

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 040**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2007 E 07755675 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2182983**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades amiloidogénicas con anticuerpos anti-beta humanizados**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.09.2014

73 Titular/es:

**JANSSEN ALZHEIMER IMMUNOTHERAPY
(50.0%)
Airton Road, Tallaght
Dublin 24, IE y
WYETH LLC (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LIEBERBURG, IVAN;
CALLAWAY, JIM y
GRUNDMAN, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 498 040 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de enfermedades amiloidogénicas con anticuerpos anti-beta humanizados

5 Antecedentes de la invención

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad progresiva que produce demencia senil. Véanse generalmente Selkoe, TINS 16:403 (1993); Hardy y col., documento WO 92/13069; Selkoe, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53:438 (1994); Duff y col., Nature 373:476 (1995); Games y col., Nature 373:523 (1995). En términos generales, la enfermedad se clasifica en dos categorías: aparición tardía, que se producen en la vejez (+65 años) y aparición temprana, que se desarrolla mucho antes del periodo senil, es decir, entre los 35 y los 60 años. En ambos tipos de enfermedad, la patología es la misma, pero las anomalías tienden a ser más graves y generalizadas en casos que empiezan en una edad más temprana. La enfermedad se caracteriza por al menos dos tipos de lesiones en el cerebro, ovillos neurofibrilares y placas seniles. Los ovillos neurofibrilares son depósitos intracelulares de microtúbulos asociados a la proteína tau que consisten en dos filamentos retorcidos el uno alrededor del otro en pares. Las placas seniles (es decir, placas de amiloide) son áreas de neuropilo desorganizado de hasta 150 µm a través de depósitos de amiloide extracelulares en el centro que son visibles por análisis microscópico de secciones de tejido de cerebro. La acumulación de placas de amiloide dentro del cerebro también está asociada a síndrome de Down y otros trastornos cognitivos.

El principal constituyente de las placas es un péptido llamado péptido Aβ o β-amiloide. El péptido Aβ es un fragmento interno de 4 kDa de 39-43 aminoácidos de una proteína llamada glucoproteína transmembrana mayor denominada proteína precursora del amiloide (APP). Como resultado del procesamiento proteolítico de la APP por diferentes enzimas secretasas, el Aβ se encuentra principalmente en tanto una forma corta, 40 aminoácidos de longitud, como en una forma larga, que oscila de 42-43 aminoácidos de longitud. Parte del dominio transmembrana hidrófobo de la APP se encuentra en el extremo carboxi de Aβ, y puede explicar la capacidad de Aβ para agregarse en placas, particularmente en el caso de la forma larga. La acumulación de placas de amiloide en el cerebro conduce eventualmente a muerte celular neuronal. Los síntomas físicos asociados a este tipo de deterioro neural caracterizan la enfermedad de Alzheimer.

Varias mutaciones dentro de la proteína APP guardan relación con la presencia de enfermedad de Alzheimer. Véanse, por ejemplo, Goate y col., Nature 349:704 (1991) (valina⁷¹⁷ a isoleucina); Chartier Harlan y col., Nature 353:844 (1991) (valina⁷¹⁷ a glicina); Murrell y col., Science 254:97 (1991) (valina⁷¹⁷ a fenilalanina); Mullan y col., Nature Genet. 1:345 (1992) (una mutación doble que cambia lisina⁵⁹⁵-metionina⁵⁹⁶ a asparagina⁵⁹⁵-leucina⁵⁹⁶). Se cree que tales mutaciones producen enfermedad de Alzheimer por procesamiento elevado o alterado de APP a Aβ, particularmente procesamiento de APP a cantidades elevadas de la forma larga de Aβ (es decir, Aβ1-42 y Aβ1-43). Se cree que las mutaciones en otros genes, tales como los genes presenilina, PS1 y PS2, afectan indirectamente el procesamiento de APP para generar cantidades elevadas de la forma larga de Aβ (véase Hardy, TINS 20: 154 (1997)).

Se han usado satisfactoriamente modelos de ratón para determinar la significancia de placas de amiloide en Alzheimer (Games y col., arriba, Johnson-Wood y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1550 (1997)). En particular, cuando ratones transgénicos PDAPP (que expresan una forma mutante de APP humana y desarrollan enfermedad de Alzheimer a una edad joven) se inyectan con la forma larga de Aβ, muestran tanto una disminución en la progresión de Alzheimer como un aumento en los títulos de anticuerpos para el péptido Aβ (Schenk y col., Nature 400, 173 (1999)). Las observaciones tratadas anteriormente indican que Aβ, particularmente en su forma larga, es un elemento causante en enfermedad de Alzheimer.

McMichael, documento EP 526.511, propone la administración de dosificaciones homeopáticas (inferiores a o iguales a 10⁻² mg/día) de Aβ a pacientes con EA preestablecida. En un ser humano típico con aproximadamente 5 litros de plasma se esperaría que incluso el límite superior de esta dosificación generara una concentración no superior a 2 pg/ml. La concentración normal de Aβ en plasma humano está normalmente en el intervalo de 50-200 pg/ml (Seubert y col., Nature 359:325 (1992)). Debido a que la dosificación propuesta del documento EP 526.511 apenas alteraría el nivel de Aβ circulante endógeno y debido a que el documento EP 526.511 no recomienda el uso de un adyuvante, como inmunoestimulante, parece inverosímil que resulte algún beneficio terapéutico.

El documento US 6787637 desvela una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-7 de A-beta y un vehículo farmacéutico, en el que el isotipo de dicho anticuerpo es IgG1 humana.

El documento WO 03/077858 desvela agentes y procedimientos mejorados para el tratamiento de enfermedades asociadas a depósitos de amiloide de A-beta en el cerebro de un paciente. Agentes preferidos incluyen anticuerpos humanizados.

El documento WO 00/72880 desvela una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo quimérico o humanizado que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-10 de A-beta, y un vehículo

farmacéuticamente aceptable

El documento WO 06/066171 desvela un procedimiento para efectuar la rápida mejora en la cognición en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una dosis eficaz de un anticuerpo A-beta, en el que el anticuerpo es específico para un epítipo dentro de los residuos 1-10 de A-beta y preferencialmente se une a A-beta oligomérico soluble con respecto a A-beta monomérico, de forma que se logre la rápida mejora en la cognición.

El documento WO06/083689 desvela formulaciones diseñadas para proporcionar estabilidad y para mantener la actividad biológica de una proteína biológicamente activa incorporada, en particular proteínas de unión a A-beta o polipéptidos, tales como, por ejemplo, anticuerpos A-beta o fragmentos o porciones de los mismos.

Por consiguiente, existe la necesidad de nuevas terapias y reactivos para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, en particular terapias y reactivos que puedan efectuar un beneficio terapéutico a dosis fisiológicas (por ejemplo, no tóxicas).

Resumen de la invención

La invención proporciona una versión humanizada del anticuerpo de ratón 3D6 expresado por el hibridoma depositado bajo ATCC bajo el n° PTA-5130 para su uso en un procedimiento para tratar enfermedad de Alzheimer, en la que dicho anticuerpo (a) se administra subcutáneamente a un paciente que padece la enfermedad a una dosificación dentro de un intervalo de 0,01-0,6 mg/kg y una frecuencia de entre semanalmente y mensualmente o (b) se administra intravenosamente a un paciente que padece la enfermedad a una dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg a 1,5 mg/kg cada 8-16 semanas, en la que el paciente se monitoriza para síndrome de encefalopatía posterior reversible (SEPR) o edema vascular o (c) se administra a un paciente que padece la enfermedad en una pauta suficiente para mantener una concentración en suero máxima del anticuerpo en el paciente inferior a aproximadamente 28 µg de anticuerpo/ml en el que la concentración en suero promedio está dentro de un intervalo de aproximadamente 1-15 µg de anticuerpo/ml. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado comprende (i) una cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de la cadena ligera inmunológica del anticuerpo de ratón 3D6; y (ii) una cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de la cadena pesada inmunológica del anticuerpo de ratón 3D6. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado comprende (i) una región de la cadena ligera variable que tiene la secuencia como se expone en SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 5; y (ii) una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia como se expone en SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 6. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado comprende (i) una región de la cadena ligera variable que tiene la secuencia como se expone en SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 5; y (ii) una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia como se expone en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 6. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es bapineuzumab.

Algunos procedimientos comprenden además monitorizar el paciente por al menos un tipo de evaluación seleccionada del grupo que consiste en Miniexamen del estado mental (MMSE), Escala de evaluación de la enfermedad de Alzheimer - cognitiva (ADAS-COG), Impresión basada en entrevista por el profesional clínico (CIBI), Batería de pruebas neurológicas (NTB), Evaluación de la discapacidad en la demencia (DAD), Clasificación clínica de la demencia - suma de cajas (CDR-SOB), Inventario neuropsiquiátrico (NPI), barrido por tomografía de emisión de positrones (obtención de imágenes por TEP), barrido de imágenes de resonancia magnética (IRM) y medición de la tensión arterial. En algunos procedimientos, el tipo de evaluación es un MMSE, y el MMSE se administra en múltiples ocasiones, tales como antes de administrar la dosificación, y en la semana 4, semana 16, 6 meses y 1 año después de administrar la dosificación. En algunos procedimientos, la puntuación de MMSE medida después de la administración es superior a una puntuación de MMSE previamente evaluada.

Opcionalmente, el paciente se monitoriza para síndrome de encefalopatía posterior reversible (SEPR) o edema vascular. Opcionalmente, la monitorización comprende realizar un barrido de IRM, opcionalmente con una obtención de imágenes de la secuencia FLAIR (recuperación de inversión atenuada por líquido). En algunos procedimientos, la monitorización identifica al menos un síntoma clínico asociado a SEPR, tal como cefalea, náuseas, vómitos, confusión, convulsiones, anomalías visuales, funcionamiento mental alterado, ataxia, síntomas frontales, síntomas parietales, estupor o signos neurológicos focales. En algunos procedimientos, la dosificación se reduce o suspende basándose en un resultado del barrido de IRM que es indicativo de SEPR o edema vascular. En algunos procedimientos, la dosificación se reduce o suspende basándose en un resultado de la obtención de imágenes de la secuencia FLAIR que es indicativa de SEPR o edema vascular. En algunos procedimientos, la dosificación se reduce o suspende basándose en una identificación de al menos un síntoma clínico asociado a SEPR. En algunos procedimientos, el barrido de MRI es cada 3 meses, cada 6 meses, o cada año. En algunos procedimientos, la obtención de imágenes de la secuencia FLAIR es cada 3 meses, cada 6 meses, o cada año.

Algunos de los procedimientos anteriores comprenden además determinar la presencia o ausencia de hipertensión en el paciente, en los que si el paciente tiene hipertensión, el procedimiento comprende además administrar un antihipertensor. Opcionalmente, el antihipertensor está seleccionado del grupo que consiste en hidroclorotiazida, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), bloqueantes de los receptores de angiotensina II (ARB),

bloqueantes beta y bloqueantes de los canales de calcio.

Algunos procedimientos comprenden además administrar un esteroide al paciente para tratar el SEPR o edema vascular. Opcionalmente, el esteroide es dexametasona o metilprednisolona.

5 Algunos procedimientos comprenden además reducir o suspender la dosificación basándose en un resultado del barrido de IRM y que es indicativo de SEPR o vascular e identificar al menos un síntoma clínico asociado a SEPR o edema vascular, tal como cefalea, náuseas, vómitos, confusión, convulsiones, anomalías visuales, funcionamiento mental alterado, ataxia, síntomas frontales, síntomas parietales, estupor, o signos neurológicos focales. Algunos procedimientos comprenden además reducir o suspender la dosificación basándose en un resultado de la obtención de imágenes de la secuencia FLAIR que es indicativa de SEPR o edema vascular e identificar al menos un síntoma clínico asociado a SEPR o edema vascular, tal como cefalea, náuseas, vómitos, confusión, convulsiones, anomalías visuales, funcionamiento mental alterado, ataxia, síntomas frontales, síntomas parietales, estupor o signos neurológicos focales.

15 En algunos procedimientos, la monitorización indica presencia de SEPR o edema vascular en un primer momento de tiempo después de la administración, y ausencia de SEPR o edema vascular en un segundo momento de tiempo después del primer momento, y al paciente se administra una primera dosificación antes de que la monitorización indique la presencia de SEPR o edema vascular, una segunda dosificación o ninguna dosificación después de la monitorización detecta la presencia de SEPR o edema vascular, y una tercera dosificación después de la monitorización detecta la ausencia de SEPR o edema vascular, en el que la primera y tercera dosificación son superiores a la segunda dosificación.

25 El anticuerpo humanizado es una versión humanizada del anticuerpo de ratón 3D6 expresado por el hibridoma depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, VA 20108, EE.UU., el 8 de abril de 2003 bajo los términos del Tratado de Budapest y tiene el número de depósito PTA-5130.

30 Opcionalmente, el anticuerpo humanizado comprende (i) una cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de la cadena ligera inmunológica del anticuerpo de ratón 3D6; y (ii) una cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de la cadena pesada inmunológica del anticuerpo de ratón 3D6. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado comprende (i) una región de la cadena ligera variable que tiene la secuencia como se expone en SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 5; y (ii) una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia como se expone en SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 6. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado comprende (i) una región de la cadena ligera variable que tiene la secuencia como se expone en SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 5; y (ii) una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia como se expone en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 6. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es bapineuzumab.

40 En algunos de los procedimientos anteriores, la dosificación es aproximadamente 0,5 mg/kg. En algunos procedimientos, la dosificación es aproximadamente 1,5 mg/kg. En algunos procedimientos, la dosificación es 0,5 a 3 mg/kg. En algunos procedimientos, la dosificación es 0,5 a 1,5 mg/kg. En algunos procedimientos, la dosificación se administra en múltiples ocasiones, tal como cada 13 semanas.

45 En algunos de los procedimientos anteriores, bapineuzumab se administra en una primera dosificación antes de que SEPR o edema vascular se determinen del barrido de IRM y una segunda dosificación después de que SEPR o edema vascular se determinen del barrido de IRM, y la segunda dosificación es inferior entonces a la primera dosificación. Opcionalmente, la primera dosificación es 3-5 mg/kg y la segunda dosificación es 0,5 a 3 mg/kg. Opcionalmente, la segunda dosificación es la mitad de la primera dosificación. Opcionalmente, bapineuzumab se administra en una primera frecuencia antes de que IRM muestre SEPR o edema vascular y una segunda frecuencia después de que IRM muestre SEPR o edema vascular, y la segunda frecuencia es inferior a la primera frecuencia.

50 En algunos de los procedimientos anteriores, el tipo de evaluación es tensión arterial, y se determina la presencia o ausencia de hipertensión. Opcionalmente, si el paciente tiene hipertensión, el procedimiento comprende además administrar un antihipertensor. Opcionalmente, el antihipertensor está seleccionado del grupo que consiste en hidroclorotiazida, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), bloqueantes de los receptores de angiotensina II (ARB), bloqueantes beta y bloqueantes de los canales de calcio.

60 En el presente documento se desvelan productos terapéuticos. Los productos comprenden un vial de vidrio e instrucciones. El vial de vidrio contiene una formulación que comprende aproximadamente 10 mg a aproximadamente 250 mg de un anticuerpo anti-A β humanizado, aproximadamente 4 % de manitol o aproximadamente NaCl 150 mM, histidina aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM y metionina aproximadamente 10 mM. Las instrucciones para monitorizar un paciente al que se administra la formulación para SEPR y o edema vascular están incluidas con los productos.

65 En un aspecto, el anticuerpo definido anteriormente se administra en una pauta suficiente para mantener una concentración en suero máxima del anticuerpo en el paciente inferior a aproximadamente 28 μ g de anticuerpo/ml de

suero y así tratar el paciente. Opcionalmente, la concentración en suero máxima está dentro de un intervalo de aproximadamente 4-28 µg de anticuerpo/ml de suero. Opcionalmente, la concentración en suero máxima está dentro de un intervalo de aproximadamente 4-18 µg de anticuerpo/ml de suero. Opcionalmente, la concentración en suero promedio del anticuerpo en el paciente es inferior a aproximadamente 7 µg de anticuerpo/ml de suero.

5 Opcionalmente, la concentración en suero promedio está dentro de un intervalo de aproximadamente 2-7 µg de anticuerpo/ml de suero. Opcionalmente, la concentración en suero promedio es aproximadamente 5 µg de anticuerpo/ml de suero. Opcionalmente, el anticuerpo se administra intravenosamente. Opcionalmente, el anticuerpo se administra subcutáneamente. Opcionalmente, una dosis de 0,1-1,0 mg/kg se administra mensualmente.

10 Opcionalmente, una dosis de 0,5-1,0 mg/kg se administra mensualmente. Opcionalmente, el anticuerpo se administra a una frecuencia entre semanalmente y mensualmente. Opcionalmente, el anticuerpo se administra semanalmente o bisemanalmente. Algunos procedimientos comprenden además medir la concentración de anticuerpo en el suero y ajustar la pauta si la concentración medida queda fuera del intervalo. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. El anticuerpo humanizado es una versión humanizada del anticuerpo de ratón 3D6 expresado por el hibridoma depositado bajo ATCC bajo el nº PTA-5130. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es bapineuzumab.

Opcionalmente, el anticuerpo se administra en una pauta suficiente para mantener una concentración en suero promedio del anticuerpo en el paciente inferior a aproximadamente 7 µg de anticuerpo/ml de suero y así tratar el paciente. Opcionalmente, la concentración en suero promedio está dentro de un intervalo de aproximadamente 2-7 µg de anticuerpo/ml de suero. Opcionalmente, la concentración en suero promedio es aproximadamente 5 µg de anticuerpo/ml de suero. Opcionalmente, el anticuerpo se administra intravenosamente. Opcionalmente, el anticuerpo se administra subcutáneamente. Opcionalmente, una dosis de 0,1-1,0 mg/kg se administra mensualmente.

20 Opcionalmente, una dosis de 0,5-1,0 mg/kg se administra mensualmente. Opcionalmente, el anticuerpo se administra a una frecuencia entre semanalmente y mensualmente. Opcionalmente, el anticuerpo se administra semanalmente o bisemanalmente. Algunos procedimientos comprenden además medir la concentración de anticuerpo en el suero y ajustar la pauta si la concentración medida queda fuera del intervalo. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es una versión humanizada del anticuerpo de ratón 3D6 expresado por el hibridoma depositado bajo ATCC bajo el nº PTA-5130. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es bapineuzumab.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera y pesada de bapineuzumab predicha a partir de las secuencias de ADN de la construcción de expresión.

La Figura 2 muestra el cambio de MMSE promedio desde el nivel inicial.

La Figura 3 muestra el cambio de MMSE desde el nivel inicial por cohorte en el mes 4.

La Figura 4 muestra la media, la mediana y la desviación estándar del cambio de MMSE desde el nivel inicial en el mes cuatro.

