(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 529 174**

(51) Int. CI.:

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: **12.06.2008 E 08768371 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 2170389**

(54) Título: **Anticuerpos humanizados para amiloide beta**

(30) Prioridad:

12.06.2007 US 943509 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2015

(73) Titular/es:

AC IMMUNE S.A. (50.0%)
EPFL Innovation Park, Building B
1015 Lausanne, CH y
GENENTECH, INC. (50.0%)

(72) Inventor/es:

PFEIFER, ANDREA;
PIHLGREN, MARIA;
MUHS, ANDREAS y
WATTS, RYAN

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanizados para amiloide beta

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para la diagnosis y al uso de estas composiciones en métodos de tratamiento de amiloidosis, un grupo de trastornos y anormalidades asociadas con proteína amiloide tal como enfermedad de Alzheimer.

La amiloidosis no es una entidad de enfermedad individual sino más bien un grupo diverso de procesos progresivos de enfermedad caracterizados por depósitos extracelulares en tejido de una proteína cerosa, tipo almidón, llamada amiloide, que se acumula en uno o más órganos o sistemas corporales. Conforme se acumulan los depósitos amiloides, empiezan a interferir con la función normal del órgano o sistema corporal. Hay al menos 15 tipos diferentes de amiloidosis. Las formas principales son amiloidosis primaria sin antecedente conocido, amiloidosis secundaria después de alguna otra condición y amiloidosis hereditaria.

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

Los depósitos amiloides incluyen componte amiloide P (pentagonal) (AP), una glicoproteína relacionada con amiloide P de suero (SAP) normal, y glicosaminoglicanos sulfatados (GAG), carbohidratos complejos de tejido conjuntivo. Las fibrillas de proteína amiloide, que dan cuenta de aproximadamente 90% del material amiloide, comprenden uno de varios tipos diferentes de proteínas. Estas proteínas son capaces de plegarse en las llamadas fibrillas de hoja “beta-plegada”, una configuración única de proteína que exhibe sitios de unión para rojo Congo que da resultado las propiedades únicas de tinción de la proteína amiloide.

Muchas enfermedades del envejecimiento se basan en o están asociadas con proteínas tipo amiloide y se caracterizan, en parte, por la acumulación de depósitos extracelulares de material amiloide o tipo amiloide que contribuyen a la patogénesis así como al progreso de la enfermedad. Estas enfermedades incluyen trastornos neurológicos tal como Enfermedad de Alzheimer (AD), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Holandés); complejo Parkinson-Demencia de Guam. Otras enfermedades que se basan en o están asociadas con proteínas tipo amiloide son parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada a VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), Diabetes de Comienzo en Adultos; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluyendo degeneración macular.

Aunque la patogénesis de estas enfermedades puede ser diversa, sus depósitos característicos contienen frecuentemente muchos constituyentes moleculares compartidos. A un grado significativo, esto puede ser atribuible a la activación local de rutas pro-inflamatorias que conducen de este modo al depósito concurrente de componentes activados de complemento, reactivos de fase aguda, inmunomoduladores, y otros mediadores inflamatorios (McGeer y colaboradores, 1994).

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno neurológico que se piensa que está provocado principalmente por placas amiloides, una acumulación de depósito normal en proteínas en el cerebro. El tipo más frecuente de amiloide encontrado en el cerebro de individuos afectados se compone principalmente de fibrillas de Aβ. La evidencia científica demuestra que un incremento en la producción y acumulación de proteína beta-amiloide en las placas conduce a muerte de células nerviosas, lo que contribuye al desarrollo y progreso de la AD. La pérdida de células nerviosas en áreas cerebrales estratégicas, a su vez, provoca reducción en los neurotransmisores y deterioro de la memora. Las proteínas principalmente responsables de la acumulación de placas incluyen la proteína precursora amiloide (APP) y dos presenilinas (presenilina I y presenilina II). La escisión secuencial de la proteína precursora amiloide (APP), que se expresa y cataboliza constitutivamente en la mayoría de las células, por las enzimas β y γ secretasa conduce a la liberación del péptido de Aβ de 39 a 43 aminoácidos. La degradación de las APP incrementa igualmente su propensión a agregarse en placas. Es especialmente el fragmento Aβ (1-42) que tiene una alta propensión de acumulación de agregados debido a dos residuos de aminoácido muy hidrófobos en su C-término. El fragmento Aβ (1-42) se cree por lo tanto que está comprendido principalmente y es responsable del inicio de la formación de placas neuríticas en la AD y tiene, por lo tanto, un alto potencial patológico. Por lo tanto, existe la necesidad de agentes para la prevención de la formación de placas amiloides y para difundir las placas existentes en la AD.

Los síntomas de la AD se manifiestan lentamente y el primer síntoma sólo puede ser amnesia moderada.

En esta etapa, los individuos pueden olvidar eventos recientes, actividades recientes, los nombres de personas o cosas familiares y no pueden ser capaces de solucionar problemas matemáticos simples. Conforme progresa la enfermedad, son más fácilmente percibidos los síntomas y llegan a ser suficientemente serios para provocar que la persona con AD o los miembros de su familia busquen ayuda médica. Los síntomas de etapa intermedia de la AD incluyen olvido de cómo hacer tareas simples tal como aseo, y problemas de desarrollo con el habla, entendimiento, lectura o escritura. Los pacientes con AD de etapa tardía pueden llegar a estar ansiosos o agresivos, pueden apartarse del hogar y finalmente necesitan cuidado completo.

Actualmente, la única manera definitiva de diagnosticar AD es identificar las placas y enmarañamientos en el tejido cerebral en una autopsia después de la muerte del individuo. Por lo tanto, los doctores sólo pueden hacer una diagnosis de AD “posible” o “probable” en tanto que aún está viva la persona. Usando los métodos actuales, los facultativos pueden diagnosticar AD de forma correcta hasta en el 90 por ciento de las veces usando varias herramientas para diagnosticar AD “probable”. Los facultativos hacen preguntas acerca de la salud general de la persona, problemas médicos anteriores y la historia de cualquier dificultad que la persona tenga para llevar a cabo las actividades diarias. Las pruebas conductuales de memoria, solución de problema, tensión, contabilidad y lenguaje proporcionan información de la degeneración cognitiva y las pruebas médicas tal como las pruebas de sangre, orina, o fluido espinal, y exploraciones cerebrales proporcionan alguna información adicional.

El manejo de la AD consiste de tratamientos basados en medicamento y no basados en medicamento. Los tratamientos que tuvieron como finalidad cambiar el curso subyacente de la enfermedad (retraso o inversión del progreso) han sido hasta ahora en su mayor parte no exitosos. Las medicinas que restauran el déficit (defecto), o mal funcionamiento, en los mensajeros químicos de las células nerviosas (neurotransmisores), en particular los inhibidores de colinesterasa (ChEI) tal como tacrina y rivastigmina, se han mostrado que mejoran los síntomas. Los ChEI impiden la degradación enzimática de los neurotransmisores, incrementando de este modo la cantidad de mensajeros químicos disponibles para transmitir las señales de los nervios en el cerebro.

Para algunas personas en las etapas temprana e intermedia de la enfermedad, los fármacos tacrina (COGNEX®, Morris Plains, NJ), donepezil (ARICEPT®, Tokyo, JP), rivastigmina (EXELON®, East Hanover, NJ), o galantamina (REMINYL®, New Brunswick, NJ) pueden ayudar a prevenir algunos síntomas de que se empeoren durante un tiempo limitado. Otro fármaco, la memantina (NAMENDA®, Nueva York, NY), se ha aprobado para tratamiento de AD moderada a severa. También están disponibles medicamentos para afrontar las manifestaciones psiquiátricas de la AD. También, algunas mediciones pueden ayudar al controlar los síntomas conductuales del AD tal como insomnio, agitación, vagabundeo, ansiedad y depresión. El tratamiento de estos síntomas hace frecuentemente a los pacientes más confortables y hace su cuidado más fácil a los enfermeros. Desdichadamente, a pesar de los avances significativos en el tratamiento que muestra que esta clase de agentes es consistentemente mejor que un placebo, la enfermedad continúa progresando, y el efecto promedio en el funcionamiento mental sólo ha sido modesto. Muchos de los fármacos usados en el medicamento de AD tal como por ejemplo, los ChEI también tienen efectos secundarios que incluyen disfunción gastrointestinal, toxicidad hepática y pérdida de peso.

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

La degeneración macular es una enfermedad ocular común que provoca deterioro de la macula, que es el área central de la retina (el tejido tipo hoja delgada en la parte posterior del ojo donde las células sensibles a la luz envían señales visuales al cerebro). La visión aguda, clara, “directa” se procesa por la mácula. El daño de la mácula da por resultado el desarrollo de puntos de ceguera y visión borrosa o distorsionada. La degeneración macular relacionada a la edad (AMD) es una causa principal de deterioro visual en los Estados Unidos de América y para personas de más de 65 años es la causa principal de ceguera legal entre los caucásicos. Aproximadamente 1.8 millones de Americanos con edad de 40 años o mayores tienen AMD avanzada, y otros 7.3 millones de personas con AMD intermedia están en riesgo sustancial de pérdida de visión. El gobierno estima que en 2020 habrá 2.9 millones de personas con AMD avanzada. Las victimas de AMD frecuentemente se sorprenden y frustran en encontrar que tan poco se conoce acerca de las causas y tratamiento de esta condición segadora.

Hay dos formas de degeneración macular: degeneración macular seca y degeneración macular húmeda. La forma seca en la cual las células de la macula empiezan a descomponerse lentamente, se diagnostica en 85 por ciento en los casos de degeneración macular. Ambos ojos se afectan usualmente por AMD, aunque un ojo puede perder la visión en tanto que el otro ojo permanece sin afectar. Los gránulos, que son depósitos amarillos bajo la retina son signos tempranos comunes de la AMD seca. El riesgo de desarrollar AMD seca avanzada o AMD húmeda se incrementa conforme se incrementa el número o tamaño de los gránulos. Es posible que la AMD seca avance y provoque pérdida de visión sin volverse a

la forma húmeda de la enfermedad; sin embargo, también es posible que AMD seca de etapa temprana cambie súbitamente a la forma húmeda.

La forma húmeda, aunque sólo da cuenta del 15 por ciento de los casos, da por resultado 90 por ciento de la ceguera y se considera AMD avanzada (ni hay etapa temprana o intermedia de AMD húmeda). La AMD húmeda siempre se precede por la forma seca de la enfermedad. Conforme se empeora la forma seca, algunas personas empiezan a tener crecimiento normal de vasos sanguíneos detrás de la macula. Estos vasos son muy frágiles y fugarán fluido y sangre (por lo tanto la degeneración macular “húmeda”), que provoca daño rápido a la macula.

La forma seca de la AMD frecuentemente provocará de forma inicial visión ligeramente borrosa. Ejemplos de visión en particular entonces puede llegar a ser borroso y esta región crece más grande conforme progresa la enfermedad. No se perciben síntomas si sólo se afecta un ojo. En la ADM húmeda, las líneas rectas pueden parecer onduladas y puede presentarse de forma rápida la pérdida de visión central.

La diagnosis de la degeneración macular comprende típicamente un examen de ojo dilatado, prueba de agudeza visual, y una vista de la parte posterior del ojo usando un procedimiento llamado fundoscopía para ayudar a diagnosticar AMD, y si se sospecha de AMD húmeda, también se puede realizar la angiografía con fluoresceína. La ADM seca alcanza las etapas avanzadas, no hay tratamiento actual para impedir la pérdida de visión. Sin embargo, una fórmula específica de alta dosis de antioxidantes y zinc puede retrasar o prevenir la AMD intermedia de que progrese a la etapa avanzada. La Macugen^{MR} (inyección de pegaptanib sódico), la fotocoagulación con láser y la terapia fotodinámica pueden controlar el crecimiento normal de los vasos sanguíneos y el sangrado en la mácula, lo que es útil para algunas personas que tienen AMD húmeda; sin embargo, la visión que se perdió ya no se restaurará por estas técnicas. Si se pierde la visión, existen ayudas de baja visión que pueden ayudar a mejorar la calidad de vida.

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

La investigación actual continúa con estudios que exploran factores ambientales, genéticos y dietéticos que pueden contribuir a la AMD. También se están explorando nuevas estrategias de tratamiento, que incluyen trasplante de células retinales, fármacos que impedirán o desacelerarán el progreso de la enfermedad, terapia de radiación, terapias génicas, un chip de computadora implantada en la retina que puede ayudar a estimular la visión y agentes que impedirán el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos bajo la macula.

Un factor importante considerará cuando se desarrollan nuevos fármacos en la facilidad de uso para los pacientes objetivo. La distribución de fármacos orales, específicamente tabletas, cápsulas y geles blandos, da cuenta de 70% de todas las formas de dosis consumidas debido a la conveniencia por los pacientes. Los desarrolladores de fármacos están de acuerdo en que los pacientes prefieren distribución oral en lugar de someterse por sí mismo a inyecciones u otras formas más invasivas de administración medicinal. También son preferibles las formulaciones que dan por resultado intervalos de baja dosificación (es decir, una vez al día o liberación sostenida). La facilidad de administrar antibióticos en formas orales de dosis da por resultado un incremento del acatamiento del paciente durante el tratamiento.

Lo que se necesita son métodos y composiciones efectivas para prevenir o afrontar las complicaciones asociadas con la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas amiloides que incluyen amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada a la edad que incluyen, pero no se limita a, trastornos neurológicos tal como Enfermedad de Alzheimer (AD), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Holandés); complejo de Parkinson-Demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan en o están asociadas con proteínas tipo amiloide tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada a VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), Diabetes de Comienzo en Adulto; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, que incluyen degeneración macular. En particular lo que se necesita son agentes capaces de contrarrestar las manifestaciones fisiológicas en enfermedad, tal como la formación de placas asociadas con agregación de fibras de péptidos amiloides o tipo amiloide.

Se reportaron anticuerpos anti-amiloide producidos por la inoculación de Aβ_{1-42} mezclado con el adyuvante completo o incompleto de Freund, para reducir la carga amiloide en ratones transgénicos para enfermedad humana de Alzheimer (Schenk y colaboradores, 1999). La inoculación intraperitoneal de Aβ_{1-16} tetrapalmitoilado reconstituido en liposomas a ratones transgénicos NORBA produjo títulos significativos

de anticuerpos anti-amiloide, que se reportaron que solubilizan fibras amiloides y placas amiloides *in vitro* e *in vivo* (Nicolau y colaboradores, 2002).

Un posible mecanismo por el cual se presentó la disolución de placas y fibras amiloides fue sugerido primero por Bard y colaboradores, (2000), quienes concluyeron que los anticuerpos opsonizan las placas, que se destruyeron de manera subsiguiente por los macrófagos de la microglia. De Mattos y colaboradores, (2001) indicaron que un mAb dirigido contra el dominio central del β-amiloide fue capaz de unirse y secuestrar completamente el amiloide plasmático. Argumentaron que la presencia de estos mAb en la circulación cambió el equilibrio del Aβ entre el cerebro y el plasma, favoreciendo la depuración periférica y el catabolismo en lugar del depósito dentro del cerebro.

La terapia humana prolongada con anticuerpos de roedor puede dar por resultado una respuesta anti-globulina que es detectable a aproximadamente 8-12 días después de la administración y alcanza un pico a aproximadamente 20-30. Si se encuentra esta respuesta anti-globulina el tratamiento se debe descontinuar después de no más de aproximadamente 10 días y usualmente se impide el re-tratamiento en una fecha posterior debido a que conducirá a comienzo rápido de una respuesta secundaria anti-globulina. Aunque los anticuerpos de roedor comparten un grado considerable de conservación de secuencia con aquella de los anticuerpos humanos, hay muchas diferencias de secuencia entre los anticuerpos de roedor y de humano, suficientes para que los anticuerpos de roedor sean inmungénicos a los humanos.

Este problema se puede llegar a superar al generar anticuerpos directamente en humanos o por la creación de “humanizados” (también conocidos como anticuerpos “reformados”). Los anticuerpos humanizados tienen una secuencia de aminoácidos de región variable que contiene las CDR derivadas de ratón intercaladas en las secuencias de regiones menos variables de humano o tipo humano. Puesto que se proporciona la especificidad del anticuerpo humanizado por las CDR derivadas de roedor, sus residuos se van a usar esencialmente sin cambio con sólo pocas modificaciones que son permisibles, que no interfieren de manera significativa con la afinidad y especificidad del anticuerpo para su antígeno objetivo. Los residuos de las regiones menos variables se pueden derivar de cualquier primate, o de manera particular, de cualquier región variable humana o pueden ser una combinación de las mismas y la región variable designada, resultante se considerará re-formada.

Para aumentar al máximo la probabilidad que se retendrá la afinidad en el anticuerpo reformado, es importante hacer una selección apropiada de la región menos variable. Se conoce que las secuencias de las regiones menos variables sirven para retener las CDR en su orientación espacial correcta para interacción con el antígeno, y que los residuos de las regiones menos variables pueden algunas veces participar aún en la unión al antígeno. A fin de mantener la afinidad del anticuerpo para su antígeno, es ventajoso seleccionar secuencias de regiones menos variables de humano que son más similares a las secuencias de las regiones menos variables de roedor. Entonces puede aún se necesario reemplazar uno o más aminoácidos en la secuencia de regiones menos variables de humano con el correspondiente residuo en la región menor variable de roedor para evitar pérdidas con la afinidad. Este reemplazo puede ser asistido por modelado con computadora.

La presente invención proporciona nuevos métodos y composiciones que comprenden anticuerpos altamente específicos y altamente efectivos, particularmente anticuerpos híbridos, incluyendo fragmentos de los mismos, de manera más particular anticuerpos parcial o completamente humanizados, incluyendo fragmentos de los mismos, que tienen la capacidad para reconocer y unirse de manera específica a epítopos específicos de una variedad de antígenos de β-amiloide, que pueden presentar al anticuerpo en una forma monomérica, dimérica, trimérica, etc., una forma polimérica en la forma de un agregado, fibras, filamentos o en la forma condensada de una placa. Los anticuerpos habilitados por la enseñanza de la presente invención son particularmente útiles para el tratamiento de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placas amiloides que incluyen amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada a la edad, que incluye, pero no se limita a, trastornos neurológicos tal como Enfermedad de Alzheimer (AD), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Holandés); complejo de Parkinson-Demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan en o están asociadas con proteínas tipo amiloide tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld-Jacob, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis tipo Holandés, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada a VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), Diabetes de Comienzo en Adultos; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluyendo degeneración macular, por nombrar unos pocos.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, capaz de unirse específicamente a beta amiloide, en donde el anticuerpo humanizado o el fragmento del mismo comprende una región variable de la cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una región variable de la cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y en donde el anticuerpo humanizado o el fragmento del mismo comprende la variante D265A de la región Fc de IgG1.

La presente invención se refiere, además, a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo humanizado de la invención o el fragmento del mismo.

La presente invención se refiere, además, a un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo humanizado de la invención o el fragmento del mismo.

La presente invención se refiere, además, a una célula que comprende un vector de expresión de la invención.

La presente invención se refiere, además, a una composición que comprende el anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en una cantidad terapéuticamente eficaz y que comprende además, opcionalmente, un soporte farmacéuticamente aceptable.

La presente invención se refiere, además, a una composición que comprende el anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo y, opcionalmente, que comprende, además, una sustancia biológicamente activa adicional en una cantidad terapéuticamente eficaz y/o un soporte y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde la sustancia biológicamente activa adicional se selecciona de un agente terapéutico utilizado en el tratamiento de amiloidosis provocada por amiloide beta, compuestos contra estrés oxidativo, compuestos anti-apoptóticos, queladores metálicos, inhibidores de la reparación del ADN tal como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de α-secretasa, inhibidores de β- y γ-secretasa, proteínas tau, neurotransmisores, interruptores de la lámina β, atrayentes de componentes celulares de depuración/agotamiento de amiloide-β, inhibidores de amiloide-beta N-terminal truncado incluyendo amiloide beta 3-42 piroglutamado, moléculas anti-inflamatorias, inhibidores de colinesterasa (ChEI) tales como tacrina, rivastigmina, donepezil y/o galantamina, agonistas de M1, fármacos modificadores de amiloide o tau y complementos nutritivos.

La presente invención se refiere, además, a un anticuerpo humanizado de la invención o un fragmento del mismo en una cantidad terapéuticamente eficaz, para uso en un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de una o más enfermedades relacionadas con la amiloidosis, seleccionadas de amiloidosis, trastornos neurológicos tal como Enfermedad de Alzheimer (AD), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Holandés); complejo de Parkinson-Demencia de Guam; parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), Diabetes de Comienzo en Adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endócrinos, degradación de neuronas inducida por Aβ o afección asociada a amiloide caracterizada por una pérdida de capacidad de memoria cognitiva y degeneración macular en un sujeto que los necesita.

La presente invención se refiere, además, a un método de diagnosis de una enfermedad o afección asociada a amiloides, que comprende:

(a) poner en contacto una muestra de tejido de un sujeto sospechoso de contener la proteína amiloide, con el anticuerpo humanizado de la invención o el fragmento del mismo, anticuerpo que es une con un epítopo de la proteína amiloide;

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

(c) detectar la formación del complejo inmunológico; y

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

La presente invención se refiere, además, a un método para determinar el grado de carga de placas amiloidogénicas en una muestra de tejido y/o fluidos corporales de un sujeto, que comprende

(a) someter a ensayo dicha muestra en cuanto a la presencia de proteína amiloide con el anticuerpo humanizado de la invención o el fragmento del mismo;

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

(c) calcular la carga de placas en el tejido y/o fluidos corporales del sujeto.

