la edad adulta, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y otros, incluyendo degeneración macular.

Las mezclas descritas en la presente memoria pueden comprender, además de un anticuerpo de acuerdo con la invención, una sustancia biológicamente activa, tal como, por ejemplo, compuestos conocidos utilizados en la medicación de enfermedades y trastornos que están causados por, o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide, incluyendo la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la proteína amiloide o de tipo amiloide como tal como la proteína Aß implicada en la enfermedad de Alzheimer.

La otra sustancia o compuesto biológicamente activos también pueden ser un agente terapéutico que se puede utilizar en el tratamiento de enfermedades y trastornos que están causados por, o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis causada por β-amiloide o pueden ser utilizados en la medicación para otros trastornos neurológicos.

La otra sustancia o compuesto biológicamente activos pueden ejercer su efecto biológico por sí mismos o mediante el mismo mecanismo o un mecanismo similar al del anticuerpo descrito en la presente memoria o por un mecanismo de acción no relacionado o por una multiplicidad de mecanismos de acción relacionados y/o no relacionados.

En general, el otro compuesto biológicamente activo puede incluir potenciadores de la transmisión de neutrones, fármacos psicoterapéuticos, inhibidores de la acetilcolinesterasa, bloqueadores de los canales de calcio, aminas biogénicas, tranquilizantes de benzodiazepina, potenciadores de la síntesis, el almacenamiento o la liberación de acetilcolina, agonistas de los receptores postsinápticos de acetilcolina, inhibidores de monoamino oxidasa A o B, antagonistas del receptor de N-metil-D-aspartato-glutamato, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, antioxidantes, y antagonistas de los receptores serotoninérgicos.

En particular, la mezcla descrita en la presente memoria puede comprender al menos otro compuesto biológicamente activo seleccionado del grupo que consiste en compuestos contra el estrés oxidativo, compuestos

anti-apoptóticos, quelantes de metales, inhibidores de la reparación del ADN, tales como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de secretasa, inhibidores de β- y γ-secretasa, proteínas tau, neurotransmisores, desorganizadores de la lámina β, moléculas anti-inflamatorias, o inhibidores de colinesterasa (ChEI) tales como tacrina, rivastigmina, donepezilo, y/o galantamina y otros fármacos y suplementos nutritivos, junto con un anticuerpo como se describe en la presente memoria y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto adicional, las mezclas descritas en la presente memoria pueden comprender niacina o memantina junto con un anticuerpo como se describe en la presente memoria y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto más, se describen mezclas que comprenden "antipsicóticos atípicos", tales como, por ejemplo clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina para el tratamiento de los síntomas psicóticos positivos y negativos, incluyendo alucinaciones, delirios, trastornos del pensamiento (que se manifiestan por incoherencia notable, descarrilamiento, tangencialidad), y comportamiento extraño o desorganizado, así como anhedonia, afecto plano, apatía, y retraimiento social, junto con un anticuerpo como se describe en la presente memoria y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto específico, las composiciones y mezclas descritas anteriormente en la presente memoria comprenden el anticuerpo y la sustancia biológicamente activa, respectivamente, en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Otros compuestos que se pueden utilizar adecuadamente en las mezclas combinados con el anticuerpo descrito en la presente memoria se describen, por ejemplo, en el documento WO 2004/058258 (véanse especialmente las páginas 16 y 17) que incluye las dianas de los fármacos terapéuticos (páginas 36-39), ácidos alcanosulfónicos y ácidos alcanolsulfúricos (páginas 39-51), inhibidores de la colinesterasa (páginas 51-56), antagonistas de los receptores NMDA (páginas 56-58), estrógenos (páginas 58-59), fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (páginas 60-61), antioxidantes (páginas 61-62), antagonistas del receptor activado de proliferador de peroxisomas (PPAR) (páginas 63 a 67), agentes reductores del colesterol (páginas 68 a 75); inhibidores de amiloides (páginas 75-77), inhibidores de la formación de amiloides (páginas 77 a 78), quelantes de metales (páginas 78 a 79), antipsicóticos y antidepresivos (páginas 80-82), suplementos nutricionales (páginas 83-89) y compuestos que aumentan la disponibilidad de sustancias biológicamente activas en el cerebro (véanse las páginas 89-93) y profármacos (páginas 93 y 94).

Adicionalmente se describe un método para producir un anticuerpo, particularmente un método para producir un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo tal como se describe en la presente memoria, cuyo método comprende la producción de anticuerpos, pero concretamente de anticuerpos monoclonales contra un constructo antigénico supramolecular que comprende un péptido antigénico correspondiente a la secuencia de aminoácidos del péptido β-amiloide, particularmente del péptido β-amiloide $Aß_{1-15}$, $Aß_{1-16}$ y $Aß_{1-16(\Delta 14)}$, modificado con radicales hidrófobos, tales como, por ejemplo, ácido palmítico o un radical hidrófilo tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o una combinación de ambos, en el que dichos radicales hidrófobo e hidrófilo, respectivamente, están unidos covalentemente a cada extremo a través de al menos uno, concretamente uno o dos, aminoácidos tales como, por ejemplo, lisina o cualquier otro aminoácido adecuado o análogo de aminoácido capaz de servir como un dispositivo de acoplamiento o molécula conectora para el acoplamiento de dichos radicales hidrófobo e hidrófilo tales como, por ejemplo, ácido glutámico o cisteína.

También se describe el uso de un anticuerpo monoclonal y/o una porción funcional del mismo como se ha descrito anteriormente en la presente memoria y/o una composición farmacéutica, o una mezcla que comprende dicho anticuerpo, para la preparación de un medicamento para tratar o aliviar los efectos de las enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placa amiloide incluyendo la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, tales como enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA) y enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); complejo de Parkinson-demencia de Guam, así como otras enfermedades que se basan en o están asociadas con las proteínas de tipo amiloide, tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (MCI), diabetes de comienzo en la edad adulta; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluyendo degeneración macular. Adicionalmente se describe un método para la preparación de una composición farmacéutica que utiliza un anticuerpo como se describe en la presente memoria y/o una porción funcional del mismo, pero en especial un anticuerpo monoclonal y/o una porción funcional del mismo o un anticuerpo funcionalmente equivalente, para uso en el tratamiento o alivio de los efectos de las enfermedades y trastornos que están causados por, o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placa amiloide incluyendo la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, tales como enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, trastornos

neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA) y enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); complejo de Parkinson-demencia de Guam, así como otras enfermedades que se basan en o están asociadas con las proteínas de tipo amiloide, tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de comienzo en la edad adulta; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluyendo degeneración macular que comprende la formulación de un anticuerpo de acuerdo con la invención en una forma farmacéuticamente aceptable.

Los anticuerpos y/o porciones funcionales de los mismos, pero especialmente los anticuerpos monoclonales y/o porciones funcionales de los mismos o un anticuerpo funcionalmente equivalente y las composiciones y mezclas que comprenden dicho anticuerpo descritas en la presente memoria se pueden utilizar para la preparación de un medicamento para prevenir, tratar o aliviar los efectos de las enfermedades y trastornos que están causados por, o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placa amiloide incluyendo la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad que incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos tal como la enfermedad de Alzheimer (EA), incluyendo enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); complejo de Parkinson-demencia de Guam, así como otras enfermedades que se basan en o están asociadas con las proteínas de tipo amiloide, tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (MCI), diabetes de comienzo en la edad adulta; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluyendo la degeneración macular.

En un aspecto adicional se describe un método para reducir la carga de placa en el cerebro de un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección que conduce a un aumento de la carga de placa en el cerebro que comprende administrar a un animal, concretamente un mamífero, más concretamente un ser humano que necesite tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo y/o una porción funcional del mismo, pero especialmente del anticuerpo monoclonal y/o una porción funcional del mismo o de un anticuerpo funcionalmente equivalente como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, o una composición o una mezcla que comprende dicho anticuerpo.

En particular, la carga de placa se reduce en al menos 20%, concretamente en al menos 25%, más concretamente en al menos 30%, incluso más concretamente en más de un 30%.

En un aspecto adicional se describe un método para reducir la cantidad de placas en el cerebro de un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección que conduce a un aumento de la carga de placa en el cerebro, que comprende administrar a un animal, particularmente un mamífero, más concretamente un ser humano que necesite tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo y/o una porción funcional del mismo, pero concretamente del anticuerpo monoclonal y/o una porción funcional del mismo o de un anticuerpo funcionalmente equivalente como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, o una composición o una mezcla que comprende dicho anticuerpo.

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

En otro aspecto más, se describe un método para disminuir la cantidad total de Aß soluble en el cerebro de un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección que conduce al aumento de las concentraciones de Aß solubles en el cerebro, que comprende administrar a un animal, particularmente un mamífero, más concretamente un ser humano que necesite tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo y/o una porción funcional del mismo, pero concretamente del anticuerpo monoclonal y/o una porción funcional del mismo o de un anticuerpo funcionalmente equivalente como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, o una composición o una mezcla que comprende dicho anticuerpo.

Un objetivo es describir un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de las enfermedades y trastornos que están causados por, o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide incluyendo la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad que incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), incluyendo enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); complejo de Parkinson-demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan en o están asociadas con las proteínas de tipo amiloide, tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld Jacob,

enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (MCI), diabetes de comienzo en la edad adulta; amiloidosis senil cardiaca; tumores endocrinos, y otros, incluyendo la degeneración macular, mediante la administración de un anticuerpo, pero en particular un anticuerpo monoclonal o una composición o mezcla que comprende un anticuerpo tal como se describe en la presente memoria a un animal o un ser humano afectado por un trastorno de este tipo, que comprende administrar a un animal, particularmente un mamífero, más concretamente un ser humano que necesite tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo y/o una porción funcional del mismo, pero concretamente del anticuerpo monoclonal y/o una porción funcional del mismo o de un anticuerpo funcionalmente equivalente como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, o una composición o una mezcla que comprende dicho anticuerpo.

En un aspecto específico se describe un método para mantener o aumentar la capacidad de memoria cognitiva de un animal, particularmente un mamífero o un ser humano que padece deterioro de la memoria mediante la administración a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano que necesite tal tratamiento, de un anticuerpo, pero en particular un anticuerpo monoclonal como se describe en la presente memoria o una composición o mezcla que comprende un anticuerpo tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

En otro aspecto, se describe un método para la preparación de una composición farmacéutica utilizando un anticuerpo como se describe en la presente memoria y/o una porción funcional del mismo, pero en especial un anticuerpo monoclonal y/o una porción funcional del mismo o un anticuerpo funcionalmente equivalente para prevenir, tratar o aliviar los efectos de las enfermedades y trastornos que están causados por, o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide incluyendo la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, tales como enfermedades que incluyen, pero no se limitan a , trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), incluyendo enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); complejo de Parkinson-demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan en o están asociadas con las proteínas de tipo amiloide, tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (MCI), diabetes de comienzo en la edad adulta, amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluyendo la degeneración macular.

Adicionalmente se describe en la presente memoria un método para la preparación de una composición farmacéutica utilizando un anticuerpo como se describe en la presente memoria y/o una porción funcional del mismo, pero en especial un anticuerpo monoclonal y/o una porción funcional del mismo o un anticuerpo funcionalmente equivalente para retener o aumentar la capacidad de memoria cognitiva de un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, que sufre deterioro de la memoria, mediante la administración a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, de un anticuerpo, pero en particular un anticuerpo monoclonal o una composición o mezcla que comprende un anticuerpo tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

Estos y otros objetos, características y ventajas se harán evidentes después de una revisión de la siguiente descripción detallada de los aspectos descritos.

Los términos "polipéptido", "péptido", y "proteína", según se utilizan en la presente memoria, son intercambiables y se definen para representar una biomolécula compuesta por aminoácidos unidos por un enlace peptídico.

Los términos "un", "una", "el" y "la" según se utilizan en la presente memoria se definen para representar "uno o más", e incluyen el plural a menos que el contexto no sea el apropiado.

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

"Amiloide ß, Aß o β-amiloide" es un término reconocido en la técnica y se refiere a proteínas y péptidos β-amiloides, proteína precursora β-amiloide (APP), así como las modificaciones, fragmentos y cualquier equivalente funcional de los mismos. En particular, por amiloide β según se utiliza en la presente memoria se quiere significar cualquier fragmento producido por escisión proteolítica de APP, pero especialmente los fragmentos que están implicados en, o asociados con las patologías amiloides, incluyendo, pero no limitados a, $Aß_{1-38}$, $Aß_{1-39}$, $Aß_{1-40}$, $Aß_{1-41}$, $Aß_{1-42}$ y $Aß_{1-43}$.

La estructura y las secuencias de los péptidos β-amiloides como se ha mencionado anteriormente son bien conocidas por los expertos en la técnica y los métodos de producción de dichos péptidos o para extraerlos del cerebro y otros tejidos son descritos, por ejemplo, por Glenner y Wong, en Biochem Biophys Res Comm 129, 885-890 (1984). Por otra parte, los péptidos β-amiloides también son asequibles comercialmente en diversas formas.

"Fibrilla Aß " o "filamento de Aß " o "fibrillas de amiloide" son formas poliméricas de proteína monomérica que forma fibras individuales o agrupadas con un diámetro de fibra constante que son insolubles en medio acuoso y contienen grandes cantidades de una estructura β cruzada en su núcleo; en gran parte con cadenas beta perpendiculares a los ejes de las fibrillas, 1.2,3)

"Aß monomérico" o "monómero de Aß" son proteína β-amiloides completamente solubilizadas sin complejos agregados en medio acuoso.

"Amiloide soluble polimérico" y "Aß oligomérico" y "oligómero de Aß" 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 organismo de mamíferos o seres humanos, más concretamente en el cerebro, pero particularmente a múltiples monómeros agregados de amiloide β (Aß) o de péptidos de amiloide β modificados o truncados (Aß) o de derivados de los mismos, que son solubles en el organismo de mamíferos o seres humanos, más concretamente en el cerebro, respectivamente.

Por "aislado" se quiere significar una molécula biológica libre de al menos algunos de los componentes con los que aparece naturalmente.

Los términos "anticuerpo" o "anticuerpos", según se utiliza en la presente memoria son un términos reconocido en la técnica y se entiende que se refieren a moléculas o fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos, concretamente a moléculas de inmunoglobulina y a porciones 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 "anticuerpos" dentro del alcance de la presente invención incluya anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, quiméricos, de cadena sencilla biespecífico o bi-eficaces, simianizados, humanos y humanizados, así como fragmentos activos de los mismos. Los ejemplos de los fragmentos activos de las moléculas que se unen a antígenos conocidos incluyen fragmentos Fab y $F(ab')_2$, incluyendo los productos de una biblioteca de expresión de inmunoglobulina Fab y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anticuerpos y fragmentos mencionados anteriormente.

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

Un "anticuerpo humanizado" se refiere a un tipo de anticuerpo manipulado que tiene sus CDR derivadas de una inmunoglobulina donadora no humana, estando derivadas el resto de las porciones derivadas de inmunoglobulina de la molécula de una (o más) inmunoglobulinas humanas. Además, los residuos de soporte del marco se pueden alterar para conservar la afinidad de unión. Los métodos para obtener "anticuerpos humanizados" son bien conocidos por los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al., Biol./Technoloy, 9:421 (1991)).

También se puede obtener un "anticuerpo humanizado" mediante un nuevo enfoque de ingeniería genética que permite la producción de anticuerpos policlonales de tipo humano madurados por afinidad en animales grandes, tales como, por ejemplo, conejos (http://www.rctech.com/bioventures/therapeutic. php).

El término "anticuerpo monoclonal" también es bien reconocido en la técnica y se refiere a un anticuerpo que es producido en masa en el laboratorio a partir de un único clon y que solo reconoce un antígeno. Los anticuerpos monoclonales se elaboran típicamente fusionando una célula B productora de anticuerpo, normalmente de vida corta a una célula de crecimiento rápido, tal como una célula cancerosa (a veces referida como célula "inmortal"). La célula híbrida resultante, o hibridoma, se multiplica rápidamente, creando un clon que produce grandes cantidades del anticuerpo.

Para el propósito de la presente invención, también se debe entender que "anticuerpo monoclonal" comprende anticuerpos que son producidos por un clon madre que todavía no ha alcanzado una monoclonalidad completa.

Se entiende que "anticuerpo funcionalmente equivalente" dentro del alcance de la presente invención hace referencia a un anticuerpo que comparte sustancialmente al menos una propiedad funcional importante con un anticuerpo mencionado anteriormente y descrito en la presente memoria que comprende: especificidad de unión a la proteína β-amiloide, concretamente a la proteína $Aß_{1-42}$, y más concretamente a la región epitópica 4-16 de la proteína $Aß_{1-42}$, inmunorreactividad *in vitro,* inhibición de la agregación de los monómeros de $Aß_{1-42}$ en fibrillas

poliméricas de alto peso molecular y/o desagregación de fibrillas poliméricas de $Aß_{1-42}$ preformadas, y/o una propiedad de rotura de la lámina β y que alivia los efectos de las enfermedades y trastornos que son causados por o asociados con las proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide incluyendo la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, tales como enfermedades que incluyen, pero no están limitadas a, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Aizheimer (AD), incluyendo enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); complejo de Parkinson-demencia 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 Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (MCI), diabetes de comienzo en la edad adulta; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluyendo degeneración macular, cuando se administra profilácticamente o terapéuticamente. Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase tal como IgG, IgM, o IgA, etc. o cualquier subclase, tal como IgG1, IgG2a, etc. y otras subclases mencionadas anteriormente en la presente memoria o conocidas en la técnica, pero en particular de la clase IgG2. Adicionalmente, los anticuerpos pueden ser producidos mediante cualquier método, tal como presentación en fagos, o producidos en cualquier organismo o línea celular, incluyendo bacterias, insectos, mamíferos u otro tipo de célula o línea celular que produce anticuerpos con las características deseadas, tales como anticuerpos humanizados . Los anticuerpos también se pueden formar mediante la combinación de una porción Fab y una región Fc de especies diferentes.

El término "biespecífico" o "bifuncional" y "bi-efectivo" se utilizan como sinónimos dentro del alcance de esta solicitud para caracterizar un anticuerpo que exhibe tanto una propiedad de inhibición en la formación de fibras de amiloide o de tipo amiloide, como una propiedad de desagregación de fibras de amiloide o de tipo amiloide.

El término "antígeno" se refiere a una entidad o fragmento de la misma que puede inducir una respuesta inmune en un organismo, concretamente un animal, más concretamente un mamífero, incluyendo un ser humano. El término incluye inmunógenos y regiones responsables de la antigenicidad o determinantes antigénicos.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "soluble" significa parcial o totalmente disuelto en una solución acuosa.

Asimismo según se utiliza en la presente memoria, el término "inmunogénico" se refiere a sustancias que provocan o potencian la producción de anticuerpos, células T y otras células inmunitarias reactivas dirigidas contra un agente inmunogénico y contribuyen a una respuesta inmunitaria en seres humanos o animales.