La Figura 5 muestra los resultados de la prueba estadística del cambio de MMSE desde el nivel inicial en el mes cuatro.

La Figura 6 muestra concentraciones en suero en estado estacionario simuladas de anticuerpo de diversas pautas subcutáneas que suponen biodisponibilidad del 70 %.

La Figura 7 muestra concentraciones en estado estacionario de anticuerpo tras la administración subcutánea de AAB-001 a la dosis de 0,05 ó 0,06 mg/kg que supone el 70 % o el 100 % de biodisponibilidad.

La Figura 8 muestra niveles de Aβ en plasma tras la administración de AAB-001 a la dosis de 0,15, 0,5 ó 1,0 mg/kg.

La Figura 9 muestra parámetros farmacocinéticos tras la administración intravenosa de AAB-001 a la dosis de 0,15, 0,5, 1,0 y 2,0 mg/kg.

La Figura 10 muestra los perfiles de concentración media de AAB-001 en suero frente al tiempo tras la administración intravenosa de AAB-001 a la dosis de 0,15, 0,5, 1,0 y 2,0 mg/kg.

La Figura 11 muestra niveles de Aβ en plasma tras la administración intravenosa de AAB-001 a la dosis de 0,15, 0,5 y 1,0 mg/kg.

Descripción detallada de la invención

La divulgación proporciona dosificaciones y frecuencias de administración preferidas de anticuerpos para un fragmento del extremo N de Aβ para maximizar el beneficio terapéutico con respecto a la manifestación de efectos secundarios, particularmente edema vasogénico. Una serie de experimentos usando diferentes pautas del anticuerpo 3D6 de ratón en ratón transgénico PDAPP han identificado una concentración en suero promedio en estado estacionario de anticuerpo de aproximadamente 3,7 µg/ml para reducir la acumulación de amiloide. Los presentes datos proporcionan pruebas de que la dosis de 0,5 mg/kg y 1,5 mg/kg administradas intravenosamente cada 13 semanas fueron eficaces en inhibir el empeoramiento cognitivo en pacientes con Alzheimer. Estas pautas dan lugar a concentraciones en suero promedio de anticuerpo que agrupan la dosis eficaz de 3,7 µg/ml en ratones. Por ejemplo, se encontró que una dosis de 0,5 mg/kg administrada cada 13 semanas daba una concentración en suero promedio de aproximadamente 3 µg/ml. Se encontró que una dosis de 1 mg/kg administrada cada 13 semanas daba una concentración en suero promedio de aproximadamente 5,5 µg/ml y se predijo que una dosis de 2

mg/kg administrada cada 13 semanas daba una concentración en suero promedio de 9,4 µg/ml. Así, los presentes datos indican que el mismo orden de magnitud de concentraciones en suero de anticuerpo que son eficaces en ratones son eficaces en seres humanos. Estos datos son adicionalmente respaldados por ensayos clínicos usando inmunoterapia con Aβ1-42 de longitud completa. En estos ensayos se encontró que los pacientes que respondían al tratamiento tenían una inhibición estadísticamente significativa del empeoramiento cognitivo. Los pacientes que responden al tratamiento tuvieron un título de anticuerpo de ELISA de al menos 1 en 2200, que se corresponde con un título del suero de aproximadamente 1 µg/ml.

Los presentes datos también proporcionan pruebas de que mayores dosis de anticuerpo, particularmente 5 mg/kg, no consiguen mayor (y posiblemente menos) beneficio terapéutico que menores dosis en el intervalo de 0,5-1,5 mg/kg, pero también producen efectos secundarios significativos, particularmente edema vasogénico, en algunos pacientes. Aunque la práctica de la presente invención no depende de un entendimiento del mecanismo, se cree que los efectos secundarios resultan de altas concentraciones máximas de anticuerpo tras su administración.

En conjunto, estos datos indican que el beneficio terapéutico puede obtenerse con dosis relativamente modestas de anticuerpo diseñadas para dar concentraciones en suero promedio similares a los 3,7 µg/ml encontrados eficaces en ratones o los valores que agrupan esta cifra que parecen ser eficaces en seres humanos. Los presentes datos también indican que para pautas que dan áreas equivalentes bajo la curva en términos de concentración en suero de anticuerpo en función del tiempo que dosificaciones más pequeñas administradas más frecuentemente tienen una mejor eficacia con respecto al perfil de efectos secundarios que dosificaciones grandes administradas menos frecuentemente debido a que las primeras pautas evitan los picos en la concentración de anticuerpo que acompañan a administrar mayores dosis en las últimas pautas. En el estudio en los presentes ejemplos las dosis se administraron intravenosamente cada 13 semanas. Aunque el intervalo para dosis puede reducirse a aproximadamente mensualmente con reducciones proporcionales en dosis individuales, un aumento adicional en la frecuencia a semanalmente o bisemanalmente (bisemanalmente) tiene un alto riesgo de no cumplimiento debido al inconveniente de administración intravenosa, que normalmente requiere una visita a un centro de infusión. Sin embargo, la dosificación semanal o bisemanal es práctica por administración subcutánea, que puede autoadministrarse fácilmente o administrarse por un cuidador sin formación médica. La administración subcutánea también produce administración más gradual a la sangre evitando picos en la concentración. La biodisponibilidad medida por el área bajo la curva del anticuerpo en plasma de administración subcutánea con respecto a la administración intravenosa es aproximadamente del 70-100 %.

Así, pautas preferidas para administrar anticuerpos que se unen específicamente a un fragmento del extremo N de Aβ logran una concentración en suero promedio de anticuerpo administrado de 1-15 µg/ml en un paciente. Este intervalo agrupa las concentraciones eficaces demostradas en ratones y seres humanos, permitiendo algún margen de error en la medición y variación de pacientes individuales. La concentración en suero puede determinarse por medición real o predecirse a partir de farmacocinética convencional (por ejemplo, WinNonline Versión 4.0.1 (Pharsight Corporation, Cary, EE.UU.)) basándose en la cantidad de anticuerpo administrado, frecuencia de administración, vía de administración y semivida del anticuerpo. La concentración de anticuerpo promedio en el suero está preferentemente dentro de un intervalo de 1-10, 1-5 ó 2-4 µg/ml.

Los presentes datos también proporcionan pruebas de que administrar un anticuerpo que se une específicamente a un fragmento del extremo N de Aβ en una pauta suficiente para mantener una concentración en suero máxima del anticuerpo en el paciente inferior a aproximadamente 28 µg de anticuerpo/ml de suero maximiza el beneficio terapéutico con respecto a la aparición de posibles efectos secundarios, particularmente edema vascular. Una concentración en suero máxima preferida está dentro de un intervalo de aproximadamente 4-28 µg de anticuerpo/ml de suero. Es particularmente beneficiosa la combinación de suero máximo inferior a aproximadamente 28 µg de anticuerpo/ml de suero y una concentración en suero promedio del anticuerpo en el paciente inferior a aproximadamente 7 µg de anticuerpo/ml de suero. Véanse las Figuras 9 y 10.

Los presentes datos también proporcionan pruebas de que administrar un anticuerpo que se une específicamente a un fragmento del extremo N de Aβ en una pauta suficiente para mantener una concentración en suero promedio del anticuerpo inferior a aproximadamente 7 µg de anticuerpo/ml de suero maximiza el beneficio terapéutico con respecto a la aparición de posibles efectos secundarios, particularmente edema vascular. Una concentración promedio preferida está dentro de un intervalo de aproximadamente 2-7 µg de anticuerpo/ml de suero.

Si el anticuerpo se administra intravenosamente es, como se trata anteriormente, inconveniente tener que administrarlo más frecuentemente de aproximadamente mensualmente. Dosis preferidas de anticuerpo para administración intravenosa mensual se producen en el intervalo de 0,1-1,0 mg/kg de anticuerpo o preferentemente 0,5-1,0 mg/kg de anticuerpo.

Para dosificación más frecuente, por ejemplo, de dosificación semanal a mensual, se prefiere la administración subcutánea. Las dosis usadas para dosificación subcutánea están normalmente en el intervalo de 0,1 a 0,6 mg/kg o 0,01-0,35 mg/kg, preferentemente 0,05-0,25 mg/kg. Para dosificación semanal o bisemanal, la dosis está preferentemente en el intervalo de 0,015-0,2 mg/kg, o 0,05-0,15 mg/kg. Para dosificación semanal, la dosis es preferentemente 0,05 a 0,07 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,06 mg/kg. Para dosificación bisemanal, la

La dosis es preferentemente 0,1 a 0,15 mg/kg. Para dosificación mensual, la dosis es preferentemente 0,1 a 0,3 mg/kg o aproximadamente 2 mg/kg. La dosificación mensual incluye dosificar por el mes natural o mes lunar (es decir, cada cuatro semanas).

5 La Fig. 6 muestra concentraciones en suero en estado estacionario simuladas de anticuerpo de diversas pautas subcutáneas que suponen biodisponibilidad del 70 %. Puede verse que una dosis de 0,1 mg/kg da una concentración en suero promedio muy próxima a los 3,7 µg/ml encontrados eficaces en ratones con poca variación de picos a valles. La Fig. 7 muestra concentraciones en estado estacionario de anticuerpo tras la administración subcutánea a la dosis de 0,05 y 0,06 mg/kg que suponen el 70 % o el 100 % de biodisponibilidad. Puede verse que al 70 % de biodisponibilidad, las dosis 0,05 y 0,06 mg/kg se encuentran justo por debajo y por encima de la dosis de 3,7 µg/ml encontrada eficaz en ratones con poca variación de picos a valles.

15 La pauta de tratamiento normalmente continúa de manera que las concentraciones en suero promedio de anticuerpo descritos anteriormente se mantengan durante al menos seis meses o un año, y algunas veces durante toda la vida. La concentración en suero puede medirse en cualquier momento durante el tratamiento y aumentarse la dosis y/o frecuencia de administración si la concentración promedio cae por debajo de un intervalo diana, o disminuirse la dosis y/o frecuencia si la concentración promedio cae por encima de un intervalo diana.

20 Aunque la determinación de concentraciones en plasma óptimas de anticuerpo es útil en la determinación de una pauta de dosificación u optimización de la dosificación en un paciente individual, en la práctica, una vez se ha determinado una pauta de dosificación eficaz en términos de mg/kg o mg y frecuencia de administración, la misma pauta de dosificación puede usarse en muchos otros pacientes sin la necesidad de cálculo o medición detallada de los títulos del paciente. Así, cualquiera de las dosificaciones y pautas de tratamiento anteriormente mencionadas puede usarse independientemente de si un título se mide o predice en un paciente particular. Por ejemplo, una pauta adecuada es la administración intravenosa a intervalos mensuales con una dosis en el intervalo de 0,1-1,0 mg/kg de anticuerpo o preferentemente 0,5-1,0 mg/kg de anticuerpo. Para dosificación subcutánea, la dosis usada está normalmente en el intervalo de 0,01-0,6 mg/kg o 0,01-0,35 mg/kg, preferentemente 0,05-0,25 mg/kg. Para dosificación semanal o bisemanal, la dosis está preferentemente en el intervalo de 0,015-0,2 mg/kg, o 0,05-0,15 mg/kg. Para dosificación semanal, la dosis es preferentemente 0,05 a 0,07 mg/kg, por ejemplo, 0,06 mg/kg. Para dosificación bisemanal, la dosis es preferentemente 0,1 a 0,15 mg/kg. Para dosificación mensual, la dosis es preferentemente 0,1 a 0,3 mg/kg o 2 mg/kg.

35 Aquí, como en cualquier parte en la solicitud, dosificaciones expresadas en mg/kg pueden convertirse en dosificaciones en masa absoluta multiplicando por la masa de un paciente típico (por ejemplo, 70 ó 75 kg), normalmente redondeando a un número entero. Expresados en términos de masa absoluta, los anticuerpos se administran normalmente a una dosis de 1-40 mg a una frecuencia de entre semanalmente y mensualmente. Intervalos preferidos son 5-25 mg o 2,5-15 mg a una frecuencia de semanalmente a mensualmente. Para administración semanal a bisemanal, la dosis es frecuentemente 1-12 mg o 2,5 a 10 mg. Para administración semanal, la dosis es frecuentemente 2,5 a 5 mg o 4-5 mg. Para administración bisemanal, la dosis puede ser 7-10 mg. La masa de anticuerpo envasado para administración en dosis unitarias se redondea normalmente al número entero, tal como 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75 ó 100 mg.

45 En el presente documento se desvelan intervalos de dosificación preferidos y pautas de monitorización para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer usando anticuerpos para Aβ. Los procedimientos se basan en parte en resultados de un ensayo clínico descrito en los ejemplos. Un intervalo preferido de dosificación para anticuerpos que se unen a un fragmento del extremo N de Aβ es de aproximadamente 0,5 a 5 mg de anticuerpo por kg de peso corporal del paciente. Dosificaciones preferidas son inferiores a 5 mg/kg. Dosificaciones de 0,5 a 3 mg/kg, 0,5 a 1,5 mg/kg y 1,5 mg/kg son particularmente preferidas.

50 En el presente documento también se desvelan pautas de monitorización que pueden evaluar cambios en síntomas o signos del paciente tras el tratamiento. Los síntomas o signos pueden referirse a la propia enfermedad de Alzheimer y/o a efectos secundarios del tratamiento. La dosificación del fármaco o su frecuencia de administración pueden ajustarse basándose en el resultado de la monitorización. Alternativamente o adicionalmente, pueden administrarse fármacos adicionales para tratar cualquier efecto secundario. Por ejemplo, puede usarse monitorización por IRM y/u obtención de imágenes de la secuencia FLAIR para detectar SEPR o edema vascular o signos o síntomas de los mismos. La presencia de SEPR o edema vascular es una indicación de que la dosificación debe reducirse o suspenderse, o aumentarse el intervalo entre la administración de dosificaciones. Alternativamente, o adicionalmente, al paciente puede administrársele un esteroide para tratar el SEPR o edema vascular. Después de reducir o suspender la dosificación o aumentar el intervalo entre dosificaciones, y/o administrar el esteroide, la monitorización continuada puede indicar la desaparición de SEPR o edema vascular, en cuyo caso puede reanudarse la cantidad original y/o intervalo de dosificación. La administración del esteroide puede o puede no continuarse como una medida profiláctica en este momento. Como otro ejemplo, la monitorización de la tensión arterial puede indicar desarrollo de hipertensión. De modo análogo, la dosificación puede reducirse en cantidad o suspenderse, y/o aumentarse los intervalos entre dosificación y/o administrarse un antihipertensor. Si y cuando la monitorización adicional indica que la hipertensión ha desaparecido, la cantidad original y/o intervalo de dosificación puede reanudarse. La administración de antihipertensor puede o puede no continuarse como medida profiláctica en

este momento.

Antes de describir la invención puede ser útil para un entendimiento de la misma exponer definiciones de ciertos términos que van a usarse en lo sucesivo.

5 El término “inmunoglobulina” o “anticuerpo” (usados indistintamente en el presente documento) se refieren a una proteína de unión a antígeno que tiene una estructura de cuatro cadenas de polipéptidos básica que consiste en dos cadenas pesadas y dos ligeras, estando dichas cadenas estabilizadas, por ejemplo, por enlaces disulfuro entre cadenas, que tiene la capacidad para unirse específicamente a antígeno. Tanto las cadenas pesadas como ligeras están plegadas en dominios. El término “dominio” se refiere a una región globular de un polipéptido de cadena pesada o ligera que comprende bucles de péptidos (por ejemplo, que comprende 3 a 4 bucles de péptidos) estabilizada, por ejemplo, por hoja plegada β y/o enlace disulfuro entre cadenas. Los dominios se denominan adicionalmente en el presente documento “constantes” o “variables” basándose en la ausencia relativa de variación de secuencias dentro de los dominios de diversos miembros de clase en el caso de un dominio “constante”, o la variación significativa dentro de los dominios de diversos miembros de clase en el caso de un dominio “variable”. Dominios “constantes” en la cadena ligera se denominan indistintamente “regiones constantes de la cadena ligera”, “dominios constantes de la cadena ligera”, regiones “CL” o dominios “CL”. Dominios “constantes” en la cadena pesada se denominan indistintamente “regiones constantes de la cadena pesada”, “dominios constantes de la cadena pesada”, regiones “CH” o dominios “CH”. Dominios “variables” en la cadena ligera se denominan indistintamente “regiones variables de cadena ligera”, “dominios variables de la cadena ligera”, regiones “VL” o dominios “VL”. Dominios “variables” en una cadena pesada del anticuerpo se denominan indistintamente “regiones constantes de la cadena pesada”, “dominios constantes de la cadena pesada”, regiones “CH” o dominios “CH”.

25 El término “región” se refiere a una parte o porción de una cadena de anticuerpo e incluye dominios constantes o variables, como se define en el presente documento, además de partes o porciones más discretas de dichos dominios. Por ejemplo, dominios o regiones variables de la cadena ligera incluyen “regiones determinantes de la complementariedad” o “CDR” intercaladas entre “regiones estructurales” o “FR”, como se define en el presente documento.

30 Las inmunoglobulinas o anticuerpos pueden existir en forma monomérica o polimérica. El término “fragmento de unión a antígeno” se refiere a un fragmento de polipéptido de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une a antígeno o compete con el anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto del que se derivaron) por la unión a antígeno (es decir, unión específica). El término “conformación” se refiere a la estructura terciaria de una proteína o polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo, cadena de anticuerpo, dominio o región del mismo). Por ejemplo, el término “conformación de cadena ligera (o pesada)” se refiere a la estructura terciaria de una región variable de la cadena ligera (o pesada) y el término “conformación de anticuerpo” o “conformación de fragmento de anticuerpo” se refiere a la estructura terciaria de un anticuerpo o fragmento del mismo.

40 “Unión específica” de un anticuerpo significa que el anticuerpo presenta afinidad apreciable por antígeno o un epítipo preferido y, preferentemente, no presenta reactividad cruzada significativa. Unión “apreciable” o preferida incluye unión con una afinidad de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 M^{-1} o 10^{10} M^{-1} . Son más preferidas afinidades superiores a 10^7 M^{-1} , preferentemente superiores a 10^8 M^{-1} . Valores intermedios de aquellos expuestos en el presente documento también pretenden estar dentro del alcance de la presente invención y una afinidad de unión preferida puede indicarse como un intervalo de afinidades, por ejemplo, 10^6 a 10^{10} M^{-1} , preferentemente 10^7 a 10^{10} M^{-1} , más preferentemente 10^8 a 10^{10} M^{-1} . Un anticuerpo que “no presenta reactividad cruzada significativa” es uno que no se unirá apreciablemente a una entidad no deseable (por ejemplo, una entidad proteínica no deseable). Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a A β se unirá apreciablemente a A β , pero no reaccionará significativamente con proteínas o péptidos no A β (por ejemplo, proteínas o péptidos no A β incluidos en placas). Por ejemplo, un anticuerpo específico para un epítipo preferido no reaccionará significativamente de forma cruzada con epítopos remotos en la misma proteína o péptido. La unión específica puede determinarse según cualquier medio reconocido en la materia para determinar tal unión. Preferentemente, la unión específica se determina según análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva.