La presente invención se refiere, además, un kit de prueba para la detección y diagnosis de enfermedades y afecciones asociadas a amiloides que comprenden el anticuerpo humanizado de la invención o el fragmento del mismo y, opcionalmente, que comprende, además, instrucciones para utilizar los anticuerpos con el fin de unirlos a proteína amiloide para formar un complejo inmunológico y detectar la formación del complejo inmunológico de modo que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de proteína amiloide.

Se describe en esta invención un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une al menos un a sitio distinto de unión, particularmente al menos a dos sitios distintos de unión, de manera más particular al menos a tres sitios distintos de unión en la proteína β-amiloide donde, uno, al menos a dos y al menos a tres sitios de unión comprenden cada uno al menos uno o dos residuos consecutivos de aminoácido predominantemente comprendidos en la unión del anticuerpo.

En particular, el anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o el anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo a la invención se une a al menos dos, particularmente a al menos tres sitios distintos de unión en la proteína β-amiloide en donde al menos dos de los tres sitios distintos de unión comprenden al menos dos residuos consecutivos de aminoácido comprendidos predominantemente en la unión del anticuerpo y al menos uno de los tres sitios distintos de unión comprende al menos un residuo de aminoácido.

Los por lo menos dos sitios distintos de unión que comprenden al menos dos residuos consecutivos de aminoácido comprendidos predominantemente en la unión del anticuerpo están localizados en proximidad cercana entre sí en el antígeno, separados y/o flanqueados por al menos un residuo de aminoácido no comprendido en la unión al anticuerpo o a un grado significativamente más pequeño en comparación a al menos dos residuos consecutivos de aminoácido, que forman de esta manera un epítopo discontinuo conformacional.

Los por lo menos tres sitios distintos de unión que comprenden al menos dos residuos consecutivos de aminoácidos y al menos un residuo de aminoácido, respectivamente, que están comprendidos predominantemente en la unión del anticuerpo se localizan en proximidad cercana entre sí en el epítopo, separados y/o flanqueados por al menos un residuo de aminoácidos no comprendido en la unión del anticuerpo o a un grado significativamente menor en comparación a los residuos de aminoácido, que están comprendidos predominantemente en la unión del anticuerpo, formando de esta manera un epítopo discontinuo conformacional.

En particular, se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos un sitio distinto de unión, particularmente al menos dos sitios de unión, de manera más particular al menos tres sitios distintos de unión en la proteína β-amiloide en donde al menos uno o al menos dos sitios distintos de unión comprenden cada uno al menos dos residuos consecutivos de aminoácido comprendidos predominantemente en la unión de anticuerpo en donde los por lo menos dos residuos consecutivos de aminoácido que representan un primer sitio de unión son -Phe-Phe incrustados dentro de la siguiente secuencia núcleo (SEQ ID NO: 9):

Xaa_3 - Phe - Phe - Xaa_4 - Xaa_5 - Xaa_6, en donde

Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;

Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, Ser e Ile;

Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp,

Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp, y en donde los residuos de aminoácido Xaa_3 Xaa_4, Xaa_5 y Xaa_6 no están comprendidos en la unión del anticuerpo o a un grado significativamente menor en comparación al sitio de unión de -Phe-Phe-.

Se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde

Xaa_3 es Val o Leu, pero particularmente Val;

Xaa_4 es Ala o Val, pero particularmente Ala;

Xaa_5 es Glu o Asp, pero particularmente Glu;

Xaa_6 es Glu o Asp, pero particularmente Asp.

En particular, se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconocer y se une al menos un sitio distinto de unión, particularmente al menos dos sitios distintos de unión, de manera más particular a al menos tres sitios distintos de unión en la proteína β-amiloide en donde los sitios distintos de unión comprenden al menos

uno y al menos dos residuos consecutivos de aminoácido, respectivamente, comprendidos predominantemente en la unión del anticuerpo, en donde los por lo menos dos residuos consecutivos de aminoácido que representan un primer sitio de unión son -Phe-Phe- y el por lo menos un residuo de aminoácido es -His- incrustado dentro de la secuencia núcleo:

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

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

Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Asn y Gln

Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de His, Asn, Gln, Lys y Arg

Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, Ser Y Ile;

Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile

Xaa_7 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu e Ile

Xaa_8 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de GLu y Asp,

Xaa_9 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp, y en donde los residuos de aminoácido Xaa_1, Xaa_3, Xaa_6, Xaa_7, Xaa_8 y Xaa_9 no están comprendidos en la unión del anticuerpo o a un grado más pequeño o significativamente más pequeño en comparación al -His- y al sitio de unión de -Phe-Phe-, respectivamente.

Alternativamente, se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde

Xaa_3 es Gln o Asn, pero particularmente Gln;

Xaa_4 es Lys

Xaa_5 es Leu

Xaa_6 es Val o Leu, pero particularmente Val;

Xaa_7 es Ala o Val, pero particularmente Ala;

Xaa_8 es Glu o Asp, pero particularmente Glu; y

Xaa_9 es Asp o Glu, pero particularmente Asp.

Alternativamente, se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos un sitio distinto de unión, particularmente a al menos dos sitios distintos de unión, de manera más particular a al menos tres sitios distintos de unión en la proteína β-amiloide, en donde el al menos uno o los al menos dos sitios distintos de unión comprenden cada uno al menos dos residuos consecutivos de aminoácido comprendidos predominantemente en la unión del anticuerpo, en donde los al menos dos residuos consecutivos de aminoácido que representan un segundo sitio de unión son -Lys-Leu- incrustados dentro de la siguiente secuencia núcleo (SEQ ID NO: 10):

Xaa_1 - Xaa_2 - Lys - Leu - Xaa_3, en donde

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

Xaa_2 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Asn y Gln;

Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile; y en donde los residuos de aminoácido Xaa2, Xaa3, no están comprendidos en la unión del anticuerpo o a un grado más pequeño o significativamente más pequeño en comparación con el sitio de unión de -Lys-Leu-.

Alternativamente, se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos un sitio distinto de unión, particularmente a al menos dos sitios distintos de unión, de manera más particular a al menos tres sitios distintos de unión en la proteína β-amiloide en donde los sitios distintos de unión comprenden al menos uno y al menos dos residuos consecutivos de aminoácido, respectivamente, comprendidos predominantemente en la unión del anticuerpo, en donde el al menos uno y los al menos dos aminoácidos consecutivos, que están separados por al menos un residuo de aminoácido no comprendido en la unión del anticuerpo o a un grado significativamente más pequeño en comparación a los residuos de aminoácido comprendidos predominantemente en la unión del anticuerpo, son -His- y -Lys-Leu-, respectivamente, incrustados dentro de la siguiente secuencia núcleo:

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

Xaa_2 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Asn y Gln;

Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;

Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;

Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;

Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, Ser e Ile;

Xaa_7 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp,

Xaa_8 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp, y en donde los residuos de aminoácido Xaa_2, Xaa_3, Xaa_6, Xaa_7, Xaa_8, no están comprendidos en la unión del anticuerpo o a un grado más pequeño a significativamente más pequeño en comparación a -His- y el sitio de unión de -Lys-Leu-, respectivamente.

Alternativamente, se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde

Xaa_2 es Gln o Asn, pero particularmente Gln;

Xaa_3 es Val o Leu, pero particularmente Val;

Xaa_4 es Phe;

Xaa_5 es Phe;

Xaa_6 es Ala o Val, pero particularmente Ala;

Xaa_7 es Glu o Asp, pero particularmente Glu; y

Xaa_8 es Asp o Glu, pero particularmente Asp.

Alternativamente, se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos dos sitios distintos de unión en la proteína β-amiloide en donde los al menos dos sitios distintos de unión comprenden cada uno al menos dos residuos consecutivos de aminoácido comprendidos predominantemente en la unión del anticuerpo, en donde los al menos dos aminoácidos consecutivos están separados por al menos un residuo de aminoácido no comprendido en la unión del anticuerpo o a un grado significativamente más pequeño que los residuos consecutivos de aminoácido, que son -Phe-Phe- y -Lys-Leu-, respectivamente, que representan un primero y un segundo sitio de unión incrustado dentro de la siguiente secuencia núcleo:

Xaa_1-Xaa_2-Lys-Leu-Xaa_3-Phe-Phe-Xaa_4-Xaa_5-Xaa_6, en donde

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

Xaa_2 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Asn y Gln;

Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;

Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, Ser, e Ile;

Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp,

Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp, y en donde los residuos de aminoácido Xaa_2, Xaa_3, Xaa_4, Xaa_5, y Xaa_6, no están comprendidos en la unión del anticuerpo o a un grado más pequeño a significativamente más pequeño al sitio de unión de -Lys-Leu- y -Phe-Phe-, respectivamente.

Alternativamente, se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos un sitio distinto de unión, particularmente a al menos dos sitios distintos de unión, de manera más particular a al menos tres sitios distintos de unión en la proteína β-amiloide en donde los sitios distintos de unión comprenden al menos uno y al menos dos residuos consecutivos de aminoácido, respectivamente, comprendidos predominantemente en la unión del anticuerpo, en donde el al menos uno y los al menos dos aminoácidos consecutivos están separados por al menos un residuo de aminoácido no comprendido en la unión del anticuerpo o a un grado significativamente más pequeño en comparación a los residuos de aminoácido, que están predominantemente comprendidos en la unión del anticuerpo, y en donde los residuos de aminoácido son -His- y -Phe-Phe- y -Lys-Leu-, respectivamente, incrustados dentro de la siguiente secuencia núcleo:

His-Xaa_2-Lys-Leu-Xaa_3-Phe-Phe-Xaa_4-Xaa_5-Xaa_6, en donde

Xaa_2 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Asn y Gln;

Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;

Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, Ser, e Ile;

Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp,

Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp, y en donde los residuos de aminoácido Xaa_2, Xaa_3, Xaa_4, Xaa_5, Xaa_6, no están comprendidos en la unión del anticuerpo o a un grado más pequeño a significativamente más pequeño en comparación al sitio de unión de -His-, -Lys-Leu- y -Phe-Phe-, respectivamente.

Alternativamente, se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde

Xaa_2 es Gln o Asn, pero particularmente Gln;
Xaa_3 es Val o Leu, pero particularmente Val;
Xaa_4 es Ala o Val, pero particularmente Ala;
Xaa_5 es Glu o Asp, pero particularmente Glu; y
Xaa_6 es Asp o Glu, pero particularmente Asp.

Alternativamente, se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos dos sitios distintos de unión en la proteína β-amiloide en donde los al menos dos sitios distintos de unión comprenden cada uno al menos dos residuos consecutivos de aminoácido comprendidos predominantemente en la unión del anticuerpo, en donde los al menos dos aminoácidos consecutivos están separados por al menos un residuo de aminoácido no comprendido en la unión del anticuerpo o a un grado significativamente más pequeño que los residuos consecutivos de aminoácido, que son, -Phe-Phe- y -Lys-Leu-, respectivamente, que representan un primero y un segundo sitio de unión incrustado dentro de la siguiente secuencia núcleo:
Xaa_1-Xaa_2-Lys-Leu-Xaa_3-Phe-Phe-Xaa_4-Xaa_5-Xaa_6, en donde
Xaa_1 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de His, Asn, Gln, Lys y Arg;
Xaa_2 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Asn y Gln;
Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Val, Ala, Leu, Met, Phe, norleucina, e Ile;
Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, e Ile;
Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp,
Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp, y en donde los residuos de aminoácido Xaa_2, Xaa_3, Xaa_4, Xaa_5, Xaa_6, no están comprendidos en la unión del anticuerpo o a un grado más pequeño a significativamente más pequeño en comparación al sitio de unión de -Lys-Leu- y -Phe-Phe-, respectivamente.

Alternativamente, se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde
Xaa_1 es His o Arg, pero particularmente His;
Xaa_2 es Gln o Asn, pero particularmente Gln;
Xaa_3 es Val o Leu, pero particularmente Val;
Xaa_4 es Ala o Val, pero particularmente Ala;
Xaa_5 es Glu o Asp, pero particularmente Glu; y
Xaa_6 es Asp o Glu, pero particularmente Asp.

Alternativamente, se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que reconoce y se une a al menos dos sitios distintos de unión en la proteína β-amiloide en donde los al menos dos sitios distintos de unión comprenden cada uno al menos dos residuos consecutivos de aminoácido comprendidos predominantemente en la unión del anticuerpo, que son -Phe-Phe-Ala-Glu-, particularmente -Phe-Phe-Ala-, pero especialmente -Phe-Phe- y Lys-Leu-, respectivamente, y en donde los al menos dos sitios distintos de unión exhiben la secuencia de aminoácidos -Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp- mostrada en SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácido His-Gln-Lys-Leu-Val- mostrada en SEQ ID NO: 8, respectivamente.

Alternativamente, se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos un sitio distinto de unión, particularmente a al menos dos sitios distintos de unión, de manera más particular a al menos tres sitios distintos de unión en la proteína β-amiloide en donde el al menos uno o los al menos dos sitios distintos de unión comprenden al menos dos residuos consecutivos de aminoácido, respectivamente, comprendidos predominantemente en la unión del anticuerpo, que son -Phe-Phe- y -Lys-Leu-, y -His-, respectivamente, en donde los sitios distintos de unión están incrustados en la secuencia de aminoácidos -Val-Phe-Phe-Ala-Glu-, y la secuencia de aminoácidos -His-Gln-Lys-Leu-Val-, respectivamente.

Alternativamente, se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo comprende un sitio de reconocimiento y unión al antígeno que reconoce y se une a al menos dos sitios distintos de unión en la proteína β-amiloide en donde los al menos dos sitios distintos de unión comprenden cada uno al menos dos residuos consecutivos de aminoácido dentro de la secuencia de aminoácidos dada en SEQ ID NO: 7 y 8, respectivamente, en donde los residuos consecutivos de aminoácido, particularmente -Phe-Phe- y -Lys-Leu, están comprendidos predominantemente en la unión de la proteína β-amiloide.

Específicamente, los sitios de reconocimiento y de unión como se definen en la presente anteriormente están formando un epítopo discontinuo conformacional localizado en la región de la proteína β-amiloide entre los residuos 12 a 24 de aminoácido, particularmente entre los residuos 14 a 23, de manera más

particular entre los residuos 14 y 20 de aminoácido, en donde los al menos dos sitios distintos de reconocimiento y unión que comprenden cada uno al menos 2 residuos de aminoácido, están localizados en la posición 16 y 17 y en la posición 19 y 20, respectivamente, y en donde el al menos un sitio distinto de reconocimiento y unión que comprende al menos un residuo de aminoácidos está localizado en la posición 14, residuos que están comprendidos predominantemente en la unión de la proteína β-amiloide y en donde los sitios distintos de reconocimiento y unión están al menos flanqueados en un lado por residuos de aminoácido, particularmente los residuos 21 y 22, y separados por un residuo de aminoácido localizado en la posición 15 y 18, residuos de aminoácido que no están comprendidos directamente en la unión del antígeno o, al menos, a un grado sustancialmente más pequeño.

Alternativamente, dichos al menos tres sitios distintos de reconocimiento y unión están flanqueados en ambos lados por residuos de aminoácido, particularmente los residuos 12 y 13, y los residuos 21 y 22 y están separados por un residuo de aminoácido localizado en la posición 15 y 18, residuos de aminoácido que no están comprendidos directamente en la unión del antígeno, o al menos, a un grado sustancialmente más pequeño.

Específicamente, dichos residuos consecutivos de aminoácido, particularmente -Lys-Leu- en la posición 16 y 17 y -Phe-Phe- en la posición 19 y 20, que están comprendidos predominantemente en la unión de la proteína β-amiloide, están incrustados en la siguiente región núcleo:

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

Según se describe en esta memoria, dichos residuos de aminoácido, particularmente -Lys-Leu- en la posición 16 y 17 y -Phe-Phe- en la posición 19 y 20, y -His- en la posición 14, que están comprendidos predominantemente en la unión de la proteína β-amiloide, están incrustados en la siguiente región núcleo:

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

Se describen en esta memoria un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende en la región variable de cadena ligera y de cadena pesada, respectivamente, al menos una CDR de origen no humano, particularmente dos CDR de origen no humano, de manera más particular tres CDR de origen no humano, incrustadas en una o más regiones variables derivadas de humano o primate, y opcionalmente, una región constante derivada de un anticuerpo fuente de primate o humano, anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que es capaz de reconocer y unirse de manera específica a la proteína β-amiloide, particularmente un péptido monomérico β-amiloide, de manera más particular un péptido polimérico β-amiloide, de manera aún más particular fibras, fibrillas o filamentos β-amiloide en aislamiento o como parte de una placa β-amiloide, en un epítopo que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 11):

Xaa_1-Xaa_2-Lys-Leu-Xaa_3-Phe-Phe-Xaa_4-Xaa_5-Xaa_6, en donde

Xaa_1 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de His, Asn, Gln, pero particularmente His;

Xaa_2 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Asn y Gln, pero particularmente Gln; y

Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Val, Leu, e Ile, pero particularmente Val;

Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, y Val, pero particularmente Ala;

Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp, pero particularmente Glu;

Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp, pero particularmente Asp.

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende en la región variable de cadena ligera y cadena pesada, respectivamente, al menos una CDR de origen no humano, particularmente dos CDR de origen no humano, de manera más particular tres CDR de origen no humano, incrustadas en una o más regiones menos variables derivadas de humano o primate, y opcionalmente, una región constante derivada de un anticuerpo fuente de humano o primate, anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que es capaz de reconocer y unirse de manera específica a la proteína β-amiloide, particularmente un péptido monomérico β-amiloide, de manera más particular un péptido polimérico β-amiloide, de manera aún más particular fibras, fibrillas o filamentos β-amiloide en aislamiento o como parte de placa β-amiloide, en un epítopo que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

His-Xaa_2-Lys-Leu-Xaa_3-Phe-Phe-Xaa_4-Xaa_5-Xaa_6, en donde

Xaa_2 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Asn y Gln, pero particularmente Gln; y

Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Val, Leu, e

Ile, pero particularmente Val;

Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, y Val, pero particularmente Ala;

Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp, pero particularmente Glu;

Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp, pero particularmente Glu; y en donde los residuos de aminoácido Xaa_2, Xaa_3, Xaa_4, Xaa_5, Xaa_6, no están comprendidos en la unión del anticuerpo o a un grado más pequeño en comparación al sitio de unión de -His- y -Lys-Leu- y -Phe-Phe-.

Específicamente se describe en esta memoria que la CDR de origen no humano se obtiene de un anticuerpo donador, pero particularmente de un anticuerpo donador murino, formulado contra un fragmento de antígeno que no contiene el sitio distinto de unión. Este cambio en la región epitópica puede haber sido provocado al menos parcialmente por el uso de una construcción antigénica supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del péptido β-amiloide, particularmente del péptido β-amiloide $A\beta_{1-16}$, modificado con una porción hidrófila tal como por ejemplo, polietilenglicol (PEG), en donde la porción hidrófila está unida covalentemente a cada uno de los términos del péptido antigénico a través de al menos uno, particularmente uno o dos aminoácidos tal como por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisteína o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado capaz de servir como un dispositivo de conexión para acoplar la porción hidrófila al fragmento peptídico, como se describe más adelante en la presente en el proceso de inmunización. Cuando se usa un PEG como la porción hidrófila, los términos de PEG libres se unen covalentemente a fosfatidiletanolamina o cualquier otro compuesto de acuerdo para funcionar como el elemento de anclaje, por ejemplo, para incrustar la construcción antigénica en la bi-capa de un liposoma como se describe en la presente.

En particular, la CDR de origen no humano se obtiene de un anticuerpo donador murino que exhibe las propiedades características de ACI-01-Ab7C2 (también llamado “mC2” a todo lo largo de la solicitud) depositado el 1 de Diciembre de 2005 con la “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, bajo las provisiones del Tratado de Budapest bajo el número de acceso DSM ACC2750).

Tal como se describe en esta memoria, la CDR de origen no humano se obtiene del anticuerpo donador murino ACI-01-Ab7C2 (también llamado “mC2” a todo lo largo de la solicitud) depositado el 1 de diciembre de 2005 con la “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, bajo las provisiones del Tratado de Budapest bajo el número de acceso DSM ACC2750).

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

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende integrado en regiones de marco derivadas de humano o primate, al menos un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consisten en SEQ ID NO: 2 que representa CDR2 y SEQ ID NO: 3 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) y SEQ ID NO: 4 que representa CDR1 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR).

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde dicho anticuerpo humanizado comprende integrado en regiones de marco de cadena pesada derivadas de humano o primate, al menos un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consisten en SEQ ID NO: 2 que representa CDR2 y SEQ ID NO: 3 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

Todavía en otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde dicho anticuerpo humanizado comprende integrado en regiones de marco de cadena ligera derivadas de humano o primate, un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 que representa CDR1 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR).

Particularmente, se describe en esta memoria una Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) que comprende integrado en regiones de marco derivadas de humano o primate, al menos un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 que representa CDR1 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR).

También se describe en esta memoria una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) que comprende integrado en regiones de marco derivadas de humano o primate, al menos un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consisten en SEQ ID NO: 2 que representa

CDR2 y SEQ ID NO: 3 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende integrados en regiones de marco derivadas de humano o primate, al menos dos péptidos, péptidos que son diferentes y exhiben una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consisten en SEQ ID NO: 1 que representa CDR1, SEQ ID NO: 2 que representa CDR2 y SEQ ID NO: 3 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) y SEQ ID NO: 4 que representa CDR1, SEQ ID NO: 5 que representa CDR2 y SEQ ID NO: 6 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) en donde la misma CDR no puede presentarse dos veces en el anticuerpo. En particular, si al menos dos CDR presentes son ambas CDR de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR), al menos una de dichas CDR debe ser CDR1 representada por SEQ ID NO: 4.