Una respuesta inmunitaria se produce ocurre cuando un individuo produce suficientes anticuerpos, células T y otras células inmunitarias reactivas contra as composiciones inmunogénicas administradas de la presente invención para moderar o aliviar el trastorno que se vaya a tratar.

"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 organismo de un mamífero o ser humano, más concretamente en el cerebro, pero particularmente a múltiples monómeros agregados de amiloide β (Aß) o de péptidos de amiloide β (Aß) modificados o truncados o de sus derivados, que son solubles en el organismos de un mamífero o ser humano, más concretamente en el cerebro.

El término "hibridoma" es reconocido en la técnica y los expertos normales en la técnica entienden que hace referencia a una célula producida por la fusión de una célula productora de anticuerpos y una célula inmortal, p. ej., una célula de mieloma múltiple. Esta célula híbrida es capaz de producir un suministro continuo de anticuerpos. Véase la definición de "anticuerpo monoclonal" más arriba y los ejemplos siguientes para obtener una descripción más detallada del método de fusión.

El término "portador", según se utiliza en la presente memoria significa una estructura en la que un péptido antigénico o constructo supramolecular se pueden incorporar a o se pueden asociar con, presentando y exponiendo de este modo los péptidos antigénicos o parte del péptido al sistema inmunológico de un ser humano o un animal. Cualquier partícula que se pueda utilizar adecuadamente en la terapia de animales o seres humanos, tales como, por ejemplo, una vesícula, una partícula o un cuerpo particulado se pueden utilizar como un vehículo en el contexto de la presente invención.

El término "portador" comprende adicionalmente métodos de liberación en los que las composiciones de constructo antigénico supramolecular que comprenden el péptido antigénico pueden ser transportadas a los lugares deseados mediante mecanismos de liberación. Un ejemplo de tal sistema de liberación utiliza metales coloidales tales como oro coloidal.

Además, el término "portador" comprende, adicionalmente, mecanismos de liberación conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) y otros coadyuvantes.

En el constructo antigénico supramolecular descrito en la presente memoria, el liposoma puede tener una doble función ya que puede ser utilizado como un vehículo que comprende el constructo supramolecular como se ha descrito anteriormente en la presente memoria y, al mismo tiempo, funciona como un coadyuvante para aumentar o estimular la respuesta inmunitaria en el animal o ser humano diana que se vaya a tratar con la vacuna terapéutica descrita en la presente memoria. También se debe entender que las composiciones de constructo antigénico supramolecular de la presente invención pueden comprender adicionalmente otros coadyuvantes, tales como, por ejemplo, lípido A, alumbre, fosfato de calcio, interleucina 1, y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas, pero en particular un lípido A destoxificado, tal como lípido A monofosforilado o difosforilado, o alumbre, conservantes, diluyentes, emulsionantes, estabilizadores adicionales, y otros componentes que son conocidos y utilizados en las vacunas de la técnica anterior. Por otra parte, se puede utilizar cualquier sistema coadyuvante conocido en la técnica en la composición descrita en la presente memoria. Tales coadyuvantes incluyen, pero no se limitan a, coadyuvante incompleto de Freund, coadyuvante completo de Freund, manano acetilado con uniones ß-(1,4) polidisperso ("Acemanano"), TI-TERMAX® (coadyuvantes de copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno de CytRx Corporación), coadyuvantes lipídicos modificados de Chiron Corporation, coadyuvantes derivados de saponina de Cambridge Biotech, *Bordetella pertussis* muerta, el lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram-negativas, aniones poliméricos grandes tales como sulfato de dextrano, y geles inorgánicos tales como alumbre, hidróxido de aluminio, o fosfato de aluminio.

Las proteínas portadoras que se pueden utilizar en las composiciones de constructo antigénico supramolecular descritas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, proteína de unión a maltosa "MBP"; albúmina de suero bovino "BSA"; hemocianina de lapa de ojo de cerradura "KLH"; ovalbúmina; flagelina; tiroglobulina; albúmina de suero de cualquier especie; gammaglobulina de cualquier especie; células singénicas; células singénicas que portan antígenos la, y polímeros de D- y/o L-aminoácidos.

Adicionalmente, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" hace referencia a la cantidad de anticuerpo que, cuando se administra a un ser humano o animal, provoca una respuesta inmunitaria que es suficiente para producir un efecto terapéutico en dicho ser humano o animal. La cantidad eficaz es determinada fácilmente por un experto en la técnica siguiendo los procedimientos rutinarios.

La "homología" entre dos secuencias se determina por la identidad de secuencia. Si dos secuencias que se van a comparar entre sí difieren en longitud, la identidad de secuencia hace referencia preferiblemente al porcentaje de residuos de nucleótidos de la secuencia más corta que son idénticos a los residuos de nucleótidos de la secuencia más larga. La identidad de secuencia se puede determinar convencionalmente mediante el uso de programas informáticos, tales como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711). Bestfit utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489, con el fin de encontrar el segmento que tiene la identidad de secuencia más alta entre dos secuencias. Cuando se usa Bestfit o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia concreta tiene por ejemplo una identidad de 95% con una secuencia de referencia de la presente invención, los parámetros se ajustan preferiblemente de modo que el porcentaje de identidad se calcula a lo largo de toda la longitud de la secuencia de referencia y se permite espacios de homología de hasta 5% del número total de los nucleótidos en la secuencia de referencia. Cuando se utiliza Bestfit, los denominados parámetros opcionales se dejan preferiblemente en sus valores preestablecidos ("por defecto"). Las desviaciones que aparecen en la comparación entre una secuencia proporcionada y las secuencias anteriormente descritas de la invención pueden estar causadas por ejemplo por adición, deleción, sustitución, inserción o recombinación. Tal comparación de secuencias también se puede llevar a cabo preferiblemente cabo con el programa "fasta20u66" (versión 2.0u66, Septiembre de 1998 por William R. Pearson y la Universidad de Virginia; véanse también W.R. Pearson (1990), Methods in Enzymology 183, 63-98, los ejemplos adjuntos y http://workbench.sdsc.edu/). Para este fin, se pueden utilizar los ajustes de los parámetros "por defecto".

El término "hibridar" según se utiliza se refiere a condiciones de hibridación convencionales, preferiblemente a condiciones de hibridación en las que se utiliza 5xSSPE, SDS al 1%, 1x solución de Denhardt como solución y/o las temperaturas de hibridación s e encuentran entre 35°C y 70°C, preferiblemente 65°C. Después de la hibridación, el lavado se lleva a cabo preferiblemente primero con 2 x SSC, SDS al 1% y posteriormente con 0,2 x SSC a temperaturas entre 35°C y 70°C, preferiblemente a 65°C (con respecto a la definición de SSPE, SSC y solución de Denhardt véase Sambrook et. al loc. cit). Las condiciones de hibridación rigurosas como por ejemplo las descritas en por Sambrook et al., supra, son particularmente preferidas. Las condiciones de hibridación rigurosas particularmente preferidas están presentes por ejemplo si se producen la hibridación y lavado a 65°C como se ha indicado anteriormente. Las condiciones de hibridación no rigurosas, por ejemplo, llevándose a cabo la hibridación y el lavado a 45°C son menos preferidas y a 35°C incluso menos.

La presente invención puede entenderse más fácilmente mediante referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones específicas incluidas en la presente memoria. Aunque la presente invención ha sido descrita con referencia a detalles específicos de ciertas realizaciones de la misma, no se pretende que tales detalles sean considerados como limitaciones del alcance de la invención.

También se describen en la presente memoria son anticuerpos y porciones funcionales de los mismos que son anticuerpos conformacionalmente sensibles. Estos anticuerpos reconocen epítopos específicos en una amplia variedad de antígenos proteicos amiloides. Los anticuerpos son útiles para la intervención diagnóstica y terapéutica en enfermedades y enfermedades y trastornos que son causados por, o están asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide tales como la proteína Aß implicada en la enfermedad de Alzheimer.

Los anticuerpos se administran a los individuos para inmunizarlos pasivamente contra una variedad de enfermedades o trastornos, incluyendo pero no limitados a, enfermedades asociadas con la proteína amiloide tales como la enfermedad de Alzheimer.

Los anticuerpos proporcionados en la presente memoria son anticuerpos monoclonales o policlonales que tienen especificidad de unión para los péptidos antigénicos representativos de diversos trastornos que están asociados con la proteína amiloide tales como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria se preparan mediante la inmunización de un animal, tal como un ratón, rata, conejo o cualquier otra especie animal que pueda producir anticuerpos nativos o humanos, con una composición con el constructo antigénico supramolecular.

Los constructos antigénicos supramoleculares descritos en la presente memoria generalmente comprenden péptidos modificados para mejorar el efecto antigénico en donde tales péptidos son modificados por medio de pegilación (utilizando polietilenglicol o polietilenglicol modificado), o modificados por medio de otros métodos tales como, ácido palmítico, poli-aminoácidos (p. ej., poli-glicina, poli-histidina), poli-sacáridos (p. ej., poli(ácido galacturónico), poli(ácido láctico), poliglicólido, quitina, quitosano), polímeros sintéticos (poliamidas, poliuretanos, poliésteres) o copolímeros (p. ej., poli (ácido metacrílico) y N-(2-hidroxi)propilmetacrilamida) y similares.

La modificación por medio de ácido palmítico (palmitoilación), si bien proporciona un ancla para el péptido en la bicapa de liposomas, debido a la reducida longitud relativa del radical de ácido graso $C_{16:0}$ conduce a la colocación del péptido prácticamente en la superficie del liposoma. Por lo tanto, las células que procesan el antígeno tendrán que absorber 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.

Adicionalmente se describe en la presente memoria un péptido amiloide 1-15 modificado utilizado en la preparación de un anticuerpo, concretamente un anticuerpo monoclonal como se describe en la presente memoria. El péptido amiloide 1-15 modificado puede ser sintetizado siguiendo el método descrito por Nicolau et al. 2002. El enfoque referido por Nicolau et al. implica modificar el péptido antigénico por medio de un injerto en resina de un radical lipófilo o hidrófobo, en los residuos de aminoácido terminales de un péptido preformado dando como resultado un producto de pureza considerablemente elevada. En particular, un ácido amino protegido, concretamente un aminoácido protegido con Fmoc, se ancla a una resina utilizando la química de acoplamiento conocida. El grupo protector se elimina y se acopla un segundo residuo de aminoácido protegido. A continuación se utilizan la síntesis de péptidos automatizada convencional empleando la química de protección conocida, concretamente la química Fmoc/tBu, y grupos protectores de la cadena lateral convencionales para la síntesis del péptido antigénico $Aß_{1-15}$ mediante el acoplamiento de los aminoácidos 1 a 15 de la proteína amiloide $Aβ_{1-42}$ para producir el fragmento peptídico con una secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 1. En una etapa final se acoplan dos aminoácidos protegidos adicionales al fragmento peptídico en crecimiento. Los grupos Mtt se pueden escindir a continuación selectivamente y acoplar a ácido palmítico. Después del lavado de la resina, se elimina el grupo protector y la resina se escinde de forma simultánea, seguido de las desprotecciones de las cadenas laterales utilizando la metodología estándar. El producto final se puede obtener a continuación con una alta pureza y confirmar su identidad por medio de métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, espectrometría de masas por electropulverización.

El radical lipófilo o hidrófobo descrito en la presente memoria puede ser un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido en donde la cadena principal carbonada del ácido graso tiene al menos 10 átomos de carbono. Concretamente, el radical lipófilo o hidrófobo es un ácido graso con una cadena principal carbonada de al menos aproximadamente 14 átomos de carbono y hasta aproximadamente 24 átomos de carbono, siendo también parte de la descripción cada número individual de átomos de carbono en entra dentro de este intervalo. Más concretamente, el radical lipófilo o hidrófobo tienen una cadena principal carbonada de al menos 14 átomos de carbono. Los ejemplos de los radicales hidrófobos incluyen, pero no se limitan a, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico y colesterol o DSPE. El radical lipófilo o hidrófobo es el ácido palmítico.

Para mejorar la respuesta inmunitaria, se puede aplicar adecuadamente otra ancla/espaciador para reconstituir el péptido en el liposoma, p. ej., polietilenglicol (PEG).

El PEG es anclado covalentemente a un residuo de aminoácido unido a ambos extremos del péptido, concretamente un residuo de aminoácido Glu, Cys o Lys o cualquier otro residuo de aminoácido que se pueda utilizar adecuadamente para unir covalentemente PEG al péptido. En el otro extremo de la cadena se puede unir covalentemente un radical hidrófobo para que funcione como elemento de anclaje en la bicapa del liposoma, tal como, por ejemplo, fosfatidiletanolamina (PEA). De este modo, el liposoma todavía funciona como coadyuvante y el péptido que está suficientemente lejos de la bicapa se puede procesar solo y de este modo aumenta su inmunogenicidad en comparación con el antígeno palmitoilado.

En ciertos aspectos, los constructos antigénicos supramoleculares descritos comprenden una secuencia peptídica, anclada covalentemente a la 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, concretamente de n = 10 a n = 80.000, más concretamente de n = 20 a n = 10.000. En un aspecto específico la longitud de la cadena de PEG no es mayor de n = 45, concretamente entre n = 5 y n = 40, más concretamente entre n = 10 y n = 30, y aún más concretamente n = 10.

Los constructos supramoleculares descritos en la presente memoria se pueden sintetizar utilizando la síntesis de péptidos automatizada y la química de protección conocida, concretamente la química de Fmoc/tBu y los grupos protectores de cadena lateral convencionales. Típicamente, la pegilación de los péptidos da como resultado mezclas de regioisómeros.

Para lograr un anclaje específico del sitio de un producto conjugado de PEG-lípido tanto para el extremo C como para el extremo N de Aß se pueden utilizar péptidos parcialmente protegidos. Para aquellas secuencias peptídicas que contienen residuos de Lys o His internos, se añade a cada extremo una Lys (ivDde) protegida ortogonalmente. Se puede añadir una Gly adicional al extremo C para facilitar la síntesis. El grupo protector se elimina y se N-acetila utilizando anhídrido acético seguido de la escisión selectiva de los grupos ivDde.

Se debe dar prioridad a una resina, especialmente una resina de 2-clorotritilo, que sea sensible a los ácidos y por lo tanto permita el aislamiento de péptidos protegidos.

En un aspecto específico, la reacción de acoplamiento se lleva a cabo en fase de solución. La escisión selectiva de la resina en condiciones suaves libera a continuación los péptidos protegidos internamente.

Los acoplamientos en fase de disolución se lograron con éxito con los péptidos derivados de una secuencia de proteína β-amiloide tal como, por ejemplo, un $Aß_{1-16}$ (SEQ ID NO: 2) a una molécula de PEG modificada por un ácido graso - fosfatidilcolina tal como, por ejemplo, DSPE. La separación de los productos mono-y di-acoplados antes de las desprotecciones finales de las cadenas laterales se puede lograr mediante el uso una cromatografía de intercambio catiónico. La posterior desprotección de las cadenas laterales de los péptidos conduce al aislamiento de los productos conjugados deseados con una pureza aceptable. La purificación se puede lograr mediante métodos bien conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, HPLC etc.

Este enfoque para la síntesis de antígenos ß-amiloides de lípido-PEG N- y C-terminales utilizando péptidos protegidos es aplicable a una amplia variedad de secuencias peptídicas.

A continuación se pueden preparar los antígenos liposomales descritos en la presente memoria como describen Nicolau et al., 2002. El péptido antigénico amiloide Aß modificado, concretamente el péptido antigénico y $Aß_{1-15}$, $Aß_{1-16}$, $Aß_{1-16(Δ14)}$, $Aß_{22-35}$ y $Aß_{29-40}$ palmitoilado modificado con PEG puede ser reconstituido en un constructo que consiste en liposomas, concretamente liposomas compuestos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPEA), dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) y colesterol, que contienen opcionalmente lípido A monofosforilado.

En un aspecto específico se utilizan liposomas con lípido A como coadyuvante para preparar la vacuna anti-amiloide. Se mezclan dimiristoilfosfatidil-colina, -glicerol y colesterol, concretamente a una razón molar de 0,9:1,0:0,7. A continuación, se añade un inmunomodulador fuerte tal como, por ejemplo, lípido A monofosforilado a una concentración adecuada, concretamente a una concentración entre 30 y 50 mg por mmol, más concretamente a 40 mg por mmol de fosfolípido. El péptido Aß antigénico modificado se añade a continuación a una razón molar de péptido con respecto a fosfolípido entre 1:30 y 1:200, concretamente a una razón molar de entre 1:50 y 1:120, más concretamente 1:100. Los disolventes se eliminan, por ejemplo, mediante evaporación, y la película resultante se hidrata con solución de tampón estéril, tal como, por ejemplo PBS.

Los liposomas se pueden preparar también mediante la técnica de inyección de flujo cruzado como describen, por ejemplo, Wagner et al (2002) en Journal of Liposome Research Vol. 12(3), págs. 259-270. Durante la inyección de disoluciones de lípidos en un sistema tampón acuoso, los lípidos tienden a formar "precipitados", seguido por auto-ordenamiento en vesículas. El tamaño de las vesículas obtenidas depende de factores tales como la concentración

de lípidos, la velocidad de agitación, la velocidad de inyección, y la elección de los lípidos. El sistema de preparación puede consistir en un módulo de inyección de flujo cruzado, recipientes para la fase polar (p. ej., una solución tampón de PBS), un recipiente para la disolución de etanol/lípido y un dispositivo de presión, pero en particular un dispositivo de presión de nitrógeno. Mientras que la disolución acuosa o polar se bombea a través del módulo de inyección de flujo cruzado la disolución de etanol/lípido se inyecta en la fase polar aplicando diferentes presiones.

El liposoma todavía funciona como un coadyuvante y el péptido que todavía está suficientemente lejos de la bicapa se puede procesar solo y de ese modo aumenta su inmunogenicidad en comparación con el antígeno palmitoilado.

El extremo de PEG libre está anclado covalentemente a una molécula de fosfatidil-etanolamina (donde el ácido graso puede ser: mirístico, palmítico, esteárico, oleico, etc. o una combinación de los mismos) para funcionar como elemento de anclaje. Esta estructura supramolecular puede ser anclada mediante reconstitución en liposomas que consisten en fosfolípidos y colesterol (fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, colesterol a diversas razones molares. Se pueden utilizar otros fosfolípidos. El lípido A se utiliza a una concentración de aproximadamente 40 g/pmol de fosfolípido.

En ciertos aspectos, los constructos antigénicos supramoleculares palmitoilados o pegilados comprenden un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos del β-amiloide. Los péptidos también pueden comprender o corresponder a péptido beta amiloide completo y fragmentos activos del mismo. Adicionalmente, los péptidos pueden comprender además $Aß_{1-16}$ (SEQ ID NO: 2); $Aß_{1-16(\Delta 14)}$; (SEC ID NO: 3); $Aß_{1-15}$ (SEQ ID NO: 1); y fragmentos activos de los mismos.