55 Los fragmentos de unión se producen por técnicas de ADN recombinante, o por escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv, cadenas individuales y anticuerpos monocatenarios. Aparte de inmunoglobulinas o anticuerpos “bienespecíficos” o “bifuncionales”, se entiende que una inmunoglobulina o anticuerpo tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. Un “anticuerpo bienespecífico” o “bifuncional” es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesadas/ligeras diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos bienespecíficos pueden producirse mediante una variedad de procedimientos que incluyen fusión de hibridomas o enlace de fragmentos Fab'. Véanse, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny y col., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

65 El término “inmunoglobulina humanizada” o “anticuerpo humanizado” se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo que incluye al menos una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo humanizada (es decir, al menos una cadena ligera o pesada humanizada). El término “cadena de inmunoglobulina humanizada” o “cadena de anticuerpo humanizada” (es decir, una “cadena ligera de la inmunoglobulina humanizada” o “cadena pesada de la inmunoglobulina

humanizada”) se refiere a una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo (es decir, una cadena ligera o pesada, respectivamente) que tiene una región variable que incluye una región estructural variable sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano y regiones determinantes de la complementariedad (CDR) (por ejemplo, al menos una CDR, preferentemente dos CDR, más preferentemente tres CDR) sustancialmente de un
 5 inmunoglobulina o anticuerpo no humano, y adicionalmente incluye regiones constantes (por ejemplo, al menos una región constante o porción de la misma, en el caso de una cadena ligera, y preferentemente tres regiones constantes en el caso de una cadena pesada). El término “región variable humanizada” (por ejemplo, “región variable de la cadena ligera humanizada” o “región variable de la cadena pesada humanizada”) se refiere a una
 10 región variable que incluye una región estructural variable sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano y regiones determinantes de la complementariedad (CDR) sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano.

El término “sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano” o “sustancialmente humano” significa que, cuando se alinea con una secuencia amino de inmunoglobulina o anticuerpo humano para fines de
 15 comparación, la región comparte al menos el 80-90 %, preferentemente el 90-95 %, más preferentemente el 95-99 % de identidad (es decir, identidad de secuencias local) con la secuencia de región estructural o región constante humana, permitiendo, por ejemplo, sustituciones conservativas, sustituciones de la secuencia consenso, sustituciones de la línea germinal, retromutaciones y similares. La introducción de sustituciones conservativas, sustituciones de la secuencia consenso, sustituciones de la línea germinal, retromutaciones y similares se denomina
 20 frecuentemente “optimización” de un anticuerpo humanizado o cadena. El término “sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano” o “sustancialmente no humano” significa que tiene una secuencia de inmunoglobulina o anticuerpo al menos el 80-95 %, preferentemente el 90-95 %, más preferentemente el 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntica a la de un organismo no humano, por ejemplo, un mamífero no humano.

Por consiguiente, todas las regiones o residuos de una inmunoglobulina o anticuerpo humanizado, o de una cadena de inmunoglobulina o de anticuerpo humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las regiones o residuos correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulina humana nativa. El término
 25 “región correspondiente” o “residuo correspondiente” se refiere a una región o residuo sobre una segunda secuencia de aminoácidos o nucleótidos que ocupa la misma posición (es decir, equivalente) que una región o residuo sobre una primera secuencia de aminoácidos o nucleótidos, cuando la primera y segunda secuencias están óptimamente
 30 alineadas para los fines de comparación.

Los términos “inmunoglobulina humanizada” o “anticuerpo humanizado” no pretenden englobar inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, como se define más adelante. Aunque las inmunoglobulinas o anticuerpos humanizados sean quiméricos en su construcción (es decir, comprendan regiones de más de una especie de proteína), incluyen características adicionales (es decir, regiones variables que comprenden residuos de CDR donantes y residuos de la región estructural aceptores) no encontrados en inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, como se define en el
 35 presente documento.

El término “inmunoglobulina quimérica” o anticuerpo se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo cuyas regiones variables se derivan de una primera especie y cuyas regiones constantes se derivan de una segunda especie. Las inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos pueden construirse, por ejemplo, por ingeniería genética, a partir de
 40 segmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies.

Un “antígeno” es una entidad (por ejemplo, una entidad o péptido proteináceo) con el que un anticuerpo se une específicamente.
 45

El término “epítope” o “determinante antigénico” se refiere a un sitio sobre un antígeno con el que una inmunoglobulina o anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo) se une específicamente. Los epítopes
 50 pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como aminoácidos contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopes formados a partir de aminoácidos contiguos son normalmente retenidos en la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítopes formados por plegamiento terciario se pierden normalmente en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítope normalmente incluye al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los
 55 procedimientos de determinación de la conformación espacial de epítopes incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

Los anticuerpos que reconocen el mismo epítope pueden identificarse en un simple inmunoensayo que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana, es decir, un ensayo de
 60 unión competitiva. La unión competitiva se determina en un ensayo en el que la inmunoglobulina en prueba inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como A β . Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo (RIA) directo o indirecto en fase sólida, inmunoensayo enzimático (EIA) directo o indirecto en fase sólida, ensayo de competencia tipo sándwich (véase Stahl y col., Methods in Enzymology 9:242 (1983)); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (véase Kirkland y col., J. Immunol. 137:3614 (1986)); ensayo de marca directa en fase sólida, ensayo de tipo sándwich de marca
 65

directa en fase sólida (véase Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de marca directa en fase sólida usando marca de I-125 (véase Morel y col., *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (Cheung y col., *Virology* 176:546 (1990)); y RIA de marca directa (Moldenhauer y col., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Normalmente, un ensayo tal implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que llevan cualquiera de estos, una inmunoglobulina de prueba sin marcar y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marca unida a la superficie sólida o células en presencia de la inmunoglobulina de prueba. Normalmente, la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Normalmente, cuando un anticuerpo de competencia está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común al menos el 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 % 70-75 % o más.

Un epítipo también es reconocido por células inmunológicas, por ejemplo, linfocitos B y/o linfocitos T. El reconocimiento celular de un epítipo puede determinarse por ensayos *in vitro* que miden la proliferación dependiente de antígeno, como se ha determinado por incorporación de ³H-timidina, por secreción de citocina, por secreción de anticuerpo o por destrucción dependiente de antígeno (ensayo de linfocitos T citotóxicos).

Epítopos o determinantes antigénicos a modo de ejemplo pueden encontrarse dentro de la proteína precursora del amiloide (APP) humana, pero se encuentran preferentemente dentro del péptido A β de APP. Existen múltiples isoformas de APP, por ejemplo, APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹ y APP⁷⁷⁰. Los aminoácidos dentro de APP son números asignados según la secuencia de la isoforma APP⁷⁷⁰ (véase, por ejemplo, el n° de acceso de GenBank P05067, también expuesta como SEC ID N°: 38). El péptido A β (también denominado el presente documento péptido beta-amiloide y A-beta) es un fragmento interno de ~4 kDa de 39-43 aminoácidos de APP (A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 y A β 43). A β 40, por ejemplo, consiste en los residuos 672-711 de APP y A β 42 consiste en los residuos 673-713 de APP. Como resultado del procesamiento proteolítico de APP por diferentes enzimas secretasas *in vivo* o *in situ*, A β se encuentra en tanto una "forma corta", 40 aminoácidos de longitud, como una "forma larga", que oscila de 42-43 aminoácidos de longitud. Epítopos o determinantes antigénicos preferidos, como se describen en el presente documento, se localizan dentro del extremo N del péptido A β e incluyen residuos dentro de los aminoácidos 1-10 de A β , preferentemente de los residuos 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 ó 3-7 de A β 42. Epítopos o determinantes antigénicos preferidos adicionales incluyen los residuos 2-4, 5, 6, 7 u 8 de A β , residuos 3-5, 6, 7, 8 ó 9 de A β o residuos 4-7, 8, 9 ó 10 de A β 42.

El término "enfermedad amiloidogénica" incluye cualquier enfermedad asociada a (o producida por) formación o deposición de fibrillas de amiloide insolubles. Enfermedades amiloidogénicas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, amiloidosis sistémica, enfermedad de Alzheimer, diabetes de aparición en la madurez, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, demencia fronto-temporal y las encefalopatías espongiiformes transmisibles relacionadas con priones (kuru y enfermedad de Creutzfeldt-Jacob en seres humanos y encefalopatía espongiiforme ovina y BSE en ovejas y ganado vacuno, respectivamente). Diferentes enfermedades amiloidogénicas se definen o caracterizan por la naturaleza del componente de polipéptido de las fibrillas depositadas. Por ejemplo, en sujetos o pacientes que tienen enfermedad de Alzheimer, la proteína β -amiloide (por ejemplo, proteína β -amiloide natural, variante o truncada) es el componente de polipéptido caracterizador del depósito de amiloide. Por consiguiente, la enfermedad de Alzheimer es un ejemplo de una "enfermedad caracterizada por depósitos de A β " o una "enfermedad asociada a depósitos de A β ", por ejemplo, en el cerebro de un sujeto o paciente. Los términos "proteína β -amiloide", "péptido β -amiloide", " β -amiloide", "A β " y "péptido A β " se usan indistintamente en el presente documento.

El término "dosis eficaz" o "dosificación eficaz" se define como una cantidad suficiente para lograr o al menos lograr parcialmente el efecto deseado. El término "dosis terapéuticamente eficaz" se define como una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya padece la enfermedad. Cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la infección y del estado general del sistema inmunitario del propio paciente.

El término "paciente" incluye sujetos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento tanto profiláctico como terapéutico.

A β "soluble" o "disociado" se refiere al polipéptido A β no agregante o desagregado. A β "insoluble" se refiere al polipéptido A β agregante, por ejemplo, A β mantenido junto por enlaces no covalentes. Se cree que A β (por ejemplo, A β 42) se agrega, al menos en parte, debido a la presencia de residuos hidrófobos en el extremo C del péptido (parte del dominio transmembrana de APP). Un procedimiento para preparar A β soluble es disolver péptido liofilizado en DMSO puro con sonicación. La disolución resultante se centrifuga para eliminar cualquier partícula insoluble.

El término "función efectora" se refiere a una actividad que reside en la región Fc de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo IgG) e incluye, por ejemplo, la capacidad del anticuerpo para unirse a moléculas efectoras tales como complemento y/o receptores de Fc, que pueden controlar varias funciones inmunitarias del anticuerpo tal como actividad de células efectoras, lisis, actividad mediada por complemento, eliminación de anticuerpo y semivida del anticuerpo.

El término "molécula efectora" se refiere a una molécula que puede unirse a la región Fc de un anticuerpo (por

ejemplo, un anticuerpo IgG) que incluye, pero no se limita a, una proteína del complemento o un receptor de Fc.

El término "célula efectora" se refiere a una célula que normalmente puede unirse a la porción Fc de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo IgG) por un receptor de Fc expresado sobre la superficie de la célula efectora que incluye, pero no se limita a, linfocitos, por ejemplo, células presentadoras de antígeno y linfocitos T.

El término "región Fc" se refiere a una región del extremo C de un anticuerpo IgG, en particular la región del extremo C de la(s) cadena(s) pesada(s) de dicho anticuerpo IgG. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG pueden variar ligeramente, una región Fc se define normalmente como una extensión desde aproximadamente el residuo de aminoácido Cys226 al extremo carboxilo de una cadena(s) pesada(s) de IgG.

El término "Numeración de Kabat", a menos que se establezca de otro modo, se define como la numeración de los residuos en, por ejemplo, un anticuerpo de la cadena pesada IgG usando el índice de EU como en Kabat y col. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

El término "receptor de Fc" o "FcR" se refiere a un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. Receptores Fc típicos que se unen a una región Fc de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo IgG) incluyen, pero no se limitan a, receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII, y Fc γ RIII que incluyen variantes alélicas y formas alternativamente cortadas y empalmadas de estos receptores. Los receptores de Fc se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel y col., Immunomethods 4:25-34 (1994); y de Haas y col., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995).

Reactivos inmunológicos y terapéuticos

Los reactivos inmunológicos y terapéuticos de la divulgación comprenden o consisten en inmunógenos o anticuerpos, o fragmentos funcionales o de unión al antígeno de los mismos, como se definen en el presente documento. Se sabe que la unidad estructural básica del anticuerpo comprende un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción del extremo amino de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento de antígeno. La porción del extremo carboxi de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora.

Anticuerpos

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une específicamente a (reconoce) un antígeno. Ejemplos de porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')₂ que pueden generarse tratando el anticuerpo con una enzima tal como pepsina o producirse por técnicas de ingeniería recombinante conocidas en la técnica. Aspectos de la invención también relevantes para la estabilización de anticuerpos incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales y monoclonales que se unen a un antígeno, por ejemplo, un antígeno diana terapéutico, tal como A β . El término "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contiene solo una especie de un sitio de unión al antígeno que puede reconocer y unirse a un epítipo particular de un antígeno diana, por ejemplo, un epítipo(s) de A β . Así, una composición de anticuerpo monoclonal normalmente muestra una única especificidad de unión y afinidad por un antígeno diana particular con el que inmunorreacciona.

Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales pueden prepararse como se ha descrito anteriormente inmunizando un sujeto adecuado con un inmunógeno. El título de anticuerpos en el sujeto inmunizado puede monitorizarse con el tiempo por técnicas convencionales, tales como con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando antígeno diana inmovilizado. Si se desea, las moléculas de anticuerpo dirigidas contra el antígeno diana pueden aislarse del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y purificarse adicionalmente por técnicas muy conocidas, tales como cromatografía en proteína A-Sepharose para obtener el anticuerpo, por ejemplo, fracción de IgG. En un momento apropiado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpos anti-antígeno son los más altos, pueden obtenerse células productoras de anticuerpos del sujeto y usarse para preparar anticuerpos monoclonales por técnicas convencionales, tales como la técnica de hibridomas originalmente descrita por Kohler y Milstein (1975) Nature 256:495-497 (véase, por tanto, Brown y col. (1981) J. Immunol. 127:539-46; Brown y col. (1980) J. Biol. Chem. 255:4980-83; Yeh y col. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:2927-31; y Yeh y col. (1982) Int. J. Cancer 29:269-75). Para la preparación de anticuerpos policlonales quiméricos véase Buechler y col., patente de EE.UU. n° 6.420.113.

Anticuerpos monoclonales

Cualquiera de los muchos protocolos muy conocidos usados para fusionar linfocitos y líneas celulares inmortalizadas puede aplicarse con el fin de generar un anticuerpo monoclonal (véase, por ejemplo, G. Galfre y col. (1977) Nature 266:55052; Gefter y col., Somatic Cell Genet., citado arriba; Lerner, *Yale J. Biol. Med.*, citado arriba; Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, citado arriba). Además, el experto habitual apreciará que hay muchas variaciones de tales procedimientos que también serían útiles. Normalmente, la línea celular inmortal (por ejemplo, una línea de células de mieloma) se deriva de las mismas especies de mamífero que los linfocitos. Por ejemplo, pueden prepararse hibridomas murinos fusionando linfocitos de un ratón inmunizado con una preparación inmunogénica de la presente invención con una línea celular de ratón inmortalizada. Líneas celulares inmortales preferidas son líneas de células de mieloma de ratón que son sensibles a medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"). Pueden usarse distintas líneas de células de mieloma como componente de fusión según técnicas convencionales, por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14. Estas líneas de mieloma están disponibles de ATCC. Normalmente, las células de mieloma de ratón sensibles a HAT se fusionan con esplenocitos de ratón usando polietilenglicol ("PEG"). Entonces, las células de hibridoma resultantes de la fusión se seleccionan usando medio HAT, que destruye células de mieloma sin fusionar y fusionadas improductivamente (los esplenocitos sin fusionar mueren después de varios días debido a que no se transforman). Las células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal de la invención se detectan seleccionando los sobrenadantes de cultivo de hibridoma para anticuerpos que se unen a antígeno diana, por ejemplo, A β , usando un ensayo de ELISA convencional.

Anticuerpos recombinantes

Alternativo a preparar hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales, un anticuerpo monoclonal puede identificarse y aislarse seleccionando una biblioteca de inmunoglobulinas combinatoria recombinante (por ejemplo, una biblioteca de anticuerpos de expresión en fago) con un antígeno diana para así aislar miembros de la biblioteca de inmunoglobulinas que se unen al antígeno diana. Kits para generar y seleccionar bibliotecas de expresión en fago están comercialmente disponibles (por ejemplo, *Recombinant Phage Antibody System* de Pharmacia, n° de catálogo 27-9400-01; y el kit de expresión en fago *SurfZAP*[™] de Stratagene, n° de catálogo 240612). Adicionalmente, ejemplos de procedimientos y reactivos particularmente aceptados para su uso en generar y seleccionar bibliotecas de expresión de anticuerpos pueden encontrarse en, por ejemplo, Ladner y col., patente de EE.UU. n° 5.223.409; Kang y col., publicación internacional PCT n° WO 92/18619; Dower y col., publicación internacional PCT n° WO 91/17271; Winter y col., publicación internacional PCT WO 92/20791; Markland y col., publicación internacional PCT n° WO 92/15679; Breitling y col., publicación internacional PCT WO 93/01288; McCafferty y col., publicación internacional PCT n° WO 92/01047; Garrard y col., publicación internacional PCT n° WO 92/09690; Ladner y col., publicación internacional PCT n° WO 90/02809; Fuchs y col. (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay y col. (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse y col. (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths y col. (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins y col. (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson y col. (1991) *Nature* 352:624-628; Gram y col. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garrard y col. (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom y col. (1991) *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137; Barbas y col. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982; McCafferty y col. *Nature* (1990) 348:552-554.

Anticuerpos quiméricos y humanizados

Adicionalmente, anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos quiméricos y monoclonales humanizados, que comprenden tanto porciones humanas como no humanas, que pueden prepararse usando técnicas de ADN recombinante convencionales, están dentro del alcance de la divulgación.

El término "inmunoglobulina humanizada" o "anticuerpo humanizado" se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo que incluye al menos una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo humanizada (es decir, al menos una cadena ligera o pesada humanizada). El término "cadena de inmunoglobulina humanizada" o "cadena de anticuerpo humanizada" (es decir, una "cadena ligera de la inmunoglobulina humanizada" o "cadena pesada de la inmunoglobulina humanizada") se refiere a una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo (es decir, una cadena ligera o pesada, respectivamente) que tiene una región variable que incluye una región estructural variable sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano y regiones determinantes de la complementariedad (CDR) (por ejemplo, al menos una CDR, preferentemente dos CDR, más preferentemente tres CDR) sustancialmente de un inmunoglobulina o anticuerpo no humano, y adicionalmente incluye regiones constantes (por ejemplo, al menos una región constante o porción de la misma, en el caso de una cadena ligera, y tres regiones constantes en el caso de una cadena pesada). El término "región variable humanizada" (por ejemplo, "región variable de la cadena ligera humanizada" o "región variable de la cadena pesada humanizada") se refiere a una región variable que incluye una región estructural variable sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano y regiones determinantes de la complementariedad (CDR) sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano.