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende integrados en regiones de marco de cadena pesada derivadas de humano o primate, al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consisten en SEQ ID NO: 1 que representa CDR1, SEQ ID NO: 2 que representa CDR2 y SEQ ID NO: 3 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR), pero particularmente un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde la misma CDR no puede estar presente dos veces en el anticuerpo.

En particular, se describe en esta memoria una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) que comprende integrados en regiones de marco de cadena pesada derivadas de humano o primate, al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consisten en SEQ ID NO: 1 que representa CDR1, SEQ ID NO: 2 que representa CDR2 y SEQ ID NO: 3 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende integrados en regiones de marco de cadena ligera derivadas de humano o primate, al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consisten en SEQ ID NO: 4 que representa CDR1, SEQ ID NO: 5 que representa CDR2 y SEQ ID NO: 6 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR).

En particular, la invención se refiere a una Región Variable de Cadena Ligera (LCVR), que comprende integrados en las regiones de marco de cadena ligera derivadas de humano o primate, al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consisten en SEQ ID NO: 4 que representa CDR1, SEQ ID NO: 5 que representa CDR2 y SEQ ID NO: 6 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR), en donde la misma CDR no puede estar presente dos veces en el anticuerpo y, en particular, al menos una de dichas CDR debe ser CDR1 representada por SEQ ID NO: 4..

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende integrados en regiones de marco derivadas de humano o primate, péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que representa CDR1, SEQ ID NO: 2 que representa CDR2 y SEQ ID NO: 3 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR), particularmente en el orden indicado anteriormente.

En particular, se describe en esta memoria una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) que comprende integrados en las regiones de marco de cadena pesada derivadas de humano o primate, péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que representa CDR1, SEQ ID NO: 2 que representa CDR2 y SEQ ID NO: 3 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR), particularmente en el orden indicado anteriormente.

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende integrados en regiones de marco de cadena ligera derivadas de humano o primate, péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 que representan CDR1, SEQ ID NO: 5 que representan CDR2 y SEQ ID NO: 6 que representan CDR3 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR), particularmente en el orden indicado anteriormente.

En particular, la divulgación se refiere a una Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) que comprende integrados en regiones de marco de cadena ligera derivadas de humano o primate péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 que representan CDR1, SEQ ID NO: 5 que representan CDR2 y SEQ ID NO: 6 que representan CDR3 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR), particularmente en el orden indicado anteriormente.

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende integrados en regiones de marco derivadas de humano o primate al menos tres péptidos con

una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consisten en SEQ ID NO: 1 que representan CDR1, SEQ ID NO: 2 que representan CDR2 y SEQ ID NO: 3 que representan CDR3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) y SEQ ID NO: 4 que representan CDR1, SEQ ID NO: 5 que representan CDR2 y SEQ ID NO: 6 que representan CDR3 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR), pero particularmente un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo en donde la misma CDR no puede estar presente dos veces en el anticuerpo.

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, anticuerpo que comprende integrados en regiones de marco derivadas de humano o primate, al menos cuatro péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consisten de SEQ ID NO: 1 que representan CDR1, SEQ ID NO: 2 que representan CDR2 y SEQ ID NO:3 que representan CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) y SEQ ID NO: 4 que representan CDR1, SEQ ID NO: 5 que representan CDR2 y SEQ ID NO: 6 que representan CDR3 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR), pero particularmente un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo en donde la misma CDR no puede estar presente dos veces en el anticuerpo.

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende integrados en regiones de marco derivadas de humano o primate al menos cinco péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consisten en SEQ ID NO: 1 que representan CDR1, SEQ ID NO: 2 que representan CDR2 y SEQ ID NO:3 que representan CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) y SEQ ID NO: 4 que representan CDR1, SEQ ID NO: 5 que representan CDR2 y SEQ ID NO: 6 que representan CDR3 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR), pero particularmente un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo en donde la misma CDR no puede estar presente dos veces en el anticuerpo.

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende integrados en regiones de marco derivadas de humano o primate péptidos con una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 que representan CDR1, SEQ ID NO: 2 que representan CDR2 y SEQ ID NO: 3 que representan CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) y SEQ ID NO: 4 que representan CDR1, SEQ ID NO: 5 que representan CDR2 y SEQ ID NO: 6 que representan CDR3 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR).

Específicamente se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado, una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR), o un fragmento del mismo, en donde dicho anticuerpo humanizado, la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) o un fragmento de los mismos comprende integrado en regiones de marco de cadena pesada derivadas de humano o primate al menos un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 que representa CDR2 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado, una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) o un fragmento de los mismos, en donde dicho anticuerpo humanizado, la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) o un fragmento de los mismos comprende integrado en las regiones de marco de cadena pesada derivadas de humano o primate al menos un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 que representan CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado, una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) o un fragmento de los mismos, anticuerpo, Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) o fragmento de los mismos que comprenden integrados en regiones de marco de cadena pesada derivadas de humano o primate, al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que representan CDR1 y SEQ ID NO: 2 que representan CDR2 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado, una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) o un fragmento de los mismos, anticuerpo, Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) o fragmentos de los mismos que comprenden integrados en regiones de marco de cadena pesada derivadas de humano o primate, al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que representan CDR1 y SEQ ID NO: 3 que representan CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado, una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) o un fragmento de los mismos, anticuerpo, Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) o fragmentos de los mismos que comprenden integrados en regiones de marco de cadena pesada derivadas de humano o primate, al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 que representan CDR2 y SEQ ID NO: 3 que representan CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que

comprende regiones variables con regiones de marco derivadas de humano o primate y al menos una CDR con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1 que representan CDR1 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR), SEQ ID NO:2 que representan CDR2 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR), y SEQ ID NO: 4 que representan CDR1 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR).

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado, una Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) o un fragmento de los mismos, anticuerpo, Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) o fragmentos de los mismos que comprenden integrados en regiones de marco de cadena pesada derivada de humano o primate, al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 que representan CDR1 y SEQ ID NO: 5 que representan CDR2 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR).

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado, una Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) o un fragmento de los mismos, anticuerpo, Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) o fragmentos de los mismos que comprenden integrados en regiones de marco de cadena pesada derivadas de humano o primate, al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 que representan CDR1 y SEQ ID NO: 6 que representan CDR3 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR).

Comprendido adicionalmente por la descripción es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde tanto la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) como la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) del anticuerpo C2 de ratón contribuyen cada una a al menos una de sus regiones de CDR a al menos dos regiones de CDR del anticuerpo humanizado. El anticuerpo humanizado resultante o un fragmento del mismo pueden comprender de esta manera:

- al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que representan CDR1 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 que representan CDR1 (LCVR);
- al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 que representan CDR2 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 que representan CDR1 (LCVR);
- al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 que representan CDR3 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 que representan CDR1 (LCVR);
- al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que representan CDR2 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 que representan CDR1 (LCVR);
- al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 que representan CDR2 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 que representan CDR2 (LCVR);
- al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 que representan CDR2 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 que representan CDR3 (LCVR);
- al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que representan CDR3 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 que representan CDR1 (LCVR);
- al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 que representan CDR3 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 que representan CDR2 (LCVR);
- al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 que representan CDR3 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 que representan CDR3 (LCVR).

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

También se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde al menos uno, particularmente al menos uno pero no más de 5, de manera más particular al menos uno pero no más de 4, aún más particularmente al menos uno pero no más de 3, pero especialmente al menos uno pero no más de 2, de los aminoácidos representativos de las regiones CDR de cadena ligera y/o de cadena pesada como se da en SEQ ID NOs: 1 - 6 se cambia a través de una sustitución conservadora de tal forma que el anticuerpo mantiene su funcionalidad completa.

En particular, se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde la CDR2 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) como se da en SEQ ID NO: 5, el Lys en la posición 50 de Kabat se reemplaza por un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gln y Glu, particularmente por Arg.

En particular, una Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) en donde CDR2 como se da en SEQ ID NO: 5, el Lys en la posición 50 de Kabat se reemplaza por un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gln y Glu, particularmente por Arg.

En otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo híbrido o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde en CDR2 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) como se da por SEQ ID NO: 5, la Ser en la posición 53 de Kabat se reemplaza por un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn o Thr, pero particularmente por Asn.

En particular, se describe en esta memoria una Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) en donde en CDR2 como se da por SEQ ID NO: 5, la Ser en la posición 53 de Kabat se reemplaza por un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn o Thr, pero particularmente por Asn.

Se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo en donde la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, particularmente 95%, de manera más particular 98% idéntica a la secuencia dada en SEQ ID NO: 15 y 16, respectivamente.

Alternativamente, se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde la región variable de cadena ligera (LCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es 90%, particularmente 95%, de manera más particular 98% idéntica a la secuencia dada en SEQ ID NO: 12 y 13, respectivamente.

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde al menos dos, pero especialmente tres, de las regiones CDR de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es 90%, particularmente 95%, de manera más particular 98% idéntica a la región CDR correspondiente como se da en SEQ ID NO: 1 - 3.

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde al menos dos, pero especialmente tres, de las regiones CDR de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es 90%, particularmente 95%, de manera más particular 98% idéntica a la región CDR correspondiente como se da en SEQ ID NO: 4 - 6.

También se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo a la presente invención como se describe anteriormente en la presente en donde la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia dada en SEQ ID NO: 15 y 16, respectivamente.

También se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo a la presente invención como se describe anteriormente en la presente en donde la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia dada en SEQ ID NO: 12 y 13, respectivamente.

También se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo a la presente invención como se describe anteriormente en la presente, en donde al menos una, particularmente al menos dos, pero especialmente tres, de las regiones CDR de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la región CDR correspondiente como se da por SEQ ID NO: 1 - 3.

También se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo a la presente invención como se describe anteriormente en la presente, en donde al menos una, particularmente al menos dos, pero especialmente tres, de las regiones CDR de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la región CDR correspondiente como se da por SEQ ID NO: 4-6.

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado de acuerdo a la presente invención y como se describe anteriormente en la presente, en donde al menos uno de los aminoácidos representativos de las secuencias de marco aceptadoras obtenidas de las secuencias V_H y V_K de línea germinal humana, respectivamente se cambia a través de una sustitución o un aminoácido de la región correspondiente del anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2 o una sustitución conservadora a esto.

En particular, se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado, en donde el Trp en la posición 47 de Kabat en la secuencia de marco obtenida de la secuencia V_H de línea germinal humana del subgrupo V_HIII de KABAT de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en SEQ ID NO: 15 se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, norleucina, Ile, Val, Met, Ala, y Phe, particularmente Leu e Ile, pero especialmente Leu.

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado, en donde la Arg en la posición 94 de Kabat en la secuencia de marco aceptadora obtenida de las secuencias V_H de línea germinal humana del subgrupo V_HIII de KABAT de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en SEQ ID NO: 15 se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Thr, pero especialmente por Ser.

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado, en donde el Trp en la posición 47 de Kabat en la secuencia de marco aceptadora obtenida de las secuencias V_H de línea germinal humana del subgrupo V_HIII de KABAT de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en SEQ ID NO: 15 se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, norleucina, Ile, Val, Met, Ala, y Phe, particularmente Leu e Ile, pero especialmente Leu y la Arg en la posición 94 de Kabat se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Thr, pero especialmente por Ser.

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado, en donde la Gln en la posición 45 de Kabat en la secuencia de marco aceptadora obtenida de las secuencias V_K de línea germinal humana del subgrupo V_KII de KABAT de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID NO: 12 se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg, Gln, y Asn, particularmente por el Lys y Arg, pero especialmente por Lys.

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado, en donde la Leu en la posición 50 de Kabat en la secuencia de marco aceptadora obtenida de las secuencias V_K de línea germinal humana del subgrupo V_KII de KABAT de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID NO: 12 se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg, Gln, y Asn, particularmente por Lys y Arg, pero especialmente por Lys.

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado, en donde la Tyr en la posición 87 de Kabat en la secuencia de marco aceptadora obtenida de las secuencias V_K de línea germinal humana del subgrupo V_KII de KABAT de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID NO: 12 se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Phe, Leu, Val, Ile, y Ala, particularmente por Leu y Phe, pero especialmente por Phe.

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado, en donde la Asn en la posición 53 de Kabat en la secuencia de marco aceptadora obtenida de las secuencias V_K de línea germinal humana del subgrupo V_KII de KABAT de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID NO: 12 se puede reemplazar por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gln, His, Lys y Arg, pero especialmente por His y Gln.

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado, en donde el Trp en la posición 47 de Kabat en la secuencia de marco aceptadora obtenida de las secuencias V_H de línea germinal humana del subgrupo V_HIII de KABAT de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en SEQ ID NO: 15 se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, norleucina, Ile, Val, Met, Ala, y Phe, particularmente Leu e Ile, pero especialmente por Leu y la Arg en la posición 94 de Kabat en la secuencia de marco aceptadora obtenida de las secuencias V_H de línea germinal humana del subgrupo V_HIII de KABAT de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en SEQ ID NO: 15 se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Thr, pero especialmente por Ser, y el Tyr en la posición 87 de Kabat en la secuencia de marco aceptadora obtenida de las secuencias de V_K de línea germinal humana del subgrupo V_KII de KABAT de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID NO: 12 se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Phe, Leu, Val, Ile, y Ala, particularmente por Leu y Phe, pero especialmente por Phe.

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado, en donde el Trp en la posición 47 de Kabat en la secuencia de marco aceptadora obtenida de las secuencias V_H de línea germinal humana del subgrupo V_HIII de KABAT de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en SEQ ID NO: 15 se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, norleucina, Ile, Val, Met, Ala, y Phe, particularmente Leu e Ile, pero especialmente por Leu.

En aún otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado, en donde la Arg en la posición 94 de Kabat en la secuencia de marco aceptadora obtenida de las secuencias V_H de línea germinal humana del subgrupo V_HIII de KABAT de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en SEQ ID NO: 15 se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Thr, pero especialmente por Ser.

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado, en donde en Trp en la posición de 47 Kabat en la secuencia de marco aceptadora obtenida de las secuencias V_H de línea germinal humana del

subgrupo V_HIII de KABAT de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en SEQ ID NO: 15 se reemplaza por Leu e Ile, pero especialmente por Leu y la Arg en la posición 94 de Kabat en la secuencia menos variable aceptadora obtenida de las secuencias V_H de línea germinal humana del subgrupo V_HIII de KABAT de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en SEQ ID NO: 15 se reemplaza por Ser.

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado, en donde la Tyr en la posición 87 de Kabat en la secuencia de marco aceptadora obtenida de las secuencias V_K de línea germinal humana del subgrupo V_KII de KABAT de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID NO: 12 se reemplaza por Phe.

También se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado, en donde el Trp en la posición 47 de Kabat en la secuencia de marco aceptadora obtenida de las secuencias V_H de línea germinal humana del subgrupo V_HIII de KABAT de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en SEQ ID NO: 15 se reemplaza por Leu e Ile, pero especialmente por Leu y la Arg en la posición 94 de Kabat en la secuencia de marco aceptadora obtenida de las secuencias V_H de línea germinal humana del subgrupo V_HIII de KABAT de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en SEQ ID NO: 15 se reemplaza por Ser y el Tyr en la posición 87 de Kabat en la secuencia de marco aceptadora obtenida de las secuencias V_K de línea germinal humana del subgrupo V_KII de KABAT de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID NO: 12 se reemplaza por Phe.

También se describe en esta memoria la Región Variable de Cadena Ligera de SEQ ID NO: 12.

Específicamente, se describe un anticuerpo humanizado, que comprende la Región Variable de Cadena Ligera de SEQ ID NO: 12.

También se describe en esta memoria la región variable de cadena ligera que incluye la secuencia de señal como se muestra en SEQ ID NO: 13.

Específicamente, se describe un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de Región Variable de Cadena Ligera completa que incluye las secuencias de señal como se muestra en SEQ ID NO: 13.

Alternativamente, se describe un anticuerpo humanizado, que comprende la Región Variable de Cadena Ligera de SEQ ID NO: 12 y la región constante de cadena ligera de SEQ ID NO: 14.

Alternativamente, se describe un anticuerpo humanizado, que comprende la Región Variable de Cadena Ligera de SEQ ID NO: 13 y la región constante de cadena ligera de SEQ ID NO: 14.
Específicamente, se describe en esta memoria la Región Variable de Cadena Pesada de SEQ ID NO: 15.

Más específicamente, se describe un anticuerpo humanizado, que comprende la Región Variable de Cadena Pesada de SEQ ID NO: 15.

También se describe en esta memoria la Región Variable de Cadena Pesada que incluye secuencias de señal como se muestra en SEQ ID NO: 16.

Específicamente, se describe un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable Región Variable de Cadena Pesada completa incluyendo las secuencias de señal como se muestra en SEQ ID NO: 16.

Alternativamente, se describe un anticuerpo humanizado, que comprende la Región Variable de Cadena Pesada de SEQ ID NO: 15 y la región constante de Cadena Pesada de SEQ ID NO: 17.

Alternativamente, se describe un anticuerpo humanizado, que comprende la Región Variable de Cadena Pesada de SEQ ID NO: 16 y la región constante de Cadena Pesada de SEQ ID NO: 17.

Según se describe en esta memoria el anticuerpo humanizado de acuerdo a la invención y como se describe en la presente, en la co-incubación con un péptido monomérico Aβ que tiene al menos 30, particularmente al menos 35, de manera más particular al menos 38, de manera aún más particular al menos 40 residuos de aminoácido y/o un péptido amiloide soluble polimérico Aβ que comprende una pluralidad de las unidades monoméricas Aβ, pero especialmente con un péptido amiloide soluble polimérico Aβ y/o monomérico $A\beta_{1-42}$ que comprende una pluralidad de las subunidades monoméricas $A\beta_{1-42}$, particularmente a una relación de concentración molar de anticuerpo a Aβ1-42 hasta 1:1000, pero especialmente a una relación de concentración molar de entre 1:10 y 1:100, inhibe la agregación de los monómeros Aβ a fibrillas poliméricas de alto peso molecular.

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

También se describe en esta memoria la co-incubación con péptidos amiloides solubles monoméricos y/o poliméricos amiloides se logra durante 24 horas a una temperatura de 37°C.

En particular, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado de acuerdo a la invención que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales de los mismos, se une al péptido monomérico $A\beta_{1-42}$ y/o al péptido amiloide soluble polimérico $A\beta$ que comprende una pluralidad de las unidades monoméricas $A\beta_{1-42}$ y en la co-incubación con el péptido monomérico $A\beta_{1-42}$ y/o péptido amiloide soluble polimérico $A\beta$ comprende una pluralidad de las unidades monoméricas $A\beta_{1-42}$ inhibe la agregación de los monómeros y/o polímeros $A\beta$ a fibrillas poliméricas de alto peso molecular.

También se describe en esta memoria, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado de acuerdo a la invención que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo inhibe la agregación de los monómeros $A\beta$ y/o polímeros solubles $A\beta$ que comprende una pluralidad de unidades monoméricas $A\beta$ a fibrillas poliméricas de alto peso molecular por al menos 50%, particularmente por al menos 60%, particularmente por al menos 65%, de manera más particular por al menos 75%, de manera aún más particular por al menos 80%, pero especialmente por al menos 85%-90%, o más en comparación a los monómeros de péptido amiloide respectivos incubados en amortiguador (control), a una relación de concentración molar de anticuerpo a $A\beta_{1-42}$ de hasta 1:1000, particularmente a una relación de concentración molar de entre 1:10 y 1:100, pero especialmente a una relación de concentración molar de 1:10.

También se describe en esta memoria, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado de acuerdo a la invención que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales de los mismos, inhibe la agregación de los monómeros $A\beta$ y/o polímeros solubles $A\beta$ que comprenden una pluralidad de unidades monoméricas $A\beta$ a fibrillas poliméricas de alto peso molecular por al menos 30% a una relación de concentración molar de anticuerpo a $A\beta_{1-42}$ de 1:100.

También según se describe en esta memoria, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado de acuerdo a la invención incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, inhibe la agregación de los monómeros $A\beta$ y/o polímeros solubles $A\beta$ que comprenden una pluralidad de unidades monoméricas $A\beta$ a fibrillas poliméricas de alto peso molecular por al menos 80% a una relación de concentración molar de anticuerpo a $A\beta$1-42 de 1:10.

La unión de los anticuerpos de acuerdo con la invención y como se describe en la presente a los péptidos monoméricos y/o poliméricos amiloidogénicos pero, particularmente la forma amiloide (1-42) conduce a la inhibición de la agregación de péptidos amiloidogénicos monoméricos y/o poliméricos a fibrillas o filamentos de alto peso molecular. A través de la inhibición de la agregación de péptidos monoméricos y/o poliméricos amiloidogénicos, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención son capaces de prevenir o desacelerar la formación de placas amiloides, particularmente la forma amiloide (1-42), que se sabe que llega a ser insoluble por el cambio de conformación secundaria y a la parte principal de placas amiloides en cerebros de animales o humanos enfermos.

El potencial de inhibición de agregación del anticuerpo de acuerdo a la invención se puede determinar por cualquier método adecuado conocido en la técnica, particularmente por ultracentrifugación por gradiente de densidad seguido por un análisis de sedimentación con SDS-PAGE en un gradiente preformado y/o por un ensayo fluorescente de tioflavina T (Th-T).

Se describe en esta memoria un anticuerpo, particularmente un anticuerpo humanizado como se describe en la presente incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que, en la co-incubación, particularmente a una relación de concentración molar de entre 1:10 y 1:1000, de manera más particular a una relación de 1:100 con fibrillas o filamentos amiloides, poliméricos de alto peso molecular, preformados, formados por agregación de péptidos monoméricos $A\beta$ que tienen al menos 30, particularmente al menos 35, de manera más particular al menos 38, de manera aún más particular al menos 40 residuos de aminoácido y, pero especialmente péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados por al menos 20%, particularmente por al menos 30%, de manera más particular por al menos 35%%, de manera aún más particular por al menos 40%, pero especialmente por al menos 50% o más.