Para originar y preparar los anticuerpos y para determinar de la inmunogenicidad del antigénico Aß modificado, se inmuniza un animal adecuado seleccionado del grupo que consiste en ratones, ratas, conejos, cerdos, aves, etc., pero en particular ratones, especialmente ratones C57BU6 con el péptido antigénico. La inmunogenicidad del constructo antigénico se determina mediante el sondeo muestras de suero a intervalos de tiempo adecuados después de la inmunización utilizando un inmunoanálisis tal como, por ejemplo, un análisis ELISA.

Los anticuerpos monoclonales descritos en la presente memoria se pueden preparar utilizando mecanismos de clonación y de fusión células clásicos bien conocidos en la técnica. El inmunógeno (antígeno) de interés, se administra típicamente (p. ej., inyección intraperitoneal) a ratones de tipo salvaje o endogámicos (p. ej., ratones BALTIC o especialmente C57BU6), ratas, conejos u otras especies animales o ratones transgénicos que pueden producir anticuerpos nativos o humanos. El inmunógeno se puede administrar solo, o mezclado con coadyuvante, o se puede expresar a partir de un vector (vector replicón VEE, vaccinia), o en forma de ADN, o en forma de 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 a proteínas portadoras, tales como, por ejemplo, beta-galactosidasa, glutatión S-transferasa, hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH), y albúmina de suero bovino. En estos casos, los péptidos sirven como haptenos con las proteínas portadoras. Una vez que el animal recibe un refuerzo, por ejemplo, dos o más veces, las células del bazo se cosechan a partir de los animales inmunizados y se generan hibridomas fusionando las células de bazo sensibilizadas con una línea celular de mieloma, tal como células de mieloma SP2/O murinas (ATCC, Manassas, VA) utilizando los procedimientos 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)).

En un aspecto específico el constructo antigénico descrito en la presente memoria, concretamente una composición de vacuna que comprende dicho constructo antigénico en una forma farmacéuticamente aceptable, se administra en dosis repetidas, concretamente, en 1 a 15 dosis, más concretamente en 2 a 10 dosis, incluso más concretamente en 3 a 7 dosis, pero especialmente en 4 a 6 dosis, a intervalos de tiempo entre 1 y 10 semanas, concretamente a intervalos de tiempo entre 1 y 6 semanas, más concretamente a intervalos de tiempo entre 1 y 4 semanas, y aún más concretamente a intervalos de tiempo de entre 2 y 3 semanas. La respuesta inmunitaria se controla tomando muestras de Suero en un momento adecuado después del refuerzo, concretamente de 3 a 10 días después del refuerzo, más concretamente de 4 a 8 días después del refuerzo y más concretamente de 5 a 6 días después del refuerzo y determinando la inmunogenicidad del constructo antigénico utilizando la metodología conocida, concretamente uno de los inmunoanálisis utilizados comúnmente tales como, por ejemplo, un análisis ELISA.

La inmunización con el constructo antigénico descrito en la presente memoria, pero concretamente con una composición de vacuna que comprende el constructo antigénico descrito en la presente memoria 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, concretamente linfocitos B con una línea celular de crecimiento continuo o inmortal, tal como una línea celular de mieloma. Se induce la fusión de las células mediante la adición de polietilenglicol. Los títulos terapéuticos son aquellos que producen un resultado positivo en un análisis ELISA a una dilución de entre 1:4000 y 1:6000, concretamente de entre 1:4500 y 1:5500, más concretamente de 1:5000.

Las células híbridas resultantes se clonan a continuación de la manera convencional, p. ej., utilizando dilución limitante, y los clones resultantes, que producen los anticuerpos monoclonales deseados, se cultivan.

Los hibridomas así obtenidos se seleccionan químicamente cultivando en placa las células en un medio de selección que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT).

Los hibridomas se escrutan a continuación para determinar su capacidad para producir anticuerpos monoclonales contra enfermedades o trastornos asociados con amiloides específicos. Los hibridomas que producen los anticuerpos de interés se clonan, se expanden y se almacenan congelados para la producción futura. El hibridoma preferido produce un Anticuerpo monoclonal que tiene el isotipo IgG, más preferiblemente el isotipo IgG2.

El anticuerpo policlonal se prepara mediante la inmunización de animales, tales como ratones o conejos, o cualquier otro animal adecuado con composiciones de constructos antigénicos supramoleculares descritos en la presente memoria. A continuación se recoge el suero sanguíneo de los animales, y los anticuerpos del suero se escrutan para determinar la reactividad de unión contra el antígeno amiloide.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden preparar en una formulación fisiológicamente aceptable y pueden comprender un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptables utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, el anticuerpo descrito anteriormente en la presente memoria, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo, concretamente, el anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o porciones funcionales del mismo se combinan con un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptables para formar una composición terapéutica. Los vehículos, diluyentes y/o excipiente farmacéuticos adecuados son bien conocidos 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.

La formulación de la composición farmacéutica descrita en la presente memoria se puede completar de acuerdo con la metodología convencional conocida por los expertos en la técnica.

Las composiciones descritas en la presente memoria se pueden administrar a un sujeto en forma de un sólido, líquido o aerosol a una dosis farmacéuticamente eficaz, adecuada. Los ejemplos de las composiciones sólidas incluyen píldoras, cremas y unidades de dosificación implantables. Las píldoras se pueden administrar por vía oral. Las cremas terapéuticas se pueden administrar por vía tópica. Las unidades de dosificación implantables se pueden administrarse localmente, por ejemplo, en un sitio del tumor, o se pueden implantar para la liberación sistemática de la composición terapéutica, por ejemplo, por vía subcutánea. Los ejemplos de las 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 las formulaciones en aerosol incluyen formulaciones para inhaladores para la administración a los pulmones.

Las composiciones se pueden administrar mediante rutas de administración convencionales. En general, la composición se puede administrar por vía tópica, oral, rectal, nasal, interdérmica, intraperitoneal, o parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, o intramuscular). Además, la composición se puede incorporar a matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, siendo implantados los polímeros en las proximidades en las que se desea la liberación, por ejemplo, en el sitio de un tumor. El método incluye la administración de una dosis única, la administración de dosis repetidas a intervalos de tiempo predeterminados, y la administración sostenida durante un período de tiempo predeterminado.

Una matriz de liberación sostenida, según se utiliza en la presente memoria, es una matriz formada de materiales, normalmente polímeros, que son degradables por hidrólisis enzimática o ácido/base o mediante disolución. Una vez insertada en el organismo, la matriz sufre la acción de las enzimas y fluidos corporales. La matriz de liberación sostenida se elige deseablemente entre materiales biocompatibles tales como liposomas, polilactidas (poli(ácido láctico)), poliglicólido (polímero de ácido glicólico), polilactida co-glicolido (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), polianhídridos, poli(orto)ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, sulfato de condroitina, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, poliaminoácidos, aminoácidos tales fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, polivinilpropileno, polivinilpirrolidona y silicona. Una matriz biodegradable preferida es una matriz de uno cualquiera de polilactida, poliglicólido, o polilactida co-glicolido (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico).

Es bien conocido por los expertos en la técnica pertinente que la dosificación de la composición dependerá de varios factores tales como, por ejemplo, la afección de que se está tratando, la composición particular utilizada, y otros factores clínicos tales como el peso, el tamaño, el sexo y estado de salud general del paciente, el área de superficie corporal, el compuesto o la composición concretos que se van a administrar, otros fármacos que se están administrando al mismo tiempo, y la ruta de administración.

La composición se puede administrar combinada con otras composiciones que comprenden una sustancia o compuesto biológicamente activos, concretamente al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste de

compuestos contra el estrés oxidativo, compuestos anti-apoptóticos, quelantes de metales, inhibidores de la reparación del ADN, tales como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de secretasa, inhibidores de β- y γ-secretasa, proteínas tau, neurotransmisores, desorganizadores de la lámina β, moléculas anti-inflamatorias, "antipsicóticos atípicos", tales como, por ejemplo, clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina o inhibidores de la colinesterasa (chels) tales como tacrina, rivastigmina, donepezilo, y/o galantamina y otros fármacos y suplementos nutritivos tales como, por ejemplo, vitamina B12, cisteína, un precursor de acetilcolina, lecitina, colina, Ginkgo biloba, acetil-L-carnitina, idebenona, propentofilina, o un derivado de xantina, junto con un anticuerpo como se ha descrito anteriormente en la presente memoria y, opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptables y los procedimientos para el tratamiento de enfermedades.

La materia proteinacea farmacéuticamente activa puede estar presente en cantidades entre 1 ng y 10 mg por dosis. Generalmente, el régimen de administración debe estar en el intervalo entre 0,1 µg y 10 mg del anticuerpo descrito en la presente memoria, concretamente en el intervalo de 1,0 µg a 1,0 mg, y más concretamente en el intervalo entre 1,0 µg y 100 µg, siendo también parte de la invención todos los números individuales que entran dentro de estos intervalos. Si la administración se produce por medio de infusión continua, una dosificación más adecuada puede estar en el intervalo entre 0,01 µg y 10 mg de unidades por kilogramo de peso corporal por hora siendo también parte de la descripción todos los números individuales que entran dentro de estos intervalos.

La administración será generalmente parenteralmente, p. ej. por vía intravenosa. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas, estériles. Los disolventes no acuosos incluyen, sin estar limitados ellos, propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los disolventes acuosos se pueden seleccionar del grupo que consiste en agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer con lactato añadido o aceites fijados. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores 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 adicionalmente vehículos proteinaceos tales como, por ejemplo, albúmina de suero o inmunoglobulina, concretamente de origen humano. Otros agentes biológicamente activos pueden estar presentes en la composición farmacéutica de la invención dependiendo de su uso pretendido.

En un aspecto adicional, se describen métodos y kits para la detección y el diagnóstico de enfermedades o afecciones asociadas con el amiloide, para el diagnóstico de una predisposición a una enfermedad o afección asociada con el amiloide o para el seguimiento de la enfermedad residual mínima en un paciente o para predecir la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con un anticuerpo o una composición de vacuna como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. Estos métodos incluyen métodos inmunológicos conocidos comúnmente utilizados para la detección o la cuantificación de sustancias en muestras biológicas o en una afección *in situ*.

El diagnóstico de una enfermedad o afección asociada con el amiloide o de una predisposición a una enfermedad o afección asociada con el amiloide en un paciente se puede lograr mediante la detección de la unión inmunoespecífica de un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo del mismo a un epítopo de la proteína amiloide en un muestra o *in situ,* lo que incluye poner la muestra o una parte del organismo o una zona del organismo específicas que se sospecha que contienen el antígeno amiloide en contacto con un anticuerpo que se une a un epítopo de la proteína amiloide, permitiendo que el anticuerpo se una al antígeno amiloide para formar un complejo inmunológico, detectando la formación del complejo inmunológico y correlacionando la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de antígeno de amiloide en la muestra o una parte o zona del organismo específicas, comparando opcionalmente la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal, en donde un aumento en la cantidad de dicho agregado en comparación con un valor de control normal indica que dicho paciente padece o tiene riesgo de desarrollar una enfermedad o afección asociada con el amiloide.

El seguimiento de la enfermedad residual mínima en un paciente después del tratamiento con un anticuerpo o una composición de vacuna como se describe en la presente memoria se puede conseguir mediante la detección de la unión inmunoespecífica de un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo del mismo a un epítopo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ,* lo que incluye poner en contacto la muestra o una parte del organismo o una zona del organismo específicas que se sospecha que contienen el antígeno amiloide con un anticuerpo que se une a un epítopo de la proteína amiloide, permitiendo que el anticuerpo se una al antígeno amiloide para formar un complejo inmunológico, detectando la formación del complejo inmunológico y correlacionando la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de antígeno amiloide en la muestra o en una parte o zona del organismo específicas, comparando opcionalmente la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de

control normal, en donde un aumento en la cantidad de dicho agregado en comparación con un valor de control normal indica que dicho paciente todavía puede padecer una enfermedad residual mínima.

La predicción de la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con una composición de vacuna como se describe en la presente memoria se puede conseguir mediante la detección de la unión inmunoespecífica de un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo del mismo a un epítopo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ,* lo que incluye poner en contacto la muestra o una parte del organismo o una zona del organismo específicas que se sospecha que contienen antígeno de amiloide con un anticuerpo que se une a un epítopo de la proteína amiloide, permitiendo que el anticuerpo se una al antígeno amiloide para formar un complejo inmunológico, detectando la formación del complejo inmunológico y correlacionando la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de antígeno amiloide en la muestra o parte o zona del organismos específicas, comparando opcionalmente la cantidad de dicho complejo inmunológico antes y después del inicio del tratamiento, en donde una disminución en la cantidad de dicho agregado indica que dicho paciente tiene un alto potencial de ser sensible al tratamiento.

Las muestras biológicas que se pueden utilizar en el diagnóstico de una enfermedad o afección asociada con el amiloide, para el diagnóstico de una predisposición a una enfermedad o afección asociada con el amiloide o para el seguimiento de una enfermedad residual mínima en un paciente o para predecir la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con un anticuerpo o una composición de vacuna como se ha descrito anteriormente en la presente memoria son, por ejemplo, fluidos tales como suero, plasma, saliva, secreciones gástricas, moco, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático y similares o muestras de tejido o células obtenidas de un organismo tal como tejido neural, cerebral, cardíaco o vascular. Para la determinación de la presencia o ausencia del antígeno amiloide en una muestra se puede utilizar cualquier inmunoanálisis conocido por los expertos normales en la técnica (véase Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York 1988 555-612)) tales como, por ejemplo, análisis que utilizan métodos de detección indirecta utilizando reactivos secundarios para la detección, ELISA y análisis de inmunoprecipitación y aglutinación. Una descripción detallada de estos análisis se proporciona, por ejemplo, en el documento WO96/13590 de Maertens y Stuyver, Zrein et al. (1998) y el documento WO96/29605.

Para el diagnóstico *in situ*, el anticuerpo o cualquier porción activa y funcional del mismo se pueden administrar al organismo que va a ser diagnosticado mediante métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, inyección intravenosa, intranasal, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial de manera que se pueda producir una unión específica entre el anticuerpo descrito en la presente memoria y una región eptitópica sobre el antígeno amiloide. El complejo anticuerpo/antígeno se puede detectar a través de una marca anclada al anticuerpo o un fragmento funcional del mismo.

Los inmunoanálisis utilizados en aplicaciones de diagnóstico o en aplicaciones para el diagnóstico de una predisposición a una enfermedad o afección asociada con el amiloide o para el seguimiento de la enfermedad residual mínima en un paciente o para predecir la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con un anticuerpo o una composición de vacuna como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, cuentan típicamente con antígenos, anticuerpos, o reactivos secundarios marcados para la detección. Estas proteínas o reactivos se pueden marcar con compuestos generalmente conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo enzimas, radioisótopos, y sustancias fluorescentes, luminiscentes y cromogénicas incluyendo partículas coloreadas, tales como oro coloidal y cuentas de látex. De éstos, el marcaje radiactivo se puede utilizar para casi todos los tipos de análisis y con la mayor parte de las variaciones. Las marcas conjugadas con enzima son particularmente útiles cuando se debe evitar la radiactividad o cuando se necesitan resultados rápidos. Los fluorocromos, aunque requieren un equipo costoso para su uso, proporcionan un método de detección muy sensible. Los anticuerpos útiles en estos análisis incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, y anticuerpos policlonales purificados por afinidad.

Alternativamente, el anticuerpo se puede marcar indirectamente mediante reacción con sustancias marcadas que tienen afinidad por la inmunoglobulina, tales como proteína A o G o anticuerpos secundarios. El anticuerpo se puede conjugarse con una segunda sustancia y detectarse con una tercera sustancia marcada que tiene afinidad por la segunda sustancia conjugada con el anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar con biotina y el producto conjugado de anticuerpo-biotina se puede detectar utilizando avidina o estreptavidina marcadas. Del mismo modo, el anticuerpo se puede conjugar con un hapteno y el producto conjugado de anticuerpo-hapteno se puede detectar utilizando un anticuerpo anti-hapteno marcado.

Los expertos normales en la técnica conocerán estas y otras marcas adecuadas que se pueden emplear de acuerdo con la descripción. La unión de estas marcas a anticuerpos o fragmentos de los mismos se puede completar utilizando mecanismos convencionales comúnmente conocidos por los expertos normales en la técnica. Los mecanismos típicos son descritos por Kennedy, J.H., et al., 1976 (Clin. Chim. Acta 70:1-31), y Schurs, AHWM, et al. 1977 (Clin. Chim Acta 81:1-40). Los mecanismos de acoplamiento mencionadas en esta última son el método del glutaraldehído, el método del peryodato, el método de dimaleimida, y otros.

Los inmunoanálisis actuales utilizan un método de doble anticuerpo para detectar la presencia de un analito, en donde el anticuerpo está marcado indirectamente por la reactividad con un segundo anticuerpo que se ha marcado con una marca detectable. El segundo anticuerpo es preferiblemente 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, en ese caso, el segundo anticuerpo marcado es un anti-anticuerpo de ratón. Para el anticuerpo monoclonal que se va a utilizar en el análisis descrito a continuación, esta marca es preferiblemente una cuenta recubierta con anticuerpo, concretamente una cuenta magnética. Para el anticuerpo policlonal que se va a emplear en el inmunoanálisis descrito en la presente memoria, la marca es preferiblemente una molécula detectable tal como una sustancia radiactiva, fluorescente o electroquimioluminiscente.

También se puede emplear dentro del alcance de la presente invención un sistema de doble anticuerpo alternativo, a menudo referido como sistemas de formato rápido, ya que se adaptan a determinaciones rápidas de la presencia de un analito. El sistema requiere una alta afinidad entre el anticuerpo y el analito. De acuerdo con un aspecto, la presencia del antígeno amiloide se determina utilizando un par de anticuerpos, cada uno específico para el antígeno amiloide. Uno de dicho par de anticuerpos es referido en la presente memoria como "anticuerpo detector" y el otro de dicho par de anticuerpos es referido en la presente memoria como "anticuerpo de captura". El anticuerpo monoclonal descrito en la presente memoria se puede utilizar o bien como anticuerpo de captura o bien como anticuerpo detector. El anticuerpo monoclonal descrito en la presente memoria también se puede utilizar como anticuerpo tanto de captura como detector, juntos en un único análisis. De este modo un aspecto utiliza el método sándwich de doble anticuerpo para la detección de antígeno amiloide en una muestra de fluido biológico. En este método, el analito (antígeno amiloide) se intercala entre el anticuerpo detector y el anticuerpo de captura, el estando el anticuerpo de captura inmovilizado de forma irreversible sobre un soporte sólido. El anticuerpo detector contendría una marca detectable, con el fin de identificar la presencia del sándwich de anticuerpo-analito y por lo tanto la presencia del analito.

Las sustancias en fase sólida ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, placas de microtitulación, tubos de ensayo de poliestireno, cuentas magnéticas, de plástico o de vidrio y portas que son bien conocidos en el campo de radioinmunoanálisis y del inmunoanálisis enzimático. Los métodos para el acoplamiento de anticuerpos a fases sólidas también son bien conocidos por los expertos en la técnica. Más recientemente, se han empleado como soportes sólidos numerosos materiales porosos tales como nailon, nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio y otros polímeros porosos.