El término "sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano" o "sustancialmente humano" significa que, cuando se alinea con una secuencia amino de inmunoglobulina o anticuerpo humano para fines de comparación, la región comparte al menos el 80-90 %, 90-95 %, 95-99 % de identidad (es decir, identidad de

secuencias local) con la secuencia de región estructural o región constante humana, permitiendo, por ejemplo, sustituciones conservativas, sustituciones de la secuencia consenso, sustituciones de la línea germinal, retromutaciones y similares. La introducción de sustituciones conservativas, sustituciones de la secuencia consenso, sustituciones de la línea germinal, retromutaciones y similares se denomina frecuentemente “optimización” de un anticuerpo humanizado o cadena. El término “sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano” o “sustancialmente no humano” significa que tiene una secuencia de inmunoglobulina o anticuerpo al menos el 80-95 %, preferentemente al menos el 90-95 %, más preferentemente el 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntica a la de un organismo no humano, por ejemplo, un mamífero no humano.

Por consiguiente, todas las regiones o residuos de una inmunoglobulina o anticuerpo humanizado, o de una cadena de inmunoglobulina o de anticuerpo humanizada, excepto las CDR, son sustancialmente idénticas a las regiones o residuos correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulina humana nativa. El término “región correspondiente” o “residuo correspondiente” se refiere a una región o residuo sobre una segunda secuencia de aminoácidos o nucleótidos que ocupa la misma posición (es decir, equivalente) que una región o residuo sobre una primera secuencia de aminoácidos o nucleótidos, cuando la primera y segunda secuencias están óptimamente alineadas para los fines de comparación.

El término “identidad significativa” significa que dos secuencias de polipéptidos, cuando están óptimamente alineadas, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten al menos el 50-60 % de identidad de secuencias, preferentemente al menos el 60-70 % de identidad de secuencias, más preferentemente al menos el 70-80 % de identidad de secuencias, más preferentemente al menos el 80-90 % de identidad de secuencias, incluso más preferentemente al menos el 90-95 % de identidad de secuencias, e incluso más preferentemente al menos el 95 % de identidad de secuencias o más (por ejemplo, el 99 % de identidad de secuencias o más). El término “identidad sustancial” significa que dos secuencias de polipéptidos, cuando están óptimamente alineadas, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten al menos el 80-90 % de identidad de secuencias, preferentemente al menos el 90-95 % de identidad de secuencias, y más preferentemente al menos el 95 % de identidad de secuencias o más (por ejemplo, el 99 % de identidad de secuencias o más). Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa de secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias. Si se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se entran en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se designan parámetro del programa del algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencias para la(s) secuencia(s) de prueba con respecto a la secuencia de referencia basándose en los parámetros de programa designados.

El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), por la búsqueda por comparación del procedimiento de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), por implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o por inspección visual (véase generalmente Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology). Un ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y la similitud de secuencias es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul y col., J. Mol. Biol. 215:403 (1990). El software para realizar los análisis de BLAST está públicamente disponible por el Centro nacional para información biotecnológica (públicamente accesible por el servidor de internet del Instituto nacional de la salud NCBI). Normalmente pueden usarse parámetros de programa por defecto para realizar la comparación de secuencias, aunque también pueden usarse parámetros personalizados. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como defectos una longitud de palabra (W) de 3, una esperanza (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

Preferentemente, las posiciones de residuos que no son idénticas se diferencian por sustituciones de aminoácidos conservativas. Para los fines de clasificar sustituciones de aminoácidos como aminoácidos conservativos o no conservativos se agrupan del siguiente modo: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): leu, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (orientación de cadenas que influye en los residuos): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservativas implican sustituciones entre aminoácidos en la misma clase. Sustituciones no conservativas constituyen el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

Preferentemente, las inmunoglobulinas o anticuerpos humanizados se unen a antígeno con una afinidad que está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco de la del anticuerpo no humanizado correspondiente. Por ejemplo, si el anticuerpo no humanizado tiene una afinidad de unión de 10^9 M, los anticuerpos humanizados tendrán una afinidad de unión de al menos 3×10^8 M, 4×10^8 M, 5×10^8 M o 10^9 M. Cuando se describen las propiedades de unión de una cadena de inmunoglobulina o de anticuerpo, la cadena puede describirse basándose en su capacidad para “dirigir la unión a antígeno (por ejemplo, A β)”. Se dice que una cadena “dirige la unión a antígeno” cuando confiere a una inmunoglobulina o anticuerpo intacto (o fragmento de unión a antígeno del mismo) una propiedad de unión o afinidad de unión específica. Se dice que una mutación (por ejemplo, una retromutación) afecta sustancialmente la

capacidad de una cadena pesada o ligera para dirigir la unión a antígeno si afecta (por ejemplo, disminuye) la afinidad de unión de una inmunoglobulina o anticuerpo intacto (o fragmento de unión a antígeno del mismo) que comprende dicha cadena por al menos un orden de magnitud en comparación con la del anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo) que comprende una cadena equivalente que carece de dicha mutación. Una mutación

5 "no afecta sustancialmente (por ejemplo, disminuye) la capacidad de una cadena para dirigir la unión a antígeno" si afecta (por ejemplo, disminuye) la afinidad de unión de una inmunoglobulina o anticuerpo intacto (o fragmento de unión a antígeno del mismo) que comprende dicha cadena sólo un factor de dos, tres o cuatro de la del anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo) que comprende una cadena equivalente que carece de dicha mutación.

10 El término "inmunoglobulina quimérica" o anticuerpo se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo cuyas regiones variables se derivan de una primera especie y cuyas regiones constantes se derivan de una segunda especie. Las inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos pueden construirse, por ejemplo, por ingeniería genética a partir de fragmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Los términos "inmunoglobulina humanizada" o "anticuerpo humanizado" no pretenden englobar inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos como se

15 define más adelante. Aunque las inmunoglobulinas o anticuerpos humanizados sean quiméricos en su construcción (es decir, comprenden regiones de más de una especie de proteína), incluyen características adicionales (es decir, regiones variables que comprenden residuos de CDR donantes y residuos de la región estructural aceptores) no encontrados en inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, como se define en el presente documento.

20 Tales anticuerpos quiméricos y monoclonales humanizados pueden producirse por técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo, usando procedimientos descritos en Robinson y col., solicitud internacional nº PCT/US86/02269; Akira y col., solicitud de patente europea 184.187; Taniguchi, M., solicitud de patente europea 171.496; Morrison y col., solicitud de patente europea 173.494; Neuberger y col., publicación PCT internacional nº WO 86/01533; Cabilly y col., patente de EE.UU. nº 4.816.567; Cabilly y col., solicitud de patente europea 125.023;

25 Better y col. (1988) Science 240:1041-1043; Liu y col. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu y col. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sun y col. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura y col. (1987) Canc. Res. 47:999-1005; Wood y col. (1985) Nature 314:446-449; y Shaw y col. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, S. L. (1985) Science 229:1202-1207; Oi y col. (1986) BioTechniques 4:214; Winter, patente de EE.UU. 5.225.539; Jones y col. (1986) Nature 321:552-525; Verhoeyan y col. (1988) Science 239:1534; y Beidler y

30 col. (1988) J. Immunol. 141:4053-4060.

Anticuerpos humanos de animales transgénicos y expresión en fago

35 Alternativamente, es ahora posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que pueden, tras la inmunización, producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de empalme de las cadenas pesadas de anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de la línea germinal produce la completa inhibición de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en tales ratones mutantes de la línea germinal produce la producción

40 de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 6.150.584; 6.114.598; y 5.770.429.

También pueden derivarse anticuerpos completamente humanos de bibliotecas de expresión en fago (Hoogenboom y col., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks y col., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)). También pueden obtenerse anticuerpos policlonales quiméricos de bibliotecas de expresión en fago (Buechler y col., patente de EE.UU. nº 6.420.113).

Anticuerpos biespecíficos, polipéptidos de fusión de anticuerpos y anticuerpos monocatenarios

50 Los anticuerpos biespecíficos (BsAbs) son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopes diferentes. Tales anticuerpos pueden derivarse de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos $F(ab)_2$). En la técnica se conocen procedimientos de preparación de anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadenas pesadas-cadenas ligeras de la inmunoglobulina, en la

55 que las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein y col., Nature, 305:537-539 (1983)). Debido a la selección al azar de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de diferentes moléculas de anticuerpo (véanse el documento WO 93/08829 y en Trauneker y col., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)).

60 Anticuerpos biespecíficos también incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina u otra carga. Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Agentes de reticulación adecuados son muy conocidos en la técnica, y se desvelan en la patente de EE.UU. nº 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

65 En otro aspecto más, el anticuerpo puede fusionarse, químicamente o genéticamente, con una carga tal como un

resto reactivo, detectable o funcional, por ejemplo, una inmunotoxina para producir un polipéptido de fusión de anticuerpo. Tales cargas incluyen, por ejemplo, inmunotoxinas, quimioterapéuticos y radioisótopos, todos los cuales son muy conocidos en la técnica.

5 También son adecuados anticuerpos monocatenarios para la estabilización según la invención. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) con un ligador, que permite conectar cada región variable entre sí y recrear el sitio de unión al antígeno del anticuerpo parental a partir del cual se derivan las regiones VL y VH. Véase Gruber y col., J. Immunol., 152:5368 (1994).

10

NANOCUERPOS

Los nanocuerpos son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades de anticuerpos de cadena pesada que se producen naturalmente. Los nanocuerpos pueden servir de una única unidad, dominio o proteína estructural de unión al antígeno funcional relativamente pequeña. La tecnología Nanobody™ (Ablynx N.V.) se desarrolló originalmente tras el descubrimiento de que los camélidos (camellos y llamas) poseían anticuerpos completamente funcionales que carecían de cadenas ligeras. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un único dominio variable (VHH) y dos dominios constantes (CH2 y CH3). VHH se usa para distinguirlos de los dominios variables de la cadena pesada que están presentes en anticuerpos de 4 cadenas convencionales (que se denominan “dominios VH”). El dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido estable que alberga la capacidad de unión al antígeno completo del anticuerpo de cadena pesada original. Los dominios VHH y los nanocuerpos también pueden manipularse en formatos multivalentes y multiespecíficos. Nanocuerpos con una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la secuencia de aminoácidos de un dominio VHH que se produce naturalmente pueden humanizarse, es decir, reemplazando uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de VHH que se produce naturalmente (y en particular en las secuencias de la región estructural) por uno o más de los residuos de aminoácidos que se producen en la(s) posición (posiciones) correspondientes en un dominio VH de un anticuerpo de 4 cadenas convencional de un ser humano. Para detalles véanse, por ejemplo, los documentos US 20050130266, US 20040253638, WO/2006/040153, US 20050214857, WO/2006/079372 o WO/2006/122825. También pueden producirse anticuerpos contra Aβ mediante los procedimientos Nanobody™.

15

Se entiende que cualquiera de las anteriores moléculas de polipéptido, solas o en combinación, son adecuadas para preparación como formulaciones estabilizadas según la invención.

Anticuerpos anti-Aβ

20

Generalmente, las formulaciones de la presente divulgación incluyen una variedad de anticuerpos para tratar enfermedades amiloidogénicas, en particular, enfermedad de Alzheimer, eligiendo como diana el péptido Aβ.

Los términos “anticuerpo para Aβ”, “anticuerpo anti-Aβ” y “anti-Aβ” se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un anticuerpo que se une a uno o más epítopes o determinantes antigénicos de la proteína precursora de amiloide (APP) humana, proteína Aβ, o ambas. Epítopes o determinantes antigénicos a modo de ejemplo pueden encontrarse dentro de APP, pero se encuentran preferentemente dentro del péptido Aβ de APP. Existen múltiples isoformas de APP, por ejemplo, APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹ y APP⁷⁷⁰. A los aminoácidos dentro de APP se les asignan números según la secuencia de la isoforma de APP¹⁷⁰ (véase, por ejemplo, nº de acceso de GenBank P05067). Ejemplos de isotipos específicos de APP que se sabe actualmente que existen en seres humanos son el polipéptido de 695 aminoácidos descrito por Kang y col. (1987) Nature 325:733-736, que se designa el APP “normal”; el polipéptido de 751 aminoácidos descrito por Ponte y col. (1988) Nature 331:525-527 (1988) y Tanzi y col. (1988) Nature 331:528-530; y el polipéptido de 770 aminoácidos descrito por Kitaguchi y col. (1988) Nature 331:530-532. Como resultado del procesamiento proteolítico de APP por diferentes enzimas secretasas *in vivo* o *in situ*, Aβ se encuentra en tanto una “forma corta”, 40 aminoácidos de longitud, como una “forma larga”, que oscila de 42-43 aminoácidos de longitud. La forma corta, Aβ₄₀, consiste en los residuos 672-711 de APP. La forma larga, por ejemplo, Aβ₄₂ o Aβ₄₃, consiste en los residuos 672-713 ó 672-714, respectivamente. Parte del dominio hidrófobo de APP se encuentra en el extremo carboxi de Aβ, y puede explicar la capacidad de Aβ para agregarse, particularmente en el caso de la forma larga. El péptido Aβ puede encontrarse en, o purificarse a partir de, los fluidos corporales de seres humanos y otros mamíferos, por ejemplo, líquido cefalorraquídeo, que incluye tanto individuos normales como individuos que padecen trastornos amiloidogénicos.

Los términos “proteína β-amiloide”, “péptido β-amiloide”, “β-amiloide”, “Aβ” y “péptido Aβ” se usan indistintamente en el presente documento. El péptido Aβ (por ejemplo, Aβ₃₉, Aβ₄₀, Aβ₄₁, Aβ₄₂ y Aβ₄₃) es un fragmento interno de ~4 kDa de 39-43 aminoácidos de APP. Aβ₄₀, por ejemplo, consiste en los residuos 672-711 de APP y Aβ₄₂ consiste en los residuos 672-713 de APP. Los péptidos Aβ incluyen péptidos resultantes de la escisión por secretasa de APP y péptidos sintéticos que tienen la misma o esencialmente la misma secuencia que los productos de escisión. Los péptidos Aβ₀ pueden derivarse de una variedad de fuentes, por ejemplo, tejidos, líneas celulares o fluidos corporales (por ejemplo, sueros o líquido cefalorraquídeo). Por ejemplo, un Aβ puede derivarse de células que expresan APP tales como células de ovario de hámster chino (CHO) establemente transfectadas con APP_{717V→F} como se describe, por ejemplo, en Walsh y col., (2002), Nature, 416, pág. 535-539. Una preparación de Aβ puede derivarse de fuentes

25

60

65

de tejido usando procedimientos previamente descritos (véase, por ejemplo, Johnson-Wood y col., (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1550). Alternativamente, los péptidos A β pueden sintetizarse usando procedimientos que son muy conocidos para aquellos en la materia. Véanse, por ejemplo, Fields y col., Synthetic Peptides: A User's Guide, ed. Grant, W.H. Freeman & Co., Nueva York, NY, 1992, pág. 77). De ahí, los péptidos pueden sintetizarse usando las técnicas de Merrifield automatizadas de síntesis en fase sólida con el grupo α -amino protegido por tanto química de t-Boc como de F-moc usando aminoácidos protegidos en la cadena lateral en, por ejemplo, un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems modelo 430A o 431. Pueden sintetizarse antígenos de péptidos más largos usando técnicas de ADN recombinante muy conocidas. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica el péptido o péptido de fusión puede sintetizarse o clonarse molecularmente e insertarse en un vector de expresión adecuado para la transfección y expresión heteróloga por una célula huésped adecuada. El péptido A β también se refiere a secuencias de A β relacionadas que resultan de mutaciones en la región A β del gen normal.

Los términos "ligando difusible derivado de A β " y "ADDL" son oligómeros de A β 42 solubles pequeños, predominantemente trímeros y tetrámeros, pero también especies de orden superior (véase, por ejemplo, Lambert, M. P. y col. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 95, pág. 6448-6453; Chromy, B. A. y col. (2000) Soc. Neurosci. Abstr., vol. 26, pág. 1284, documento WO 2004/031400.)

El término "anticuerpo anti-ADDL" se refiere a un anticuerpo que se ha generado y seleccionado para la capacidad para unirse a ADDL específicamente, sin unión a monómero de A β o fibrillas de amiloide. Véase, por ejemplo, el documento WO 2004/031400.

El término "epítotope" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio sobre un antígeno con el que una inmunoglobulina o anticuerpo (o fragmento de unión al antígeno del mismo) se une específicamente. Epítotope o determinantes antigénicos a modo de ejemplo con los que un anticuerpo para A β se une pueden encontrarse dentro de la proteína precursora del amiloide (APP) humana, pero se encuentran preferentemente dentro del péptido A β de APP. Epítotope o determinantes antigénicos a modo de ejemplo dentro de A β se localizan dentro del extremo N, región central, o extremo C de A β . Un "epítotope del extremo N" es un epítotope o determinante antigénico localizado dentro del extremo N del péptido A β . Epítotope del extremo N a modo de ejemplo incluyen residuos dentro de los aminoácidos 1-10 ó 1-12 de A β , preferentemente de los residuos 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 2-6, 2,7, 3-6 ó 3-7 de A β 42. Otros epítotope del extremo N a modo de ejemplo empiezan en los residuos 1-3 y terminan en los residuos 7-11 de A β . Epítotope del extremo N a modo de ejemplo adicionales incluyen los residuos 2-4, 5, 6, 7 u 8 de A β , los residuos 3-5, 6, 7, 8 ó 9 de A β , o los residuos 4-7, 8, 9 ó 10 de A β 42. "Epítotope centrales" son epítotope o determinantes antigénicos que comprenden residuos localizados dentro de la porción central o media del péptido A β . Epítotope centrales a modo de ejemplo incluyen residuos dentro de los aminoácidos 13-28 de A β , preferentemente de los residuos 14-27, 15-26, 16-25, 17-24, 18-23 ó 19-22 de A β . Otros epítotope centrales a modo de ejemplo incluyen residuos dentro de los aminoácidos 16-24, 16-23, 16-22, 16-21, 18-21, 19-21, 19-22, 19-23 ó 19-24 de A β . Los epítotope o determinantes antigénicos del "extremo C" se localizan dentro del extremo C del péptido A β e incluyen residuos dentro de los aminoácidos 33-40, 33-41 ó 33-42 de A β . "Epítotope del extremo C" son epítotope o determinantes antigénicos que comprenden residuos localizados dentro del extremo C del péptido A β (por ejemplo, dentro de aproximadamente los aminoácidos 30-40 o 30-42 de A β . Epítotope o determinantes antigénicos del extremo C a modo de ejemplo adicionales incluyen los residuos 33-40 ó 33-42 de A β .