Específicamente, la inhibición de la agregación y el potencial de desagregación del anticuerpo,

respectivamente, se determina por ultracentrifugación de gradiente de densidad seguido por un análisis de sedimentación de SDS-PAGE en un gradiente preformado.

También según se describe en esta memoria, la inhibición de agregación y el potencial de desagregación del anticuerpo, respectivamente, se determinan por ensayo fluorescente de tioflavina T (Th-T).

También según se describe en esta memoria, el anticuerpo de acuerdo a la invención se co-incuba con fibrillas o filamentos amiloides, poliméricos, de alto peso molecular, preformados, durante 12 horas a 36 horas, particularmente durante 18 horas a 30 horas, de manera más particular durante 24 horas a una temperatura entre 28°C y 40°C, particularmente de entre 32°C y 38°C, de manera más particular a 37°C.

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

Tal como se describe en esta memoria, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado de acuerdo a la invención incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente o partes funcionales del mismo, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados por al menos 24% a una relación de concentración molar de anticuerpo a *Aβ*1-42 de 1:100.

Tal como se describe en esta memoria, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado de acuerdo a la invención incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados por al menos 32% a una concentración de relación molar de anticuerpo Aβ1-42 de 1:10.

A través de la desagregación de las fibrillas o filamentos poliméricos amiloidogénicos, los anticuerpos de acuerdo a la presente invención son capaces de prevenir o desacelerar la formación de placas amiloides lo que conduce un alivio de síntomas asociados con la enfermedad y un retraso o inversión de su progreso.

Por consiguiente, se describe, además, un anticuerpo, particularmente un anticuerpo humanizado, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente, anticuerpo que es capaz de disminuir la cantidad total de Aβ en el cerebro de un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un humano que padece una enfermedad o condición que conduce a concentración incrementa de Aβ en el cerebro.

Se describe, además, un anticuerpo humanizado de acuerdo a la invención y como se describe anteriormente en la presente, anticuerpo que es bi-efectivo ya que exhibe tanto una propiedad de inhibición de agregación así como la propiedad de desagregación, particularmente apareada con un alto grado de sensibilidad conformacional.

En particular, en esta memoria se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo a la invención y como se describe de forma anterior anticuerpo que, en la co-incubación con péptidos amiloides, solubles, monoméricos y/o poliméricos, amiloides particularmente con péptidos monoméricos β-amiloides tal como por ejemplo, péptidos 1-39; 1-40, 1-41, o 1-42, monoméricos Aβ y/o un péptido β-amiloide soluble, polimérico que comprende una pluralidad de estas unidades monoméricas Aβ pero especialmente con un péptido amiloide soluble polimérico Aβ y/o monoméricos A$\beta_{1\text{-}42}$ que comprende una pluralidad de estas unidades monoméricas A$\beta_{1\text{-}41}$, inhibe la agregación de los monómeros Aβ en fibrillas o filamentos de alto peso molecular y además, en la co-incubación con fibrillas o filamentos amiloides, poliméricos, de alto peso molecular, preformados, formados por la agregación de péptidos monoméricos amiloides, particularmente péptidos monoméricos β-amiloides tal como por ejemplo los péptidos 1-39; 1-40, 1-41, o 1-42 monoméricos, Aβ pero especialmente péptidos monoméricos Aβ_1-42, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados.

También se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo a la presente invención y como se describe anteriormente en la presente, anticuerpo que es capaz de inducir una transición de la conformación de β-hoja hacia una conformación de α-hélice y/o una conformación de espiral aleatoria, pero particularmente una conformación de espiral aleatoria, de manera aún más particular una conformación de espiral aleatoria en una ubicación determinada en la molécula especialmente en el ambiente de Tyr 10 y Val 12 de la proteína Aβ lo que conduce a un incremento de la conformación de espiral aleatoria a costa de la conformación de β-hoja y una solubilización mejorada de las fibrillas o filamentos amiloides, amiloides, poliméricos, de alto peso molecular, preformados. En particular, la disminución de la conformación de β-hoja da cuenta de al menos 30%, particularmente de al menos 35%, y de manera más particular de al menos 40% y más en comparación a las fibrillas o filamentos poliméricos, amiloides, preformados,

respectivos, incubados en amortiguador (control).

El potencial del anticuerpo en la inducción de una transición en la estructura secundaria se determina por espectroscopia RMN 13C de estado sólido, pero en particular, al medir las intensidades integrales de las intensidades integrales de las conformaciones de Tyr 10 y Val 12 en el péptido Aβ_{1-42}.

También se describe en esta memoria un anticuerpo quinmérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo a la presente invención y como se describe anteriormente en la presente, que comprende al menos una cadena ligera o un fragmento de la misma o al menos una cadena pesada o un fragmento de la misma, en donde el anticuerpo o fragmento se une a un monómero Aβ con una afinidad de unión de al menos aproximadamente 1 x 10^{-7} a al menos aproximadamente 1 x 10^{-12}, particularmente de al menos aproximadamente 1 x 10^{-8} a al menos aproximadamente 1 x 10^{-11}, de manera más particular de al menos aproximadamente 1 x 10^{-9} a al menos aproximadamente 1 x 10^{-10}, de manera aún más particular de al menos aproximadamente 1 x 10^{-8} a al menos aproximadamente 2 x 10^{-8} pero, de manera preferente, no muestra ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora amiloide (APP).

También se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo a la presente invención y como se describe anteriormente en la presente, que comprende al menos una cadena ligera o un fragmento de la misma o al menos una cadena pesada o un fragmento de la misma, donde el anticuerpo o fragmento se une a una fibra, fibrilla o filamento Aβ con una afinidad de unión de al menos aproximadamente 1 x 10^{-7} a al menos aproximadamente 1 x 10^{-12}, particularmente de al menos aproximadamente 1 x 10^{-8} a al menos aproximadamente 1 x 10^{-11}, de manera más particular de al menos aproximadamente 1 x 10^{-9} a al menos aproximadamente 1 x 10^{-10}, de manera aún más particular de al menos aproximadamente 2 x 10^{-9} a al menos aproximadamente 5 x 10^{-9}, pero, de manera preferente, no muestra ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora amiloide (APP).

También según se describe en esta memoria el anticuerpo de acuerdo a la invención y como se describe anteriormente en la presente o un fragmento del mismo, exhibe una afinidad de unión a una fibra, fibrilla o filamento Aβ que es al menos 10 veces, particularmente al menos 15 veces, de manera más particular al menos 20 veces, pero especialmente al menos 25 veces mayor que la afinidad de unión a un monómero Aβ.

También según se describe en esta memoria, un anticuerpo híbrido o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo se proporciona como se describe anteriormente en la presente, anticuerpo que es une de manera sustancial Aβ agregado, incluyendo placas Aβ, en el mamífero, particularmente en el cerebro humano, pero de manera preferente, no muestra ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora amiloide (APP).

También según se describe en esta memoria, el anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo se proporciona como se describe anteriormente en la presente, anticuerpo que es une de manera sustancial a amiloide polimérico soluble, particularmente amiloide β (Aβ), incluyendo monómeros Aβ, en el mamífero, particularmente el cerebro humano, pero de manera preferente, no muestra ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora amiloide (APP).

Se describe adicionalmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo a la invención y como se describe anteriormente en la presente, anticuerpo que reduce de manera significativa la carga de la placa Aβ en el mamífero, particularmente el cerebro humano. Esto se puede lograr ya sea por la unión del anticuerpo a la placa o al cambiar el equilibrio entre el amiloide, particularmente amiloide β (Aβ), en su estado insoluble y agregado hacia su forma soluble al desagregar las fibras a formas poli- y mono-méricas solubles al inducir un cambio en la conformación y al unir y estabilizar las formas amiloides desagregadas y solubilizadas, particularmente las formas amiloides β (Aβ), en el tejido y/o fluidos corporales de un sujeto, incluyendo un mamífero y un humano, particularmente el cerebro del sujeto. A través de la actividad del anticuerpo de acuerdo a la invención, la depuración periférica y el catabolismo se favorecen de esta manera en lugar del depósito dentro del tejido y/o fluidos corporales del sujeto, particularmente el cerebro. El efecto benéfico del anticuerpo de acuerdo a la invención de esta manera puede obtener sin la unión del anticuerpo a la placa.

A través de esta actividad estabilizadora, el anticuerpo de acuerdo a la invención es capaz de neutralizar los efectos tóxicos de la proteína amiloide soluble polimérica y menos agregada, particularmente proteína amiloide β (Aβ) en el tejido y/o fluidos corporales de un sujeto, particularmente de un mamífero, y de manera aún más particular de un humano. Específicamente, el anticuerpo de acuerdo a la invención

puede lograr de esta manera sus efectos benéficos sin unirse necesariamente a amiloide beta agregado en el cerebro del sujeto.

Además de ello, se describe un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo a la presente invención y como se describe anteriormente en la presente, que comprende al menos una cadena ligera o un fragmento de la misma o al menos una cadena pesada o un fragmento del misma que incorpora al menos una, particularmente dos y de manera más particular tres regiones CDR obtenidas de un anticuerpo donador de ratón, particularmente el anticuerpo de ratón ACI-01-Ab7C2 (llamado “mC2” y hC2 para el anticuerpo C2 humanizado, a todo el largo de la solicitud) depositado el 01 de Diciembre del 2005 con la “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, bajo el número de acceso DSM ACC2750, en donde el anticuerpo o fragmentos del mismo tiene una afinidad al antígeno de Aβ que es al menos 5 veces, particularmente al menos 8 veces, de manera más particular al menos 10 veces, pero especialmente por al menos 15 veces mayor que aquella del anticuerpo donador de ratón.

El anticuerpo de esta invención puede ser en una modalidad, o un anticuerpo entero (por ejemplo, con dos cadenas ligeras de longitud completa y dos cadenas pesadas de longitud completa) de cualquier isotipo y subtipo (por ejemplo, IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA1 e IgA2); pero especialmente un anticuerpo del isotipo IgG4; de manera alternativa, en otra modalidad puede ser un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, Fab, $F(ab')_2$, y Fv) de un anticuerpo entero.

Por lo tanto, también se describen fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos descritos en la presente. Específicamente, el fragmento es selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento $F(ab)_2$, y un fragmento F_v, incluyendo los productos de la una biblioteca de expresión de inmunoglobulina de Fab y fragmentos de unión a epítopo de cualquiera de los anticuerpos y fragmentos mencionados anteriormente.

Específicamente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención se conjuga a polietilenglicol. Especificamente, la región constante del anticuerpo de la invención se modifica para reducir al menos una función efectora biológica mediada por región constante, con relación a un anticuerpo no modificado. En aún otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención comprende una región Fc que tiene una función efectora alterada.

Se describe en esta memoria una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo a la invención y como se describe anteriormente en la presente.

En particular, se describe una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un tramo de las moléculas contiguas de aminoácido como se da en SEQ ID NO: 2 y 3, respectivamente, o la secuencia complementaria que presenta las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR) 2 y 3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

De manera más particular, se describe una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un tramo de moléculas contiguas de aminoácido como se da en SEQ ID NO: 4, o la secuencia complementaria, que representan las regiones determinantes de Complementariedad (CDR) 1 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR).

Específicamente, se describe una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos como se da por SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19, o la secuencia complementaria, que codifica la secuencia de aminoácidos de CDR 2 y CDR 3, respectivamente, de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

Específicamente, se describe una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos como se da por SEQ ID NO: 20, o la secuencia complementaria, que codifica la secuencia de nucleótidos de CDR 1 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR).

Específicamente, se describe una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 21, o la secuencia complementaria, que codifica la Región Variable de Cadena Ligera.

Específicamente, se describe una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 22, o la secuencia complementaria, que codifica la Región Variable de Cadena Ligera completa incluyendo secuencias de señal.

Específicamente, se describe una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la Región Variable de Cadena Ligera de SEQ ID NO: 22 y la región constante de cadena ligera de SEQ ID NO: 23. Se describe también la hebra complementaria de la molécula de nucleótido.

Se describe una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 24 que codifica la Región Variable de Cadena Pesada. Se describe también la hebra complementaria de la molécula de nucleótido.

Específicamente, se describe una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 25 que codifica la Región Variable de Cadena Pesada completa incluyendo secuencias de señal. Se describe también la hebra complementaria de la molécula de nucleótido.

Específicamente, se describe una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la Región Variable de Cadena Pesada de SEQ ID NO: 25 y la región constante de cadena pesada de SEQ ID NO: 26. Se describe también la hebra complementaria de la molécula de nucleótido.

También comprendida por la descripción es una secuencia de nucleótidos que se hibrida a una de las secuencias de nucleótidos que codifica para el anticuerpo descrito anteriormente, de la invención, particularmente a la hebra complementaria de las mismas, ya sea en aislamiento o como parte de una molécula más grande de nucleótido.

En particular, se describe una secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones convencionales de hibridación, particularmente bajo condiciones de hibridación severa, a cualquiera de las secuencias de nucleótidos dadas en SEQ ID NOs: 18-26 y 29 - 32, particularmente a la hebra complementaria de las mismas.

También se describe en esta memoria un vector de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleíco de acuerdo a la invención como se menciona anteriormente en la presente.

También se describe en esta memoria una célula que comprende un vector de expresión que comprende el ácido nucleíco de acuerdo a la invención y como se menciona anteriormente en la presente.

También se describe en esta memoria una composición que comprende el anticuerpo de acuerdo a la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo a la invención como se describe anteriormente en la presente incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o cualquier derivado o partes funcionales del mismos, en una cantidad terapéuticamente efectiva, en particular a una composición que es una composición farmacéutica o terapéutica que comprende además de forma opcional un portador farmacéuticamente aceptable.

También se describe en esta memoria una composición comprende el anticuerpo en una cantidad terapéuticamente efectiva.

Comprendida adicionalmente por la descripción es una composición que comprende un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo a la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo a la invención y como se describe anteriormente en la presente incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o cualquier derivado o parte funcional del mismo, en una cantidad terapéuticamente efectiva y, opcionalmente, una sustancia biológicamente activa adicional y/o un portador farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente y/o un excipiente.

En particular, se describe en esta memoria una composición o mezcla, en donde la sustancia biológicamente activa, adicional, es un compuesto usado en el medicamento de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con proteína amiloide o tipo amiloide tal como la proteína Aβ comprendida en la enfermedad de Alzheimer.

Según se describe en esta memoria, la otra sustancia biológicamente activa o compuesto también puede ser un agente terapéutico que se puede usar en el tratamiento de amiloidosis provocada por amiloide β o se puede usar en el medicamento de otros trastornos neurológicos.

La otra sustancia o compuesto biológicamente activo puede ejercer su efecto biológico por el mismo o similar mecanismo como el anticuerpo de acuerdo a la invención o por un mecanismo no relacionado de acción o por una multiplicidad de mecanismos relacionados y/o no relacionados de acción.

En general, el otro compuesto biológicamente activo puede incluir mejoradores de transmisión de neutrones, fármacos psicoterapéuticos, inhibidores de acetilcolina-esterasa, bloqueadores de canal de calcio, aminas biogénicas, tranquilizadores de benzodiazepinas, mejoradores de la síntesis, almacenamiento y liberación de acetilcolina, agonistas del receptor pos-sináptico de acetilcolina, inhibidores de monoamina-oxidasa-A o -B, antagonistas del receptor de N-metil-D-aspartato-glutamato,

fármacos antiinflamatorios no esteroidales, antioxidantes, y antagonistas de receptores serotonérgicos.

De manera más particular, se describe una composición o mezcla que comprende al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos efectivos contra estrés oxidativo, compuestos anti-apoptóticos, queladores metálicos, inhibidores de la reparación del ADN tal como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de α-secretasa, inhibidores de β- y γ-secretasa, proteínas tau, neurotransmisor, interruptores de la β-hoja, atrayentes de componentes celulares de depuración/agotamiento de amiloide-β, inhibidores de amiloide-beta N-terminal truncado incluyendo amiloide beta 3-42, piroglutamado, moléculas anti-inflamatorias, o inhibidores de colinesterasa (ChEI) tal como tacrina, rivastigmina, donepezil, y/o galantamina, agonistas de M1 y otros fármacos incluyendo cualquier fármaco modificador de amiloide o tau y complementos nutritivos, y complementos nutritivos, junto con un anticuerpo de acuerdo a la presente invención, y opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente y/o un excipiente.

También se describe en esta memoria una composición o mezcla, en donde el compuesto es un inhibidor de colinesterasa (ChEI), particularmente una mezcla, en donde el compuesto es uno seleccionado del grupo que consiste en tacrina, rivastigmina, donepezil, galantamina, niacina y memantina.

Específicamente, las composiciones de acuerdo a la acuerdo a la invención pueden comprender niacina o memantina junto con un anticuerpo de acuerdo a la presente invención y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable y/o un diluente y/o un excipiente.

Específicamente, se describen composiciones que comprenden “anti-psicóticos atípicos" tal como por ejemplo, clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina para el tratamiento de síntomas psicóticos positivos y negativos incluyendo alucinaciones, delirios, trastornos del pensamiento (manifestados por incoherencia marcada, descarrilamiento, tangencialidad), y comportamiento bizarro o desorganizado, así como anhedonia, afecto aplanado, apatía, retiro social en un sujeto en necesidad de las mismas, junto con un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo a la monoclonal de acuerdo a la invención pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo a la invención y como se describe en la presente y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente y/o un excipiente.

Tal como se describe en esta memoria, las composiciones y mezclas de acuerdo a la invención y como se describe anteriormente en la presente comprenden el anticuerpo y la sustancia biológicamente activa, respectivamente, en una cantidad terapéuticamente efectiva.

Otros compuestos que pueden ser usados de manera adecuada en mezclas en combinación con el anticuerpo de acuerdo a la presente invención se describen en la WO 2004/058258 (*ver* especialmente páginas 16 y 17) incluyendo objetivos de pasos terapéuticos (página 36-39), ácidos alcanosulfónicos y ácidos alcanolsulfúricos (páginas 39-51), inhibidores de colinesterasa (páginas 51-56), antagonistas del receptor NMDA (páginas 56-58), estrógenos (páginas 58-59), fármacos anti-inflamatorios no esteroidales (páginas 60-61), antioxidantes (páginas 61-62), agonistas del receptor activado por proliferadores de peroxisoma (PPAR) (páginas 63-67), agentes disminuidores de colesterol (páginas 68-75); inhibidores de amiloides (páginas 75-77), inhibidores de la formación amiloide (páginas 77-78), queladores metálicos (páginas 78-79), anti-psicóticos y anti-depresivos (páginas 80-82), complementos nutricionales (páginas 83-89) y compuestos que incrementan la disponibilidad de sustancias biológicamente activas en el cerebro (ver páginas 89-93) y profármacos (páginas 93 y 94).

Se describe en esta memoria una composición que comprende el anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo a la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo a la invención y como se describe anteriormente en la presente y/o la sustancial biológicamente activa en una cantidad terapéuticamente efectiva.

La invención se refiere además al uso de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo a la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo a la invención y como se describe anteriormente en la presente y/o una parte funcional del mismo y/o una composición farmacéutica, o una mezcla que comprende el anticuerpo, para la preparación de un medicamento para tratar o aliviar los efectos de las amiloidosis, un grupo de enfermedades o trastornos asociados con formación de placas amiloides que incluyen amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada a la edad tal como enfermedades que incluyen trastornos neurológicos tal como Enfermedad de Alzheimer (AD), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Holandés); complejo de Parkinson-Demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan en trastornos asociados con

proteínas tipo amiloide tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada a VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), Diabetes de Comienzo en Adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endócrinos y otros incluyen degeneración macular, en un sujeto en necesidad del mismo.

También se describe en esta memoria un método para la preparación de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo a la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo a la invención y como se describe anteriormente en la presente y/o una parte funcional del mismo y/o una composición farmacéutica, o una mezcla que comprende el anticuerpo y/o una parte funcional del mismo, particularmente en una cantidad terapéuticamente efectiva, para el uso en un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de las amiloidosis, un grupo de enfermedades o trastornos asociados con formación de placas amiloides que incluye amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada a la edad tal como diabetes que incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos tal como Enfermedad de Alzheimer (AD), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Holandés); complejo de Parkinson-Demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan o están asociados con proteínas tipo amiloide tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada a VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), Diabetes de Comienzo en Adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endócrinos y otros incluyen degeneración macular, en un sujeto en necesidad de lo mismo, que comprende formular un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo a la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo a la invención en una forma farmacéuticamente aceptable.

Además, se describe un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de las amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placas amiloides que incluye amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada a la edad, tal como enfermedades, que incluyen pero no se limitan a, trastornos neurológicos tal como Enfermedad de Alzheimer (AD), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Holandés); complejo de Parkinson-Demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan en o están asociadas con proteínas tipo amiloide tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada a VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), Diabetes de Comienzo en Adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endócrinos y otros incluyen degeneración macular, en un sujeto en necesidad de lo mismo al administrar un anticuerpo y/o una parte funcional del mismo, pero particularmente un anticuerpo humanizado y/o una parte funcional del mismo, o una composición o mezcla que comprende este anticuerpo y/o una parte funcional del mismo, a un sujeto, incluyendo un mamífero o un humano afectado por este trastorno, en una cantidad terapéuticamente efectiva.