Adicionalmente se describe en la presente memoria un kit de diagnóstico para la detección de antígeno amiloide en una muestra biológica que comprende una composición como se ha definido anteriormente. Por otra parte, el último kit de diagnóstico, además de una composición como se ha definido anteriormente, también comprende un reactivo de detección como se ha definido anteriormente. El término "kit de diagnóstico" se refiere en general a cualquier kit de diagnóstico conocido en la técnica. Más específicamente, este último término se refiere a un kit de diagnóstico como describen Zrein y col. (1998).

Otro aspecto más para describir inmunosondas y kits de ensayo novedosos para la detección y el diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas con el amiloide comprenden los anticuerpos descritos en la presente memoria. Para las inmunosondas, los anticuerpos se anclan directa o indirectamente a una molécula informadora adecuada, p. ej., una enzima o un radionúclido. El kit de ensayo incluye un recipiente que contiene uno o más anticuerpos descritos en la presente memoria e instrucciones para el uso de los anticuerpos para que se unan al antígeno amiloide para formar un complejo inmunológico y detectar la formación del complejo inmunológico de manera que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de antígeno amiloide.

Ejemplos

Antígenos utilizados para originar anticuerpos monoclonales de ratón

Tabla 1. Anticuerpos y constructos antigénicos utilizados para originar dichos anticuerpos

mAb de Ratón	Antígeno/Secuencia	Conector	Ancla	Coadyuvante
maCl-01-Ab7	$Aß_{1-16}$	PEG	DSPE	Lípido A
maCl-02-Ab6	$Aß_{1-16\ (\Delta 14)}$	PEG	DSPE	Lípido A
maCl-11-Ab9	$Aß_{22-35}$	PEG	DSPE	Lípido A
maCl-12-Ab11	$Aß_{29-40}$	PEG	DSPE	Lípido A
maCl-24-Ab4	$Aß_{1-15}$	-	Palm	Lípido A

Ejemplo 1: Métodos para elaborar constructos antigénicos supramoleculares de $Aß_{1-15}$ palmitoilados

Síntesis del péptido antigénico tetra(palmitoil lisina)Aß1-15

Se sintetizó el péptido amiloide 1-15 palmitoilado siguiendo un método previamente referido mejorado (Nicolau et. al. 2002). Este nuevo enfoque implicó el injerto sobre resina de ácido palmítico en los residuos de Lys terminales del péptido preformado en lugar de la síntesis en fase sólida por etapas que incorpora el aminoácido modificado 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc)-Lys (Pal)-OH. Este nuevo enfoque mejora la eficacia del 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 de Wang utilizando la química de acoplamiento de [hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio] (HBTU). El grupo Fmoc se eliminó utilizando piperidina al 20% en DMF y se acopló un segundo residuo de Fmoc-Lys(Mtt)-OH. A continuación se utilizó la síntesis de péptidos automatizada utilizando la química de Fmoc/tBu y grupos protectores de la cadena lateral convencionales para acoplar los siguientes 15 aminoácidos para producir una secuencia peptídica como se proporciona en el SEQ ID NO: 1. Finalmente, los dos últimos aminoácidos acoplados fueron Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Los grupos Mtt se escindieron a continuación selectivamente utilizando ácido trifluoroacético (TFA) al 1% en diclorometano, para liberar un fragmento peptídico y luego se acoplaron a ácido palmítico utilizando HBTU. Después de lavar la resina, el grupo Fmoc se eliminó con piperidina al 20% en dimetilformamida (DMF) y, finalmente, se llevaron a cabo simultáneamente la escisión de la resina y las desprotecciones de la cadena lateral utilizando TFA en condiciones convencionales. La trituración en éter dietílico frío proporcionó el producto en forma de un sólido blanco. La espectrometría de masas por electropulverización confirmó la identidad del producto (m/z esperado: 1097,9 ([M]3+); encontrado: 1096,8 ([M-3H]3+), sin detectar otros tri-, di- o monopéptidos palmitoilados.

Ejemplo 2: Métodos para elaborar constructos antigénicos supramoleculares

Síntesis de antígeno peptídico ß-amiloide pegilado

Para mejorar la respuesta inmunitaria, se ha aplicado otra ancla/espaciador para reconstituir el péptido en el liposoma, por ejemplo, polietilenglicol (PEG). El PEG se unió covalentemente al residuo de lisina unido a ambos extremos del péptido. En el otro extremo de la cadena (PEGn = 70) se unió covalentemente fosfatidiletanolamina (PEA) para que funcionara como un elemento de anclaje en la bicapa del liposoma. Por lo tanto, el liposoma todavía funciona como coadyuvante y el péptido que todavía está suficientemente lejos de la bicapa, se puede procesar por sí solo y de ese modo aumenta su inmunogenicidad en comparación con el antígeno palmitoilado.

Los constructos supramoleculares descritos en la presente memoria se sintetizaron únicamente utilizando protecciones de las cadenas laterales de los 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 el anclaje específico del sitio de un producto conjugado de PEG-lípido tanto al extremo C como al N de Aß utilizando péptidos parcialmente protegidos.

Para aquellas secuencias de péptidos que contienen residuos de Lys o His internos (1-16, 1-16Δ14, 22-35), se añadió Lys(ivDde) protegida ortogonalmente a cada extremo. Se añadió una Gly adicional al extremo C para facilitar la síntesis. El grupo Fmoc se eliminó con piperidina al 20% en DMF y se N-acetiló utilizando anhídrido acético. La escisión selectiva de los grupos ivDde se logró con hidrato de hidrazina al 3% en DMF durante una hora. Se prefiere la resina de 2-clorotritilo antes que la resina de Wang más ampliamente utilizada, ya que se ha demostrado que la primera es mucho más resistente a la hidrazinolisis. Además, la resina de 2-clorotritilo es extremadamente sensible a los ácidos y por lo tanto, a diferencia de la resina de Wang, permite el aislamiento de péptidos protegidos. En efecto,

fue necesario llevar a cabo la reacción de acoplamiento en fase de solución ya que el acoplamiento del péptido unido a la resina al 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 hora, RT) proporcionó los péptidos protegidos internamente. Los acoplamientos en fase de solución se lograron con éxito con los péptidos derivados de la secuencia de Aß$_{1-16}$ (SEQ ID NO: 2) a DSPE-PEG-SPA en DMSO y exceso de base. Las reacciones se extinguieron a continuación por medio de la adición de un exceso de etanolamina durante 2 horas y la solución se liofilizó.

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

La purificación por HPLC (columna C_4 de fase inversa semi-preparativa) proporcionó entre 50 y 70% de pureza de los productos conjugados de PEG-lípido N- y C-terminales cuyas identidades se confirmaron por medio de MALDI (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz). Cada secuencia mostró una variación considerable en la facilidad de la reacción y las condiciones de acoplamiento se ajustaron en consecuencia (temperatura, número de equivalentes molares de DSPE-PEG-SPA, tiempo). Para la separación del exceso de DSPE-PEG-SPA del producto deseado se aplica la purificación por HPLC. La separación de los productos mono- y di-acoplados antes de las desprotecciones finales de las cadenas laterales se puede lograr mediante el uso de cromatografía de intercambio catiónico. Las posteriores desprotecciones de la cadena lateral del péptido y la separación del exceso de DSPE-PEG-SPA inactivado condujeron al aislamiento de los productos conjugados deseados con una pureza aceptable.

Este enfoque para la síntesis de antígenos ß-amiloides lípido-PEG N- y C-terminales utilizando péptidos protegidos es aplicable a una amplia variedad de secuencias de péptidos.

Ejemplo 3: Anticuerpos originados por constructos antigénicos supramoleculares

3.1 Fabricación de mAb originados contra el constructo antigénico supramolecular Aβ$_{1-15}$ palmitoilado:

Se utilizó antígeno palmitoilado (ACI-24, Aβ$_{1-15}$) para la inmunización en ratones C57BU6 a intervalos de 2 semanas. Se inmunizaron 10-12 animales con cada antígeno (Vol. de la inyección: 200 µl que contenían 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 1:5.000 del suero fue positiva en un ELISA) para la fusión. Las células del bazo se cosecharon a partir de los animales inmunizados y se generaron hibridomas fusionando células de bazo sensibilizadas con una línea celular de mieloma. La fusión de los linfocitos B de los bazos de los ratones se llevó a cabo con células de la línea celular de mieloma SP2-0. (ATCC, Manassas, VA) utilizando los procedimientos 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 la fusión de las células mediante la adición de polietilenglicol. Las células híbridas resultantes se cultivaron a continuación durante 10 ± 14 días de la manera convencional para permitir el crecimiento clonal. La selección clonal inicial se realizó utilizando la dilución limitante. Los clones de hibridoma productores de IgG se seleccionaron y se sometieron a ensayo para determinar su unión específica al péptido Aβ$_{1-42}$ por medio de ELISA y se cultivaron los clones resultantes que producían los anticuerpos monoclonales deseados.

Los hibridomas así obtenidos se seleccionan químicamente cultivando en placa las células en un medio de selección que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT).

Los hibridomas se escrutan a continuación para determinar la capacidad para producir anticuerpos monoclonales contra enfermedades o trastornos asociados con amiloides específicos. Una vez que se identificó el clon madre, éste se subclonó cuatro veces para garantizar la monoclonalidad y permitir que el híbrido se estabilice.

Los hibridomas productores de anticuerpos de interés se clonan, se expanden y se almacenan congelados para una producción en el futuro.

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

El hibridoma preferido produce un anticuerpo monoclonal que tiene el isotipo IgG, más preferiblemehte el isotipo IgG1.

3.2 Fabricación de mAb originados contra los constructos antigénicos supramoleculares PEG-AB$_{1-16}$, Aβ$_{4-11}$, Aβ$_{22-35}$ y Aβ$_{29-40}$ pegilados

Se prepararon antígenos liposomales como se ha descrito (Nicolau et al., 2002, PNAS, 99, 2332-37). Las secuencias PEG-Aβ$_{1-16}$, Aβ$_{4-11}$, Aβ$_{22-35}$ y Aβ$_{29-40}$ (Figura 1) se reconstituyeron en un constructo que consistía en liposomas elaborados con dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPEA), dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) y colesterol (razones molares 0,9:0,1:0,1:0,7) que contenían lípido A

monofosforilado (40 mg/mM de fosfolípido). Estos antígenos y el $A\beta_{1-16}$ pegilado se utilizaron para la inmunización en ratones C57BU6 a intervalos de 2 semanas. Se inmunizaron 10-12 con cada antígeno. Después de 3 a 6 refuerzos, se seleccionaron los ratones con títulos terapéuticos (cuando una dilución 1:5.000 del suero fue positiva en el ELISA) para la fusión. Las células del bazo se recogieron de los animales inmunizados y se generaron hibridomas por fusión de las células de bazo sensibilizadas con una línea celular de mieloma. La fusión de los linfocitos B de los bazos de los ratones se llevó a cabo con células de la línea celular de mieloma SP2-0. (ATCC, Manassas, VA) utilizando los procedimientos 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 la fusión de las células mediante la adición de polietilenglicol. Las células híbridas resultantes se clonaron a continuación de la manera convencional, p. ej. utilizando la dilución limitante. Los clones de hibridoma productoras de IgG se seleccionaron y se sometieron a ensayo para determinar su unión específica al péptido $A\beta_{1-42}$ por medio de ELISA y se cultivaron los clones resultantes, que producían los anticuerpos monoclonales deseados.

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

Los hibridomas se escrutan a continuación para determinar la capacidad para producir anticuerpos monoclonales contra enfermedades o trastornos asociados con amiloides específicos. Los hibridomas productores de anticuerpos de interés se clonan, se expanden y se almacenan para la producción en el futuro. El hibridoma preferido produce un anticuerpo monoclonal que tiene el isotipo IgG, más preferiblemente el isotipo IgG1.

Ejemplo 4: Determinación de la especificidad para el anticuerpo mACI-24-Ab4

Para analizar la especificidad del anticuerpo mACI-24-Ab4, se transfirieron diferentes concentraciones de fibrillas de Amiloide 1-42, 1-40 y 1-38 pre-formadas a Membrana de Nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham Biosciences). Después de bloquear con leche en polvo al 10% y Tween 20 al 0,7%, las membranas se incubaron con anticuerpo primario a 20 µg/ml durante 2 horas a RT. Después de lavar, las membranas se incubaron con anticuerpo anti-IgG de ratón de oveja conjugado con peroxidasa de rábano picante (Amersham Biosciences) durante 1 hora a RT, se lavaron y se incubaron con una solución quimioluminiscente seguido de exposición de la membrana a una película de rayos X.

Para medir la unión del mAb mACI-24-Ab4 a fibras de amiloide β 1-42, se pre-formaron fibras de Aβ 1-42, 1-40 y 1-38 durante siete días a 37°C y se transfirieron a la membrana. Se utilizaron 20 µg/ml de anticuerpo para medir la capacidad de unión y el anticuerpo unido se detectó mediante exposición a anticuerpo anti-IgG de ratón de oveja conjugado con peroxidasa de rábano picante durante 20 minutos.

Como se pudo demostrar por medio de análisis de Transferencia Puntual, el anticuerpo mACI-24-Ab4 se une a diferentes fibras de Aβ preformadas con diferentes sensibilidades. El anticuerpo muestra mayor sensibilidad de unión para las fibras de $A\beta_{1-42}$ que para $A\beta_{1-40}$ o $A\beta_{1-38}$. Es capaz de detectar al menos 0,001 µ de fibras $A\beta_{1-42}$, mientras el límite de detección del anticuerpo para las fibras de $A\beta_{1-40}$ es de al menos 0,1 µg y para las fibras de $A\beta_{1-38}$ de 1 µg, lo que significa que la sensibilidad es de 100 veces a 1.000 veces menor para estos tipos de fibras amiloides. Estos datos demuestran que el anticuerpo ACI-24-Ab4 es al menos 100 veces más sensible a la forma amiloide (1-42) que se sabe que se vuelve insoluble por un cambio de conformación secundaria y que es una parte principal de las placas amiloides en los cerebros de pacientes con EA.

Ejemplo 5: Unión del anticuerpo monoclonal de AC Immune mACI-01-Ab7 C2 a especies amiloides en la Transferencia Western y la Transferencia Puntual

Para determinar si la unión del anticuerpo de ratón mACI-01-Ab7 C2 es dependiente de la conformación nativa de Aß, se llevó a cabo una comparación de la unión al amiloide linealizado mediante Transferencia Western o al amiloide nativo en una Transferencia Puntual (Figuras 2a y 2b)

Se generaron monómeros de amiloide disolviendo péptido $A\beta_{1-42}$ en HFIP y el disolvente se evaporó en argón. Se almacenó una película de péptido seco a -80°C hasta su uso. Para la preparación de monómeros, se resuspendió la película de péptido en DMSO a una concentración de 2,75 µg/pl y se diluyó en PBS a 1µg/µl. Para la preparación de oligómeros, se resuspendió la película de péptido seco en DMSO a 5 mM, se sometió a sonicación y se añadió PBS hasta alcanzar amiloide 400 µM seguido de la adición de SDS a una concentración final de 0,2%. Después de 6 horas de incubación a 37°C, se diluyó el amiloide en agua a una concentración final de 100 µM y se incubó otras 18 horas a 37°C. Los oligómeros amiloides se precipitaron con metanol al 33% enfriado con hielo, solución de ácido acético al 4% durante 1 hora a 4°C, se centrifugó a 16.200 g durante 10 minutos y el sedimento se resuspendió en $Na2H2PO_4$ 5 mM, NaCl 35 mM, pH 7,4 a una concentración final de 1 µg/µl. Para la preparación de las fibras, se diluyó la película de péptido en tampón Tris-HCl 50 mM para obtener una concentración de 1 mg/ml de amiloide y se incubó a 37°C durante 5 días. Los tubos se centrifugaron a 10.000 g durante 5 minutos y el sedimento se resuspendió en tampón carbonato 0,1 M, pH 9,6 para alcanzar 1 µg/µl.

Se diluyeron 1 o 5 µg de monómeros, oligómeros o fibras en PBS y en tampón de carga y se aplicaron a SDS-PAGE al 12% y el gel se transfirió a membranas de nitrocelulosa. Alternativamente, se diluyeron 3 o 1 µg o 100 y 10 ng de especies de amiloide en PBS y se aplicaron puntualmente directamente sobre la membrana de nitrocelulosa y la membrana se secó a la RT durante 1 hora. Después de bloquear durante 30 minutos con solución de Caseína (Vector), las membranas se incubaron durante 30 minutos con anticuerpos mACI-01-Ab7 C2 o 6E10 (Chemicon) diluidos a 1 µg/ml en solución de Caseína. Después de 3 lavados en solución de Caseína, las membranas se incubaron a RT durante 30 minutos con anti-IgG de ratón de cabra marcado con HRP (Dako Cytomation) diluido en solución de Caseína, se lavaron 3 veces y se desarrollaron con sustrato DAB (Dako Cytomation).

El anticuerpo monoclonal de ratón mACI-01-Ab7 C2 se unió específicamente a los monómeros, oligómeros y fibras en el análisis de Transferencia Puntual como lo hizo el anticuerpo de control positivo 6E10. En contraste, el anticuerpo mACI-01-Ab7C2 no detectó especies de amiloide linealizadas por medio de Transferencia Western en contraste con el anticuerpo 6E10 que reconoció claramente todos los péptidos linealizados. Este resultado demuestra que la unión de mACI-01-Ab7 C2 al amiloide depende de la conformación nativa del amiloide.

Ejemplo 6: Interacciones mACI-01Ab7 C2 -$A\beta_{1-42}$

Las interacciones entre el anticuerpo principal de AC Immune mACI-01-Ab7 C2 (mC2) y el péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ se estudió utilizando la resonancia de plasmón superficial. Se determinó la unión del anticuerpo de ratón mACI-01-Ab7 C2 a cualquiera de los monómeros o fibras de $A\beta_{1-42}$.

Todos los experimentos SPR se llevaron a cabo en un aparato Biacore X (Biacore AB). Los reactivos para la inmovilización (EDC, NHS y etanolamina), los chips sensores CM5 y SA así como el tampón de muestra y el de migración HBS-EP se adquirieron de Biacore AB. Se utilizó acetato de sodio (10 mM, pH 5,0) como tampón de acoplamiento para incrementar el rendimiento del acoplamiento. Se preparó $A\beta_{1-42}$ fibrilar (Bachem) añadiendo tampón PBS a $A\beta_{1-42}$ a una concentración final de 3 mg/ml y dejando los viales a 37°C durante 7 días. Se acopló $A\beta_{1-42}$ fibrilar a un chip sensor CM5 que contenía una matriz de carboximetildextrano unido a la superficie. El $A\beta_{1-42}$ monomérico biotinilado (Bachem) se acopló a un chip Sensor SA que consistía en matriz de carboximetildextrano con Estreptavidina anclada covalentemente. Típicamente se analizaron cuatro o cinco concentraciones de mAb mediante diluciones seriadas utilizando tampón. Las inyecciones se realizaron empezando con la concentración más baja y se hicieron pasar por fc 1 y 2 a una velocidad de flujo de 30 µL/min durante 3 min. La célula de flujo 2 no se derivatizó y las respuestas se restaron de fc 1 para corregir el ruido del aparato y los cambios refractarios de volumen. Una vez finalizada la inyección, las superficies se lavaron inmediatamente con tampón de migración durante 5 min. Para eliminar el anticuerpo unido restante de las fibrillas de $A\beta_{1-42}$, se llevó a cabo la regeneración de la superficie inyectando pulsos de NaOH 10 mM. El análisis cinético se realizó utilizando algoritmos para la integración numérica y el análisis global utilizando BIAevaluation 3.0. Las curvas obtenidas para las inyecciones de analito a diferentes concentraciones se superpusieron y los datos de referencia se ajustaron a cero. Para el ajuste de la curva, todos los datos se ajustaron simultáneamente a un complejo homogéneo 1:1.