Cuando se dice que un anticuerpo se une a un epítotope dentro de residuos especificados, por ejemplo, 3-7 de A β , lo que significa es que el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que contiene los residuos especificados (es decir, 3-7 de A β en este ejemplo). Un anticuerpo tal no se pone necesariamente en contacto con cualquier residuo dentro de 3-7 de A β . Ni ninguna sustitución única de aminoácidos ni delección en 3-7 de A β afecta necesariamente significativamente la afinidad de unión.

En diversos aspectos, un anticuerpo para A β es específico de extremo. Como se usa en el presente documento, el término "específico de extremo" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a los residuos del extremo N o extremo C de un péptido A β , pero que no reconoce los mismos residuos cuando está presente en una especie de A β más larga que comprende los residuos o en APP. En diversos aspectos, un anticuerpo A β es "específico del extremo C". Como se usa en el presente documento, el término "específico del extremo C" significa que el anticuerpo reconoce específicamente un extremo C libre de un péptido A β . Ejemplos de anticuerpos para A β específicos del extremo C incluyen aquellos que: reconocen un péptido A β que termina en el residuo 40, pero no reconocen un péptido A β que termina en el residuo 41, 42 y/o 43; reconocen un péptido A β que termina en el residuo 42 pero no reconocen un péptido A β que termina en el residuo 40, 41 y/o 43; etc.

El anticuerpo 3D6 se describe en la publicación de patente de EE.UU. n° 20030165496A1, la publicación de patente de EE.UU. n° 20040087777A1, la publicación de patente internacional n° WO 02/46237A3 y la publicación de patente internacional n° WO04/080419A2. La descripción de anticuerpos 3D6 también puede encontrarse, por ejemplo, en la publicación de patente internacional n° WO02/088306A2 y la publicación de patente internacional n° WO02/088307A2. Anticuerpos 3D6 adicionales se describen en la solicitud de patente de EE.UU. n° 11/303.478 y la solicitud internacional n° PCT/US05/45614. 3D6 es un anticuerpo monoclonal (mAb) que se une específicamente a un epítotope del extremo N localizado en el péptido β -amiloide humano, específicamente los residuos 1-5. Una línea celular que produce el anticuerpo monoclonal 3D6 (RB96 3D6.32.2.4) se depositó en la Colección Americana de

Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, VA 20108, EE.UU., el 8 de abril de 2003 bajo los términos del Tratado de Budapest y tiene el número de depósito PTA-5130.

5 Bapineuzumab significa un anticuerpo 3D6 humanizado que comprende una cadena ligera que tiene una región variable madura que tiene la secuencia de aminoácidos designada SEC ID N°: 1 y una cadena pesada que tiene una región variable madura que tiene la secuencia de aminoácidos designada SEC ID N°: 2.

Región variable de la cadena ligera de 3D6 humanizado

10 **Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro**
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys
15 **Pro Gly Gln Ser Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp**
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
20 **Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys**
Val Glu Ile Lys (SEQ ID NO: 1)

25 Región variable de la cadena pesada de 3D6 humanizado

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
30 **Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu**
Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser
35 **Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn**
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp
40 **Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO: 2)**

Bapineuzumab también se conoce como AAB-001. La Figura 1 muestra secuencias de aminoácidos de la región variable madura de las cadenas ligera y pesada de bapineuzumab predichas a partir de las secuencias de ADN de la construcción de expresión. La secuencia de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas de AAB-001 se predijo a partir de las secuencias de ADN de la construcción de expresión. Las regiones CDR están subrayadas. Las cisteínas que se espera que formen enlaces disulfuro intermoleculares están subrayadas y se indica la conectividad. El sitio consenso de glicosilación ligado a N está en cursiva en negrita. La lisina del extremo COOH de la cadena pesada predicha se muestra entre paréntesis.

50 Una segunda versión del anticuerpo 3D6 humanizado que comprende una cadena ligera que tiene una región variable madura que tiene la secuencia de aminoácidos designada SEC ID N°: 3 y una cadena pesada que tiene una región variable madura que tiene la secuencia de aminoácidos designada SEC ID N°: 4 se muestra a continuación.

Región variable de la cadena ligera de 3D6 humanizado

55 **Tyr Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro**
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys
60 **Pro Gly Gln Ser Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp**
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
65 **Val Glu Ile Lys (SEQ ID NO:3)**

Región variable de la cadena pesada de 3D6 humanizado

5 **Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln**
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser
10 **Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn**
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu
Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp
15 **Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:4)**

Una tercera versión del anticuerpo 3D6 humanizado que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos designada SEC ID N°: 5 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos designada SEC ID N°: 6 se describe en el documento US 2005/0090649 A1 publicado el 28 de abril de 2005.

20 Cadena ligera de 3D6 humanizado

25 **Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly**
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
30 **Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile**
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
35 **Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu**
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
40 **Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu**
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
45 **Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys (SEQ ID NO: 5)**

50

55

60

65

Cadena pesada de 3D6 humanizado

5 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Asn Val
 10 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 15 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Gln Pro Val Thr Val Ser Trp
 20 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 25 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gln Leu Leu Gly Gly Pro
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 30 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 35 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 40 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 45 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 50 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 Lys (SEQ ID NO: 6)

55 Los anticuerpos para su uso en la presente invención pueden producirse recombinantemente o sintéticamente. Por ejemplo, el anticuerpo puede producirse por un procedimiento en cultivo celular recombinante usando, por ejemplo, células CHO, células NIH 3T3, células PER.C6®, células NS0, células VERO, fibroblastos de embrión de pollito o células BHK. Además, los anticuerpos con modificaciones secundarias que retienen la propiedad funcional primaria de unión al péptido A β se contemplan por la presente invención. El anticuerpo es un anticuerpo 3D6 anti-péptido A β humanizado que se une selectivamente al péptido A β . Más específicamente, el anticuerpo 3D6 anti-péptido A β humanizado se diseña para unirse específicamente a un epítipo del extremo NH₂, por ejemplo, los residuos de aminoácidos 1-5, localizados en el péptido 1-40 ó 1-42 de β -amiloide humano encontrado en depósitos de placa en el cerebro (por ejemplo, en pacientes que padecen enfermedad de Alzheimer).

65 Procedimientos profilácticos y terapéuticos

La presente divulgación se refiere, entre otras cosas, al tratamiento de Alzheimer y otras enfermedades amiloidogénicas por administración de reactivos terapéuticos inmunológicos (por ejemplo, inmunoglobulinas humanizadas) para epítopes específicos dentro de A β a un paciente en condiciones que generan una respuesta terapéutica beneficiosa en un paciente (por ejemplo, inducción de fagocitosis de A β , reducción de la carga de placas, inhibición de la formación de placas, reducción de distrofia neurítica, mejora y/o inversión de la función cognitiva, tratamiento o prevención del empeoramiento cognitivo) en el paciente, por ejemplo, para la prevención o el tratamiento de una enfermedad amiloidogénica. La invención también se refiere al uso de los reactivos inmunológicos desvelados (por ejemplo, inmunoglobulinas humanizadas) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad amiloidogénica.

El término "tratamiento", como se usa en el presente documento, se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico a un paciente, o aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido aislado o línea celular de un paciente, que tiene una enfermedad, un síntoma de enfermedad o una predisposición hacia una enfermedad, con el fin de curar, sanar, aliviar, atenuar, alterar, remediar, mejorar, corregir o afectar la enfermedad, los síntomas de enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad.

La divulgación proporciona anticuerpos para su uso en procedimientos que previenen o tratan una enfermedad asociada a depósitos de amiloide de A β en el cerebro de un paciente. Tales enfermedades incluyen enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down y deterioro cognitivo. Esta última puede producirse con o sin otras características de una enfermedad amiloidogénica. Algunos procedimientos de la divulgación implican administrar una dosificación eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un componente de un depósito de amiloide al paciente. Tales procedimientos son particularmente útiles para prevenir o tratar enfermedad de Alzheimer en pacientes humanos. Procedimientos a modo de ejemplo implican administrar una dosificación eficaz de un anticuerpo que se une a A β . Procedimientos preferidos implican administrar una dosificación eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-10 de A β , por ejemplo, anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-3 de A β , anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-4 de A β , anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-5 de A β , anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-6 de A β , anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-7 de A β , o anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 3-7 de A β . La divulgación ofrece administrar anticuerpos que se unen a un epítipo que comprende un residuo del extremo N libre de A β . La divulgación ofrece administrar anticuerpos que se unen a un epítipo dentro de los residuos 1-10 de A β en el que el residuo 1 y/o el residuo 7 de A β es ácido aspártico. La divulgación muestra administrar anticuerpos que se unen específicamente a péptido A β sin unirse a proteína precursora del amiloide (APP) de longitud completa. En otro aspecto más, el isotipo del anticuerpo es IgG1 humana.

La divulgación muestra administrar anticuerpos que se unen a un depósito de amiloide en el paciente e inducir una respuesta de eliminación contra el depósito de amiloide. Por ejemplo, una respuesta de eliminación tal puede efectuarse por fagocitosis mediada por el receptor de Fc.

Los agentes terapéuticos de la invención están normalmente sustancialmente puros de contaminante no deseado. Esto significa que un agente tiene normalmente al menos aproximadamente el 50 % en p/p (peso/peso) de pureza, además de estar sustancialmente libre de proteínas y contaminantes interferentes. Algunas veces, los agentes tienen al menos aproximadamente el 80 % en p/p y, más preferentemente al menos el 90 o aproximadamente el 95 % en p/p de pureza. Sin embargo, usando técnicas de purificación de proteínas convencionales, pueden obtenerse péptidos homogéneos de al menos el 99 % en p/p.

Los anticuerpos pueden usarse en procedimientos que pueden usarse en pacientes tanto asintomáticos como aquellos que actualmente muestran síntomas de enfermedad. Los anticuerpos usados en tales procedimientos pueden ser anticuerpos humanos, humanizados, quiméricos o no humanos, o fragmentos de los mismos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) y pueden ser monoclonales o policlonales, como se describe en el presente documento. La divulgación muestra administrar anticuerpos preparados a partir de un humano inmunizado con péptido A β , humano que puede ser el paciente que va a tratarse con el anticuerpo.

En otro aspecto, el anticuerpo se administra con un vehículo farmacéutico como composición farmacéutica. Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse a un paciente administrando un polinucleótido que codifica al menos una cadena de anticuerpo. El polinucleótido se expresa para producir la cadena de anticuerpo en el paciente. Opcionalmente, el polinucleótido codifica cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo. El polinucleótido se expresa para producir las cadenas pesadas y ligeras en el paciente. En otros aspectos, el paciente se monitoriza para el nivel de anticuerpo administrado en la sangre del paciente.

Por tanto, la invención satisface una necesidad que viene de largo para pautas terapéuticas para prevenir o mejorar la neuropatología y, en algunos pacientes, el deterioro cognitivo asociado a enfermedad de Alzheimer.

Pacientes aceptados para el tratamiento

Los pacientes aceptados para el tratamiento incluyen individuos en riesgo de enfermedad, pero que no muestran

síntomas, además de pacientes que presentemente muestran síntomas. En el caso de enfermedad de Alzheimer, prácticamente cualquiera está en riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer si vive el tiempo suficiente. Por tanto, los presentes procedimientos pueden administrarse profilácticamente a la población general sin la necesidad de ninguna evaluación del riesgo del paciente objeto. Los presentes procedimientos son especialmente útiles para individuos que tienen un riesgo genético conocido de enfermedad de Alzheimer. Tales individuos incluyen aquellos que tienen parientes que han sufrido esta enfermedad, y aquellos cuyo riesgo se determina por análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo hacia enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones en el gen APP, particularmente mutaciones en la posición 717 y posiciones 670 y 671 denominadas las mutaciones de Hardy y Swedish, respectivamente (véase Hardy, arriba). Otros marcadores de riesgo son mutaciones en los genes presenilina, PS1 y PS2, y ApoE4, historia familiar de EA, hipercolesterolemia o aterosclerosis. Los individuos que presentemente padecen enfermedad de Alzheimer pueden reconocerse por demencia característica, además de la presencia de los factores de riesgo descritos anteriormente. Además, están disponibles varias pruebas de diagnóstico para identificar individuos que tienen EA. Éstas incluyen medición de niveles de CSF tau y Aβ42. Niveles elevados de tau y disminuidos de Aβ42 significan la presencia de EA. Los individuos que padecen enfermedad de Alzheimer también pueden diagnosticarse por criterios de ADRDA como se trata en la sección de Ejemplos.

En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede empezar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20, 30). Normalmente, sin embargo, es necesario empezar el tratamiento hasta que un paciente llega a 40, 50, 60 ó 70. El tratamiento normalmente implica múltiples dosificaciones durante un periodo de tiempo. El tratamiento puede monitorizarse ensayando niveles de anticuerpo con el tiempo. Si la respuesta cae, se indica una dosificación de refuerzo. En el caso de posibles pacientes con síndrome de Down, el tratamiento puede empezar prenatalmente administrando agente terapéutico a la madre o poco después del parto.

Pacientes aceptados para el tratamiento incluyen pacientes de 50 a 87 años de edad, pacientes que padecen enfermedad de Alzheimer de leve a moderada, pacientes que tienen una puntuación de MMSE de 14-26, pacientes que tienen un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer probable basado en el criterio de trastornos neurológicos y transmisibles y trastornos relacionados con accidente cerebrovascular-enfermedad de Alzheimer (NINCDS-ADRDA) y/o pacientes que tienen una puntuación isquémica de Hachinski modificada por Rosen inferior a o igual a 4. Los pacientes con barrido de IRM de acuerdo con el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer, es decir, que no hay otras anomalías presentes en la IRMN que pudieran atribuirse a otras enfermedades, por ejemplo, accidente cerebrovascular, lesión cerebral traumática, quistes aracnoideos, tumores, etc., también son aceptados para tratamiento.

Los procedimientos de la invención son particularmente aceptados para pacientes que no tienen historia ni evidencia de alguno de los siguientes: encefalitis; accidente cerebrovascular clínicamente evidente; estenosis o placa carótida o vertebrobasilar clínicamente significativa; convulsiones, excluyendo convulsiones febriles en la infancia; cualquier enfermedad autoinmunitaria significativa o trastorno del sistema inmunitario; y/o trastorno renal clínicamente significativo. Los procedimientos de la invención son particularmente aceptados para pacientes que no han tenido infección clínicamente significativa en el plazo de 30 días antes de que comience el tratamiento, por ejemplo, una infección persistente o aguda crónica. Los procedimientos de la invención son particularmente aceptados para pacientes que no han sido tratados con medicación inmunosupresora (por ejemplo, corticosteroides sistémicos) en el plazo de 90 días antes de que comience el tratamiento (se permiten corticosteroides tópicos y nasales y corticosteroides inhalados para asma) o agentes quimioterapéuticos para tumor maligno en el plazo de 3 años antes de que comience el tratamiento. Los procedimientos de la invención también son particularmente aceptados para pacientes que no tienen anomalía clínicamente significativa en examen físico, neurológico, de laboratorio o ECG (por ejemplo, fibrilación auricular) si la anomalía pudiera ser perjudicial para el paciente. Los procedimientos de la invención también son particularmente aceptados para pacientes que no usan anticonvulsivos para convulsión, antiparkinsoniano, anticoagulante (excluyendo el uso de aspirina 325 mg/día o menos) o medicaciones narcóticas.

50 Pautas de tratamiento y dosificaciones

En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o medicamentos se administran a un paciente susceptible a o, de otro modo, en riesgo de enfermedad de Alzheimer en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar la aparición de la enfermedad, que incluye síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones o medicamentos se administran a un paciente del que se sospecha de o que ya padece una enfermedad tal en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad (bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento), que incluyen sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad.

En algunos procedimientos, la administración del agente reduce o elimina el deterioro miocognitivo en pacientes que todavía no han desarrollado patología de Alzheimer característica. Una cantidad adecuada para realizar tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis terapéuticamente o profilácticamente eficaz. En pautas tanto profilácticas como terapéuticas, los agentes se administran normalmente en varias dosificaciones hasta que se ha

alcanzado una respuesta inmunitaria suficiente. El término “respuesta inmunitaria” o “respuesta inmunológica” incluye el desarrollo de una respuesta humoral (mediada por anticuerpos) y/o celular (mediada por linfocitos T específicos para antígeno o sus productos de secreción) dirigida contra un antígeno en un sujeto receptor. Una respuesta tal puede ser una respuesta activa, es decir, inducida por la administración de inmunogén, o una respuesta pasiva, es decir, inducida por la administración de inmunoglobulina o anticuerpo o linfocitos T sensibilizados.

Un “agente inmunogénico” o “inmunogén” puede inducir una respuesta inmunológica contra sí mismo en la administración a un mamífero, opcionalmente conjuntamente con un adyuvante. Normalmente, la respuesta inmunitaria se monitoriza y se administran dosificaciones repetidas si la respuesta inmunitaria empieza a disminuir. Normalmente, la respuesta inmunitaria se monitoriza y se administran dosificaciones repetidas si la respuesta inmunitaria empieza a disminuir.

Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de las afecciones anteriormente descritas, varían dependiendo de muchos factores diferentes que incluyen medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otras medicaciones administradas y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Normalmente, el paciente es un humano, pero también pueden tratarse mamíferos no humanos, que incluyen mamíferos transgénicos. Las dosificaciones de tratamiento necesitan valorarse para optimizar la seguridad y eficacia.

Para inmunización pasiva, la dosificación oscila de aproximadamente 0,0001 a 100, y más normalmente 0,01 a 5 mg/kg de peso corporal del huésped. Por ejemplo, los intervalos de dosificación pueden ser inferiores a 20 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1,0 a 7 mg/kg. Para inmunización pasiva, la dosificación preferida oscila de aproximadamente 0,5 a menos de 5 mg/kg, y más normalmente 0,5 a 3 mg/kg, de peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser inferiores a 5 mg/kg de peso corporal o 1,5 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 0,5 a 1,5 mg/kg, preferentemente al menos 1,5 mg/kg. A los sujetos pueden administrársele tales dosis diariamente, en días alternos, semanalmente o según cualquier otro programa determinado por análisis empírico. Un tratamiento a modo de ejemplo implica administración en múltiples dosificaciones durante un periodo prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Pautas de tratamiento a modo de ejemplo adicionales implican administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses.

Programas de dosificación pasiva a modo de ejemplo incluyen 1,5-3 mg/kg o 1,5 mg/kg cada trece semanas. Los agentes de la invención se administran normalmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones únicas pueden ser semanalmente, mensualmente o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares, como se indica midiendo los niveles en sangre de anticuerpo para A β en el paciente.