También se describe en esta memoria un método para el tratamiento de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placas amiloides que incluye amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada a la edad que incluye, pero no se limita a, trastornos neurológicos tal como Enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o condición caracterizada por una pérdida de capacidad de memoria cognitiva en un sujeto en necesidad de lo mismo, al administrar a un sujeto, particularmente un mamífero o un humano, afectado por este trastorno, un anticuerpo, particularmente una composición farmacéutica de acuerdo a la invención y como se describe en la presente.

También se describe en esta memoria un método para retener o incrementar la capacidad de memoria cognitiva, pero de manera particular, para restaurar la capacidad de memoria cognitiva de un sujeto, particularmente un mamífero o un humano, que padece de deterioro de memoria al administrar a un sujeto, particularmente un mamífero o un humano, en necesidad del mismo, un anticuerpo, particularmente una composición farmacéutica o terapéutica de acuerdo a la invención y como se describe anteriormente en la presente.

Es un objeto adicional de la invención proporcionar una composición terapéutica y un método para producir esta composición así como un método para el tratamiento de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placas amiloides que incluyen amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada a la edad que incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos tal como Enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o condición caracterizada por una pérdida de capacidad de memoria cognitiva, en un sujeto en necesidad de lo mismo usando un anticuerpo de acuerdo a la invención y como se describe anteriormente en la presente.

En particular, la invención se refiere al tratamiento de un sujeto, particularmente un mamífero o un humano, que padece de una afección asociada a amiloide caracterizada por una pérdida de capacidad de memoria cognitiva, que conduce a la retención de capacidad de memoria cognitiva.

La invención se refiere además a un método de diagnosis de una enfermedad o afección asociada a amiloides en un sujeto, que comprende detectar la unión inmunoespecífica de un anticuerpo o un fragmento activo del mismo o un epítopo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ* que incluye los pasos de

(a) poner en contacto la muestra del sujeto sospechoso de contener la proteína amiloide, con un anticuerpo, particularmente anticuerpo monoclonal de acuerdo a la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo a la invención y como se describe anteriormente en la presente, y/o una parte funcional del mismo, anticuerpo que es une con un epítopo de la proteína amiloide;

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

(c) detectar la formación del complejo inmunológico; y

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

También está comprendido un método para determinar el grado de carga de placas amiloidogénicas en un tejido y/o en un y/o en fluidos corporales de un sujeto en necesidad del mismo que comprende

(a) obtener una muestra representativa del tejido y/o de los fluidos corporales del sujeto bajo investigación;

(b) probar la muestra para la presencia de proteína amiloide con un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo a la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo a la invención y como se describe anteriormente en la presente, y/o una parte funcional del mismo;

(c) determinar la cantidad de anticuerpo unida a la proteína; y

(d) calcular la carga de placas en el tejido y/o fluidos corporales del sujeto.

En particular, se describe un método para determinar el grado de carga de placas amiloidogénicas en un tejido y/o en fluidos corporales de un sujeto en necesidad del mismo, en donde la formación del complejo inmunológico en el paso c) se determina de tal forma que la presencia o ausencia del complejo inmunológico correlaciona con la presencia o ausencia de proteína amiloide.

Adicionalmente, se describe un kit de prueba para la detección y diagnosis de enfermedades y afecciones asociadas a amiloides en un sujeto, que comprende un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo a la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo a la invención y como se describe anteriormente en la presente, y/o una parte funcional del mismo.

En particular, se describe un kit de prueba para la detección y diagnosis de enfermedades y afecciones asociadas a amiloides en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende un recipiente que retiene uno o más anticuerpos de acuerdo a la presente invención, y/o una parte funcional de los mismos, e instrucciones para el uso de los anticuerpos para el propósito de la unión a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico y para detectar la formación del complejo inmunológico de tal forma que la presencia o ausencia del complejo inmunológico correlacione con la presencia o ausencia de la proteína amiloide.

También se describen en esta memoria métodos y composiciones para prevenir, tratar o detectar una enfermedad asociada con amiloidosis en un sujeto en necesidad de lo mismo usando inmunoglobulinas como se describe en la presente que comprenden además una región Fc variante, en donde la región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con relación a la región Fc tipo silvestre. La región Fc medía la función efectora del anticuerpo o fragmento del mismo. Al modular la capacidad de la porción Fc del anticuerpo o fragmento del mismo al unirse a o activar su receptor, es posible anular o mejorar la función efectora del anticuerpo o fragmentos del mismo.

De esta manera, también se describe un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención que comprende además una región Fc variante que comprende al menos una mutación de aminoácido que disminuye la función efectora. Específicamente, la por lo menos una mutación de aminoácido disminuye la glicosilación del anticuerpo o fragmento del mismo. Específicamente, la por lo menos una mutación de aminoácido disminuye la unión a un receptor Fc cognado. Específicamenten, la al menos una mutación de aminoácido disminuye la activación de un receptor Fc cognado en la unión del anticuerpo o fragmento del mismo. Específicamente, la región Fc variante es una región Fc variante de IgG1. Específicamente, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una mutación D265A en la región Fc.

Se describe en esta memoria un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención que comprende además una región Fc variante que comprende al menos una mutación de aminoácido que disminuye la

función efectora. Específicamente, la al menos una mutación de aminoácido mejora la glicosilación del anticuerpo o fragmento del mismo. Específicamente, la al menos una mutación de aminoácido incrementa la unión a un receptor de Fc cognado. Específicamente, la al menos una mutación de aminoácido incrementa la activación de un receptor de Fc cognado en la unión del anticuerpo o fragmento del mismo. Estos y otros objetos, características y ventajas de la presente invención llegarán a ser evidentes después de una revisión de la siguiente descripción detallada de la modalidad descrita y de las reivindicaciones anexas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1 (Ejemplo 2): Vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo quimérico.

Figura 2 (Ejemplo 2): Vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo quimérico.

Figura 3 (Ejemplo 2): Casete de expresión de la Región Variable de Cadena Ligera de ratón del Anticuerpo quimérico

Figura 4 (Ejemplo 2): Casete de expresión de la Región Variable de Cadena Pesada de ratón del Anticuerpo quimérico

Figura 5 (Ejemplo 5.2): Comparación de la Región Variable de Cadena Pesada de ratón a la secuencia de línea germinal murina más cercana

Figura 6 (Ejemplo 8): Actividad de anticuerpo C2 humanizados, purificados

Figura 7 (Ejemplo 9): Actividad de unión de los anticuerpos producidos por expresión transiente de construcciones CDRL2 modificadas con C2 en unión con cadena pesada híbrida de C2, en comparación al anticuerpo quimérico C2ChVHAF/ChVK, producido por transfección transiente y anticuerpo purificado.

Figura 8 (Ejemplo 11): Resultados del Ensayo de Unión Inmunohistoquímica con el anticuerpo quimérico AF (IgG4) y el anticuerpo humanizado H4K1 (IgG4).

Figura 9 (Ejemplo 12): Funcionalidad de mC2 en fibras Amiloides. A). Comparación de los espectros de ^{13}C CPMAS y ajustes para las fibras amiloides β1-42 marcadas con U-^{13}C Tyr10 y Val12, incubadas con PBS (a la izquierda sirvió como control) o ACI-7-C2 (derecha) durante 24 horas y luego se liofilizó. El pico en c33 ppm corresponde a la conformación de beta-hoja de las fibras en tanto que el pico a 30 ppm es el resultado de la conformación de espiral aleatoria. B) Comparación de los parámetros ajustados para las dos conformaciones de Val12 Cβ. Los desplazamientos químicos ajustados para las dos conformaciones son bastante similares pero son muy diferentes las intensidades integrales, que reflejan una reducción en la conformación original de la beta-hoja por aproximadamente 35% (1-(53.5/81.7)), de acuerdo con el valor obtenido de la medición fluorescente.

Figura 10 (Ejemplo 12): Afinidad de Unión de C2 humanizado en ELISA.

Figura 11 (Ejemplo 14): Unión específica de la conformación de mC2 a diferentes clases de Proteína Amiloide. La preparación de sedimento en la leyenda a esta figura se refiere a las fibras $A\beta_{1-12}$, la preparación de sobrenadante se refiere a monómeros amiloides.

Figura 12: Secuencias VK de C2 humanizadas en comparación a la secuencia murina y las secuencias aceptoras humanas DPK15 y J_K1.

Figura 13: Secuencias VH de C2 humanizadas en comparación a secuencia murina y secuencias aceptoras humanas DP54 y J_H6.

Figura 14: ADN completo y secuencia de proteína de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado C2, C2HuVK1.

Figuras 15-1 a 15-5: ADN completo y secuencia de proteína de la región constante de cadena ligera (C Kappa humana) del anticuerpo C2 humanizado.

Figuras 16-1 a 16-2: ADN completo y secuencia de proteína de la región constante de cadena pesada (IgG4 humana ser228-pro) del anticuerpo C2 humanizado.

Figuras 17-1 a 17-3 (Ejemplo 15): Resultados de los experimentos de correlación de epítopos.

Figura 18 (Ejemplo 13): Resultados de los experimentos de ensayo de agregación.

Figura 19 (Ejemplo 13): Resultados de los experimentos del ensayo de desagregación.

Figura 20 (Ejemplo 16): Resultados de los experimentos de neuroprotección con el anticuerpo C2 humanizado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1.- Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada humanizada (CDR1) de C2 HuVH AF4.

SEQ ID NO: 2.- Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada humanizada (CDR2) de C2 HuVH AF4.

SEQ ID NO: 3.- Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada humanizada (CDR3) de C2 HuVH AF4.

SEQ ID NO: 4.- Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera humanizada (CDR1) de C2 HuVK 1.

SEQ ID NO: 5.- Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera humanizada (CDR2) de C2 HuVK 1.

SEQ ID NO: 6.- Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera humanizada (CDR3) de C2 HuVK 1.

SEQ ID NO: 7.- Secuencia de aminoácidos de la región 2 de epítopo de Aβ.

SEQ ID NO: 8.- Secuencia de aminoácidos de la región 1 de epítopo de Aβ.

SEQ ID NO: 9.- Secuencia de aminoácidos de la región 2 modificada de epítopo de Aβ.

SEQ ID NO: 10.- Secuencia de aminoácidos de la región 1 modificada de epítopo de Aβ.

SEQ ID NO: 11.- Secuencia de aminoácidos de la región modificada, completa de epítopo.

SEQ ID NO: 12.- Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera humanizada de C2 HuVK 1.

SEQ ID NO: 13.- Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera humanizada de C2.

SEQ ID NO: 14.- Secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena ligera de C2 humanizada.

SEQ ID NO: 15.- Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada humanizada de C2 HuVH AF 4.

SEQ ID NO: 16.- Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada de C2.

SEQ ID NO: 17.- Secuencia de aminoácidos de la región modificada de cadena C de IG gamma-4.

SEQ ID NO: 18.- Secuencia de nucleótido de CDR2 de región variable de cadena pesada humanizada de C2 HuVH AF 4.

SEQ ID NO: 19.- Secuencia de nucleótido de CDR3 de región variable de cadena pesada humanizada de C2 HuVH AF 4.

SEQ ID NO: 20.- Secuencia de nucleótido de CDR1 de región variable de cadena pesada humanizada de C2 HuVK 1.

SEQ ID NO: 21.- Secuencia de humedad de región variable de cadena ligera humanizada de C2 HuVK 1.

SEQ ID NO: 22.- Secuencia de nucleótidos de cadena ligera humanizada de C2.

SEQ ID NO: 23.- Secuencia de nucleótidos de región constante de cadena ligera humanizada de C2.

SEQ ID NO: 24.- Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada humanizada de C2

HuVH AF 4.

SEQ ID NO: 25.- Secuencia de nucleótidos de cadena pesada humanizada de C2.

SEQ ID NO: 26.- Secuencia de nucleótidos de región constante de cadena pesada humanizada de C2.

SEQ ID NO: 27.- Secuencia de aminoácidos de la Región Variable de la Cadena Ligera de C2 de Ratón.

SEQ ID NO: 28.- Secuencia de aminoácidos de la Región Variable de Cadena Pesada de C2 de Ratón.

SEQ ID NO: 29.- Secuencia de nucleótidos de Región Variable de Cadena Ligera de C2 de Ratón.

SEQ ID NO: 30.- Secuencia de nucleótidos de Cadena Ligera de C2 de Ratón.

SEQ ID NO: 31.- Secuencia de nucleótidos de Región Variable de Cadena Pesada de C2 de Ratón.

SEQ ID NO: 32.- Secuencia de nucleótidos de Cadena Pesada de C2 de Ratón.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Los términos “polipéptido”, “péptido”, y “proteína”, como se usa en la presente, son indistintos y se definen como que significan una biomolécula compuesta de aminoácidos enlazados por un enlace peptídico.

Los términos “un”, “una” y “el(la)” como se usan en la presente se definen que significan “uno o más” e incluyen lo plural a menos que el contexto sea inapropiado.

El texto “enfermedades y trastornos que se provocan por o están asociadas con proteínas amiloides o tipo amiloides” incluye, pero no se limita a, enfermedades y trastornos provocados por la presencia o actividad de proteínas tipo amiloide en estado monomérico, de fibrillas o polimérico, o cualquier combinación de los tres. Estas enfermedades y trastornos incluyen, pero no se limitan a, amiloidosis, tumores endócrinos, y degeneración macular.

El término “amiloidosis” se refiere a un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placas amiloides que incluyen, pero no se limitan a, amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada a la edad tal como enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos tal como Enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de capacidad de memoria cognitiva tal como por ejemplo, deterioro cognitivo moderado (MCI), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Holandés); complejo de Parkinson-demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan en o están asociadas con proteínas tipo amiloide tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada a VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (IBM), Diabetes de Comienzo en Adulto; amiloide cardiaca senil, así como enfermedades del ojo que incluyen degeneración macular, neuropatía óptica relacionada a gránulos, y cataratas debidas a depósitos beta-amiloides.

Los términos “que detecta” o “detectado” como se usan en la presente significan el uso de técnicas conocidas para la detección de moléculas biológicas tal como métodos inmunoquímicos o histológicos y se refieren a determinar de manera cualitativa o cuantitativa la presencia o concentración de la biomolécula bajo investigación.

“Amiloide soluble polimérico” se refiere a múltiples monómeros agregados de péptidos amiloides, o de péptidos tipo amiloide, o de péptidos amiloides modificados o truncados o de otros derivados de péptidos amiloides que forman estructuras oligoméricas o poliméricas que son solubles en el mamífero o cuerpo humano, más particularmente en el cerebro, pero particularmente a múltiples monómeros agregados de amiloide β (Aβ) o de péptidos amiloides β (Aβ) modificados o truncados o de derivados de los mismos, que son solubles en el cuerpo de mamífero o humano, más particularmente en el cerebro.

“Amiloide β, Aβ o β-amiloide” es un término reconocido en la técnica y se refiere a proteínas y péptidos amiloides β, proteína precursora amiloide β (APP), así como a modificaciones, fragmentos y equivalentes funcionales de los mismos. En particular, por amiloide β como se usa en la presente se quiere decir cualquier fragmento producido por escisión proteolítica de APP pero especialmente aquellos fragmentos que están comprendidos en o están asociados con patologías de amiloides que incluyen, pero no se limitan a, $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$, $A\beta_{1-42}$ y $A\beta_{1-43}$.

La estructura y secuencias de los péptidos amiloides β como se menciona anteriormente es bien conocida por los expertos en la técnica y los métodos para producir estos péptidos o para extraerlos del cerebro y

otros tejidos se describen, por ejemplo, en Glenner y Wong, Biochem Biophys Res Comm 129, 885-890 (1984). Además, los péptidos amiloides β también están comercialmente disponibles en varias formas.

Por “aislado” se quiere decir una molécula biológica libre de al menos algunos de los componentes con los cuales se presenta de manera natural.

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

Como se usa en la presente, “se une de manera específica” con referencia a un anticuerpo significa que el anticuerpo se une a su antígeno objetivo con mayor afinidad que lo que lo hace a un antígeno estructuralmente diferente.

Se sabe que una unidad estructural típica de inmunoglobulina comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, cada par que tiene una cadena “ligera” (aproximadamente 25 kD) y una cadena “pesada” (aproximadamente 50-70 kD). El N-término de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 ó más aminoácidos, principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren respectivamente a las cadenas ligera y pesada.

Los anticuerpos existen como anticuerpos intactos de longitud completa o como varios fragmentos bien caracterizados producidos por la digestión con varias peptidasas o productos químicos. De esta manera, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por abajo de los enlaces de disulfuro en la región de articulación para producir $F(ab')_2$, un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera unida a V_H-CH_1 por un enlace de disulfuro. El $F(ab')_2$ se puede reducir bajo condiciones moderadas para romper el enlace de disulfuro en la región de articulación, convirtiendo de este modo el dímero $F(ab')_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un fragmento Fab con parte de la región de articulación (ver, Fundamental Immunology, W. E. Paul, Ed., Raven Press, N.Y. (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpo). En tanto que se definen varios fragmentos de anticuerpo en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto en la técnica apreciará que se puede sintetizar cualesquiera de una variedad de fragmentos de anticuerpo, de novo ya sea de manera química o al utilizar metodología de ADN recombinante. De esta manera, el término anticuerpo, como se usa en la presente también incluye fragmentos de anticuerpo ya sea producidos por la modificación de anticuerpos enteros o sintetizados de novo o anticuerpos y fragmentos obtenidos al usar metodologías de ADN recombinante.

Se proponen los “anticuerpos” dentro del alcance de la presente invención para que incluyan anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos quiméricos, de cadena individual, biespecíficos, simianizados, humanos y humanizados así como fragmentos activos de los mismos. Los ejemplos de fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos incluyen cadenas ligeras y pesadas separadas, fragmentos Fab, Fab/c, Fv, Fab' y $F(ab')_2$, incluyendo los productos de una biblioteca de expresión de inmunoglobulina de Fab y los fragmentos de unión a epítopo de cualesquiera de los anticuerpos y fragmentos mencionados anteriormente.

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

Los anticuerpos producidos de manera recombinante pueden ser anticuerpos convencionales de longitud completa, fragmentos activos de anticuerpo conocidos de digestión proteolítica, fragmentos únicos activos

de anticuerpo tal como Fv o Fv de cadena individual (scFv), anticuerpos suprimidos de dominios, y similares. Un anticuerpo de Fv es de aproximadamente 50 Kd de tamaño y comprende las regiones variables de la cadena ligera y pesada. Un polipéptido de Fv de cadena individual ("scFv") es un heterodímero VH::VL covalentemente enlazado que se puede expresar de un ácido nucleico que incluye secuencias que codifican para VH y VL ya sea unidas de manera directa o unidas por un ligador que codifica para péptidos. Ver Huston, et al. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883. Varias estructuras para convertir las cadenas de polipéptido ligera y pesada, naturalmente agregadas, pero químicamente separadas, de una región V de anticuerpo en una molécula scFv que se plegará en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión a antígeno. Ver, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos números 5,091,513, 5,132,405 y 4,956,778.

El sitio de combinación se refiere a la parte de una molécula de anticuerpo que participa en la unión al antígeno. El sitio de unión a antígeno se forma por residuos de aminoácido de las regiones variables ("V") N-terminales de las cadenas pesada ("H") y ligera ("L"). Las regiones variables de anticuerpo comprenden tres tramos altamente divergentes referidos como "regiones hipervariables" o "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) que se interponen entre tramos de flanqueo más conservados conocidas como "regiones menos variables" (FR). En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) están colocadas con relación una a la otra en el espacio tridimensional para formar una superficie o cavidad de unión a antígeno. Por lo tanto, el sitio de combinación de anticuerpo representa los aminoácidos que constituyen las CDR de un anticuerpo o cualquier residuo de regiones menos variables que constituyan la cavidad del sitio de unión.

La identidad de los residuos de aminoácido en un anticuerpo particular que constituyen el sitio de combinación, se puede determinar usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden identificar CDR de anticuerpo como las regiones hipervariables originalmente definidas por Kabat et al. (ver, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", E. Kabat et al., U.S. Department of Health and Human Services; Johnson, G y Wu, TT (2001) Kabat Database and its applications: future directions. Nucleic Acids Research, 29: 205-206; http://immuno.bme.nwa.edu). Las posiciones de las CDR también se pueden identificar como las estructuras de asa estructural originalmente descritas por Chothia y otros, (ver Chothia y Les, J. Mol. Biol. 196, 901 (1987); Chothia et al., Nature 342, 877 (1989), y Tramontano et al., J. Mol. Biol. 215, 175 (1990)). Otros métodos incluyen la "definición de AbM" que es un compromiso entre Kabat y Chothia y se deriva usando el software de modelado de anticuerpos Oxford Molecular AbM (ahora Accelrys) o la "definición de contacto" de las CDR por Macallum et al., ("Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography", J Mol Biol. 1996 Oct 11; 262(5):732-45). Las siguientes gráficas identifican a las CDR en base a varias definiciones conocidas.

Asa	Kabat	AbM	Chothia	De contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32…34	H30-H35B
(Numeración de Kabat)				
H1	H31-H35	H26-H35	H-26-H32	H30-H35
(Numeración de Chothia)				
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102	H93-H101

Las guías generales por las cuales se pueden modificar las CDR en un anticuerpo de la secuencia sola son como sigue:

LCDR1:

Inicio.- Aproximadamente residuo 24.

Residuo anterior es siempre una Cys.

Residuo posterior es siempre Trp. Típicamente, TRP se sigue por TYR-GLN, pero siempre se puede seguir por LEU-GLN, PHE-GLN, o TYR-LEU.

Longitud es de 10 a 17 residuos.

LCDR2:

Inicio.- 16 residuos después del final de L1.

Secuencia antes en general es ILE-TYR, pero también puede ser VAL-TYR, ILE-LYS, o ILE-PHE.