Se determinó que la unión del anticuerpo mACI-01-Ab7 C2 de ratón al amiloide era relativamente fuerte. Como se demuestra en la Tabla 2, el anticuerpo de ratón mACI-01-Ab7 C2 se unió específicamente a fibras de $A\beta_{1-42}$ inmovilizadas con una constante de asociación media (ka) de $3{,}8 \times 10^{-4}$ M/s, una constante de disociación (kd) de $1{,}1 \times 10^{-3}$ s^{-1} y por lo tanto con la KD media resultante de $3{,}5 \times 10^{-8}$ M. La asociación de mACI-01-Ab7 C2 a los monómeros de Aβ fue similar o ligeramente más rápida con una ka media de $1{,}6 \times 10^{-4}$ M/s pero la disociación fue más rápida proporcionando una KD de $2{,}5 \times 10^{-7}$ M.

Tabla 2

	Monómeros			Fibras		
	k_a(1/Ms)	k_d(1/s)	KD (M)	k_a(1/Ms)	k_d(1/s)	KD (M)
mACl-01-Ab7 C2						
exp.1	1.8E+04	2.7E-03	1.5E-07	2.4E+04	9.9E-04	4.1E-08
mACl-01-Ab7 C2						
exp. 2	1.5E+04	5.3E-03	3.5E-07	5.60E+04	9.66E-04	1.73E-08
mACl-01-Ab7 C2						
exp. 3				3.26E+04	1.49E-03	4.58E-08
media mACl-01-Ab7 C2	1.6E+04	4.0E-03	2.5E-07	3.8E+04	1.1E-03	3.5E-08
	±0,21	1,84	1,41	1,66	0,3	1,53

Ejemplo 7: Unión del anticuerpo monoclonal mACl-01-Ab7 C2 a fibras de amiloide

Para analizar el lado de la unión molecular del anticuerpo sobre las fibras pre-formadas se realizó microscopía electrónica de transmisión (TEM) con contraste negativo (Figuras 3a y 3b).

El anticuerpo, mACl-01-Ab7 C2, se acopló a oro coloidal de 8 nm de acuerdo con [4,5]. Para la incubación simultánea de las fibras de amiloide 1-42 (Aβ1-42), se incubaron fibras de 6,65 µM durante 24 horas a RT con el anticuerpo marcado con oro con una razón molar de 1:100. Con posterioridad se incubaron muestras de 5 µl en una gradilla de Cu de descarga luminiscente recién preparada (malla 200) cubierta con una película de parlodio/C durante 45 segundos, se lavó 3 veces con agua y 1 vez con acetato de uranilo recién dluido y filtrado al 2%. Las muestras se tiñeron en acetato de uranilo al 2% durante 15-20 seg. El exceso de tinción en las gradillas se aspiró y a continuación se seco al aire. Se prepararon tres gradillas de cada muestra. Las gradillas se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi 7000. El anticuerpo monoclonal, mACl-01-Ab7 C2, se une directamente a las fibras de $A\beta_{1-42}$. Curiosamente, el anticuerpo no muestra una unión simétrica al eje de las fibras individuales sino que se une a zonas concretas, y no a todas las zonas, de las ramas laterales de la red de la fibra. Parece ser que el anticuerpo se dirige a regiones específicas dentro de las ramas laterales. La explicación potencial es una estructura secundaria específica que existe solamente en estas ramas laterales específicas. Esta hipótesis es apoyada por los datos de la RMN que demuestran que el anticuerpo induce una transición en la conformación, y por lo tanto es probable que su unión sea dependiente de una conformación de la fibra amiloide que comprende una estructura en lámina β.

Ejemplo 8: Fraccionamiento mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad

Se estudiaron las propiedades de los anticuerpos monoclonales en la inhibición de la polimerización de la fibra de $A\beta_{1-42}$ y la desagregación de las fibras de $A\beta_{1-42}$ mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad (Rzepecki et al., 2004) que se basa en el principio de distribuir en diferentes tamaños las fibras de péptidos resultantes después de la incubación con y sin anticuerpos, seguido de un análisis de sedimentación en SDS-PAGE en un gradiente pre-formado (OptiPrep™). El análisis simultáneo de poblaciones de fibras de Aβ preformadas, las propiedades de desagregación e inhibición de la agregación de los anticuerpos incubados simultáneamente, y la unión de los anticuerpos a las fibras son ventajas obvias de estos métodos.

Los anticuerpos monoclonales originados contra $A\beta_{1-16}$ (mACl-01-Ab7 C2), $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$ (mACl-02-Ab6), $A\beta_{1-15}$ (mACl-24-Ab4), $A\beta_{22-35}$ (mACl-11-Ab9), y $A\beta_{29-40}$ (mACl-12-Ab11) fueron analizados todos en análisis de desagregación mientras las propiedades de inhibición de la agregación se estudiaron solamente para los anticuerpos monoclonales mACl-02-Ab6, mACl-24-Ab4, y mACl-01-Ab7 C2.

Para la inhibición de la agregación de $A\beta_{1-42}$, se incubaron monómeros de $A\beta_{1-42}$ con mAbs a dos razones molares

diferentes (razón molar de monómero $A\beta_{1-42}$ treinta o cien veces mayor que la de mAb) con una concentración final de Aβ de 50 µM. Después de 24 horas de incubación a 37°C, las muestras se superpusieron sobre un gradiente discontinuo de Optiprep™ y los tubos se centrifugaron a 259.000 g durante 3 hrs a 4°C. Se recogieron 15 fracciones (140 µL cada una), la fracción 1 fue la fracción menos densa desde la parte superior del gradiente y la fracción 15 es la fracción más densa desde la parte inferior del gradiente. También se recogió el sedimento. Las fracciones recogidas se analizaron por SDS-PAGE mediante tinción con plata. La concentración de $A\beta_{1-42}$ para los análisis de inhibición fue cinco veces menor que para los análisis de desagregación que disminuyen la cinética de agregación de amiloide y garantizan la medición en la fase lineal.

Para la desagregación de las fibrillas de $A\beta_{1-42}$ pre-formadas mediante incubación simultánea con los mAb (a dos razones molares diferentes 1:30 y 1:100, mAb + Monómero $A\beta_{1-42}$ con una concentración final de Aβ de 246 µM), las muestras se incubaron durante 24 horas a 37°C. Después de 24 hrs las muestras se fraccionaron mediante ultracentrifugación y se separaron mediante SDS-PAGE como se describe más arriba y anteriormente (Rzepecki et al., 2004).

8.1 Análisis de inhibición de la agregación de $A\beta_{1-42}$

Se pudo demostrar que sin adición de mAb, el péptido Aβ se agregaba después de 24 hrs de incubación y la mayor parte de la proteína se encontraba en las fracciones 13-15, demostrando la completa polimerización de los monómeros de péptido Aβ. Una inhibición satisfactoria y significativa de la agregación debe dar como resultado fibras más pequeñas o proteína amiloide ß (Aß) soluble polimérica, que se debería encontrar en fracciones con una densidad menor (10-13). Se pudo demostrar exactamente este desplazamiento en las bandas en el análisis de agregación que contenía mACI-01-Ab7 C2, que mostró una distribución de péptido Aβ en las fracciones 11, 12 y 13.

Esto se confirmó en un segundo experimento en el que mACI-01-Ab7 C2 ocasionó de nuevo un desplazamiento de las bandas para la mayor parte (banda más fuerte) de 14 a 13 y una solubilización significativa de las bandas en la que corre la fracción 14 al sedimento. Esto significa, que mACI-01-Ab7 C2 muestra una fuerte capacidad para inhibir la polimerización de los monómeros de péptido Aβ en fibras y reveló una unión específica para las fibras de Aβ (en la fracción 13)

Se realizaron observaciones similares cuando se utilizó anticuerpo mACI-24-Ab4 y mACI-02-Ab6. Sin adición de mAb, el péptido Aβ se agregó después de un tiempo de incubación de 24 horas y la mayor parte de la proteína se encontró en las fracciones 13 hasta el sedimento, (sedimento, muy poco en 12), demostrando la completa polimerización de los monómeros de péptido Aβ. La inhibición satisfactoria y significativa de la agregación debe dar como resultado fibras más pequeñas o proteína amiloide ß (Aß) soluble polimérica, que se debe encontrar en las fracciones con una densidad menor. En el análisis de inhibición de la agregación, mACI-24-Ab4 ocasionó un desplazamiento en las bandas para la mayor parte (banda más fuerte) desde 13 hasta 11 y 12 una solubilización significativa de las bandas en las que corre la fracción 13 al sedimento, mientras mACI-02-Ab6 ocasionó un desplazamiento en las bandas desde 13 hasta 10 pero además una inhibición completa de la formación de fibras más grandes (fraccionadas en 13 hasta el sedimento). Estos datos indican que tanto mACI-24-Ab4 como mACI-02-Ab6 muestran una fuerte capacidad para inhibir la polimerización de monómeros de péptido Aβ en fibras y reveló una unión específica para las fibras de Aβ (en la fracción 11 y 12).

En contraste, el análisis de agregación que contenía mACI-11-Ab9, a una razón molar de 1:30, mostró agregados más grandes dispersos entre las fracciones 12-15 y el sedimento. En presencia de mACI-12-Ab11, a una razón molar de 1:30, los agregados se encuentran en las fracciones 11-15 y en el sedimento, pero con la señal más fuerte en las fracciones 11 y 12. Esto significa, que mACI-01-Ab7 C2 y mACI-24-Ab4 muestran la capacidad más fuerte para inhibir la polimerización de los monómeros de péptido Aβ en fibras. mACI-12-Ab11 tiene unas propiedades de inhibición significativamente menores que mACI-01-Ab7 C2, para obtener esta débil actividad inhibidora se necesitó una razón molar tres veces mayor. Todavía se puede observar una inhibición menor cuando se compara con mACI-11-Ab9 que no fue capaz de inhibir la agregación de fibras de péptido Aβ. Todos los mAb revelaron una unión específica para las fibras de Aβ (para mACI-01-Ab7 C2 en la fracción 11 + 12; para mACI-11-Ab9 en la fracción 12 y débil en 13; para mACI-12-Ab 11 en la fracción 11 y 12).

En todos los análisis de inhibición, se detectó péptido en las fracciones de la parte inferior. El mAb no unido (37 kDa, 95 kDa y mayor de 120 kDa) apareció en la mitad superior del gradiente (fracciones 3-9 y 4-8, respectivamente).

8.2 Análisis de desagregación de fibras de $A\beta_{1-42}$

Debido a la polimerización incompleta de la fibra, la distribución de las fibrillas de $A\beta_{1-42}$ solas demuestra un intervalo de fracciones más amplio (11-15). Por lo tanto, la demostración de las propiedades de desagregación satisfactorias y significativas de los anticuerpos cuando se incuban simultáneamente con las fibras pre-formadas es más difícil que en el análisis de agregación. Solamente un desplazamiento en la mayoría de las fibras hacia fracciones de densidad menor, pero todavía en el intervalo de la fracción de amiloide solo, indicaría actividad de desagregación; para el amiloide solo la banda principal es la fracción 12. La adición de mACI-01-Ab7 C2 a una razón molar de 1:100 no mostró desplazamiento de las fibras amiloides hacia las fracciones de menor densidad (todavía entre las fracciones

11-15), pero con un desplazamiento de la señal más fuerte dentro del intervalo de fracciones entre 12 y 11, cuando se compara con el amiloide solo. A pesar de unas circunstancias no óptimas de la formación de fibras incompleta, mACl-01-Ab7 C2 indica actividades de desagregación bajas pero detectables.

En contraste, la incubación simultánea de fibrillas de $A\beta_{1-42}$ pre-formadas con mACI-02-Ab6 no demostró desplazamiento de las bandas a una fracción de densidad menor cuando se incubó con la misma razón molar de péptido amiloide:anticuerpo que mACl-01-Ab7 C2. Solamente cuando se utilizó una razón molar tres veces mayor que 1:30, las fibras amiloides se desplazaron de 12-15 (amiloide solo sin incubación simultánea con anticuerpo) a las fracciones 11-15. Por lo tanto parece que mACI-01-Ab7 C2 tiene propiedades de desagregación ligeramente superiores que mACl-02-Ab6.

La detección de las bandas correspondientes a mAb en la mitad inferior de la fracción del gradiente demuestra la unión de mACl-02-Ab6 y mACl-01-Ab7 C2 a fibrillas de $A\beta_{1-42}$ (fracción 11 a 15 para ambos mAb).

La propiedad de desagregación de mACI-01-Ab7 C2 se pudo confirmar en un experimento adicional, en el que se pudo demostrar la polimerización de la fibra completa por medio de la distribución de las fibrillas de $A\beta_{1-42}$ en ausencia de un anticuerpo en las fracciones 13 a P (sedimento). Aquí, los desplazamientos de las fibras hacia las fracciones de menor densidad indican la actividad de desagregación del anticuerpo, cuando se incuba simultáneamente con fibras pre-formadas. La adición de mACl-01-Ab7 C2 a una razón molar de 1:100 mostró un desplazamiento de la mayor parte de las fibras amiloides de 13 a 12 y adicionalmente un desplazamiento de la banda con la densidad más baja de 13 a 11. Por lo tanto, mACl-01-Ab7 C2 indica también una fuerte actividad de desagregación.

La detección de las bandas correspondientes al mAb en la mitad inferior de la fracción del gradiente demuestra la unión de mACl-01-Ab7 C2 a las fibrillas de $A\beta_{1-42}$ (fracción 11 a P), mientras las bandas que corresponden a mAb en las fracciones 4 a 7 indican anticuerpo no unido.

Para resumir estos resultados se pudo demostrar satisfactoriamente que el anticuerpo monoclonal mACl-01-Ab7 C2 que elige como diana el péptido amiloide Aβ se une a las fibras pre-formadas y es capaz de inhibir la agregación *in vitro* de los péptidos Aβ monoméricos a las fibras y de desagregar las fibras pre-formadas.

Se realizaron observaciones similares cuando se utilizó mACl-24-Ab4. De una manera similar al análisis de agregación, se pudo demostrar la polimerización de la fibra completa mediante la distribución de fibrillas de $A\beta_{1-42}$ solas en las fracciones 12 a P (sedimento). Aquí, los desplazamientos de las fibras hacia fracciones de menor densidad indicarían actividad de desagregación del anticuerpo, cuando se incubaba simultáneamente con fibras pre-formadas. La adición de mACl-24-Ab4 a una razón molar de 1:100 mostró un desplazamiento de la mayoría de las fibras de amiloide de 12 a 11. Por lo tanto, mACl-24-Ab4 indica también una fuerte actividad de desagregación.

Ejemplo 9: Análisis fluorescente para evaluar la inhibición de la agregación de filamentos de $A\beta_{1-42}$ y la desagregación de filamentos de $A\beta_{1-42}$ pre-formados mediante incubación simultánea con mAb

Análisis fluorescente BIS-ANS

Para evaluar las propiedades de inhibición del mAb, se utilizó el análisis fluorescente BIS-ANS (LeVine, 2002) que detecta específicamente el monómero o la población no fibrosa de filamentos de $A\beta_{1-42}$. Antes de la medición de la fluorescencia, se incubaron previamente los monómeros de $A\beta_{1-42}$ con tampón, sirve como control, o con mAb (razón molar 1:100, mAb vs. péptido $A\beta_{1-42}$) durante 14 horas a 37°C. Las unidades fluorescentes relativas se registraron automáticamente y los resultados se expresaron como cambios con respecto al control en el procentaje.

mACl-02-Ab6 mostró una ligera capacidad de inhibición en comparación con el control (125,8 ± 28,5% vs 100 ± 29,5%). mACl-01-Ab7 C2 pareció tener una débil actividad (108, 0 ± 30,0%) y no se pudo observar ninguna mejora con respecto al control con el mAb mACl-11-Ab9 y mACl-12-Ab11 (93,5 ± 21,9% y 73,2 ± 47,7%). Este resultado confirma los datos de ultracentrifugación, en los que mACl-01-Ab7 C2 muestra mayor capacidad de inhibición que mACl-11-Ab9 y mACl-12-Ab11.

Ejemplo 10: Análisis fluorescente con Tioflavina T (Th-T)

Para medir tanto la inhibición de la agregación como las propiedades de desagregación del mAb, se utilizó el análisis fluorescente con Tioflavina T (Th-T) que se une específicamente a moléculas de $A\beta_{1-42}$ fibrilar y con posterioridad se correlaciona la intensidad de emisión fluorescente con la cantidad de filamentos de $A\beta_{1-42}$ presentes en la solución.

Antes de la medición de la fluorescencia, se pre-incubaron los monómeros de $A\beta_{1-42}$ con tampón (control), o con mAb (razón molar 1:100, mAb vs. péptido $A\beta_{1-42}$) durante 48 horas a 37°C. Las unidades fluorescentes relativas se registraron automáticamente y los resultados se expresaron como los cambios con respecto al control en el porcentaje.

mACl-01-Ab7 C2 mostró una capacidad de inhibición significativa cuando se comparó con el control (11,03 ± 20,7%

vs 100 ± 40,5%). Este resultado confirma los datos de la ultracentrifugación, en los que mACl-01-Abl C2 muestra capacidad de inhibición.

Para medir las propiedades de desagregación del mAb, se utilizó el análisis fluorescente con Tioflavina T (ThT) que se une específicamente moléculas de $A\beta_{1-42}$ fibrilar y con posterioridad se correlaciona la intensidad de la emisión de fluorescencia con la cantidad de filamentos de $A\beta_{1-42}$ presentes en la solución. Antes de la medición, la fibra de Aß se preformó durante 7 días (a 37°C en PBS, pH 7,1) y a continuación se incubó simultáneamente con mAb o tampón (control negativo), durante 24 horas a 37°C a una razón molar de 1 : 100 (mAb vs. $A\beta_{1-42}$). Las unidades fluorescentes relativas se registraron automáticamente por medio de un lector de placa de microtitulación ELISA y los resultados se expresaron como cambios con respecto al control en el porcentaje.