En algunos procedimientos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de anticuerpo en plasma de 1-1000 μ g/ml y en algunos procedimientos 25-300 μ g/ml. Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la semivida más larga, seguida de anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos.

La dosificación y frecuencia de la administración puede variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los presentes anticuerpos o una mezcla de los mismos se administran a un paciente que todavía no está en el estado de enfermedad para potenciar la resistencia del paciente. Se define que una cantidad tal es una “dosis eficaz profiláctica”. En este uso, las cantidades precisas dependen de nuevo del estado de salud del paciente y la inmunidad general, pero generalmente oscilan de 0,1 a 25 mg por dosis, especialmente de 0,5 a 2,5 mg por dosis. Una dosificación relativamente baja se administra a intervalos relativamente poco frecuentes durante un largo periodo de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento para el resto de sus vidas.

En aplicaciones terapéuticas, algunas veces se requiere una dosificación relativamente alta (por ejemplo, de aproximadamente 10 a 250 mg de anticuerpo por dosis, siendo las dosificaciones de 5 a 25 mg las más comúnmente usadas) a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad, y preferentemente hasta que el paciente muestra mejora parcial o completa de síntomas de enfermedad. Después, al paciente puede administrársele una pauta profiláctica.

Los agentes terapéuticos pueden administrarse por medios parenterales, tópicos, intravenosos, orales, subcutáneos, intraarteriales, intracraneales, intraperitoneales, intranasales o intramusculares para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. La vía de administración más típica de un agente inmunogénico pasivo es infusión intravenosa, aunque otras vías pueden ser igualmente eficaces. La siguiente vía más común es inyección intramuscular. Este tipo de inyección se realiza lo más normalmente en los músculos del brazo o la pierna. En algunos procedimientos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular en el que se han acumulado depósitos, por ejemplo, inyección intracraneal. Se prefieren inyección intramuscular o infusión intravenosa para la administración del

anticuerpo. En algunos procedimientos, anticuerpos terapéuticos particulares se inyectan directamente en el cráneo. En algunos procedimientos, los anticuerpos se administran como una composición o dispositivo de liberación sostenida, tal como un dispositivo Medipad™.

5 Los agentes de la invención pueden administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de enfermedad amiloidogénica. En el caso de Alzheimer y síndrome de Down, en los que se producen depósitos de amiloide en el cerebro, los agentes de la invención también pueden administrarse conjuntamente con otros agentes que aumentan el paso de los agentes de la invención a través de la barrera hematoencefálica.

10

Composiciones farmacéuticas

15 Los agentes de la invención se administran frecuentemente como composiciones farmacéuticas que comprenden un agente terapéutico activo, es decir, y una variedad de otros componentes farmacéuticamente aceptables. Véase Remington's Pharmaceutical Science (15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania (1980)). La forma preferida depende del modo previsto de administración y la aplicación terapéutica. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, vehículos o diluyentes no tóxicos farmacéuticamente aceptables que se definen como vehículos comúnmente usados para formular composiciones farmacéuticas para administración animal o humana. El diluyente está seleccionado de forma que no afecte la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, disoluciones de Ringer, disolución de dextrosa y disolución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros vehículos, adyuvantes o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

25 Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir macromoléculas grandes lentamente metabolizadas tales como proteínas, polisacáridos tales como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (tales como Sepharose(TM) funcionalizada con látex, agarosa, celulosa, y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados de lípidos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Adicionalmente, estos vehículos pueden funcionar de agentes inmunoestimulantes (es decir, adyuvantes).

30

Para administración parenteral, los agentes de la invención pueden administrarse como dosificaciones inyectables de una disolución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como aceites en agua, solución salina, glicerol o etanol. Adicionalmente, sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias de tamponamiento del pH y similares pueden estar presentes en las composiciones. Otros componentes de composiciones farmacéuticas son aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite mineral. En general, glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol son vehículos líquidos preferidos, particularmente para disoluciones inyectables. Los anticuerpos pueden administrarse en forma de una inyección de liberación prolongada o preparación de implante, que pueden formularse de tal forma que se permita una liberación sostenida del principio activo. Una composición a modo de ejemplo comprende anticuerpo monoclonal a 5 mg/ml, formulado en tampón acuoso que consiste en L-histidina 50 mM, NaCl 150 mM, ajustado a pH 6,0 con HCl.

35

Normalmente, las composiciones se preparan como inyectables, tanto como disoluciones como suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas o micropartículas tales como polilactida, poliglicolida o copolímero para el efecto adyuvante potenciado, como se trata anteriormente (véase Langer, Science 249: 1527 (1990) y Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28:97 (1997)). Los agentes de la presente invención pueden administrarse en forma de una inyección de liberación prolongada o preparación de implante, que puede formularse de tal forma que se permita una liberación sostenida o pulsada del principio activo.

50

Formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales, intranasales y pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas. Para supositorios, aglutinantes y vehículos incluyen, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo del 0,5 % al 10 %, preferentemente del 1 %-2 %. Formulaciones orales incluyen excipientes tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa y carbonato de magnesio. Estas composiciones toman la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen 10 %-95 % de principio activo, preferentemente 25 %-70 %.

60

La administración tópica puede producir administración transdérmica o intradérmica. La administración tópica puede facilitarse por co-administración del agente con toxina del cólera o derivados desintoxicados o subunidades de los mismos u otras toxinas bacterianas similares (véase Glenn y col., Nature 391, 851 (1998)). La co-administración puede lograrse usando los componentes como una mezcla o como moléculas ligadas obtenidas por reticulación o expresión química como una proteína de fusión.

65

Alternativamente, la administración transdérmica puede lograrse usando una ruta de la piel o usando transferosomas (Paul y col., Eur. J. Immunol. 25:3521 (1995); Cevc y col., Biochem. Biophys. Acta 1368:201-15 (1998)).

5 Monitorización de la evolución del tratamiento

La invención proporciona anticuerpos para su uso en procedimientos de tratamiento, en los que dichos procedimientos se monitorizan en un paciente que padece o es susceptible a Alzheimer, es decir, para monitorizar una evolución del tratamiento que se administra a un paciente. Los procedimientos pueden usarse para monitorizar tanto tratamiento terapéutico en pacientes sintomáticos como tratamiento profiláctico en pacientes asintomáticos. En particular, los procedimientos son útiles para monitorizar inmunización pasiva (por ejemplo, medir el nivel de anticuerpo administrado).

Algunos procedimientos implican determinar un valor del nivel inicial, por ejemplo, de un nivel o perfil de anticuerpo en un paciente, antes de administrar una dosificación de agente, y comparar este con un valor para el perfil o nivel después del tratamiento. Un aumento significativo (es decir, superior al margen típico del error experimental en mediciones repetidas de la misma muestra, expresado como una desviación estándar de la media de tales mediciones) en el valor del nivel o perfil indica un desenlace del tratamiento positivo (es decir, que la administración del agente ha alcanzado una respuesta deseada). Si el valor para la respuesta inmunitaria no cambia significativamente, o disminuye, se indica un desenlace del tratamiento negativo.

En otros procedimientos se determina un valor de control (es decir, una media y desviación estándar) del nivel o perfil para una población de control. Normalmente, los individuos en la población de control no han recibido tratamiento previo. Los valores medidos del nivel o perfil en un paciente después de administrar un agente terapéutico se comparan luego con el valor de control. Un aumento significativo con respecto al valor de control (por ejemplo, superior a una desviación estándar de la media) indica un desenlace del tratamiento positivo o suficiente. Una falta de aumento significativo o una disminución indica un desenlace del tratamiento negativo o insuficiente. La administración del agente continúa generalmente mientras que el nivel vaya aumentando con respecto al valor de control. Como antes, el logro de una meseta con respecto a valores de control es un indicador de que la administración de tratamiento puede interrumpirse o reducirse en dosificación y/o frecuencia.

En otros procedimientos, un valor de control del nivel o perfil (por ejemplo, una media y desviación estándar) se determina a partir de una población de control de individuos que han recibido tratamiento con un agente terapéutico y cuyos niveles o perfiles han alcanzado una meseta en respuesta a tratamiento. Los valores medidos de niveles o perfiles en un paciente se comparan con el valor de control. Si el nivel medido en un paciente no es significativamente diferente (por ejemplo, más de una desviación estándar) del valor de control, el tratamiento puede interrumpirse. Si el nivel en un paciente está significativamente por debajo del valor de control, la administración continuada del agente se garantiza. Si el nivel en el paciente persiste por debajo del valor de control, entonces puede indicarse un cambio en el tratamiento.

Un paciente que no está presentemente recibiendo tratamiento, pero que ha experimentado una evolución previa del tratamiento, se monitoriza para los niveles de anticuerpos o perfiles para determinar si se requiere una reanudación del tratamiento. El nivel medido o perfil en el paciente puede compararse con un valor previamente alcanzado en el paciente después de una evolución previa del tratamiento. Una disminución significativa con respecto a la medición previa (es decir, superior a un margen de error típico en mediciones repetidas de la misma muestra) es una indicación de que el tratamiento puede reanudarse. Alternativamente, el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control (media más desviación estándar) determinado en una población de pacientes después de experimentar una evolución del tratamiento. Alternativamente, el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control en poblaciones de pacientes profilácticamente tratados que siguen estando libres de síntomas de enfermedad, o poblaciones de pacientes terapéuticamente tratados que muestran mejora de las características de enfermedad. En todos estos casos, una disminución significativa con respecto al nivel de control (es decir, superior a una desviación estándar) es un indicador de que el tratamiento debe reanudarse en un paciente.

La muestra de tejido para análisis es normalmente sangre, plasma, suero, líquido mucoso o líquido cefalorraquídeo del paciente. La muestra se analiza, por ejemplo, para niveles o perfiles de anticuerpos para el péptido A β , por ejemplo, niveles o perfiles de anticuerpos humanizados. Los procedimientos de ELISA de detección de anticuerpos específicos para A β se describen en la sección de ejemplos. En algunos procedimientos, el nivel o perfil de un anticuerpo administrado se determina usando un ensayo de eliminación, por ejemplo, en un ensayo de fagocitosis *in vitro*, como se describe en el presente documento. En tales procedimientos, una muestra de tejido de un paciente que se prueba se pone en contacto con depósitos de amiloide (por ejemplo, de un ratón PDAPP) y células fagocíticas que llevan receptores de Fc. Entonces se monitoriza la posterior eliminación del depósito de amiloide. La existencia y el grado de la respuesta de eliminación proporcionan una indicación de la existencia y el nivel de anticuerpos eficaces para eliminar A β en la muestra de tejido del paciente en prueba.

El perfil de anticuerpos tras la inmunización pasiva normalmente muestra un pico inmediato en la concentración de

anticuerpos, seguido de un decaimiento exponencial. Sin otra dosificación, el decaimiento se aproxima a niveles de pretratamiento en el plazo de un periodo de días a meses dependiendo de la semivida del anticuerpo administrado. Por ejemplo, la semivida de algunos anticuerpos humanos es del orden de 20 días.

5 En algunos procedimientos desvelados se hace una medición del nivel inicial del anticuerpo para A β en el paciente antes de la administración, se hace una segunda medición poco después de determinar el nivel de pico del anticuerpo, y se hacen una o más mediciones adicionales a intervalos para monitorizar el decaimiento de los niveles de anticuerpo. Cuando el nivel de anticuerpo ha disminuido hasta el nivel inicial o un porcentaje predeterminado del pico menos el nivel de inicial (por ejemplo, 50 %, 25 % o 10 %), se administra la administración de otra dosificación de anticuerpo. En algunos procedimientos se comparan el pico o niveles medidos posteriores menos la referencia con niveles de referencia previamente determinados para constituir una pauta de tratamiento profiláctico o terapéutico beneficiosa en otros pacientes. Si el nivel medido de anticuerpo es significativamente inferior a un nivel de referencia (por ejemplo, inferior a la media menos una desviación estándar del valor de referencia en la población de pacientes que se benefician del tratamiento), se indica la administración de una dosificación adicional de anticuerpo.

15 Procedimientos adicionales incluyen monitorizar durante la evolución del tratamiento cualquier síntoma fisiológico reconocido en la materia (por ejemplo, síntoma físico o mental) rutinariamente confiado por investigadores o médicos para diagnosticar o monitorizar enfermedades amiloidogénicas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer). Por ejemplo, puede monitorizarse deterioro cognitivo. Este último es un síntoma de enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down, pero también puede producirse sin otras características de cualquiera de estas enfermedades. Por ejemplo, el deterioro cognitivo puede monitorizarse determinando la puntuación de un paciente en el minexamen del estado mental según convención durante toda la evolución de tratamiento.

20 El paciente puede monitorizarse por al menos un tipo de evaluación seleccionada del grupo que consiste en Minexamen del estado mental (MMSE), Escala de evaluación de la enfermedad de Alzheimer - cognitiva (ADAS-COG), Impresión basada en entrevista por el profesional clínico Interview (CIBI), Batería de pruebas neurológicas (NTB), Evaluación de la discapacidad en la demencia (DAD), Clasificación clínica de la demencia - suma de cajas (CDR-SOB), Inventario neuropsiquiátrico (NPI), barrido de tomografía de emisión de positrones (obtención de imágenes por TEP), barrido de imágenes de resonancia magnética (IRM), un ECG y medición de la tensión arterial. El tipo de evaluación puede administrarse en múltiples ocasiones. Por ejemplo, puede realizarse un MMSE antes de administrar una dosificación del agente inmunogénico, y en la semana 4, semana 6, semana 16, 6 meses y 1 año después de administrar la dosificación del agente inmunogénico. En algunos pacientes puede realizarse un MMSE antes de administrar una dosificación del agente inmunogénico, y en la semana 6 y semana 16. Puede realizarse un barrido de IRM cada 3 meses, cada 6 meses, o cada año.

25 Los pacientes pueden monitorizarse para síndrome de encefalopatía posterior reversible (SEPR) o edema vascular después de la administración de un anticuerpo dentro de un intervalo de aproximadamente 0,5 mg/kg a menos de 5 mg/kg, en el que el anticuerpo se une específicamente al péptido beta amiloide (A β) con una afinidad de unión de al menos 10^7 M⁻¹. El SEPR consiste clásicamente en edema vasogénico reversible en los territorios de circulación posterior, sin embargo, se ha descrito la conversión a edema citotóxico irreversible. El SEPR se caracteriza normalmente por cefalea, náuseas, vómitos, confusión, convulsiones, anomalías visuales, funcionamiento mental alterado, ataxia, síntomas frontales, síntomas parietales, estupor y signos neurológicos focales. Además de los anteriores síntomas clínicos, barridos de IRM u obtención de imágenes de la secuencia de recuperación de inversión atenuada por líquido (FLAIR) pueden usarse para indicar la presencia de SEPR (véanse *Pediatric Neurology*, 20(3):241-243; *AJNR*, 26:825-830; *NEJM*. 334(8):494-500; *Pediatr Nephrol*, 18:1161-1166; *Internal Medicine Journal*, 35:83-90; *JNNP*, 68:790-791; *AJNR*, 23:1038-1048; *Pak J Med Sci*, 21(2):149-154 y, *AJNR*, 21:1199-1209.)

30 Los pacientes pueden monitorizarse para SEPR o edema vascular mensualmente, cada cuatro meses, cada seis meses, o anualmente. El paciente puede monitorizarse para al menos un síntoma clínico asociado a SEPR o edema vascular. La monitorización puede comprender realizar un barrido de IRM. La monitorización puede comprender además realizar obtención de imágenes de secuencias de FLAIR. Los resultados de la monitorización pueden influir en la pauta de dosificación. Por ejemplo, si se detecta SEPR o edema vascular, la dosificación puede suspenderse o las dosificaciones pueden reducirse o los intervalos entre dosificaciones pueden aumentarse.

35 Los pacientes con SEPR o edema vascular pueden medir su tensión arterial para hipertensión. Si se detecta hipertensión en el paciente, el paciente puede tratarse para la hipertensión por administración de un antihipertensor. El antihipertensor puede seleccionarse del grupo que consiste en hidroclorotiazida, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), bloqueantes de los receptores de angiotensina II (ARB), bloqueantes beta y bloqueantes de los canales de calcio. El paciente con SEPR o edema vascular puede tratarse con esteroides tales como dexametasona o metilprednisolona.

C. Kits

40 La divulgación proporciona además productos terapéuticos. Los productos comprenden un vial de vidrio e instrucciones. El vial de vidrio contiene una formulación que comprende aproximadamente 10 mg a

aproximadamente 250 mg de un anticuerpo anti-A β humanizado, aproximadamente 4 % de manitol o NaCl aproximadamente 150 mM, histidina aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM y metionina aproximadamente 10 mM. Las instrucciones para monitorizar un paciente al que se administra la formulación para SEPR y o edema vascular están incluidas con los productos. En algunos productos terapéuticos, el vial de vidrio

5

Ejemplo I. Prevención y tratamiento de sujetos humanos

Bapineuzumab (AAB-001) es un anticuerpo monoclonal humanizado para A β . El objetivo de este estudio es determinar la seguridad y tolerabilidad de dosis únicas de bapineuzumab en EA.

15

Procedimientos: Ensayo de una única dosis ascendente controlado por placebo, de doble ciego, aleatorizado de infusión de bapineuzumab en pacientes con EA de leve a moderada. Los pacientes enrolados en el ensayos cumplieron todos los siguientes criterios:

20

1. Diagnóstico de enfermedad de Alzheimer (EA) probable según los criterios del Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Transmisibles y trastornos relacionados con accidente cerebrovascular-enfermedad de Alzheimer (NINCDS-ADRDA).

25

2. Edad de 50 a 87 años, ambos incluidos.

3. Puntuación del Miniexamen del estado mental (MMSE) de 14-26.

4. Puntuación isquémica de Hachinski modificada por Rosen ≤ 4 .

5. Vive en casa con cuidador apropiado que puede acompañar al paciente a todas las visitas clínicas, o vive en comunidad con cuidador que puede acompañar al paciente a todas las visitas clínicas y visitar al paciente aproximadamente 5 veces por semana durante la duración del estudio.

30

6. Barrido de obtención de imágenes de resonancia magnética (IRM) del cerebro en la visita de selección de acuerdo con el diagnóstico de EA, es decir, que no hay otras anomalías presentes en la IRM que puedan atribuirse a otras enfermedades (por ejemplo, accidente cerebrovascular, lesión cerebral traumática, quistes aracnoides, tumores, etc.).

7. Quirúrgicamente estéril o 2 años después de la menopausia.

35

8. Inglés fluido y pruebas de funcionamiento intelectual premórbido adecuado. El paciente debe tener capacidades visuales y auditivas adecuadas para realizar todos los aspectos de las evaluaciones cognitivas y funcionales.