Longitud en general es de 7 residuos.

LCDR3:

Inicio.- En general 33 residuos después del final de L2.

Residuo antes es una Cys.

Secuencia después es PHE-GLY-X-GLY.

Longitud es 7 a 11 residuos.

HCDR1:

Inicio.- En aproximadamente residuo 26 (cuatro residuos después de una CYS) [definición Chothia/AbM] Definición de Kabat inicia 5 residuos posterior.
Secuencia antes es CYS-X-X-X.
Residuos después es un TRP, típicamente seguido por VAL, pero también seguido por ILE, o ALA.
Longitud es de 10 a 12 residuos bajo definición de AbM en tanto que la definición de Chothia excluye los últimos 4 residuos.

HCDR2:

Inicio.- 15 residuos después del final de la definición de Kabat/AbM de CDR-H1.
Secuencia antes es típicamente LEU-GLU-TRP-ILE-GLY (SEQ ID NO: 1), pero son posibles varias variaciones.
Secuencia después es LYS/ARG-LEU/ILE/VAL/PHE/THR/ALA-THR/SER/ILE/ALA.
Longitud es de 16 a 19 residuos bajo definición de Kabat (definición de AbM termina 7 residuos antes).

HCDR3:

Inicio.- 33 residuos después del final de CDR-H2 (dos residuos después de una CYS).
Secuencia antes es CYS-X-X (típicamente CYS-ALA-ARG).
Secuencia después es TRP-GLY-X-GLY.
Longitud es de 3 a 25 residuos.

La identidad de los residuos de aminoácido es un anticuerpo particular que están fuera de las CDR, pero sin embargo constituyen parte del sitio de combinación al tener una cadena lateral que es parte del forro del sitio de combinación (es decir, está disponible para enlace a través del sitio de combinación), se puede determinar usando métodos bien conocidos en la técnica tal como modelado molecular y cristalografía por rayos X. Ver, por ejemplo, Riechmann et al., (1988) Nature, 332::323-327.

Los anticuerpos quiméricos son aquellos en los cuales una o más regiones del anticuerpo son de una especie de animal y una o más regiones del anticuerpo son de una especie diferente de animal. Un anticuerpo quimérico preferido es uno que incluye regiones de una inmunoglobulina de primate. Un anticuerpo quimérico para uso clínico en humanos se entiende típicamente que tiene regiones variables de un animal no humano, por ejemplo, un roedor, con las regiones constantes de un humano. En contraste, un anticuerpo humanizado usa las CDR del anticuerpo no humano con la mayoría o todas las regiones menos variables de, y todas las regiones constantes de, una inmunoglobulina humana. Típicamente, se entiende que un anticuerpo quimérico humano tiene las regiones variables de un roedor. Un anticuerpo quimérico, humano, típico tiene regiones constantes, pesadas, humanas y regiones constantes, humanas de cadena ligera con las regiones variables tanto de lo pesado como de lo ligero que vienen de un anticuerpo de roedor. Un anticuerpo quimérico puede incluir algunos cambios a una secuencia nativa de aminoácidos de las regiones constantes humanas y la secuencia nativa de región variable de roedor. Se pueden preparar anticuerpos quiméricos y humanizados por métodos bien conocidos en la técnica que incluyen planteamientos de injerto de CDR (ver, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos números 5,843,708; 6,180,370; 5,693,762; 5,585,089; 5,530,101), estrategias de trasposición de cadenas (ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos número 5,565,332; Rader et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95:8910-8915), estrategias de modelado molecular (patente de los Estados Unidos número 5.639.641), y similares.

Un “anticuerpo humanizado” como se usa en la presente en el caso de un anticuerpo de dos cadenas es uno donde se humaniza al menos una cadena. Una cadena de anticuerpo humanizado tiene una región variable donde una o más de las regiones menos variables son humanas. Un anticuerpo humanizado que es una cadena individual es uno donde la cadena tiene una región variable donde una o más de las regiones menos variables son humanas. Las porciones no humanas de la región variable de la cadena de anticuerpo humanizado o fragmento de la misma, se derivan de una fuente no humana, particularmente un anticuerpo no humano, típicamente de origen de roedor. La contribución no humana al anticuerpo humanizado se proporciona típicamente en la forma de al menos una región CDR que se intercala entre las regiones menos variables derivadas de una (o más) inmunoglobulina(s) humana(s). Además, los residuos de soporte de regiones menos variables se pueden alterar para conservar la afinidad de unión.

El anticuerpo humanizado puede comprender además regiones constantes (por ejemplo, al menos una región constante o porción de la misma, en el caso de una cadena ligera, y de manera preferente tres regiones constantes en el caso de una cadena pesada). Las regiones constantes de un anticuerpo humanizado si está presente en general son humanas.

Los métodos para obtener “anticuerpos humanizados” son bien conocidos por los expertos en la técnica. (Ver, por ejemplo, Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)).

Un “anticuerpo humanizado” también se puede obtener por un nuevo planteamiento de ingeniería genética que permite la producción de anticuerpos policlonales tipo humano madurados por afinidad en animales grandes tal como por ejemplo, conejos y ratones. Ver, por ejemplo, la patente de los Estados

Unidos número 6,632,976.
[*secciones reemplazadas aquí con definiciones anteriores].

El término región constante (CR) como se usa en la presente se refiere a genes de regiones constantes de la inmunoglobulina. Los genes de regiones constantes codifican para la porción de la molécula de anticuerpo que confiere funciones efectoras. Para anticuerpos humanos quiméricos y anticuerpos humanizados, típicamente no humanos (por ejemplo, murinos), las regiones constantes se sustituyen por regiones constantes humanas. Las regiones constantes de los anticuerpos quiméricos o humanizados típicamente se derivan de inmunoglobulinas humanas. La región constante de cadena pesada se puede seleccionar de cualquiera de los cinco isotipos: alfa, delta, épsilon, gamma o mu. Adicionalmente, las cadenas pesadas de las varias sub-clases (tal como las sub-clases de IgG de cadenas pesadas) son responsables de las diferentes funciones efectoras y de esta manera, al elegir la región constante de cadena pesada deseada, se pueden producir anticuerpos con la función efectora deseada. Las regiones constantes que se pueden usar dentro del alcance de esta invención son gamma 1 (IgG1), particularmente una región Fc del isotipo gamma 1 (IgG1), gamma 3 (IgG3) y especialmente gamma 4 (IgG4). La región constante de cadena ligera puede ser del tipo kappa o lambda, preferentemente del tipo kappa. En una modalidad, la región constante de cadena ligera es la cadena constante kappa, humana (Heiter et al., (1980) Cell 22:197-207) y la cadena constante pesada es la cadena constante IgG4 humana.

El término “región Fc” se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina. La “región Fc” puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. Aunque pueden variar los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina, la región Fc de cadena pesada de IgG humana usualmente se define para abarcar desde un residuo de aminoácido a la posición Cys226, o desde Pro230, al carboxil-término de la misma. La región Fc de una inmunoglobulina comprende en general dos dominios constantes, CH2 y CH3.

Una “región Fc funcional” posee una “función efectora” de una región Fc de secuencia nativa. Las “funciones efectoras” de ejemplo incluyen la unión de Clq; citotoxicidad dependiente de complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; reducción de la expresión de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR); etc. Estas funciones efectoras requieren en general que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y se puede valorar usando varios ensayos como se describe en la presente, a manera de ejemplo. Una región Fc funcional incluye en general dos polipéptidos que contienen cadenas pesadas CH2 y CH3 que están en asociación.

Una “región Fc de secuencia nativa” comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza de variantes que se presentan de manera natural de la misma.

Una “región Fc variante” comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de aquella de una región Fc de secuencia nativa por virtud de al menos una “modificación de aminoácido” como se define en la presente. De manera preferente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación a una región Fc de secuencia nativa o a la región Fc de un polipéptido de origen, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácido, y de manera preferente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácido en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido de origen. La región Fc variante poseerá de manera preferente en la presente al menos aproximadamente 80% de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido de origen, y de manera más preferente al menos aproximadamente 90% de homología con la misma, de manera más preferente al menos aproximadamente 95% de homología con la misma.

Una “modificación de aminoácido” se refiere a un cambio en la secuencia de aminoácidos de una secuencia predeterminada de aminoácidos. Las modificaciones de ejemplo incluyen una sustitución, inserción y/o supresión de aminoácido. La modificación preferida de aminoácido en la presente es una sustitución.

Una “modificación de aminoácido en” una posición especificada, por ejemplo, de la región Fc, se refiere a la sustitución o supresión del residuo especificado, o a la inserción de al menos un residuo de aminoácido adyacente al residuo especificado. Por inserción “adyacente” a un residuo especificado se quiere decir inserción dentro de uno o dos residuos del mismo. La inserción puede ser N-terminal o C-terminal al residuo especificado.

Una “sustitución de aminoácido” se refiere al reemplazo de al menos un residuo existente de aminoácido en una secuencia predeterminada de aminoácidos con otro diferente residuo de aminoácido “de reemplazo”. El residuo o residuos de reemplazo pueden ser “residuos de aminoácido que se presenta de

manera natural" (es decir, codificados por el código genético) y seleccionado del grupo que consiste de: alanina (Ala); arginina (Arg); asparagina (Asn); ácido aspártico (Asp); cisteína (Cys); glutamina (Gln); ácido glutámico (Glu); glicina (Gly); histidina (His); Isoleucina (Ile); leucina (Leu); lisina (Lys); metionina (Met); fenilalanina (Phe); prolina (Pro); serina (Ser); treonina (Thr); triptofano (Trp); tirosina (Tyr); y valina (Val). De manera preferente, el residuo de reemplazo no es cisteína. La sustitución con uno o más residuos de aminoácido que no se presentan de manera natural también se abarca por la definición de una sustitución de aminoácido en la presente.

Un "residuo de aminoácido que no se presenta de manera natural" se refiere a un residuo, diferente de aquellos residuos de aminoácido que se presentan de manera natural, listados anteriormente, que es capaz de unirse covalentemente a residuos adyacentes de aminoácidos en una cadena de polipéptido. Los ejemplos de residuos de aminoácidos que no se presentan de manera natural incluyen norleucina, ornitina, norvalina, homoserina y otros análogos de residuos de aminoácido tal como aquellos descritos en Ellman et al., Meth. Enzym. 202:301-336 (1991). Para generar estos residuos de aminoácido que no se presentan de manera natural, se pueden usar los procedimientos de Noren et al. Science 244:182 (1989) y Ellman et al., supra. De forma concisa estos procedimientos comprenden activar químicamente un ARNt supresor con un residuo de aminoácido que no se presente da manera natural seguido por trascripción y traducción *in vitro* del ARN.

Una "inserción de aminoácidos" se refiere a la incorporación de al menos un aminoácido en una secuencia predeterminada de aminoácidos. En tanto que la inserción consistirá usualmente de la inserción de uno o dos residuos de aminoácido, la presente solicitud contempla "inserciones peptídicas" más grandes por ejemplo, inserción de aproximadamente tres a aproximadamente cinco o aún hasta aproximadamente diez residuos de aminoácido. Los residuos insertados pueden ser que se presente de manera natural o que no se presente de manera natural como se describe anteriormente.

Una "supresión de aminoácido" se refiere a la remoción de al menos un residuo de aminoácido de una secuencia predeterminada de aminoácidos.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refieren a una forma de citotoxicidad en la cual el anticuerpo segregado unido al antígeno objetivo expresado por las células objetivo se reconoce por receptores de Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo células Aniquiladoras Naturales (NK), neutrófilo, y macrófagos) que permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan de manera específica para reconocer la célula objetivo revestida con anticuerpo y aniquilen de manera subsiguiente la célula objetivo con citotoxina. Las células primarias para mediar la ADCC, células NK, expresan FcγRIII únicamente, en tanto que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y Fcγ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resumen en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Para valorar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC in vitro, tal como aquel descrito en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,500,362 ó 5,821,337. Las células efectoras útiles para estos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células Aniquiladoras Naturales (NK). De manera alternativa, o adicionalmente, se puede valorar in vivo la actividad de ADCC de la molécula de interés, por ejemplo, en un modelo de animal tal como aquel descrito en Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998).

Las "células efectoras inmunitarias" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. De manera preferente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que medían ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células aniquiladoras naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; con las PBMC y las células NK que son las preferidas. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo, de sangre o PBMC como se describe en la presente.

"La citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a lisis dependiente de complemento de una célula objetivo que se ha unido por anticuerpo reactivo con antígeno expresado por la célula objetivo. La activación de la ruta clásica de complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que se unen a su antígeno cognado. Para valorar la activación de complemento se puede realizar un ensayo de CDC, por ejemplo como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996).

Un polipéptido con una Fc variante de IgG con afinidad "alterada" de unió a FcR o actividad de ADCC es uno que tienen ya sea actividad mejorada o reducida de unión de FcR (FcγR o FcRn) y/o actividad de ADCC en comparación a un polipéptido de origen o un polipéptido que comprende una región Fc de secuencia nativa. La Fc variante que "exhibe unión incrementada" a un FcR se une al menos a un FcR con mejor afinidad que el polipéptido de origen. La mejora en la unión en comparación a un polipéptido de origen puede ser aproximadamente 3 veces, de manera preferente aproximadamente 5, 10, 25, 50, 60, 100, 150, 200, hasta 500 veces, o aproximadamente 25 % a 1000 % de mejora en la unión. La variante de

polipéptido que “exhibe unión disminuida” a FcR, se une al menos un FcR con peor afinidad que un polipéptido de origen. La disminución en la unión en comparación a un polipéptido de origen puede ser de aproximadamente 40 % o más disminución en la unión. Estas variantes de Fc que presentan unión disminuida a un FcR pueden poseer poca o ninguna unión apreciable a un FcR, por ejemplo, 0-20 % de unión al FcR en comparación a la región Fc de IgG de secuencia nativa, por ejemplo como se determina en los Ejemplos de la presente.

El polipéptido que comprende una Fc variante que “exhibe ADCC incrementada” o media la citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) en la presencia de células efectoras humanas más efectivamente que un polipéptido que tiene Fc de IgG tipo silvestre es una que vitro o in vivo es sustancialmente más efectiva en mediar la ADCC, cuando las cantidades de polipéptido con región Fc variante y el polipéptido con región Fc tipo silvestre usadas en el ensayo son esencialmente las mismas (todos los otros factores que son iguales). En general estas variantes se identificaran usando un ensayo de ADCC in vitro, pero se contemplan otros ensayos o métodos para determinar la ADCC, por ejemplo en un modelo de animal, etc. La variante preferida es de aproximadamente 5 veces a aproximadamente 100 veces, por ejemplo de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 veces, más efectiva en mediar la ADCC que la Fc tipo silvestre.

El término “anticuerpo monoclonal” también es bien reconocido en la técnica y se refiere a un anticuerpo que es el producto de una célula individual clonada productora de anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen típicamente al fusionar una célula B productora de anticuerpos, normalmente de vida corta, a una célula de crecimiento rápido, tal como una célula de cáncer (algunas veces referida como una célula “inmortal”). La célula híbrida resultante o hibridoma, se multiplica rápidamente creando un clon que produce el anticuerpo.

Para el propósito de la presente invención, el “anticuerpo monoclonal” también se va a entender que comprende anticuerpos que se producen por un clon madre no alcanzado monoclonalidad completa.

“Anticuerpo funcionalmente equivalente" se entiende dentro del alcance de la presente invención que se refiere a un anticuerpo que comparte sustancialmente al menos una propiedad funcionalmente principal con un anticuerpo mencionado anteriormente y descrito en la presente, que comprende: especificidad de unión a la proteína β-amiloide, particularmente a la proteína A$\beta_{1\text{-}42}$, y de manera más particular a la región de epítopo 16-21 de la proteína A$\beta_{1\text{-}42}$, inmunoreactividad in vitro, inhibición de la agregación de los monómeros A$\beta_{1\text{-}42}$ en fibrillas poliméricas de alto peso molecular y/o desagregación de fibrillas poliméricas A$\beta_{1\text{-}42}$ preformadas, y una propiedad de interrupción de β-hoja y alivio de los efectos de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placas amiloide que incluye amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada a la edad tal como enfermedades que incluyen pero no se limitan a, trastornos neurológicos tal como enfermedad de Alzheimer (AD), Demencia por cuerpo de Lewy, Síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Holandés); complejo de Parkinson-Demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan en muestras asociados con proteínas tipo amiloide tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada a VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), Diabetes de Comienzo en Adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endrocrinos y otros incluyen degeneración macular, cuando se administran de manera profiláctica o terapéuticamente. Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase tal como IgG, IgM, o IgA, etc o cualquier subclase tal como IgG1, IgG2a, etc y otras subclases mencionadas anteriormente en la presente conocidas en la técnica, pero particularmente la clase IgG4. Adicionalmente, los anticuerpos se pueden producir por cualquier método, tal como visualización en fagos, o producidos en cualquier organismo o línea célula, incluyendo bacterias, insectos, mamíferos u otros tipos de células o líneas celulares que producen anticuerpos con características deseadas, tal como anticuerpos humanizados. Los anticuerpos también se pueden formar al combinar una porción Fab y una región Fc de diferentes especies.

El término “hibridar” como se usa se refiere a condiciones convencionales de hibridación, preferentemente a condiciones de hibridación en las cuales se usa 5xSSPE, 1 % SDS, solución 1x Denhardts como una solución y/o temperaturas de hibridación están entre 35°C y 70°C, de manera preferente 65°C. Después de la hibridación, el lavado se lleva a cabo preferentemente primero con 2xSSC, 1 % SDS y subsiguientemente con 0.2xSSC a temperaturas entre 35°C y 70°C, de manera preferente a 65°C (con respecto a la definición de SSPE, SSC y solución Denhardts ver Sambrook et al. loc. cit.). Las condiciones de hibridación severa por ejemplo como se describe en Sambrook et al., supra, son particularmente preferidos. Las condiciones de hibridación severa particularmente preferida están por ejemplo presentes si la hibridación y lavado se presentan a 65°C como se indica anteriormente. Las condiciones de hibridación no severas, por ejemplo con hibridación y lavado que se llevó a cabo a 45°C son menos preferidas y a 35°C aún menos.

“Homología” entre dos secuencias se determina por entidad de secuencia. Si dos secuencias que se van a comparar entre sí difieren en longitud, la identidad de secuencia se refiere de manera preferente al

porcentaje de los residuos de nucleótido de la secuencia más corta que son idénticos con los residuos de nucleótidos de la secuencia más larga. Se puede determinar la identidad de secuencia de manera convencional con el uso de programa de computadora tal como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711). Bestfit utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489, a fin de encontrar el segmento que tiene la identidad más alta de secuencia entre dos secuencias. Cuando se usa Bestfit u otros programa de alineación de secuencias para determinar si una secuencia particular tiene por ejemplo un 95 % de identidad con una secuencia de referencia de la presente invención, los parámetros se ajustan preferentemente de modo que el porcentaje de identidad se calcula sobre la longitud completa de la secuencia de referencia y que se permiten separaciones de homología de hasta 5 % del número total de los nucleótidos en la secuencia de referencia. Cuando se usa Bestfit, los llamados parámetros opcionales se dejan preferentemente en sus valores preajustados ("por defecto"). Las desviaciones que aparecen en la comparación entre una secuencia determinada y las secuencias descritas anteriormente de la invención se pueden provocar por ejemplo por adición, supresión, sustitución, inserción o recombinación. Esta comparación de secuencias también se puede llevar a cabo de manera preferente con el programa "fasta20u66" (version 2.0u66, Septiembre 1998 por William R. Pearson y la University of Virginia; ver también W.R. Pearson (1990), Methods in Enzymology 183, 63-98, ejemplos anexos y http://workbench.sdsc.edu/). Para este propósito se puede usar los ajustes de parámetro "por defecto".

El anticuerpo de acuerdo a la invención puede ser una inmunoglobulina o anticuerpo, que se entiende que tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos (y es multivalente), o en lo alternativo puede ser un "anticuerpo biespecífico" o "bifuncional".

Un "anticuerpo biespecífico" o "bifuncional" es un anticuerpo quimérico artificial que tiene dos diferentes pares de cadena pesada/ligera y dos diferentes sitios de unión. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir por una variedad de métodos que incluyen fusión de hibridomas o enlace de fragmentos Fab'. Ver, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

El término "fragmento" se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende menos residuos de aminoácido que un anticuerpo intacto o completo o cadena de anticuerpo. Se pueden obtener fragmentos mediante tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo intacto completo o cadena pesada de anticuerpo. También se pueden obtener fragmentos por medios recombinantes. Los fragmentos de ejemplo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')2, Fabc y/o Fv. El término "fragmento de unión a antígeno" se refiere a un fragmento de polipéptido de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une al antígeno o compite con el anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacta del cual se derivaron) para la unión al antígeno (es decir, unión específica).

Se producen fragmentos de unión 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 de cadena individual.

"**Fragmento**" también se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos contiguos de aminoácido, al menos 10 residuos contiguos de aminoácido, al menos 15 residuos contiguos de aminoácido, al menos 20 residuos contiguos de aminoácido, al menos 25 residuos contiguos de aminoácido, al menos 40 residuos contiguos de aminoácido, al menos 50 residuos contiguos de aminoácido, al menos 60 residuos contiguos de aminoácido, al menos 70 residuos contiguos de aminoácido, al menos 80 residuos contiguos de aminoácido, al menos 90 residuos contiguos de aminoácido, al menos 100 residuos contiguos de aminoácido, al menos 125 residuos contiguos de aminoácido, al menos 150 residuos contiguos de aminoácido, al menos 175 residuos contiguos de aminoácido, al menos 200 residuos contiguos de aminoácido, o al menos 250 residuos contiguos de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido. En una modalidad específica, un fragmento de un polipéptido retiene al menos una función de polipéptido.