De acuerdo con los datos de ultracentrifugación, mACl-01-Ab7 C2 mostró también en el ensayo de desagregación con Th-T en dos experimentos independientes, las mejores propiedades con 35 ± 11 % y 64,57 ± 13,58% (vs 100,0 ± 15,37%), respectivamente, un poder de desagregación por encima del control.

mACl-24-Ab4 también mostró propiedades de desagregación significativas (62,99 ± 10,34% vs 100,0 ± 10,03%; $p<0,0001$) en el análisis con Th-T.

mACl-11=Ab9 fue algo menos activo con 28 ± 14%, mientras ACl-02-Ab6 y ACl-12-Ab11 no mostraron propiedades de desagregación significativas (17 ± 12% y 13 ± 11%, respectivamente).

Cuando se resumen los análisis de ultracentrifugación y fluorescencia, mACl-01-Ab7 C2, mACl-01-Ab6 y mACl-24-Ab4 mostraron capacidades de bifuncionalidad para inhibir la agregación de las fibras y acortar los filamentos de $A\beta_{1-42}$ preformados en un experimento de centrifugación que podía ser confirmado mediante análisis fluorescente. Adicionalmente, el experimento de centrifugación demostró la unión específica del mAb a las fibras de amiloide.

mACl-11-Ab9 mostró una capacidad de inhibición significativamente menor en la ultracentrifugación, cuando se comparó con mACl-01-Ab7 C2, incluso tres veces más concentrado, lo que se pudo confirmar por medio del análisis con BIS-ANS. Para el análisis de desagregación mACl-01-Ab7 C2 demostró, tanto en el análisis de centrifugación como en el análisis con ThT, propiedades para acortar los filamentos de $A\beta_{1-42}$ preformados. mACl-02-Ab6, tres veces más concentrado en el experimento de centrifugación, también fue positivo en ambos análisis, pero mucho mas fuerte en el experimento de centrifugación.

A partir de los resultados anteriores, resulta evidente que mACl-01-Ab7 C2 y mACl-02-Ab6 son los únicos anticuerpos que muestran actividad en términos de bifuncionalidad al interaccionar con los filamentos de $A\beta_{1-42}$, inhibición de la agregación y desagregación de las fibras preformadas.

Ejemplo 11: RMN y caracterización por fluorescencia de la interacción del anticuerpo monoclonal mACl-01-Ab7 C2 con el péptido β-amiloide 1-42 marcado con ^{13}C

Para evaluar el mecanismo potencial por el cual el mAb solubiliza las fibras pre-formadas o inhibe la formación de fibra, se llevó a cabo un experimento directo entre el análisis fluorescente con Th-T y la RMN en estado sólido del péptido β-amiloide 1-42 marcado en Tyr10 y Val12 con U-^{13}C (Figura 4). Por lo tanto, el propósito de esta investigación fue seguir la transición de la lámina β por medio de espectroscopía de RMN en estado sólido en el péptido β-amiloide y en presencia del anticuerpo monoclonal y comparar directamente éste con la capacidad de desagregación medida por medio del análisis fluorescente con Th-T.

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

La síntesis del péptido marcado que incluye una valina pre-marcada con ^{13}C en la posición 12 (^{12}Val) y una tirosina pre-marcada con ^{13}C en la posición 10 (^{10}Tyr) se llevó a cabo mediante un protocolo de síntesis Fmoc. La identidad y la pureza del péptido se confirmaron mediante espectroscopía de masas MALDI. El péptido β-amiloide (1-42) marcado se utilizó para generar fibras incubando la solución de péptido en tampón PBS durante 1 semana a 37°C. El principal problema, la escasa solubilidad del péptido β-amiloide en tampón PBS, se pudo resolver de la siguiente manera: Se incrementó temporalmente el valor de pH del tampón PBS por medio de cantidades diminutas de amoníaco para disolver el péptido β-amiloide. Se volvió a obtener el valor de pH original del tampón PBS incubando la muestra en presencia de un baño de PBS más grande utilizando el carácter volátil del amoníaco.

Para medir el efecto de los anticuerpos que rompen la lámina β, se incubó la solución de las fibras con el anticuerpo durante 24 horas a 37°C para el análisis tanto de RMN como de Th-T. Para la comparación en tiempo real se utilizó

una alícuota de la misma solución para el análisis fluorescente con Th-T y la solución restante se liofilizó para las mediciones de la RMN.

Después de analizar en primer lugar las capacidades de desagregación de mACl-01-Ab7 C2 mediante incubación simultánea con fibras de β-amiloide marcadas con 13C pre-formadas utilizando el análisis fluorescente con Th-T, se pudo demostrar que el mAb desagregaba las fibras en 38%. A continuación se llevó a cabo el análisis del espectro de RMN.

Para investigar las diferencias entre la incubación con PBS (control) y con mAb, se desconvolucionó cada espectro utilizando PeakFit (http://www.systat.com/products/PeakFit). Las líneas se emparejaron bien empleando un procedimiento de ajuste Lorentziano/Gaussiano mixto, cuyos resultados se muestran en la figura 4. Los resultados se resumen en la Tabla 3, pero la diferencia más obvia son las intensidades integrales de las dos poblaciones que se necesitan para ajustar el doble pico en torno a 30-33 ppm. El pico en c33 ppm corresponde a la conformación en lámina beta de las fibras, mientras que en 30 ppm es el resultado de una conformación en espiral al azar. La muestra incubada en PBS mostró la mayor parte de la marca en la conformación en lámina beta (81,7%) (Fig. 2 parte superior) que se reduce cuando la muestra se incuba con mACl-01-Ab7 C2 (53,5%) (Fig. 4 parte inferior). La reducción en la población de la conformación en lámina beta con respecto a la conformación en espiral al azar determinada por medio del estudio de la Val 12 Cβ es del orden de 35% y por lo tanto está en íntima conformidad con la medida utilizando fluorescencia.

Tabla 3. Comparación de los parámetros ajustados para las dos conformaciones de Val 12 Cβ. Los desplazamientos químicos ajustados para las dos conformaciones son bastante similares pero las intensidades integrales son muy diferentes, reflejando una reducción en la conformación en lámina beta original en aprox. 35% (1-(53,5/81,7)). Esto está en íntima conformidad con el valor obtenido a partir de la medición de la fluorescencia.

Resonancia	PBS			mACl-01-Ab7-C2		
	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	% Intensidad Integral	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	% Intensidad Integral
Val Cβ - lámina	32,60	479	81,7	33,09	366	53,5
Val Cβ - al azar	30,27	200	18,3	30,27	340	46,5

Para resumir estos resultados se pudo demostrar satisfactoriamente que el anticuerpo monoclonal mACl-01-Ab7 C2 que se dirige a la región 1-16 N-terminal del péptido amiloide Aβ se une a las fibras pre-formadas y es capaz de inhibir la agregación *in vitro* a partir de péptidos Aβ monoméricos a fibras y desagregar las fibras pre-formadas, como se demuestra mediante un experimento de ultracentrifugación en gradiente de densidad así como mediante un análisis fluorescente con Th-T. Además, mediante la unión de este anticuerpo a fibras pre-formadas, se pudo inducir una transición de conformación mayoritaria en lámina beta a conformación secundaria en espiral al azar en el entorno de Val12. Este podría ser el mecanismo potencial mediante el cual las fibras podrían ser solubilizadas por la unión del anticuerpo monoclonal mACl-01-Ab7 C2, también porque el análisis detallado del pico de Val 12 Cβ revela la reducción del componente en lámina beta en 35%, lo que está en íntima conformidad con los datos de fluorescencia (38%).

Ejemplo 12: Funcionalidad de mACl-01-Ab7 C2 sobre fibras de amiloide

12.1 Modificación de la conformación de fibras de Aβ1-42 e inicio de la desagregación después de la unión del anticuerpo mACl-01-Ab7 C2

Con el fin de evaluar el mecanismo por medio del cual el anticuerpo es capaz de desagregar las fibras de beta-amiloide ($A\beta_{1-42}$) preformadas, se realizó una comparación directa del análisis fluorescente con Tioflavina-T (Th-T) midiendo la desagregación y una Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en estado sólido del péptido Aβ1-42 marcado en la Tirosina 10 y la Valina 12 con U-^{13}C que analiza la conformación secundaria. El anticuerpo solubilizó 35,4% de las fibras de Aβ1-42 preformadas e indujo simultáneamente un desplazamiento en la conformación secundaria de lámina beta a espiral al azar. La reducción en la población de conformación en lámina beta con respecto a espiral al azar es del orden de 35% y por lo tanto está en íntima conformidad con la medida utilizando el análisis de fluorescencia con Th-T. Estos datos indican que la unión del anticuerpo inicia una transición de la estructura secundaria que ocasiona potencialmente una desestabilización de la disposición intermolecular paralela de las láminas beta que determina la rotura de las fibras elongadas en fragmentos más pequeños.

12.2 Afinidad de unión dependiente de la conformación del anticuerpo mACl-01-Ab7 C2

Puesto que es bien sabido en la bibliografía científica que una proporción de la energía de unión anticuerpo-antígeno se puede utilizar para una modificación dependiente de la energía de la conformación de un antígeno[6], se llevó a cabo un experimento de comparación de la afinidad de unión del anticuerpo mACl-01-Ab7 C2 a la proteína $A\beta_{1-42}$ completa y a un péptido más pequeño, de nueve aminoácidos de longitud, que comprende el epítopo del anticuerpo. Para esta comparación, se analizaron las afinidades del anticuerpo mACl-01-Ab7 C2 por medio de ELISA utilizando péptidos biotinilados que abarcan la secuencia de aminoácidos completa del epítopo de mACl-01-Ab7 C2 (aminoácidos 13-21 de la secuencia $A\beta_{1-42}$, producida por Mimotopes y adquirida de ANAWA Trading SA) y un péptido $A\beta_{1-42}$ completo biotinilado (Bachem). El análisis se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mimotopes). El anticuerpo se une con una afinidad mayor de 38,40% al péptido que comprende su epítopo específico (aminoácidos 13-21 de la secuencia de $A\beta_{1-42}$) que a la proteína $A\beta_{1-42}$ completa. Por lo tanto se sugiere que la diferencia en la energía de afinidad de unión se utilizó para la transición que consume energía de la conformación secundaria de la proteína amiloide para presentar el antígeno en una posición más aceptable para la interacción con el anticuerpo. Esto puede explicar por qué la afinidad del anticuerpo es menor para la subunidad nativa (la proteína amiloide completa) que para la subunidad aislada.

Ejemplo 13: Unión específica de la conformación de mACl-01-Ab7 C2 a diferentes clases de proteína amiloide

Con el fin de evaluar la especificidad de mACl-01-Ab7 C2 a diferentes fases de proteína amiloide polimerizada, amiloide soluble monomérico y polimérico, concretamente proteína amiloide ß (Aß), y amiloide fibrilar, se llevó a cabo un ELISA recubierto con estas diferentes fases de beta-amiloide polimérico. Los monómeros se prepararon de acuerdo con un método modificado publicado por [7], amiloide polimérico soluble, concretamente, amiloide ß (Aß) de acuerdo con [8], mientras las fibras se realizaron mediante incubación del amiloide (Bachem, Suiza) con una concentración final de 1 µg/µl en Tris/HCl pH 7,4 a 37°C durante 5 días seguido de una etapa de centrifugación (10.000 rpm durante 5 minutos). A continuación los polímeros de amiloide se aplicaron como recubrimiento sobre placas de ELISA con una concentración final de 55 µg/ml y se llevó a cabo un ELISA para la afinidad de unión utilizando un anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) marcado con fosfatasa alcalina. El anticuerpo se une con mayor afinidad a la proteína amiloide ß (Aß) soluble polimérica (CI50 = 2,53 nM) que a las fibras (CI50 = 5,27 nM) y con la afinidad más pequeña a los monómeros (CI50 = 8,3 nM). Estos datos indican que la unión del anticuerpo está influenciada además de por su epítopo, por la conformación de los diferentes agregados de amiloide.

Ejemplo 14: Mapeo epitópico del anticuerpo monoclonal mACl-01-Ab7 C2

Se realizó el mapeo epitópico del anticuerpo monoclonal mACl-01-Ab7 C2 mediante ELISA utilizando tres bibliotecas peptídicas diferentes. Una biblioteca comprende un total de 33 péptidos biotinilados que abarcan la secuencia de aminoácidos (aa) completa de Aβ1-42 (producida por Mimotopes y adquirida de ANAWA Trading SA), la segunda biblioteca contiene péptidos biotinilados que utiliza un péptido 12 (aa 12-20 de Aβ) de la primera biblioteca de péptidos y que sustituye cada aminoácido de la secuencia por alanina (véase la siguiente tabla 41), y la tercera biblioteca contiene los péptidos biotinilados 13, 14, o 15 (aa 13-21, 14-22 o 15-23 de Aβ y que sustituye en cada caso los últimos aminoácidos alanina o glicina por el aa 21 que ya es una alanina (véase la siguiente tabla 5). Se utilizó un péptido Aβ1-42 completo biotinilado como control positivo (Bachem). El mapeo epitópico se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mimotopes). En resumen, se bloquearon placas recubiertas con estreptavidina (NUNC) con BSA al 0,1% en PBS durante la noche a 4°C. Después de lavar con PBS-Tween 20 al 0,05%, las placas se recubrieron durante 1 hora a RT con diferentes péptidos de la biblioteca, se diluyeron en BSA al 0,1%, azida de sodio al 0,1% en PBS a una concentración final de 10 µM. Después de lavar, las placas se incubaron durante 1 hora a RT con el anticuerpo mACl-01-Ab7 C2 o un anticuerpo IgG2b de ratón de control de isotipo, diluido a 10 µg/ml en BSA al 2%, azida de sodio al 0,1% en PBS. Las placas se lavaron de nuevo y se incubaron con anti-IgG de ratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina durante 1 h a RT. Tras el lavado final, las placas se incubaron con sustrato de fosfatasa (pNPP) y se leyeron a 405 nm utilizando un lector de placa de ELISA.

Se demostró que el anticuerpo monoclonal mACl-01-Ab7 C2 se unía específicamente a los péptidos 12, 13, 14 y 15 de la primera biblioteca de péptidos. Estos 4 péptidos comprende los aa 12-20 (VHHQKLVFF), 13-21 (HHQKLVFFA), 14-22 (HQKLVFFAE) y 15-23 (QKLVFFAED) de Aβ1-42 lo que sugiere que el epítopo se encuentra en la región 12-23 de Aβ. Se utilizó una segunda biblioteca con sustituciones de alanina para determinar el aa crítico para la unión al péptido 12-20 (VHHQKLVFF). La unión del anticuerpo mACl-01-Ab7 C2 se pierde completamente cuando los aa 16, 17, 19 o 20 son sustituidos por alanina, lo que indica que estos aa son absolutamente críticos para la unión del anticuerpo a Aβ. La unión del anticuerpo mACl-01-Ab7 C2 se pierde parcialmente cuando se sustituyen los aa 15 y 18.

La unión también se perdió casi completamente cuando el aa 14 fue sustituido por una alanina, indicando que el aa 14 también es muy importante para la unión.

Finalmente, se utilizó una tercera biblioteca para determinar si los aa 21, 22 o 23 son críticos para la unión al epítopo. La unión del anticuerpo a los aa 15-23 se redujo cuando el aa 23 fue sustituido por una alanina, indicando que el aa 23 también es importante para la unión. La unión se perdió parcialmente cuando el aa 21 fue sustituido por

una glicina y se perdió parcialmente cuando el aa 22 fue sustituido por una alanina.

Tabla 4. Resumen de los péptidos utilizados en la segunda biblioteca.

Los aa que son importantes para la unión están marcados en cursiva y subrayados y los aa absolutamente críticos para la unión están marcados en cursiva y negrita y subrayados									
p12-20	V	H	H	Q	K	L	V	F	F
A12	**A**	H	H	Q	K	L	V	F	F
A13	V	**A**	H	Q	K	L	V	F	F
A14	V	H	**A**	Q	K	L	V	F	F
A15	V	H	H	**A**	K	L	V	F	F
A16	V	H	H	Q	**A**	L	V	F	F
A17	V	H	H	Q	K	**A**	V	F	F
A18	V	H	H	Q	K	L	**A**	F	F
A19	V	H	H	Q	K	L	V	**A**	F
A20	V	H	H	Q	K	L	V	F	**A**
aa núm.	12	13	***14***	*15*	***16***	***17***	*18*	***19***	***20***

Tabla 5. Resumen de los péptidos utilizados en la tercera biblioteca.

Los aa que son importantes para la unión están marcados en cursiva y subrayados y los aa absolutamente críticos para la unión están marcados en cursiva y negrita y subrayados												
p13-21		H	H	Q	K	L	V	F	F	A		
p13-21	G21	H	H	Q	K	L	V	F	F	**G**		
p14-22			H	Q	K	L	V	F	F	A	E	
p14-22	A22		H	Q	K	L	V	F	F	A	**A**	
p15-23				Q	K	L	V	F	F	A	E	D
p15-23	A23			Q	K	L	V	F	F	A	E	**A**
aa núm.		13	***14***	*15*	***16***	***17***	*18*	***19***	***20***	21	22	*23*

Ejemplo 15: Influencia de la vacunación pasiva con mACI-01-Ab7 C2 sobre la carga de amiloide del cerebro en ratones hAPP transgénicos sencillos

Para evaluar la capacidad *in vivo* del anticuerpo monoclonal mACI-01-Ab7 C2 para unirse a y aclarar el amiloide soluble del cerebro, se utilizaron ratones hAPP sencillos de 6 meses de edad [9], agrupados por género y edad, para

un estudio de inmunización pasiva con dosis diferentes. La carga de amiloide soluble se analizó al final del estudio recogiendo el cerebro de los animales y realizando un ELISA específico para Aβ 1-40 y Aβ 1-42 (TGC, Alemania).

Ocho-trece animales por grupo recibieron dos inyecciones a un intervalo de una semana de 100, 300 y 1000 µg de anticuerpo monoclonal en 200 µl de PBS mientras la inyección de PBS solo sirvió como control. Un día después de la segunda inyección, los animales se sacrificaron para el análisis bioquímico de la fracción de amiloide soluble. Para cuantificar la cantidad de Aβ 1-40 humano y Aβ 1-42 humano en la fracción soluble de los productos homogeneizados de cerebro y/o fluido cefalorraquídeo (LCR), se utilizaron kits de Análisis de Inmunoabsorción con Enzima Ligada (ELISA) asequibles comercialmente (h Amyloid β 40 or β 42 ELISA high sensitive, TGC, Suiza). El ELISA se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, se prepararon patrones (una dilución de Aβ 1-40 o Aβ 1-42 sintéticos) y muestras en una placa de polipropileno de 96 pocillos sin capacidad de unión a la proteína (Greiner, Alemania). Se prepararon diluciones de los patrones con concentraciones finales de 1.000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3 y 15,6 µg/ml y las muestras se prepararon en el diluyente de muestra, facilitado con el kit de ELISA, hasta un volumen final de 60 µl. Puesto que los niveles de amiloide se incrementan con la edad del ratón y puesto que la evaluación real requiere que las lecturas de las muestras estén en una porción lineal de la curva patrón, las muestras para el análisis de Aβ 40 se diluyeron 2:3, las muestras para el análisis de Aβ 42 no se diluyeron.