9. Recibir dosis estables de medicación (medicaciones) para el tratamiento de la afección (afecciones) médica(s) no excluida(s) durante al menos 30 días antes de la selección. Si un paciente está tomando inhibidores de la acetilcolinesterasa o memantina, entonces esta(s) medicación (medicaciones) debe(n) mantenerse en una pauta de dosis estable durante al menos 60 días antes de las evaluaciones de selección.

40

Uno cualquiera de los siguientes criterios excluyeron que un paciente se enrolara en el ensayo:

45

1. Enfermedad neurológica significativa, distinta de EA, que puede afectar la cognición.

2. Presencia actual de un trastorno psiquiátrico importante clínicamente significativo (por ejemplo, trastorno depresivo mayor) según los criterios del Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, cuarta edición (DSM-IV), o síntoma (por ejemplo, alucinaciones), que pudieran afectar la capacidad del paciente para completar el estudio.

50

3. Enfermedad sistémica clínicamente significativa actual que es probable que produzca deterioro de la afección del paciente o afecte la seguridad del paciente durante el estudio.

4. Historia o evidencia de cualquiera de lo siguiente: encefalitis; accidente cerebrovascular clínicamente evidente; estenosis o placa carótida o vertebrobasilar clínicamente significativa; convulsiones, excluyendo convulsiones febriles en la infancia; cualquier enfermedad autoinmunitaria significativa o trastorno del sistema inmunitario; trastorno renal clínicamente significativo.

55

5. Infección clínicamente significativa en los últimos 30 días (por ejemplo, infección persistente crónica o aguda).

6. Tratamiento con medicaciones inmunosupresoras (por ejemplo, corticosteroides sistémicos) en el plazo de los últimos 90 días (se permiten corticosteroides tópicos y nasales y corticosteroides inhalados para asma) o agentes quimioterapéuticos para tumor maligno en el plazo de los últimos 3 años.

60

7. Infarto de miocardio en el plazo de los últimos 2 años.

8. Historia de cáncer en el plazo de los últimos 5 años, con la excepción de carcinoma de células basales no metastásico y carcinoma de células escamosas de la piel.

65

9. Otra anomalía clínicamente significativa en el examen físico, neurológico, de laboratorio o de ECG (por ejemplo, fibrilación auricular) que pudiera comprometer el estudio o ser perjudicial para el paciente.

10. Hemoglobina inferior a 11 g/dl.

11. Historia de dependencia o abuso del alcohol o fármacos en el plazo de los últimos 2 años.
12. Puntuación de la Escala de valoración psiquiátrica de Hamilton para depresión (HAM-D) (17 puntos) >12.
13. Uso actual de anticonvulsivos para convulsión, antiparkinsonianos, anticoagulante (excluyendo el uso de aspirina 325 mg/día o menos), o medicaciones narcóticas.
14. Uso actual de medicación con receta o de venta libre para la potenciación cognitiva distinta de inhibidores de la colinesterasa y memantina. El uso actual de inhibidor de colinesterasa y memantina está prohibido a menos que se cumplan las siguientes condiciones: (a) se mantengan en una pauta de dosis estable durante al menos 60 días antes de la selección; (b) el paciente esté libre de cualquier efecto secundario clínicamente significativo atribuible al fármaco; y (c) paciente y cuidador están de acuerdo en que, salvo circunstancias imprevistas, continuarán la misma pauta durante la duración del ensayo.
15. A menos que se mantenga en una pauta de dosis estable durante al menos 30 días antes de la selección, cualquier otra medicación con el potencial para afectar la cognición distinta de aquella mencionada en nº 18 (que incluye, pero no se limita a, ansiolíticos, sedantes, hipnóticos, antipsicóticos, antidepresivos, somníferos de venta sin receta (OTC), medicaciones antialérgicas sedantes, vitamina E, suplementos para la tiroides y suplementos de vitamina B12 mediante inyección).
16. Pacientes que han suspendido definitivamente inhibidores de la colinesterasa, memantina, agentes de potenciamiento cognitivo o fármacos que afectan potencialmente la cognición en los 60 días antes de la selección.
17. Uso de una medicación experimental (compuesto químico) o dispositivo para EA o cualquier otra medicación o dispositivo en investigación para indicación distinta del tratamiento para EA en el plazo de 30 días antes de la selección o dentro de 5 semividas de uso de una medicación tal antes de la selección, cualquiera que sea más larga.
18. Cualquier tratamiento experimental previo con AN1792, AAB-001, ACC-001, u otro inmunoterapéutico experimental o vacuna para EA.
19. Cualquier tratamiento previo con un producto biológico distinto de aquellos mencionados en nº 18 para el tratamiento de EA en el plazo de los últimos 3 años.
20. Pacientes que han donado sangre (donación de sangre rutinaria) 90 días antes de la selección.
21. Cualquier hipersensibilidad conocida a cualquiera de los excipientes contenidos en la formulación del fármaco del estudio.
22. Presencia de marcapasos, clips de aneurisma, prótesis valvulares, implantes de oído, fragmentos metálicos de objetos extraños en los ojos, piel o cuerpo que contraindicaría un barrido de IRM del cerebro.
23. Peso superior a 120 kg (264 lbs).

Resultados: 30 pacientes recibieron bapineuzumab a la dosis de 0,5 mg/kg (6 activo, 2 placebo) 1,5 mg/kg (6 activo, 2 placebo) y 5 mg/kg (10 activo, 4 placebo). 3/10 pacientes a 5 mg/kg desarrollaron anomalías por IRM, que consistieron predominantemente en anomalías de alta señal sobre secuencias de FLAIR, y el estudio no continuó pasada esa dosis. En dos pacientes éstos se observaron en barridos de vigilancia rutinaria sin síntomas clínicos, sin embargo un tercer paciente experimentó elevada confusión. Las anomalías de FLAIR por IRM se resolvieron en los tres casos 12 semanas después de la dosis. Como parte de las evaluaciones de seguridad se realizó MMSE en el nivel inicial, semana 4, semana 16, 6 meses y 1 año. La Figura 2 muestra el cambio promedio de MMSE desde el nivel inicial. La Figura 3 muestra el cambio a partir de MMSE del nivel inicial por cohorte en el mes 4. En la semana 16, el momento de tiempo primario previamente especificado para el análisis, la diferencia de tratamiento con respecto a placebo favoreció el grupo tratado a la dosis de 0,5 mg/kg (diferencia de tratamiento frente a placebo de 2,0, p=0,152) y alcanzó significancia estadística a la dosis de 1,5 mg/kg (diferencia de tratamiento frente a placebo de 2,5, p=0,047). No hubo diferencia significativa en el cambio de MMSE con respecto a placebo para el grupo de 5,0 mg/kg. La Figura 4 muestra la media, mediana y desviación estándar del cambio de MMSE desde el nivel inicial en el mes cuatro. La Figura 5 muestra los resultados de la prueba estadística del cambio de MMSE desde el nivel inicial en el mes cuatro. No se encontró correlación entre las anomalías de FLAIR por IRM y la diferencia en el cambio de MMSE.

Se elevó A-beta en plasma desde los niveles iniciales en un modo dependiente de la dosis, alcanzando el máximo aproximadamente 24 horas después de la infusión. El análisis farmacocinético mostró una semivida de 22 - 28 días y fue de ayuda un intervalo de dosificación de 13 semanas en múltiples dosificaciones.

Conclusión: En este pequeño estudio, el MMSE mejoró estadísticamente significativamente en comparación con el placebo a la dosis de 1,5 mg/kg de bapineuzumab. La mayor dosis de infusión individual de 5 mg/kg se asoció a anomalías de FLAIR por IRM que se resolvieron.

Aunque la anterior invención se ha descrito en detalle para los fines de claridad de entendimiento, será obvio que ciertas modificaciones pueden ponerse en práctica dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Todas las publicaciones y documentos de patente citados en el presente documento, además del texto que aparece en las figuras, se incorporan por este documento por referencia en su totalidad para todos los fines al mismo grado que si cada uno se indicara así individualmente.

Ejemplo II. Estudio farmacocinético de AAB-001

El objetivo de este estudio es determinar la farmacocinética (PK) humana después de la administración intravenosa de AAB-001.

5 Procedimientos: Ensayo de múltiples dosis crecientes controlado por placebo, de doble ciego, aleatorizado de AAB-001 administrado intravenosamente. Se administraron intravenosamente 6 dosis de AAB-001 cada 13 semanas. Hubo cuatro cohortes de dosis, fueron 0,15, 0,5, 1,0 y 2,0 mg/kg.

10 Resultados: La PK fue predecible y dependiente de la dosis. PK- CL 0,05-0,06 ml/h/kg a través de todos los niveles de dosis. Exposición proporcional a la dosis. Muy poca acumulación con dosificación IV cada 13 semanas, aunque concentraciones de pre-infusión cuantificables a todos los niveles de dosis. $t_{1/2}$ osciló de 21-34 horas. En el estado estacionario, C_{prom} después de 0,5 mg/kg de AAB-001 (es decir, ~35 mg) ~3,3 µg/ml. Véase la Figura 9. C_{prom} después de 0,5 mg/kg de AAB-001 de ~3,3 µg/ml es próxima a los 3,7 µg/ml de concentración encontrada que es eficaz en ratones de PDAPP. La Figura 10 muestra concentración de AAB-001 en suero media frente a los perfiles de tiempo tras la administración intravenosa de AAB-001 a la dosis de 0,15, 0,5, 1,0 y 2,0 mg/kg.

15 Las concentraciones de Aβ en plasma tienden a reproducir concentraciones de AAB-001. Al final del intervalo de dosificación de 13 semanas, los niveles de Aβ en plasma por encima de los niveles de referencia y por encima del grupo de placebo a niveles de dosis de AAB-001 ≥0,5 mg/kg. Véase la Figura 11. $t_{máx}$ osciló de 14-48 horas.

20 Los niveles de anticuerpo anti-AAB-001 en suero han sido indetectables en cualquiera de las muestras (hasta pre-infusión n° 6 para la cohorte de 0,5 mg/kg de AAB-001).

REIVINDICACIONES

1. Una versión humanizada del anticuerpo de ratón 3D6 expresado por el hibridoma depositado bajo ATCC nº PTA-5130, para su uso en un procedimiento para tratar enfermedad de Alzheimer, en la que dicho anticuerpo (a) se administra subcutáneamente a un paciente que padece la enfermedad a una dosificación dentro de un intervalo de 0,01-0,6 mg/kg y una frecuencia de entre semanalmente y mensualmente o (b) se administra intravenosamente a un paciente que padece la enfermedad a una dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg a 1,5 mg/kg cada 8-16 semanas, en la que el paciente se monitoriza para síndrome de encefalopatía posterior reversible (SEPR) o edema vascular o (c) se administra a un paciente que padece la enfermedad en una pauta suficiente para mantener una concentración en suero máxima del anticuerpo en el paciente inferior a aproximadamente 28 µg de anticuerpo/ml, en la que la concentración en suero promedio está dentro de un intervalo de aproximadamente 1-15 µg de anticuerpo/ml.
2. Un anticuerpo de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en el que el paciente tiene una puntuación de MMSE de 14-26.
3. Un anticuerpo de la reivindicación 1(a) o 1(c), para el uso de la reivindicación 1, en el que dicho paciente se monitoriza para síndrome de encefalopatía posterior reversible (SEPR) o edema vascular.
4. Un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, para el uso de aquellas reivindicaciones, en el que el paciente se monitoriza por al menos un tipo de evaluación seleccionada del grupo de que consiste en Miniexamen del estado mental (MMSE), Escala de evaluación de la enfermedad de Alzheimer - cognitiva (ADAS-COG), Impresión basada en entrevista por el profesional clínico (CIBI), Batería de pruebas neurológicas (NTB), Evaluación de la discapacidad en la demencia (DAD), Clasificación clínica de la demencia - suma de cajas (CDR-SOB), Inventario neuropsiquiátrico (NPI), barrido de tomografía de emisión de positrones (obtención de imágenes por TEP), barrido de imágenes de resonancia magnética (IRM), ECG y medición de tensión arterial.
5. Un anticuerpo de la reivindicación 4, para el uso de la reivindicación 4, en el que un MMSE se administra en múltiples ocasiones y la puntuación de MMSE medida después de la administración es superior a una puntuación de MMSE previamente evaluada.
6. Un anticuerpo de la reivindicación 4, para el uso de la reivindicación 4, en el que la monitorización comprende realizar un barrido de IRM, y opcionalmente comprende además realizar una obtención de imágenes de la secuencia FLAIR (recuperación de inversión atenuada por líquido), o identificar al menos un síntoma clínico asociado a SEPR o edema vascular.
7. Un anticuerpo de la reivindicación 6, para el uso de la reivindicación 6, en el que la dosificación se reduce o suspende basándose en un resultado del barrido de IRM y/o de la obtención de imágenes de la secuencia FLAIR que es indicativa de SEPR o edema vascular, y basándose en una identificación de al menos un síntoma clínico asociado a SEPR o edema vascular.
8. Un anticuerpo de la reivindicación 7, para el uso de la reivindicación 7, en el que el barrido de IRM o la obtención de imágenes de la secuencia FLAIR es cada 3 meses, cada 6 meses, o cada año.
9. Un anticuerpo de la reivindicación 7, para el uso de la reivindicación 7, en el que la presencia o ausencia de hipertensión en el paciente se determina y en el que si el paciente tiene hipertensión, se administra un antihipertensor, opcionalmente en el que el antihipertensor está seleccionado del grupo que consiste en hidrocloreotiazida, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), bloqueantes de los receptores de angiotensina II (ARB), bloqueantes beta y bloqueantes de los canales de calcio.
10. Un anticuerpo de la reivindicación 7, para el uso de la reivindicación 7, en el que se administra un esteroide al paciente para tratar el SEPR o edema vascular, opcionalmente, en el que el esteroide es dexametasona o metilprednisolona.
11. Un anticuerpo de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, para el uso de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que el al menos un síntoma clínico está seleccionado del grupo que consiste en cefalea, náuseas, vómitos, confusión, convulsiones, anomalías visuales, funcionamiento mental alterado, ataxia, síntomas frontales, síntomas parietales, estupor y signos neurológicos focales.
12. Un anticuerpo de la reivindicación 3, para el uso de la reivindicación 3, en el que la monitorización indica presencia de SEPR o edema vascular en un primer momento de tiempo después de la administración, y ausencia de SEPR o edema vascular en un segundo momento de tiempo después del primer momento, y al paciente se administra una primera dosificación antes de que la monitorización indique presencia de SEPR o edema vascular, una segunda dosificación o ninguna dosificación después de que la monitorización detecte la presencia de SEPR o edema vascular, y una tercera dosificación después de que la monitorización detecte la ausencia de SEPR o edema vascular, en el que la primera y tercera dosificación son superiores a la segunda dosificación o en el que la primera y tercera dosificaciones son las mismas.

13. Un anticuerpo de la reivindicación 6, para el uso de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo se administra en una primera dosificación antes de que SEPR o edema vascular se determine del barrido de IRM y una segunda dosificación después de que SEPR o edema vascular se determine del barrido de IRM, y la segunda dosificación es entonces inferior a la primera dosificación.
- 5
14. Un anticuerpo de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se administra al paciente en una pauta suficiente para mantener una concentración en suero promedio del anticuerpo en el paciente en un intervalo de 1-15 μg de anticuerpo/ml de suero, preferentemente dentro de un intervalo de 1-10 μg de anticuerpo/ml de suero, 1-5 μg de anticuerpo/ml de suero o 2-4 μg de anticuerpo/ml de suero.
- 10
15. Un anticuerpo de la reivindicación 14, para el uso de la reivindicación 14, en el que la concentración en suero promedio del anticuerpo se mantiene durante al menos seis meses, opcionalmente durante al menos un año.
- 15
16. Un anticuerpo de la reivindicación 1(a), para el uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se administra a una dosis de 0,05-0,5 mg/kg o 0,05-0,25 mg/kg.
17. Un anticuerpo de la reivindicación 1(a), para el uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se administra a una dosis de 0,015-0,2 mg/kg semanalmente a bisemanalmente, a una dosis de 0,05-0,15 mg/kg semanalmente a bisemanalmente, a una dosis de 0,05-0,07 mg/kg semanalmente, a una dosis de 0,06 mg/kg semanalmente, a una dosis de 0,1 a 0,15 mg/kg bisemanalmente, a una dosis de 0,1 a 0,3 mg/kg mensualmente o a una dosis de 0,2 mg/kg mensualmente.
- 20
18. Un anticuerpo de la reivindicación 1(a), para el uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se administra subcutáneamente a un paciente que tiene la enfermedad a una dosis de 1-40 mg y una frecuencia de entre semanalmente y mensualmente.
- 25
19. Un anticuerpo de la reivindicación 18, para el uso de la reivindicación 18, en el que el anticuerpo se administra a una dosis de 1-12 mg semanalmente a bisemanalmente, 2,5-10 mg semanalmente a bisemanalmente, 2,5-5 mg semanalmente, 4-5 mg semanalmente o 7-10 mg bisemanalmente.
- 30
20. Un anticuerpo de la reivindicación 1(c), para el uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se administra a un paciente que tiene la enfermedad en una pauta suficiente para mantener una concentración en suero máxima del anticuerpo en el paciente dentro de un intervalo de aproximadamente 4-28 μg de anticuerpo/ml de suero o aproximadamente 4-18 μg de anticuerpo/ml de suero y la concentración en suero promedio del anticuerpo en el paciente es inferior a aproximadamente 7 μg de anticuerpo/ml de suero.
- 35
21. Un anticuerpo de la reivindicación 1(c), para el uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se administra a un paciente que tiene la enfermedad en una pauta suficiente para mantener una concentración en suero promedio del anticuerpo en el paciente inferior a aproximadamente 7 μg de anticuerpo/ml de suero, preferentemente en el que la concentración en suero promedio está dentro de un intervalo de aproximadamente 2-7 μg de anticuerpo/ml de suero o aproximadamente 5 μg de anticuerpo/ml de suero.
- 40
22. Un anticuerpo de la reivindicación 14, 20 ó 21, para el uso de aquellas reivindicaciones, en el que la concentración de anticuerpo en el suero se mide y la pauta se ajusta si la concentración medida queda fuera del intervalo.
- 45
23. Un anticuerpo de cualquier reivindicación precedente, para el uso de cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo humanizado comprende una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1 y una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, opcionalmente en el que el anticuerpo humanizado es bapineuzumab.
- 50

Figura 1 secuencia de aminoácidos de la cadena ligera y pesada de AAB-001 predicha

CADENA LIGERA

1 DVVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCKSSOSLL DSDGKTYL^{LNW} LLQKPGQSPQ
 51 RLIYL^{VSKLD} SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYC^{WQ}QTHFP
 101 R^TFGQGT^{KVE} IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASV^{VCL} LNNFY^PPREAK
 151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
 201 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