El término "antígeno" se refiere a una entidad o fragmento de la misma que puede unirse a un anticuerpo. Un inmunógeno se refiere a un antígeno que puede producir a una respuesta inmunitaria en un organismo, particularmente un animal de manera más particular un mamífero incluyendo un humano. El término antígeno incluye regiones conocidas como determinantes antigénicos o epítopos que se refiere a una porción del antígeno (que se ponen en contacto o que juegan un papel significativo en el soporte de que un contacto reside en el antígeno responsable de la antigenicidad o determinantes antigénicos.

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

También como se usa en la presente, el término "inmunogénico" se refiere a sustancias que provocan la

producción de anticuerpos, células T y otras células inmunitarias reactivas dirigidas contra un antígeno del inmunógeno.

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

El término inmunogenicidad como se usa en la presente se refiere a una medida de la capacidad de un antígeno para producir una respuesta inmunitaria (humoral o celular) cuando se administra a un receptor. La presente invención se relaciona con planteamientos que reducen a imunogenecidad de los presentes anticuerpos quiméricos humanos o humanizados.

El anticuerpo humanizado de inmunogenicidad reducida se refiere a un anticuerpo humanizado que exhibe inmunogenicidad reducida con relación al anticuerpo de origen, por ejemplo, el anticuerpo murino.

El anticuerpo humanizado que retiene sustancialmente las propiedades de unión del anticuerpo de origen se refiere a un anticuerpo humanizado que retiene la capacidad para unirse de manera específica al antígeno reconocido por el anticuerpo de origen usado para producir este anticuerpo humanizado. De manera preferente, el anticuerpo humanizado exhibirá la misma o sustancialmente la misma afinidad de unión al antígeno y la misma avidez como el anticuerpo de origen. De manera ideal, la afinidad del anticuerpo no será menor de 10 % de la afinidad del anticuerpo de origen, de manera más preferente no menor que aproximadamente 30 %, y de manera más preferente la afinidad no será menor que 50 % del anticuerpo de origen. Son bien conocidos en la técnica los métodos para valorar la afinidad de unión al antígeno e incluyen ensayos de unión medio-máximos, ensayos de competición y análisis de Scatchard. Los ensayos adecuados de unión al antígeno se describen en esta solicitud.

Una “retro-mutación” es una mutación introducida en una secuencia de nucleótidos que codifica para un anticuerpo humanizado, la mutación da por resultado un aminoácido que corresponde a un aminoácido en el anticuerpo de origen (por ejemplo, anticuerpo donador, por ejemplo, un anticuerpo murino). Ciertos residuos de regiones menos variables del anticuerpo de origen se pueden detener mediante la humanización de los anticuerpos de la invención a fin de detener de manera sustancial las propiedades de unión del anticuerpo de origen, en tanto que al mismo tiempo se reduce al mínimo la inmunogenicidad potencial del anticuerpo resultante. Tal como se describe en esta memoria, el anticuerpo de origen es de origen de ratón. Por ejemplo, la retro-mutación cambia un residuo de región menos variable humana a un residuo murino de origen. Los ejemplos de residuo de región menos variable que se pueden retro-mutar incluyenresiduos canónicos, residuos de empaque de interconexión, residuos de origen inusuales que están cerca al sitio de unión, residuos en la “Zona Vernier” (que forma una plataforma en la cual descansa la CDR) (Foote & Winter, 1992, J. Mol. Biol. 224, 487-499), y aquellos cercanos a CDR H3.

Como se usa en la presente, un “cambio conservador” se refiere a alteraciones que son sustancialmente neutrales de forma conformacional o antigénica, que producen cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o que produce cambios mínimos en los determinantes antigénicos de los polipéptidos mutantes, respectivamente, en comparación a la proteína nativa. Cuando se refiere a los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo descritos en esta memoria, un cambio conservador significa una sustitución de aminoácidos que no vuelve al anticuerpo incapaz de unirse al presente receptor. Aquellos expertos en la técnica serán capaces de predecir que sustituciones de aminoácido se pueden producir en tanto que mantengan una alta probabilidad de ser conformacionalmente y antigénicamente neutrales. Está guía se proporciona, por ejemplo, en Berzofsky, (1985) Science 229:932-940 y Bowie et al. (1990) Science 247: 1306-1310. Los factores que se van a considerar que afectan probabilidad de mantener neutralidad conformacional y antigénica incluyen, pero no se limitan a: (a) la sustitución de aminoácidos hidrófobos es menos probable que afecte la antigenicidad debido a que los residuos hidrófobos son menos probable que estén localizados en el interior de una proteína; (b) la sustitución de aminoácidos fisicoquímicamente similares es menos probable que afecte la conformación debido a que el aminoácido sustituido imita de manera estructural el aminoácido nativo; y (c) la alteración de secuencias evolutivamente conservadas es menos probable que afecte de manera adversa la conformación puesto que esta conservación sugiere que las secuencias de aminoácidos pueden tener importancia funcional. Un experto en la técnica será capaz de valorar las alteraciones en la conformación de proteínas usando ensayos bien conocidos, tal como, pero no limitado a métodos de fijación de microcomplementos (Wasserman et al. (1961) J. Immunol. 87:290-295; Levine et al. (1967) Meth. Enzymol. 11:928-936) y a través de estudios de unión usando anticuerpos monoclonales dependientes de la conformación (Lewis et al. (1983) Biochem. 22:948-954).

Adicionalmente, el término “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de anticuerpo que, cuando se administra un humano o animal, es suficiente para dar por resultado un efecto terapéutico en el humano o animal. La cantidad efectiva se determina fácilmente por un experto en la técnica siguiendo procedimientos de rutina.

Como se usa en la presente, los términos “tratar”, “prevenir”, “que previenen”, “prevención” se refieren a la prevención de la recurrencia o comienzo de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto que resultan de la administración de un agente profiláctico o terapéutico.

Construcción de Anticuerpos Humanizados

Se describen en esta memoria nuevos métodos y composiciones que comprenden anticuerpos altamente específicos y altamente efectivos que tienen la capacidad de reconocer y unirse de manera específica a epítopos específicos de una variedad de antígenos β-amiloides. Los anticuerpos habilitados por la enseñanza de la presente invención son particularmente útiles para el tratamiento de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placas amiloides que incluye amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada a la edad, que incluye trastornos neurológicos tal como enfermedad de Alzheimer (AD), demencia por cuerpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Holandés); el complejo de Parkinson-Demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan en muestras asociadas con proteínas tipo amiloide tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld-Jacob, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis tipo holandés; enfermedad de Parkinson, demencia relacionada a VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), Diabetes de Comienzo en Adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endrocrinos y otros incluyen degeneración macular, por nombrar solo unos pocos.

Una región variable completamente humanizada o reformada de acuerdo a la presente invención se puede crear dentro del alcance de la invención al diseñar primero una secuencia de aminoácidos de región variable que contiene CDR no humanas derivadas particularmente de roedor, pero especialmente CDR derivadas del anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2 (llamado “mC2” a todo lo largo de la solicitud y depositado el 01 Diciembre de 2005 con la “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1B, 38124 Branuschweig, bajo las provisiones del Tratado de Budapest y acceso dado no. DSM ACC2750) incrustado en secuencias de regiones menor variables derivadas de humano. La CDR no de humano, particularmente derivadas de roedor, que se pueden obtener del anticuerpo de acuerdo a la presente invención, proporcionan la especificidad deseada. Por consiguiente, estos residuos se van a incluir en el diseño de la región variable reformada, esencialmente sin cambio. Cualquiera de las modificaciones se debe restringir de esta manera a un mínimo y se observa cercanamente los cambios en la especificidad y afinidad del anticuerpo. Por otra parte, los residuos de regiones menos variables en teoría se pueden derivar de cualquier región variable humana.

A fin de crear un anticuerpo reformado que muestre una afinidad afectable o aún mejorada, una secuencia de región menos variable humana se debe elegir, que sea igualmente adecuada para crear una región variable reformada y para retener la afinidad del anticuerpo.

A fin de lograr este objetivo, se desarrolló la estrategia de mejor ajuste. Como se sabe que las secuencias de región menos variable sirven para retener las CDR en la orientación espacial correcta para interacción con el antígeno, y que los residuos de región menos variable pueden participar aún algunas veces en la unión al antígeno, estrategia tiene como finalidad reducir al mínimo los cambios que pueden afectar negativamente la estructura tridimensional del anticuerpo al derivar la secuencia de región menos variable humana, usada para la reformación de anticuerpo de la región variable humana que es más homóloga o similar a la región variable no humana, particularmente derivada del roedor. También esto aumentará al máximo la probabilidad que se retendrá la afinidad en el anticuerpo reformado.

A su nivel más simple, la estrategia de “mejor ajuste” comprende comparar la región V de roedor, donadora, con todas las secuencias de aminoácidos de región V humanas conocidas, y luego seleccionar la más homóloga para proporcionar las regiones menos variables aceptadoras para los ejercicios de humanización. En realidad, hay varios factores diferentes que se deben considerar, y que pueden tener influencia en la selección final de las selecciones menos variables aceptadoras. Se pueden usar predicciones por modelado molecular, a este respecto, antes de cualquier trabajo experimental en un intento para aumentar al máximo la afinidad del anticuerpo reformado resultante. Esencialmente, el objetivo del modelado es predecir que residuos clave “si los hay” de la región menos variable humana, más homóloga se deben dejar como en el roedor para obtener la mejor afinidad en el anticuerpo reformado.

Tal como se describe en esta memoria, las CDR se pueden obtener del anticuerpo monoclonal de ratón, particularmente del anticuerpo monoclonal de ratón ACI-01-Ab7C2 (nombrado “mC2” a todo lo largo de la solicitud) descrito en la solicitud co-pendiente EP 05 02 7092.5 presentada el 12.12.2005.

Las células de hibridoma FP-12H3-C2, que producen el anticuerpo monoclonal de ratón ACI-01 - Ab7C2 (llamadas “mC2” y hC2 para el anticuerpo C2 humanizado, a todo lo largo de la solicitud) se depositaron

el 01 de Diciembre de 2005 en la solicitud co-pendiente no EP05027092.5 con la “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, bajo las provisiones del Tratado de Budapest y se le dio en no de acceso DSM ACC2750.

El anticuerpo de ratón se puede formular contra una construcción antigénica supra molecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del péptido β-amiloide, particularmente del péptido β-amiloide A$\beta_{1\text{-}15}$, A$\beta_{1\text{-}16}$ y A$\beta_{1\text{-}16(\Delta 14)}$, modificado con una porción hidrófoba tal como por ejemplo, ácido palmítico o una porción hidrófila tal como por ejemplo, polietilenglol (PEG) o una combinación de ambos, en donde la porción hidrófoba e hidrófila, respectivamente, se unen covalentemente a cada uno de los términos del péptido antigénico a través de al menos uno, particularmente uno o dos aminoácidos tal como por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisteína o cualquier otro aminoácido adecuado análogo de aminoácido adecuado capaz de servir como un dispositivo conectador para acoplar la porción hidrófoba e hidrófila al fragmento peptídico. Cuando se usa PEG como la porción hidrófila, los términos de PEG libres se unen covalentemente a fosfatidiletanolamina o cualquier otro compuesto adecuado para funcionar como el elemento de anclaje, por ejemplo, para incrustar la construcción antigénica en la bi-capa de un liposoma.

En particular, un anticuerpo de ratón se puede formular contra una construcción antigénica supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del péptido β-amiloide A$\beta_{1\text{-}16}$ modificado con una porción hidrófila tal como por ejemplo, polietilenglicol (PEG) porción hidrófila que se une de manera covalente a cada uno de los términos del péptido antigénico a través de al menos uno, particularmente uno o dos aminoácidos de tal forma que por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisteína o cualquier otro aminoácido adecuado o análogo de aminoácido adecuado capaz de servir como un dispositivo conectador para acoplar la porción hidrófoba e hidrófila al fragmento peptídico. Cuando se usa PEG como la porción hidrófila, los términos de PEG libres se unen covalentemente a fosfatidiletanolamina o cualquier otro compuesto adecuado para funcionar como el elemento de anclaje, por ejemplo, para incrustar la construcción antigénica en la bi-capa de un liposoma.

Se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende en la región variable al menos una CDR de origen no humano incrustada en una o más regiones menos variables derivadas de humano o primate y combinada con una región constante derivada de un anticuerpo fuente de humano o primate, anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que es capaz de reconocer y unirse de manera específica al péptido monomérico β-amiloide.

Las CDR contienen los residuos que se unen más probablemente al antígeno y se deben retener en el anticuerpo reformado. Las CDR se definen por la secuencia de acuerdo a Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5ta Edición, The United States Department of Health and Human Services, The United States Government Printing Office, 1991. Las CDR caen en clases canónicas (Chothia et al., 1989 Nature, 342, 877-883) donde los residuos claves determinan en gran grado la conformación estructural de la asa de CDR. Estos residuos casi siempre se retienen en el anticuerpo reformado.

En el proceso para preparar un anticuerpo humanizado de acuerdo a la invención, las secuencias de aminoácido de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de C2 (V_H y V_k) se comparan a las secuencias V_H y V_κ de anticuerpo de roedor en las bases de datos NCBI y Kabat.

El gen de línea germinal de ratón de mejor correspondencia a C2 V_κ es bb 1, Locus MMU231201, (Schable et al., 1999). Una comparación revela que dos aminoácidos difieren de esta secuencia de línea germinal, ambos localizados en CDRL1. Se pueden encontrar anticuerpos murinos maduros con secuencia similar, pero no idéntica. Varios tienen una CDRL2 idéntica y CDRL3, pero la CDRL1 de C2 parece ser única. La comparación con las secuencias de V_K de línea germinal humana muestra que los genes del subgrupo V_KII son la mejor correspondencia para C2 V_K (Cox et al., 1994). C2 V_K de esta manera se puede asignar a el subgrupo de Kabat MUV_KII.

DPK15 conjuntamente con la región J humana HuJ_K1 se puede seleccionar para proporcionar las secuencias de regiones menos variables aceptadoras de la V_K humanizada.

Los residuos en la entrecara entre las cadenas ligera y pesada variables se han definido (Chothia et al., 1985 J. Mol. Biol, 186, 651-663). Estos usualmente se retienen en el anticuerpo reformado. La Phe en la posición 87 de C2 V_K de ratón es inusual en la entrecara, donde una Tyr es más común en el subgrupo V_KII, indicando que este residuo de región menor variable puede ser importante para la actividad del anticuerpo. Tyr 87 está presente en C2V_K humanizada y de línea germinal humana.

Las secuencias V_K humanizadas de esta manera se pueden diseñar de tal forma que C2HuV_K1 consiste en las CDR de C2 V_K de ratón con regiones menos variables de DPK 15 y J_K1 humana. En una modalidad

específica de la invención, se pueden sustituir residuos murino en la región menos variable humana en las posiciones 45, y/o 87, y/o 50 y/o 53. El residuo 45 puede estar comprendido en el soporte de la conformación de las CDR. El residuo 87 está localizado en la entrecara o interconexión de los dominios V_H y V_K. Por lo tanto, estos residuos pueden ser críticos para el mantenimiento de la unión del anticuerpo.

El gen de línea germinal de ratón de correspondencia más cercana a C2 V_H AF es VH7183, Locus AF 120466, (Langdon et al., 2000). La comparación con las secuencias V_H de línea germinal humana muestran que los genes del subgrupo V_HIII son la mejor correspondencia para C2 V_H. Se puede asignar C2 V_H AF al subgrupo de Kabat MUV$_H$IIID. La secuencia de DP54 junto con la región J humana HuJ_H6 se puede seleccionar para proporcionar las secuencias de regiones menos variables aceptadoras para la V_H humanizada.

La comparación muestra que hay nueve diferencias de aminoácido entre las secuencias V_H de C2 y la secuencia DP54 de línea germinal aceptadora humana y J_H6, la mayoría que se localiza dentro de CDRH2. Se encuentran anticuerpos murinos maduros con CDRH1 idéntica o similar (un residuos diferente) o con CDRH2 similar (un residuo diferente), pero ninguno con tres CDR idénticas a C2 V_H AF. La CDRH3 del anticuerpo C2 es inusualmente corta, que consiste de solo tres residuos. Sin embargo, se encuentran otros anticuerpos en la base de datos con CDRH3 de esta longitud. El residuo 47 de C2 V_H es Leu en lugar del Trp más común, y el residuo 94 es Ser en lugar de la Arg normal, indicando que estos residuos de región menos variable pueden ser importantes para la actividad del anticuerpo.

Se pueden diseñar varias secuencias V_H humanizadas. C2HuVH1 consiste de las CDR C2 VH AF con regiones menos variables de DP54 y HuJ_H6. Se pueden sustituir residuos murinos en la región menos variable humana en las posiciones 47 ó 94 o ambas. El residuo 47 en la región menos variable 2 hace contacto tanto con la CDR como con el dominio V_K. El residuo 94 puede estar comprendido en el soporte de la conformación de las CDR. Por lo tanto, estos residuos pueden ser críticos para el mantenimiento de la unión al anticuerpo.

Se pueden diseñar diferentes regiones de HCVR y LCVR que comprendan la CDR no humanas obtenibles del anticuerpo donador, por ejemplo, un anticuerpo murino, incrustadas en las regiones menos variables nativas o modificadas derivadas de humano o primate. La modificación puede relacionarse particularmente a un intercambio de uno o más residuos de aminoácido dentro de la región menos variable por residuos no humanos, particularmente residuos murino, más comúnmente encontrados en esta posición en los subgrupos respectivos o residuos que tienen propiedades similares a los más comúnmente encontrados en esta posición en los subgrupos respectivos.

La modificación de la región menos variable de las secuencias de las regiones menos variables sirve para retener la CDR en su orientación espacial correcta para interacción con el antígeno, y que los residuos de región menos variable pueden aún participar algunas veces en la unión al antígeno. En una modalidad de la invención, se toman medida para adaptar adicionalmente las secuencias de regiones menos variables, humanas, seleccionadas para hacerlas más similares a las secuencias de las regiones menos variables de roedor a fin de aumentar al máximo la probabilidad que se retendrá la afinidad en el anticuerpo reformado.

Por consiguiente, se pueden sustituir residuos murinos en la región menor variable humana. En particular, se pueden sustituir residuos murinos en la región menos variable humana de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) en las posiciones 47 ó 94 o ambas y en la Región menos Variable humana de la región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) en la posición 45 y/o 87 y/o 50 y/o 53, respectivamente.

Los residuos encontrados en las posiciones indicadas anteriormente en la región menos variable humana se pueden intercambiar por residuos murinos más comúnmente encontrados en esta posición en los subgrupos respectivos. En particular, el Trp en la posición 47 de Kabat en la región menos variable derivada de humano o primate de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en SEQ ID NO: 15 se puede reemplazar por una Leu o por un residuo de aminoácido que tiene propiedades similares y la sustitución del cual conduce a alteraciones que son de manera sustancialmente conformacional o antigénicas neutrales, que producen cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o que producen cambios mínimos en los determinantes antigénicos. En particular, el Trp en la posición 47 de Kabat en la región menos variable derivada de humano o primate de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en SEQ ID NO: 15 se puede reemplazar adicionalmente por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de He, Val, Met, Ala, y Phe, particularmente por Ile. Se pueden contemplar sustituciones conservadoras alternativas que son conformacionalmente y antigénicamente neutrales.

La Arg en la posición 94 de Kabat en la región menos variable derivada de humano o primate de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en SEQ ID NO: 15 se puede reemplazar por Ser o por un residuo de aminoácido que tiene propiedades similares y la sustitución en el cual conduce

alteraciones que son conformacionalmente o antigénicamente neutrales de manera sustancial, produciendo cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produciendo cambios mínimos en los determinantes antigénicos. En particular, la Arg en la posición 94 de Kabat en la región menos variable derivada de humano o primate de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en SEQ ID NO: 15 se puede reemplazar de manera alternativa por Thr.

Alternativamente, ambos residuos se puede reemplazar en el anticuerpo humanizado.

La Gln en la posición 45 de Kabat en la región menos variable derivada de humano o primate de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID NO: 12 se puede reemplazar por Lys o por un residuo de aminoácido que tiene propiedades similares y la sustitución del cual conduce a alteraciones que son conformacionalmente o antigénicamente neutrales de forma sustancial, produciendo cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produciendo cambios mínimos en los determinantes antigénicos. En particular, la Gln en la posición 45 de Kabat en la región menos variable derivada de humano o primate de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID NO: 12 se puede reemplazar por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Arg, Gln, y Asn, particularmente por Arg.

La Leu en la posición 50 de Kabat en la región menos variable derivada de humano o primate de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID NO: 12 se puede reemplazar por Lys o por un residuo de aminoácido que tiene propiedades similares y la sustitución del cual conduce alteraciones que son que son conformacionalmente o antigénicamente neutrales de manera sustancial, produciendo cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produciendo cambios mínimos en los determinantes antigénicos. En particular, la Leu en la posición 50 de Kabat en la región menos variable derivada de humano o primate de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID NO: 12 se puede reemplazar por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Arg, Gln, y Asn, particularmente por Arg.

La Asn en la posición 53 de Kabat en la región menos variable derivada de humano o primate de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID NO: 12 se puede reemplazar por His y Gln o por un residuo de aminoácido que tiene propiedades similares y la sustitución del cual conduce alteraciones que son conformacionalmente o antigénicamente neutrales de manera sustancial, produciendo cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes o produciendo cambios mínimos en los determinantes antigénicos. En particular, la Asn en la posición 53 de Kabat en la región menos variable derivada de humano o primate de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID NO: 12 se puede reemplazar por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Gln, His, Lys y Arg.