Las muestras, los patrones y los blancos (50 µl) se añadieron a la placa de poliestirol recubierta con anti- Aβ (el anticuerpo de captura reconoce selectivamente el extremo C terminal del antígeno) además de con producto conjugado de anticuerpo anti-Aβ selectivo (anticuerpo de detección biotinilado) y se incubaron durante la noche a 4°C con el fin de permitir la formación del complejo anticuerpo-Amiloide-anticuerpo. Al día siguiente, se añadió un producto conjugado de Estreptavidina-Peroxidasa, seguido 30 minutos más tarde de la adición de una mezcla de TMB/peróxido, dando como resultado la conversión del sustrato en un producto coloreado y la intensidad de color se midió por medio de fotometría con un lector de ELISA con un filtro de 450 nm. La cuantificación del contenido de Aβ de las muestras se obtuvo comparando la absorbancia para la curva patrón elaborada con Aβ 1-40 o Aβ 1-42 sintéticos. Los datos se expresaron como cambios individuales con respecto al valor de control medio (en porcentaje con respecto al control).

La cantidad total de Aβ 40 en productos homogeneizados de cerebro se pudo reducir significativamente y aproximadamente de manera no sustancial para Aβ 42 cuando los ratones hAPP sencillos fueron inmunizados pasivamente por medio de dos inyecciones i.p. de anticuerpo monoclonal ACI-01-Ab7 C2 a una dosis de 300 µg (Aβ 40: -27,3 ± 13,9% con $p<0,05$; Aβ 42: -8,6 ± 22,4 con $p=0,56$; test de T de Student no pareado), mientras 100 y 1.000 µg no alcanzaron significación. La inmunización con 100 µg condujo a un incremento para Aβ 40 y Aβ 42 en productos homogeneizados de cerebro (Aβ 40: 32,3 ± 36,8%; Aβ42: 38,3 ± 51,4%) mientras el tratamiento con 1.000 µg logró la tendencia correcta de disminución de la carga de amiloide y pudo ser potencialmente eficaz con un mayor número de animales por grupo (Aβ 40: -2,2 ± 26,0%; Aβ 42: -9,3 ± 15,9%). Estos datos demuestran que en un protocolo de inmunización aguda el anticuerpo mACI-01-Ab7 C2 es capaz de disminuir la cantidad total de Aβ soluble en el cerebro de este modelo de EA murino. Curiosamente, parece que la relación con la dosis es transitoria, pero se deben realizar más estudios con grupos más grandes con el fin de obtener datos significativos.

Ejemplo 16: Influencia de la administración pasiva crónica de mACI-01-Ab7 C2 sobre la carga de placa en ratones hAPPxPS1 transgénicos dobles

Para evaluar la capacidad *in vivo* del anticuerpo monoclonal mACI-01-Ab7 C2 para unirse a y reducir las placas amiloides en el cerebro, se utilizaron ratones hAPPxPS1 transgénicos dobles de 3,5 meses de edad [10], agrupados por género y edad, para un estudio de inmunización pasiva crónica de 4 meses de duración. Las placas amiloides se analizaron al final del estudio mediante inmunohistoquímica del cerebro de los animales por la unión de Tioflavina S.

Quince animales transgénicos recibieron 16 inyecciones semanalmente de 500 µg de anticuerpo monoclonal en PBS. Quince animales a los que se les inyectó PBS solo, sirvieron como controles. Todas las inyecciones fueron administradas intraperitonealmente. Al sacrificarlos, los ratones fueron anestesiados y sometidos a lavado trans-cardíaco con suero fisiológico a 4°C para eliminar la sangre de los vasos del cerebro. Con posterioridad, se retiró el cerebro del cráneo y se separaron el cerebro posterior y el prosencéfalo con un corte en el plano coronal/frontal. El prosencéfalo se dividió uniformemente en hemisferio izquierdo y derecho utilizando un corte sagital en la línea media. Un hemisferio se fijó con posterioridad durante la noche en paraformaldehído al 4% para la histología. Las secciones sagitales del vibrátomo (40 µm) se cortaron para la libre circulación de las incubaciones y se almacenaron a 4°C hasta la tinción en PBS con azida de sodio al 0,1%. Se tiñeron cinco secciones a diferentes niveles para las placas densas con Tioflavina S. Las secciones de todos los animales utilizados se distribuyeron al azar para la tinción y la cuantificación ciega. Se captaron imágenes con un microscopio DMR Leica equipado con una cámara Sony DXC-9100P y se analizaron con un ordenador utilizando el programa Leica Q-Win. Los ajustes de intensidad de luz y condensador para el microscopio se mantuvieron constantes durante todo el procedimiento de captación de imágenes. Todas las imágenes captadas se sometieron a las mismas subrutinas de ordenador para minimizar las tendencias del investigador. Se aplicaron los umbrales de la agrupación por densidades de luz uniformemente a lo largo de todo el análisis. Se seleccionó la zona del subículo para la cuantificación automática de la carga de amiloide

en la tinción con Tioflavina S.

La carga total de placas y el número de placas en la zona del subículo se pudieron reducir significativamente cuando los ratones hAPP/PS1 dobles se inmunizaron pasivamente durante 4 meses como se ha descrito anteriormente. En la carga de placas se pudo lograr un descenso significativo de 31% (mACI-01-Ab7 C2: 1,11 ± 0,21% y control: 1,61 ± 0,35%; p=0,003, Test de la U de Mann-Whitney) mientras la inmunización pasiva crónica redujo significativamente la cantidad de placas en 19% (mACl-01-Ab7 C2: 8,73 ± 1,36 y control: 10,78 ± 1,36; p=0,006, Test de la U de Mann-Whitney), indicando que la solubilización de la placa se producía en un grado ligeramente menor que la desorganización de la placa.

Ejemplo 17: Influencia de la vacunación pasiva con mACl-01-Ab7 C2 sobre la capacidad de memoria en ratones hAPP transgénicos sencillos

Para analizar la capacidad *in vivo* del anticuerpo mACl-01-Ab7 C2 para modificar o incrementar la funcionalidad cognitiva, se utilizaron ratones hAPP sencillos de 9 meses de edad, agrupados por género y edad, para el estudio de inmunización pasiva. Se midió la cognición no espacial al final del período de inmunización basado en un Test de Reconocimiento de Objetos nuevos (ORT).

Doce animales por grupo recibieron dos inyecciones intraperitoneales de 400 µg de anticuerpo monoclonal en 200 µl de PBS mientas la inyección de PBS solo sirvió como control. Un día después de la segunda inyección, se estudió la capacidad cognitiva en un Test de Reconocimiento de Objetos nuevos (ORT)[12, 13]. Para enrolarlos en el ORT, los ratones se colocaron durante 10 minutos en una arena conductual y se enfrentaron a un nuevo objeto desconocido. Se registró el tiempo de exploración. Tres horas más tarde los mismos animales se volvieron a colocar en la misma arena para una segunda sesión pero enfrentados al objeto viejo, previamente explorado, y adicionalmente a un objeto nuevo. De nuevo se midieron los tiempos de exploración para ambos objetos y se calculó el índice de cognición resultante como la razón del tiempo de exploración para el nuevo objeto en relación con el tiempo de exploración total y se expresó como cambios proporcionales con respecto al control.

La vacunación pasiva con mACl-01-Ab7 C2 conduce a un incremento significativo de las capacidades de memoria cognitiva en ratones con EA transgénicos sencillos (mACl-01-Ab7 C2: 131,6 ± 9,1% y control: 100,0 ± 9,2% con $p<0,05$; test de la T de Student no pareado y n=12 para cada grupo).

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 Branuschweig, bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest:

Denominación de la línea de hibridoma	Denominación del anticuerpo	Fecha del depósito	Núm. de Acceso
FP 12H3	mACl-01-Ab7	1 de Diciembre de 2005	DSM ACC2752
FP 12H3-C2	mACl-01-Ab7C2	1 de Diciembre de 2005	DSM ACC2750
FP 12H3-G2	mACl-01-Ab7G2	1 de Diciembre de 2005	DSM ACC2751
ET 7E3	mACl-02-Ab6	8 de Diciembre de 2005	DSM ACC2755
EJ 7H3	mACl-24-Ab4	8 de Diciembre de 2005	DSM ACC2756

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 Microsc Tech 14:313-323.

Blond y Goldberg, 1987, PNAS March 1, 1987 Vol. 84| núm. 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, Holtzmann, D.M (2001). Proc Natl Acad Sci USA 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 presenilin1. 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)

Hanan E. et al (1996), Amyloid: The International Journal of Experimental and Clinical Investigation, vol. 3, 130-133.

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/Technoloy, 9:421 (1991)

Iwadate M, Asakura T, Williamson MP. (1999) J.Biomol.NMR; 13: 199-211.

Kirschner, D.A., Abraham,C., & 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).

Khaw, B. A. et al. J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982)

Kennedy, J. H., et al., 1976 (Clin. Chim. Acta 70:1-31)

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))

LeVine, H. III, (2002). Arch Biochem Biophys 404, 106-115.

Luca et al., 2001

McGeer et al., 1994

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.

Nelson, R. & Eisenberg, D. Recent atomic models of amyloid fibril structure. Curr. Opin. Struct. Biol.(2006*).*

Nicolau, C., Greferath, R., Balaban, T. S., Lazarte, J. E., y Hopkins, R. J. (2002). Proc Natl Acad Sci USA 99, 2332-2337.

Queen et al., Proc. Natl 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.

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

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. loc. cit.

Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Smith, S. O., and Bormann, B. J. (1995). Proc Natl Acad Sci USA 92, 488-491.

Schenk et al., 1999

Schurs, A. H. W. M., et al. 1977 (Clin. Chim Acta 81;1-40

Slot JW, Geuze HJ (1985) A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. Eur J Cell Biol 38:87-93.

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), págs. 259 - 270

Ye, J., Dave, U. P., Grishin, N. V., Goldstein, J. L., y Brown, M. S. (2000). Proc Natl 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 US 2003/108551

Documento WO 2004/058258

Documento WO 96/1359

Documento WO 96/29605

Documento WO 2007/064972

LISTA DE SECUENCIAS

<110> AC Immune S.A.

<120> Anticuerpo Monoclonal

<130> L3017 EP/1 BS

<150> EP 05027092.5
<151> 2005-12-12

<150> EP 06014729.5
<151> 2006-07-14

<150> EP 06020766.9
<151> 2006-10-02

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<223> péptido antigénico Aß 1-15

<400> 1
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln
1 5 10 15

<210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<223> péptido antigénico Aß 1-16

<400> 2
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<223> péptido antigénico Aß 1-16(Δ14)

<400> 3
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His Gln Lys
1 5 10 15

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>

<223> péptido antigénico Aß 22-35

<400> 4
Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met
1 5 10

<210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<223> péptido antigénico Aß29-40

<400> 5
Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val
1 5 10

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<223> péptido antigénico Aß1-17

<400> 6
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
Leu
1 5 10 15

<210> 7
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8

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

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

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

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

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

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

<210> 9
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 9
gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc
60

atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta tttacattgg
120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagtttc caaccgattt
180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc
240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcct
300

tggacgttcg gtggaggcac caagctagaa atcaaa
336

<210> 10
<211> 417
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 10
atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttcctgcttc cagcagtgat
60

gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc
120

tcttgcagat ctagtcagag ccttgtatat agtaatggag acacctattt acattggtac
180

ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct
240

ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc
300

agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccttgg
360

acgttcggtg gaggcaccaa gctagaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgta
417

<210> 11
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 11
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc
60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact
120

ccagacaaga ggctggaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat
180

ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac
240

ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagtggtgac
300

tactggggcc aaggctccac tctcacagtc tcctca
336

<210> 12
<211> 408
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 12
atgrasttsg ggytcagmtt grttttcctt gcccttattt taaaaggtgt ccaatgtgag
60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtccct gaaactctcc
120

tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tatggcatgt cttgggttcg ccagactcca
180

gacaagaggc tggaattggt cgcaagcatc aatagtaatg gtggtagcac ctattatcca
240

gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg
300

caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag tggtgactac
360

tggggccaag gctccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacaccc
408

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

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

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (5)..(5)
<223> xaa puede ser Ala, val, Leu, norleucina, Met, Phe, o Ile

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (6)..(6)
<223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, o Ile

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (7)..(7)
<223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, o Ile

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

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (9)..(9)
<223> Xaa puede ser Glu o Asp

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

<400> 13
His Xaa Lys Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 14
<211> 11

<212> PRT
<213> Homo sapiens

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

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (3)..(3) Asn o Gln
<223> Xaa puede ser Asn o Gln

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser His, Asn, Gln, Lys o Arg

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (5)..(5)
<223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, Ser o Ile

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (6)..(6)
<223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, Ser o Ile

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (9)..(9)
<223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, Ser o Ile

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

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (11)..(11)
<223> Xaa puede ser Glu o Asp

<400> 14
Xaa His Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

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

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

<220>
<221> rasgo_misc

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

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (8)..(8)
<223> xaa puede ser Ala, Val, Leu, Ser o Ile

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (9)..(9)
<223> Xaa puede ser Glu o Asp

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

<400> 15
Xaa Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

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

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

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (8)..(8)
<223> xaa puede ser Ala, Val, Leu, Ser o Ile

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (9)..(9)
<223> Xaa puede ser Glu o Asp

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (10)..(10)
<223> Xaa puede ser Flu o Asp

<400> 16
His Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> rasgo_misc

<222> (1)..(1)
<223> Xaa puede ser His, Asn, Gln, Lys o Arg

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

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

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

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (9)..(9)
<223> Xaa puede ser Glu o Asp

<400> 17
Xaa Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Asp
1 5 10

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

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

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

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

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (9)..(9)
<223> Xaa puede ser Glu o Asp

<400> 18
His Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Asp
1 5 10

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (1)..(1)
<223> xaa puede ser His, Asn, Gln, Lys o Arg

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

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (3)..(3)
<223> Xaa puede ser Lys, His, Asn, Gln o Arg

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

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

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (9)..(9)
<223> Xaa puede ser Glu o Asp

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

<400> 19
Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Val His His Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
1 5 10

<210> 21
<211> 219
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
        115                 120                 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
    130                 135                 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
145                 150                 155                 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
                165                 170                 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
            180                 185                 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
        195                 200                 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
    210                 215
```

<210> 22
<211> 448
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 22

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
        35                  40                  45
```

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

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

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

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

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

Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
145                 150                 155                 160

Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met
                165                 170                 175

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val
            180                 185                 190

Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Thr Val Asp Lys Lys
        195                 200                 205

Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys
    210                 215                 220

Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser
225                 230                 235                 240

Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu
                245                 250                 255

Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro
            260                 265                 270

Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala
        275                 280                 285

Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val
```

```
    290                 295                 300

Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
305                 310                 315                 320

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr
                325                 330                 335

Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Ile Leu
            340                 345                 350

Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys
        355                 360                 365

Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser
    370                 375                 380

Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp
385                 390                 395                 400

Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser
                405                 410                 415

Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly
            420                 425                 430

Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
        435                 440                 445
```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o una porción funcional del mismo, capaz de reconocer o unirse a un epítopo específico de amiloide beta, en donde dicho anticuerpo o porción funcional del mismo comprenden un fragmento de unión al epítopo de un anticuerpo monoclonal obtenible a partir de una línea celular de hibridoma FP 12H3-C2, depositada el 1 de Diciembre de 2005 como DSM ACC2750.

2. Un anticuerpo monoclonal o una porción funcional del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, producido por una línea celular de hibridoma FP 12H3-C2, depositada el 1 de Diciembre de 2005 como DSM ACC2750.

3. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores o las partes funcionales del mismo, que es un anticuerpo monoclonal, o un anticuerpo quimérico.

4. Un anticuerpo humanizado, o una porción funcional del mismo, cuyo anticuerpo o porción funcional del mismo comprenden las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo monoclonal obtenible a partir de una línea celular de hibridoma FP 12H3-C2, depositada el 1 de Diciembre de 2005 como DSM ACC2750.

5. Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo o una porción funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

6. Una línea celular productora de un anticuerpo o una porción funcional del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

7. La línea celular de la reivindicación 6, que es una línea celular de hibridoma FP 12H3-C2, depositada el 1 de Diciembre de 2005 como DSM ACC2750.

8. Un método para producir un anticuerpo o una porción funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende cultivar la línea celular de la reivindicación 6 o 7.

9. Un anticuerpo o una porción funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 producido mediante el método de la reivindicación 8.

10. Una composición que comprende el anticuerpo o una porción funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y que comprende opcionalmente de manera adicional un vehículo farmacéuticamente aceptable.

11. La composición de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis.

12. Una mezcla que comprende un anticuerpo o una porción funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y, opcionalmente, una sustancia biológicamente activa adicional utilizada en la medicación de enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amilode y/o un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

13. El uso de un anticuerpo y/o una porción funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una composición de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, o una mezcla de acuerdo con la reivindicación 12, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o el alivio de los efectos de la amiloidosis incluyendo, pero no limitados a:

(a) trastornos neurológicos tales como la Enfermedad de Alzheimer (EA);
(b) enfermedades o afecciones **caracterizadas por** una pérdida de capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Holandés), y el complejo de Parkinson-Demencia de Guam; y
(c) parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (MCI), diabetes de comienzo en la edad adulta, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y degeneración macular.

14. Un método para la preparación de un anticuerpo o una porción funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una composición de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, o una mezcla de acuerdo con la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento o alivio de los efectos de la amiloidosis incluyendo, pero no limitados a:

(a) trastornos neurológicos tales como la Enfermedad de Alzheimer (EA);
(b) enfermedades o afecciones **caracterizadas por** una pérdida de capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down,

hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Holandés), y el complejo de Parkinson-Demencia de Guam; y
(c) parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (MCI), diabetes de comienzo en la edad adulta, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y degeneración macular.

15. La composición de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, para su uso en:

(a) la reducción de la carga de placas o en la reducción de la cantidad de placas en el cerebro de un animal, concretamente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con el amiloide; o
(b) la reducción de la cantidad de placas en el cerebro de un animal, concretamente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección; o
(c) la disminución de la cantidad total de Aβ soluble en el cerebro de un animal, concretamente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociadas con el amiloide; o
(d) la prevención, el tratamiento o el alivio de los efectos de la amiloidosis incluyendo, pero no limitados a:

(i) trastornos neurológicos tales como la Enfermedad de Alzheimer (EA);
(ii) enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Holandés), y el complejo de Parkinson-Demencia de Guam; y
(iii) parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (MCI), diabetes de Comienzo en la edad adulta, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y degeneración macular; o

(e) la conservación o el incremento de la capacidad de memoria cognitiva en un mamífero que muestra una enfermedad o afección asociadas con el amiloide.

16. La línea celular de la reivindicación 6, que es una línea celular de hibridoma.

17. Un método de diagnóstico de una enfermedad o afección asociadas con el amiloide en un paciente que comprende detectar la unión inmunoespecífica de un anticuerpo o un fragmento activo del mismo a un epítopo de la proteína amiloide en una muestra que incluye las etapas de:

a) poner en contacto la muestra que se sospecha que contiene el antígeno amiloide con un anticuerpo o porción funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, cuyo anticuerpo o porción funcional del mismo se unen a un epítopo de la proteína amiloide;
b) permitir que el anticuerpo o porción funcional del mismo se unan al antígeno amiloide para formar un complejo inmunológico;
c) detectar la formación del complejo inmunológico; y
d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de antígeno amiloide en la muestra.

18. Un método para diagnosticar una predisposición a una enfermedad o afección asociadas con el amiloide en un paciente que comprende detectar la unión inmunoespecífica de un anticuerpo o un fragmento activo del mismo a un epítopo de la proteína amiloide en una muestra que incluye las etapas de:

a) poner en contacto la muestra que se sospecha que contiene el antígeno amiloide con un anticuerpo o porción funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, cuyo anticuerpo o porción funcional del mismo se une a un epítopo de la proteína amiloide;
b) permitir que el anticuerpo o porción funcional del mismo se unan al 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 antígeno amiloide en la muestra; y
e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal,

en donde un incremento en la cantidad de dicho agregado en comparación con un valor de control normal indica que dicho paciente está en riesgo de desarrollar una enfermedad o afección asociadas con el amiloide.

19. Un método para verificar una enfermedad residual mínima en un paciente después del tratamiento con un anticuerpo o porción funcional del mismo o una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho método comprende:

a) poner en contacto la muestra que se sospecha que contiene el antígeno amiloide con un anticuerpo o porción funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, cuyo anticuerpo o porción funcional del mismo se une a un epítopo de la proteína amiloide;
b) permitir que el anticuerpo o porción funcional del mismo se unan al 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 antígeno amiloide en la muestra; y
e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal,

en donde un incremento en la cantidad de dicho agregado en comparación con un valor de control normal indica que dicho paciente todavía padece una enfermedad residual mínima.

20. Un método para pronosticar la capacidad de respuesta de un paciente que está siendo tratado con un anticuerpo o porción funcional del mismo o una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:

a) poner en contacto la muestra que se sospecha que contiene el antígeno amiloide con un anticuerpo o porción funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, cuyo anticuerpo o porción funcional del mismo se une a un epítopo de la proteína amiloide;
b) permitir que el anticuerpo o porción funcional del mismo se unan al 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 antígeno amiloide en la muestra; y
e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico antes y después del comienzo del tratamiento,

en donde una disminución en la cantidad de dicho agregado indica que dicho paciente tiene un alto potencial de responder al tratamiento.

21. Un kit de ensayo para la detección y el diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas con el amiloide que comprende un anticuerpo o una porción funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

Aβ $_{1-15}$ (ACI-24)

H_2N-Lys-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-His(Trt)-Gln(Trt)- Lys-Lys-OH

Aβ $_{1-16}$ (ACI-01)

Ac-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Lys-Gly-OH

Aβ $_{1-16(614)}$ (ACI-02)

Ac-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Lys-Gly-OH

Aβ $_{22-35}$(ACI-11)

Ac-Lys-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Val-Gly-Ser(tBu)-Asn(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Lys-Gly-OH

Aβ $_{29-40}$ (ACI-12)

Ac-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Lys-Gly-OH

FIG 1

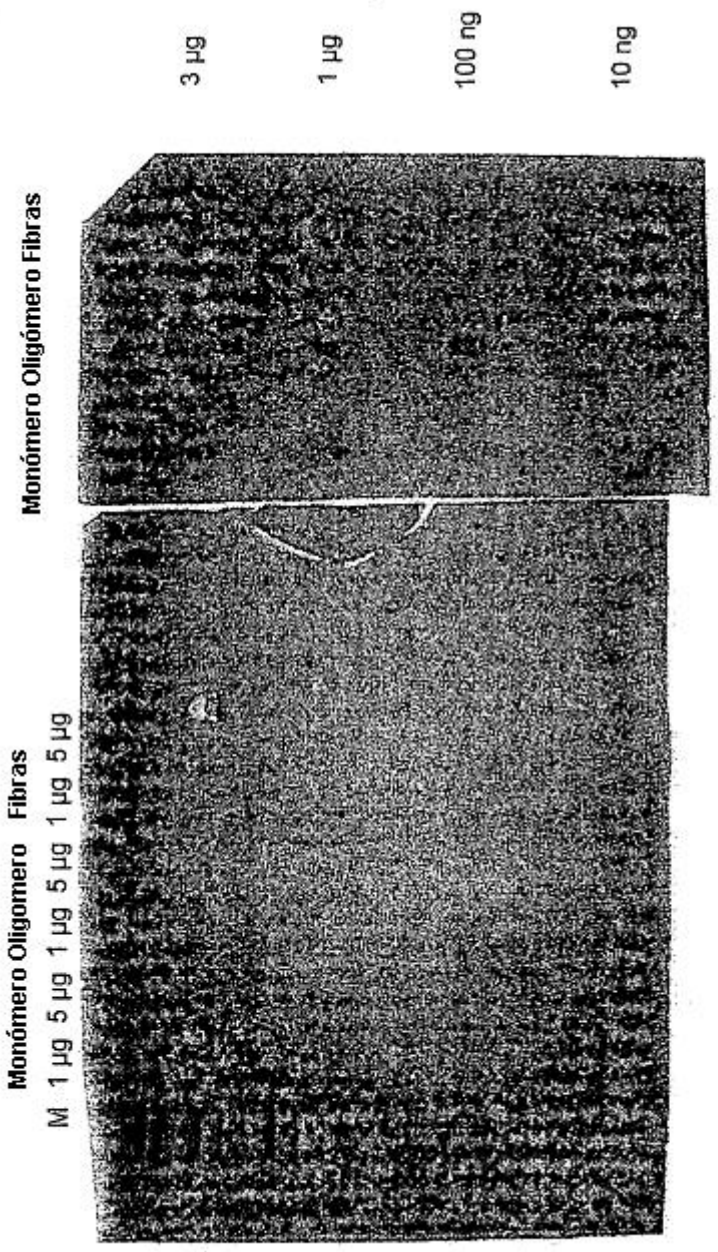
Monómero Oligomero Fibras
M 1 µg 5 µg 1 µg 5 µg 1 µg 5 µg
Monómero Oligómero Fibras
3 µg
1 µg
100 ng
10 ng

FIG. 2a

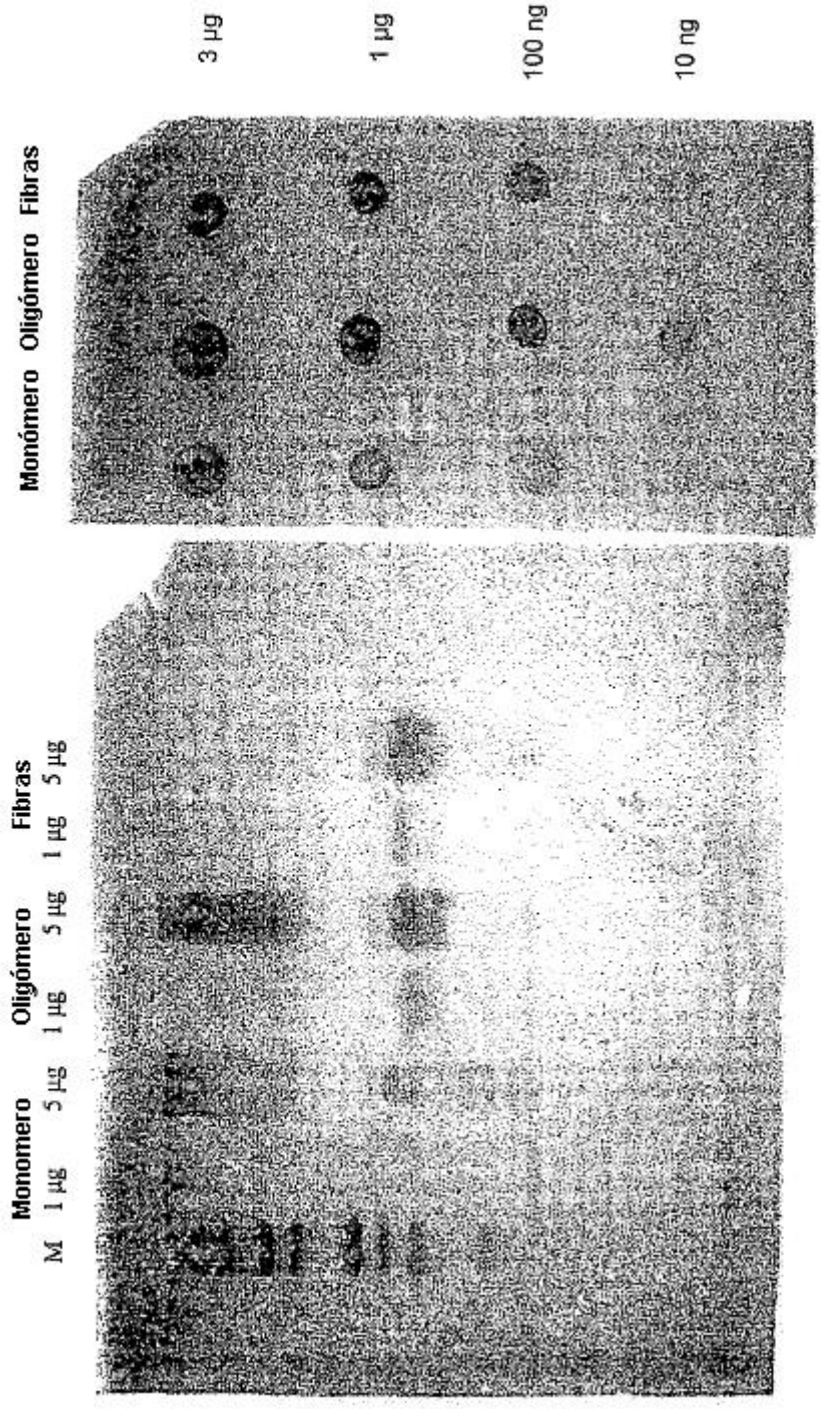
Monómero Oligómero Fibras
3 µg
1 µg
100 ng
10 ng
M 1 µg 5 µg 1 µg 5 µg 1 µg 5 µg
Monomero Oligómero Fibras

FIG. 2b

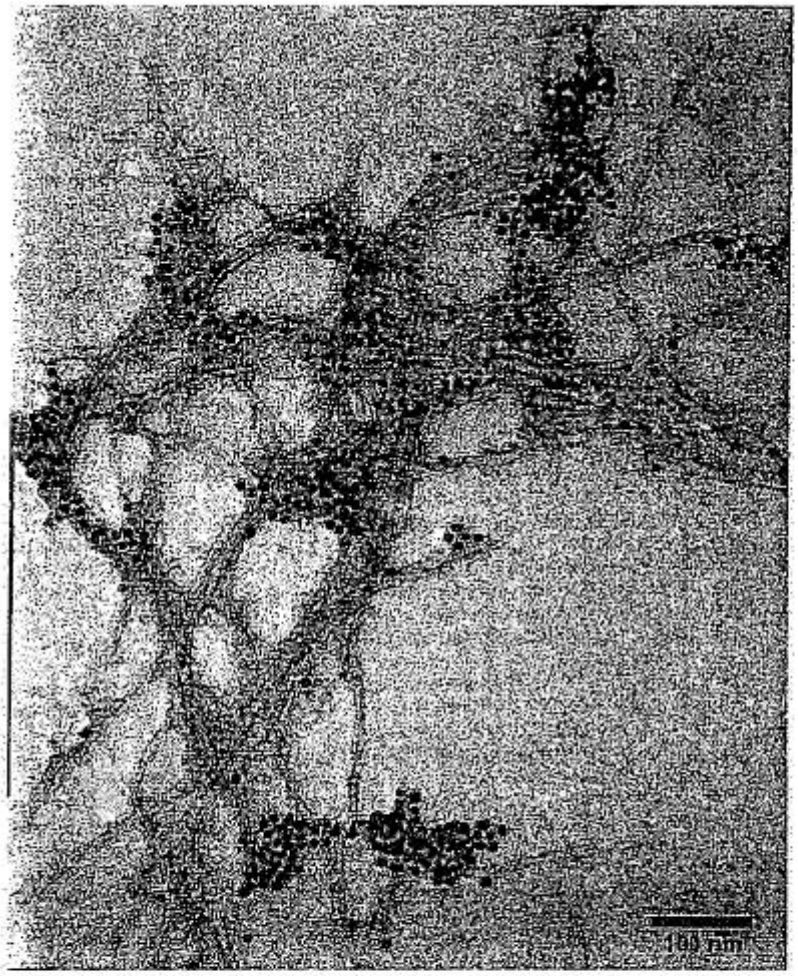

FIG. 3a

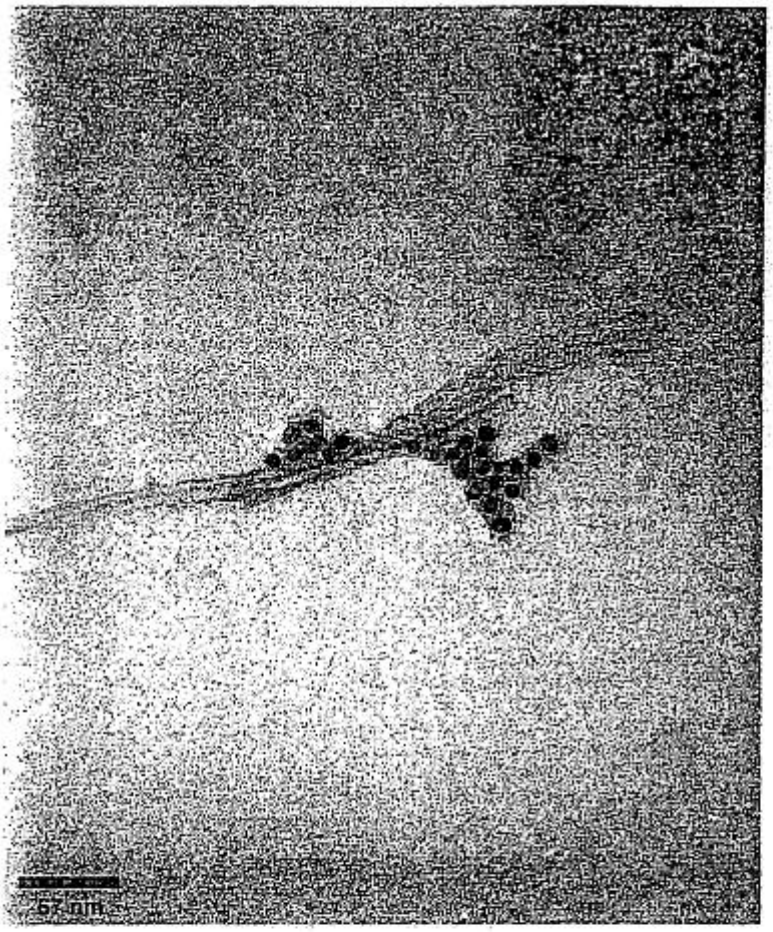

FIG 3b

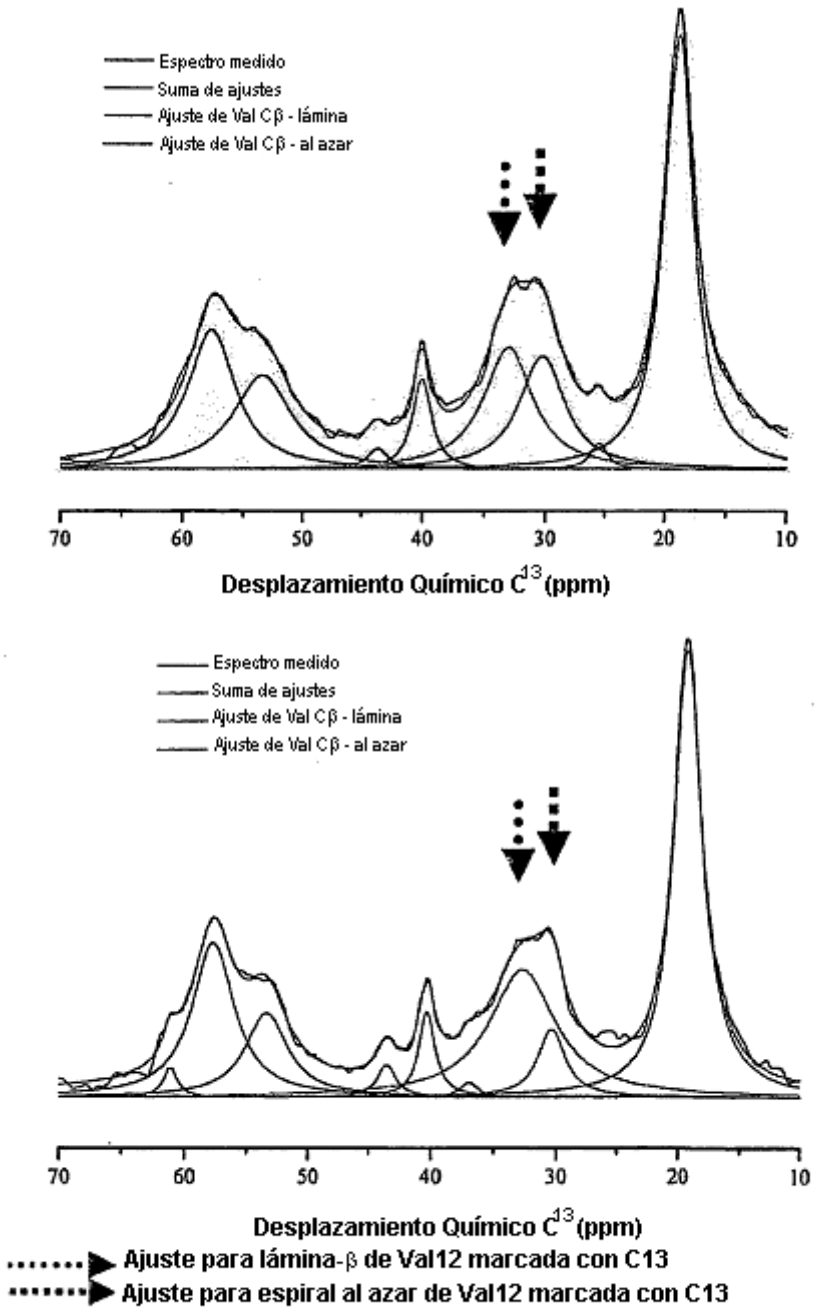
Espectro medido
Suma de ajustes
Ajuste de Val Cβ - lámina
Ajuste de Val Cβ - al azar
70
60
50
40
30
20
10
Desplazamiento Químico C13 (ppm)
Espectro medido
Suma de ajustes
Ajuste de Val Cβ - lámina
Ajuste de Val Cβ - al azar
70
60
50
40
30
20
10
Desplazamiento Químico C13 (ppm)
Ajuste para lámina-β de Val12 marcada con C13
Ajuste para espiral al azar de Val12 marcada con C13

FIG. 4