↳ Cadena pesada

CADENA PESADA

1 EVQLES^{GGG} LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYGMSWVRQA PGKGLEWVAS
 51 IRSGGRT^YY SDNVKGRFTI SRD^{NSKNTLY} LQMNSLRAED TAVY^{YCVRYD}
 101 H^{YSGSSDYWG} QGTLVTVSSA STKGPSVFP^L APSSKSTSGG TAALGCLVKD
 151 YFPEPVT^{SW} NSGALTS^{GVH} TFP^{AVLQSSG} L^{YSLSSVTV} P^{SSSLGTQTY}
 201 I^{CNVNHKPSN} TKVD^{KKVEPK} S^{CDKTHTCPP} C^{PAPELLGGP} SVFL^{FPPKPK}
 Cadena ligera ← → Cadena pesada
 251 DTLMISRTPE V^{TCVVVDVSH} EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
 301 TYRVVSVLTV LHQD^{WLNKKE} YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
 351 YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
 401 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNV^{FSCSVM} HEALHNHYTQ KSLSLSPG (K)

Cambio de MMSE promedio desde el nivel inicial

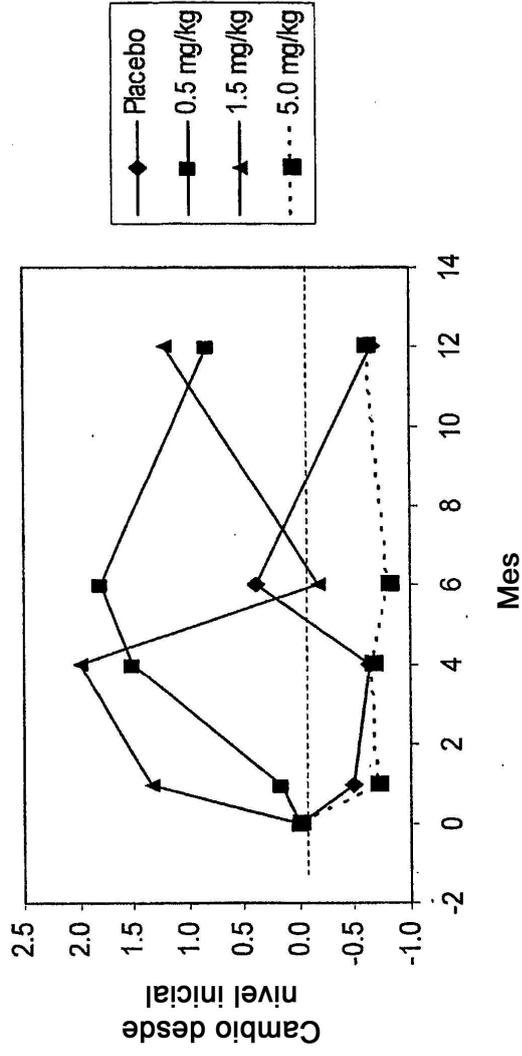


Fig. 2

Cambio de MMSE desde el nivel inicial por cohorte en el mes 4

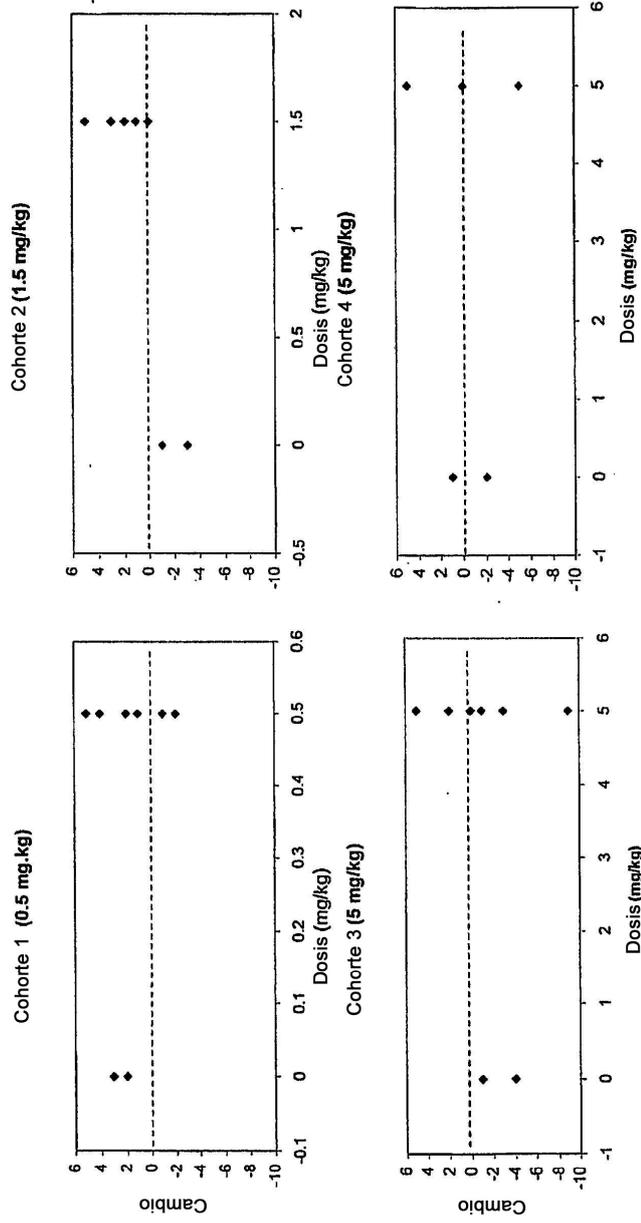


Fig. 3

Cambio de MMSE desde el nivel inicial en el mes cuatro

Dosis	n	Media	Mediana	SD
Placebo	8	-0.63	-1.0	2.446
0.5 mg/kg	6	1.50	1.5	2.739
1.5 mg/kg	6	2.00	1.5	1.789
5.0 mg/kg	9	-0.67	0.0	4.555

Fig. 4

Prueba estadística: Cambio de MMSE desde el nivel inicial en el mes cuatro

- Prueba específica con SAP primario:
Prueba de tendencia lineal: $p=0.3840$
- Pruebas adicionales:

Método	Placebo (n=8) vs. 0.5 mg/kg (n=6)	Placebo (n=8) vs. 1.5 mg/kg (n=6)	Placebo (n=8) vs. 0.5 + 1.5 mg/kg (n=12)
Sin ajustar ANCOVA	0.152	0.047	0.037
ANCOVA	0.199	0.018	0.0499
Ajustado para nivel inicial MMSE			
Prueba de Mann-Whitney (no paramétrica)	0.172	0.069	0.057

Fig. 5

FIGURA 6 concentraciones en suero en estado estacionario simuladas de anticuerpo de diversas pautas subcutáneas que suponen biodisponibilidad del 70 %.

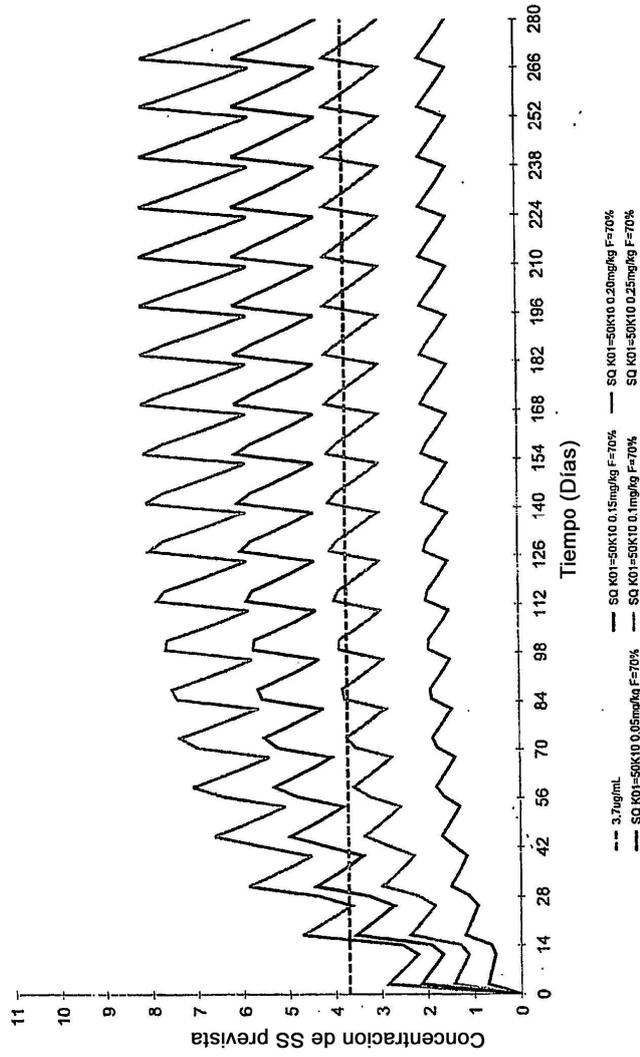


Figura 7 Concentraciones en estado estacionario de anticuerpo tras la administración subcutánea de AAB-001 a la dosis de 0,05 ó 0,06 mg/kg que supone el 70 % o el 100 % de biodisponibilidad

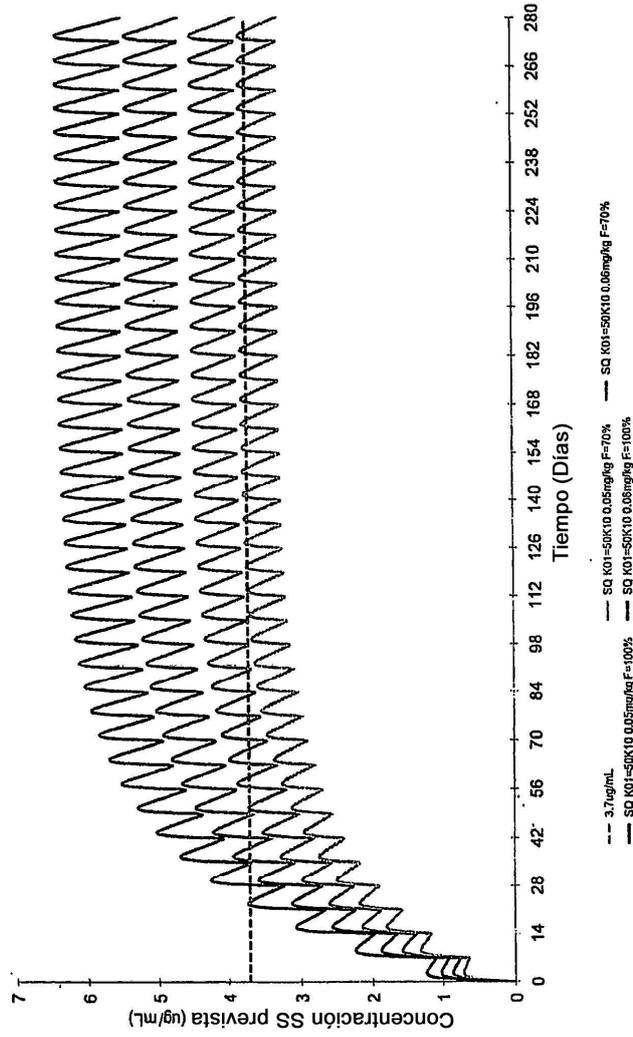


Figura 8 Prueba 201: Niveles de Aβ en Plasma (Efecto de PD)

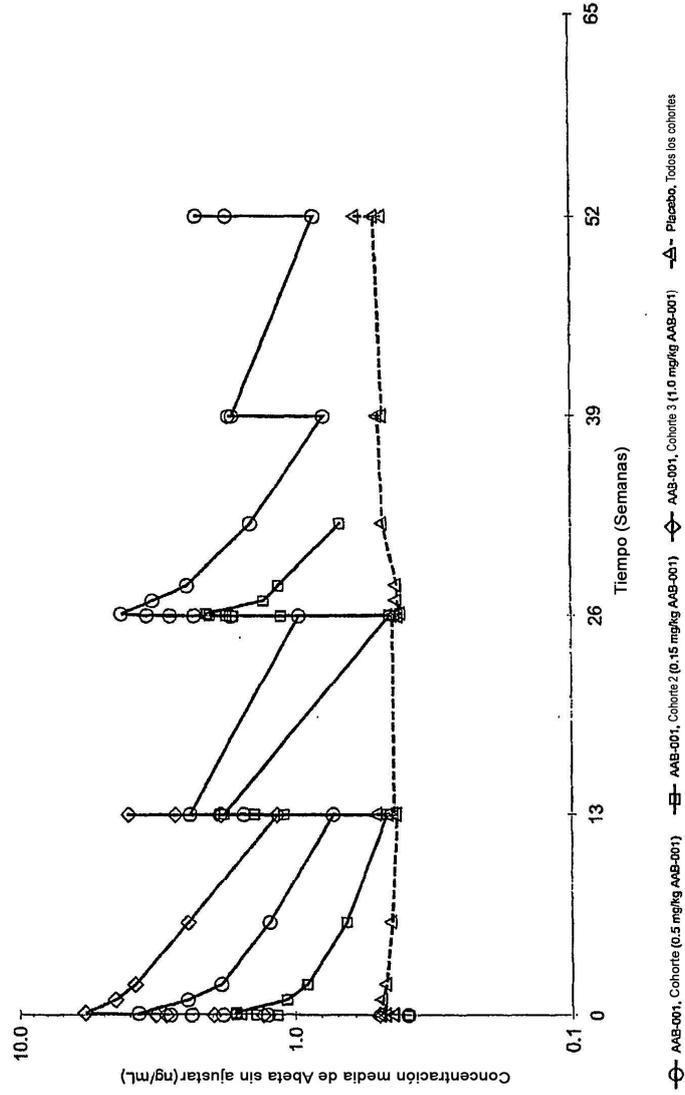


Figura 9
Prueba 201: Concentración media de suero AAB-001 vs. Tiempo tras la administración IV

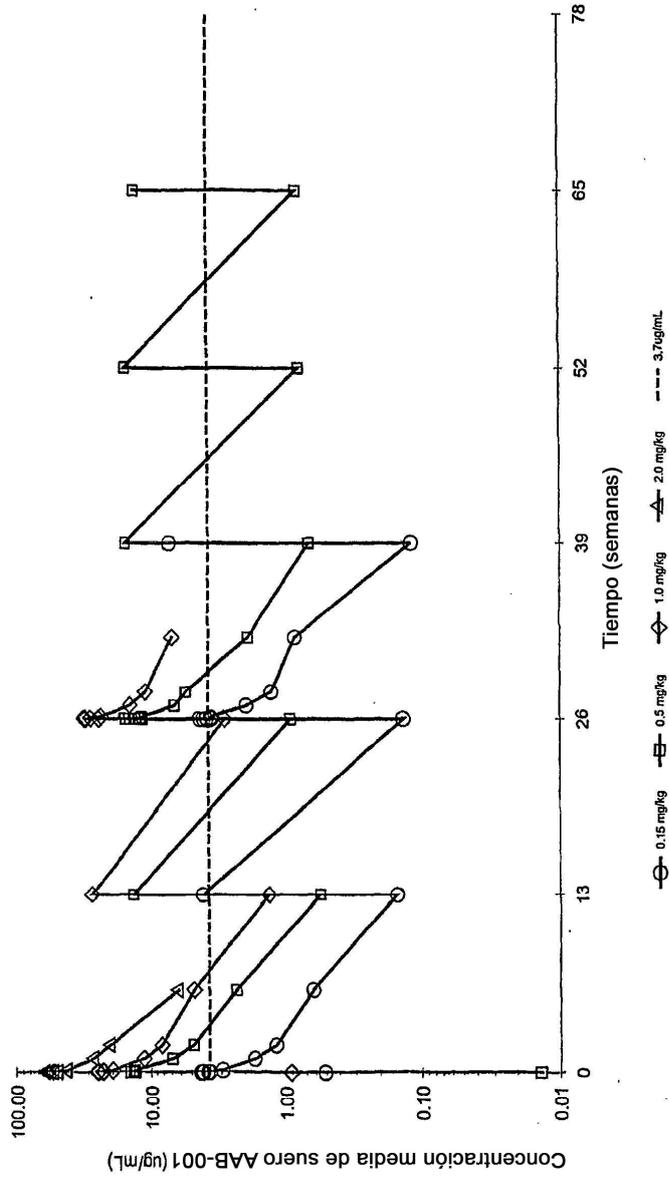


Figura 10

Prueba 201: IV AAB-001 Parametros PK

AAB-001		INFUSION #1									
Dosis	Parámetro	C _{max} (µg/mL)				t _{max} (h)	AUC _{inf} (µg·h/mL)	CL (mL/h/kg)	V _z (mL/kg)	t _{1/2} (dias)	
0.15 mg/kg (Cohorte 2)	n	6				6	6	6	6	6	
	Media (SD)	4.60 (0.61)				1.5 (median)	1897 (255)	0.06 (0.01)	56.49 (22.27)	26.65 (9.07)	
0.5 mg/kg (Cohorte 1)	n	6				6	6	6	6	6	
	Media (SD)	17.20 (5.34)				1.75 (median)	7578 (1717)	0.05 (0.01)	45.87 (8.44)	26.26 (7.07)	
1.0 mg/kg (Cohorte 3)	n	6				6	6	6	6	6	
	Media (SD)	28.04 (4.59)				1.99 (median)	14135 (4373)	0.06 (0.02)	58.13 (11.43)	28.50 (6.07)	
2.0 mg/kg (Cohorte 4)	n	3				3	NE	NE	NE	NE	
	Media (SD)	63.17 (11.28)				1.99 (median)					
AAB-001		INFUSION #3									
Dosis	Parámetro	C _{max} (µg/mL)	C _{avg} (µg/mL)	C _{min} (µg/mL)		t _{max} (h)	AUC _{0-∞} (µg·h/mL)	CL (mL/h/kg)	V _z (mL/kg)	t _{1/2} (dias)	
0.15 mg/kg (Cohorte 2)	n	6	6	6		6	6	6	6	6	
	Media (SD)	4.42 (0.93)	1.08 (0.24)	0.11 (0.04)		1.00 (median)	2364 (517)	0.05 (0.02)	34.65 (13.31)	21.13 (2.87)	
0.5 mg/kg (Cohorte 1)	n	4	4	4		4	4	4	4	4	
	Media (SD)	17.04 (5.09)	3.28 (1.26)	0.76 (0.52)		1.24 (median)	7164 (2755)	0.05 (0.02)	42.42 (13.67)	23.75 (8.81)	
1.0 mg/kg (Cohorte 3)	n	4	4	3		4	2	2	2	2	
	Media (SD)	32.13 (2.36)	5.65 (2.79)	2.82 (1.17)		1.73 (median)	16869 (5319)	0.05 (0.02)	50.40 (9.48)	34.01 (8.68)	

NE = No evaluable

Figura 11
Prueba 201: Niveles A β en plasma (Efecto PD)