La Thr en la posición 87 de Kabat en la región menos variable derivada de humano o primate de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID NO: 12 se puede reemplazar por Phe o por un residuo de aminoácido que tiene propiedades similares y la sustitución del cual conduce a alteraciones que son conformacionalmente o antigénicamente neutrales de manera sustancial, que produce cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o que produce cambios mínimos en los determinantes antigénicos. En particular, la Tyr en la posición 87 de Kabat en la región menos variable derivada de humano o primate de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID NO: 12 se puede reemplazar por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Leu, Val, He, y Ala, particularmente por Leu.

La región variable obtenida de esta manera que comprende al menos una CDR de origen humano incrustada en una o más regiones menos variables derivadas de humano o primate entonces se puede combinar con una región constante derivada de un anticuerpo fuente de humano o primate, particularmente con IgG4 humana o regiones constantes κ, respectivamente. La región constante de IgG4 se puede modificar, por ejemplo, al cambiar Serina en la posición 228 en la región de articulación a Prolina (HuIgG4 Ser-Pro). Esta mutación estabiliza el enlace de disulfuro intercadena e impide la formación de medias moléculas que pueden presentarse en preparaciones de IgG4 humana nativa. La región constante de IgG4 se puede modificar adicionalmente por supresión de la Lys terminal en la posición 439 como se muestra en SEQ ID NO: 16.

Las regiones variables modificadas se pueden construir por el método conocido en la técnica tal como por ejemplo, recombinación con PCR de traslape. Se pueden usar los casetes de expresión para el anticuerpo polimérico, C2 ChV_H AF y C2 ChV_K, como plantillas para mutagénesis de las regiones menos variables a las secuencias menos requeridas. Se sintetizan conjuntos de pares de cebadores mutagénicos, que abarcan las regiones que se van a alterar. Los casetes de expresión de V_H y V_K humanizadas producidos, se pueden clonar en vectores apropiados de clonación conocidos en la técnica tal como por ejemplo, pUC19. Después de que se confirma que la secuencia completa de ADN es la correcta para cada V_H y V_K, los genes de la región V de cadena pesada y ligera, modificados, se pueden

escindir del vector de clonación como casetes de expresión y transferir a vectores apropiados de expresión.

REGIÓN FC MUTANTE

La presente descripción proporciona métodos para producir una variante de polipéptido, particularmente un anticuerpo que comprende una región variante. Este anticuerpo que comprende, por ejemplo, una región Fc variante se puede usar para tratar una enfermedad o trastorno, tal como amiloidosis.

El polipéptido “de origen”, “de inicio” o “no variante” se prepara usando técnicas disponibles para generar polipéptidos que comprenden, por ejemplo, una región Fc. Preferiblemente, el polipéptido de origen es un anticuerpo y los métodos de ejemplo para generar anticuerpos se describen en más detalle en las siguientes secciones. El polipéptido de origen puede ser, sin embargo, cualquier otro polipéptido que comprende una región Fc, por ejemplo, una inmunoadesina. Los métodos para producir inmunoadesina se laboran en más detalle más adelante.

Tal como se describe en esta memoria, una región Fc variante se puede generar de acuerdo a los métodos descritos en la presente y esta “región Fc variante” se puede fusionar a un polipéptido heterólogo de elección tal como un dominio variable de anticuerpo o un dominio de unión de un receptor o ligando.

El polipéptido de origen comprende una región Fc. En general, la región Fc del polipéptido de origen comprenderá una región Fc de secuencia nativa, y de manera preferente una región Fc de secuencia nativa humana. Sin embargo, la región Fc del polipéptido de origen puede tener una o más alteraciones o modificaciones pre-existentes de la secuencia de aminoácidos de una región Fc de secuencia nativa. Por ejemplo, la actividad de unión de C1q de la región Fc se ha alterado previamente (otros tipos de modificaciones de región Fc se describen en más detalle más adelante. Además de ello, la región Fc de polipéptido de origen es “conceptual” y en tanto que no existe físicamente, el ingeniero de anticuerpos puede decidir de una secuencia de aminoácidos deseada, de región Fc variante y generar un polipéptido que comprende esa secuencia o un ADN que codifique para la secuencia deseada de aminoácidos de la región Fc variante.

En una realización preferida de la invención, sin embargo, si está disponible un ácido nucleico que codifica una región Fc de un polipéptido de origen y esta secuencia de ácido nucleico se altera para generar una secuencia de ácido nucleico variante que codifica la variante D265A de región Fc.

Se prepara ADN que codifica para una variante de secuencia de aminoácidos del polipéptido de inicio por una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen la preparación por mutagénesis dirigida (o mediada por oligonucleótidos), mutagénesis por PCR y mutagénesis de casete de un ADN preparado anteriormente que codifica el polipéptido.

La mutagénesis dirigida al sitio es un método preferido para preparar variantes de sustitución. Está técnica es bien conocida (ver, por ejemplo, Carter et al. Nucleic Acids Res. 13:4431-4443 (1985) y Kunkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 82:488 (1987)). De forma breve, al llevar a cabo la mutagénesis dirigida al sitio del ADN, el ADN de inicio se altera al hibridizar primero un oligonucleótido que codifica para la mutación deseada a una hebra individual de este ADN de inicio. Después de la hibridación, se usa ADN-polimerasa para sintetizar una segunda hebra completa, usando el oligonucleótido hibridizando como un cebador, y usando la hebra individual del ADN de inicio como una plantilla. De esta manera, el oligonucleótido que codifica para la mutación deseada se incorpora en el ADN resultante de doble hebra.

También es adecuada la mutagénesis por PCR para producir variantes de secuencias de aminoácidos del polipéptido de inicio. Ver Higuchi, en PCR Protocols, pp. 177-183 (Academic Press, 1990); y Vallette et al., Nuc. Acids Res. 17:723-733 (1989). De forma breve, cuando se usan pequeñas cantidades de ADN de plantilla como material de inicio en una PCR, se pueden usar cebadores que difieren ligeramente la secuencia de la región correspondiente de un ADN de plantilla para generar cantidades relativamente grandes de un fragmento específico de ADN que difiere de la secuencia de plantilla solo en las posiciones donde los cebadores difieren de la plantilla.

Otro método para preparar variantes, mutagénesis de casete, se basa en la técnica descrita por Wells et al., Gene 34:315-323 (1985). El material de inicio es el plásmido (u otro vector) que comprende el ADN del polipéptido de inicio que se va a mutar. Se identifican los codones en el ADN de inicio que se va a mutar. Debe haber un sitio único de enduonucleasa de restricción en cada lado de los sitios identificados de mutación. Si no existen estos sitios de restricción, se pueden generar usando el método de mutagénesis mediado por oligonucleótido, descrito anteriormente para introducirlos en ubicaciones apropiadas en el ADN de polipéptido de inicio. El ADN de plásmido se corta en estos sitios para linealizarlo. Usando procedimientos normales, se sintetiza un oligonucleótido de doble hebra que codifica para la secuencia de ADN entre los sitios de restricción pero que contiene las mutaciones deseadas, en

donde las dos hebras del oligonucleótido se sintetizan de manera separada y luego se hibridizan conjuntamente usando técnicas normales. Este oligonucleótido de doble hebra se refiere como el casete. Este casete se diseña para tener extremos 5' y 3' que son compatibles con los extremos del plásmido linealizado de tal forma que se puede ligar directamente al plásmido. Este plásmido contiene ahora la secuencia de ADN mutada.

De manera alternativa, adicionalmente, la secuencia deseada de aminoácido se codifica una variante de polipéptido se puede determinar, y se puede generar de manera sintética una secuencia de ácido nucleico que codifica esta variante de secuencia de aminoácidos.

La secuencia de aminoácido del polipéptido de origen se modifica a fin de generar una región Fc variante con afinidad o actividad alterada de unión al receptor de Fc, in vitro y/o in vivo y/o actividad alterada de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC) in vitro y/o in vivo y/o actividad alterada de citotoxicidad mediada por células (CDC) in vitro y/o in vivo.

En general, la modificación conlleva uno o más sustituciones de aminoácido. La sustitución puede ser, por ejemplo, una "sustitución conservadora", las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas en la región Fc se pueden lograr al seleccionar sustituciones que difieran significativamente en su efecto al mantener (a) la estructura de la columna del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, con una confirmación de hoja o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos que se presentan de manera natural se dividen en grupos en base a las propiedades comunes de cadena lateral.
(1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
(2) hidrófilos neutrales: cys, ser, thr;
(3) ácidos: asp, glu;
(4) básico: asn, gln, his, lys, arg;
(5) residuos que interfieren con la orientación de la cadena: gly, pro; y
(6) aromático: trp, tyr, phe.

Además de las sustituciones de aminoácido, la presente invención contempla otras modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la región de origen a fin de generar, por ejemplo, una región Fc variante con función efectora alterada.

Por ejemplo, se pueden suprimir uno o más residuos de aminoácido de la región Fc a fin de reducir la unión a un FcR. En general, se suprimirá uno o más de los residuos de la región Fc identificados en la presente como que afectan la unión a FcR a fin de generar esta variante de región Fc. En general, se suprimirán no más de uno a aproximadamente diez residuos de la región Fc de acuerdo a esta modalidad de la invención. La región Fc que comprende en la presente una o más supresiones de aminoácido retendrá de manera preferente al menos aproximadamente 80 %, y de manera preferente al menos aproximadamente 90 %, y de manera más preferente al menos aproximadamente 95 %, de la región Fc de origen de una región Fc humana de secuencia nativa.

Al introducir las modificaciones apropiadas de la secuencia de aminoácidos en una región Fc de origen, por ejemplo, se puede generar una región Fc variante que (a) medie la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) en la presencia de células efectoras humanas de manera más o menos efectiva y/o (b) se una al recetor Fc gamma (FcγR) con más o menos afinidad que polipéptido de origen. Estas variantes de región Fc comprenderán en general al menos una modificación de aminoácido en la región Fc. La combinación de modificaciones de aminoácido se piensa que es particularmente deseable. Por ejemplo, la región Fc variante puede incluir dos, tres, cuatro, cinco, etc sustituciones en la misma, por ejemplo las posiciones específicas de las regiones Fc identificadas en la presente.

Por ejemplo, en el contexto de IgG1, se puede generar una variante de región Fc con unión reducida a FcγR al introducir una modificación de aminoácido en cualquiera o más de las posiciones de aminoácido y 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 ó 439 de la región Fc. Ver, por ejemplo Presta Patente de los Estados Unidos No. 6,737,056.

Las variantes de IgG1 que presentan unión reducida a FcγRI, incluyen aquellas que comprenden una modificación de aminoácido de la región Fc en cualquiera de una o más de las posiciones de aminoácido 238, 265, 269, 270, 327 ó 329. Ver, por ejemplo Presta Patente de los Estados Unidos No. 6.737.056.

Las variantes de IgG1 que presentan unión reducida a FcγRII incluyen aquellas que comprenden una modificación de aminoácido de la región Fc en cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 ó 439. Ver, por ejemplo Presta Patente de los Estados Unidos No. 6.737.056.

Las variantes de la región Fc de IgG1 que presenta unión reducida a FcγRIII incluyen aquellas que comprenden una modificación de aminoácido de la región Fc en cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 ó 437. Ver, por ejemplo Presta Patente de los Estados Unidos No. 6.737.056.

Se entenderá por un experto en la técnica que se pueden obtener efectos similares al variar los residuos específicos en otras regiones Fc de Ig, aunque puede ser diferente la numeración de los residuos. Ver, por ejemplo Presta Patente de los Estados Unidos No. 6.737.056.

Se puede diseñar una región Fc con función efectora alterada, por ejemplo, al modificar la unión de C1q y/o la unión de FcR y cambiando de esta manera la actividad de CDC y/o la actividad de ADCC. Por ejemplo, se puede generar una región Fc variante con unión de C1q mejorada y unión mejorada de FcγRIII, que tiene por ejemplo tanto actividad mejorada de ADCC como actividad mejorada de CDC. De manera alternativa, donde se desea que se reduzca o inhabilite la función efectora, se puede manejar una región Fc variante con actividad reducida de CDC y/o actividad reducida de ADCC. En otras modalidades, se puede incrementar una de estas actividades, y opcionalmente también reducir la otra actividad, por ejemplo, para generar una variante de región Fc con actividad mejorada de ADCC, pero actividad reducida de CDC y viceversa. Ver, por ejemplo Presta Patente de los Estados Unidos No. 6.737.056.

Con respecto a las alteraciones adicionales de la secuencia de aminoácidos, se puede sustituir cualquier residuo de cisteína no comprendido en el mantenimiento de la conformación apropiada de la variante de polipéptido, en general con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y para impedir la reticulación anormal. Ver, por ejemplo Presta Patente de los Estados Unidos No. 6.737.056.

Otro tipo de sustitución de aminoácido sirve para alterar el patrón de glicosilación de polipéptido. Esto se puede lograr al suprimir una o más porciones de carbohidrato encontradas en el polipéptido, y/o adicionando uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el polipéptido. La glicosilación de los polipéptidos es ya sea típicamente N-enlazada u O-enlazada. N-enlazada se refiere a la unión de la porción de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para unión enzimática de la porción de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De esta manera, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio potencial de glicosilación. La glicosilación O-enlazada se refiere a la unión de uno de los azúcares, N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxi prolina o 5-hidroxilisina. La adición de sitios de glicosilación al péptido se logra de manera conveniente al alterar la secuencia de aminoácidos de tal forma que contiene una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glicosilación N-enlazados). La alteración también se puede hacer por la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina termina a la secuencia de polipéptido original (para sitio de glicosilación O-enlazada). Una variante de glicosilación de ejemplo tiene una sustitución de aminoácidos del residuo Asn 297 de la cadena pesada. Ver, por ejemplo Presta Patente de los Estados Unidos No. 6.737.056.

Además, la clase, subclase o alotipo de la región Fc se puede alterar por una o más sustituciones adicionales de aminoácido para generar una región Fc con una secuencia de aminoácido más homóloga a una clase, subclase o alotipo diferente como se desee. Por ejemplo, se puede alterar una región Fc murina para generar una secuencia de aminoácidos más homóloga a una región Fc humana; una región Fc de IgG1 de alotipo no A humano se puede modificar para lograr una región Fc de IgG1 de alotipo A humano etc. En una modalidad, las modificaciones de aminoácido en la presente que alteran la unión a FcR y/o la actividad de ADCC se producen en el domino CH2 de la región Fc y el domino CH3 se suprime o se reemplaza con otro dominio de dimerización. De manera preferente, sin embargo, el dominio CH3 se retiene (además de las modificaciones de aminoácido en la presente que alteran la función efectora como se describe en la presente). Ver, por ejemplo Presta Patente de los Estados Unidos No. 6.737.056.

ENSAYOS DE UNIÓN

Se puede evaluar la capacidad de la variante de polipéptido para unirse a un FcR. Donde el FcR es un receptor de Fc de alta afinidad, tal como FcγRI, FcRn o FcγRIIIA-V158, se puede medir la unión al titular la variante de polipéptido monomérico y al medir la variante de polipéptido unida usando un anticuerpo que se une de manera específica a la variante de polipéptido en un formato normal de ELISA. Ver, por ejemplo Presta Patente de los Estados Unidos No. 6.737.056. Los ensayos de unión de FcR para FcR de baja afinidad son bien conocidos en la técnica y se describen por ejemplo, inter alia, en Presta Patente de los Estados Unidos No. 6.737.056.

Para valorar la actividad de ADCC de la variante de polipéptido, se puede realizar un ensayo e ADCC in vitro usando relaciones variables de efector: objetivo. Las “células efectoras” útiles para estos ensayos

incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células Aniquiladoras Naturales (NK). De manera alternativa, o adicionalmente, se puede valorar in vivo la actividad de ADCC de la variante de polipéptido, por ejemplo, en un modelo de animal tal como aquel descrito en Clynes et al. PNAS (EUA) 95:652-656 (1998).

VECTORES DE EXPRESIÓN

Para practicar la invención se puede usar cualquier vector adecuado de expresión. Por ejemplo el experto en la técnica será capaz de expresar IgG1 en, por ejemplo, *pSVgpt*. El vector de expresión *pSVgpt* se basa en *SV2gpt* (Mulligan y Berg, 1980) e incluye el gen de resistencia ampicilina para selección en células bacterianas, el gen *gpt* para la selección en células mamíferas, la región intensificadora de inmunoglobulina de cadena pesada murina, la secuencia genómica que codifica para el gen de región constante y las secuencias de SV40 poli A. la región variable de cadena pesada para la expresión se inserta como un fragmento *HindIII* a *BamHI*.

El vector de expresión pSVhyg incluye el gen de resistencia a ampicilina para la selección en células bacterianas, el gen *hyg* para la selección en células mamíferas, la región intesificadora de inmunoglobulina de cadena pesada murina, la secuencia genómica que codifica para el gen de región constante kappa y que incluye el intensificador kappa y las secuencias SV40 poli A. La región variable de cadena ligera para la expresión se inserta como un fragmento *Hin*dIII *Bam*HI.

La secuencia de ADN entonces se va a confirma para corregir la V_H y V_K humanizadas en los vectores de expresión.

Para la producción del anticuerpo, se pueden introducir vectores de expresión de cadena pesada y ligera humanizadas en líneas celulares de producción apropiada conocidas en la técnica tal como por ejemplo, células NS0. Mediante la co-transfección mediante electroporación o cualquier otra tecnología de transformación adecuada conocida en la técnica se puede lograr la introducción de vectores de expresión. Entonces se pueden seleccionar líneas celulares productoras de anticuerpo y expander y se purifican los anticuerpos humanizados. Los anticuerpos purificados entonces se pueden analizar por técnica normales tal como SDS-PAGE.

ANTICUERPO CON AFINIDAD, ESPECIFICIDAD, ESTABILIDAD, MEJORADAS

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

La afinidad, especificidad y estabilidad de un anticuerpo de acuerdo a la invención como se describe anteriormente en la presente o un fragmento del mismo se puede modificar por cambio de su perfil o patrón de glicosilación dando por resultado valores terapéuticos mejorados.

Para lograr este cambio en el patrón de glicosilación, se pueden manejar células hospedadoras de tal forma que sean capaces de expresar una variedad preferida de una actividad de glicosil-transferasa modificadora de glicoproteínas que incrementa los oligosacáridos N-enlazados complejos que tienen GlcNAc bisectriz. Adicionalmente, se pueden obtener glicoformas modificadas de glicoproteínas, por ejemplo anticuerpos, incluyendo moléculas enteras de anticuerpo, fragmentos de anticuerpo, o proteínas de fusión que incluyen una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, que tiene una citotoxicidad celular mejorada mediada por Fc.

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

PREPARACIÓN FARMACÉUTICA Y ADMINISTRACIÓN

Los anticuerpos de acuerdo a la invención, pero particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo a la invención, se pueden preparar en una formulación fisiológicamente aceptable y pueden comprender un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable usando técnicas conocidas. Por ejemplo, el anticuerpo de acuerdo a la invención y como se describe en la presente de forma anterior incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, en particular, el anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo se combina con un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable para formar

una composición terapéutica. Los portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, soluciones salinas amortiguadas con fosfato, agua, emulsiones tal como emulsiones de aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc.

La formulación de la composición farmacéutica de acuerdo a la invención se puede lograr de acuerdo a metodología normal conocida por los expertos en la técnica.

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

Las composiciones se pueden administrar por rutas normales de administración. En general, la composición se puede administrar por rutas tópica, oral, rectal, nasal, intradérmica, intraperitoneal, o parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular). Además, la composición se puede incorporar en matrices de liberación sostenida tal como polímeros biodegradables, los polímeros que se implantan en la vecindad donde se desea la distribución, por ejemplo, en el sitio de un tumor. El método incluye la administración de una dosis individual, la administración de dosis repetidas a intervalos predeterminados de tiempo, y administración sostenida durante un periodo predeterminado de tiempo.

Una matriz de liberación sostenida, como se usa en la presente, es una matriz producida de materiales, usualmente polímeros que son degradables por hidrólisis enzimática o de ácido/base o por disolución. Una vez que se inserta en el cuerpo, la matriz actúa por enzimas y fluidos corporales. La matriz de liberación sostenida se elije de manera deseable por materiales biocompatibles tal como liposomas, poliláctidos (ácido poliláctido), poliglicólido (polímero de ácido glicólico), poliláctido-co-glicólido (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), polianhídridos, poli(orto)ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, sulfato de condroitina, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, poliaminoácidos, aminoácidos tal como fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, polivinil-propileno, polivinilpirrolidona y silicón. Una matriz biodegradable preferida es una matriz de uno de ya sea poliláctido, poliglicólido, o poliláctido-co-glicólido (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico).

Es bien conocido por los expertos en la técnica pertinente que la dosis de la composición dependerá de varios factores tal como por ejemplo, la condición que se trata, la composición particular usada, y otros factores clínicos tal como el peso, sexo, tamaño y condición general de salud del paciente, área de superficie corporal, el compuesto o composición particular que se va a administrar, otros fármacos que se administran de manera concurrente, y la ruta de administración.

La composición se puede administrar en combinación con otras composiciones que comprenden una sustancia o compuesto biológicamente activo, particularmente al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste de compuestos contra estrés oxidativo, compuestos anti-apoptóticos, queladores metálicos, inhibidores de la reparación del ADN tal como pirenzapina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de α-secretasa, inhibidores de β- y γ-secretasa, proteínas tau, neutrotransmisor, interruptores de β-hoja, atrayentes para componentes celulares de depuración/agotamiento de amiloide-beta, inhibidores de amiloide-beta N-terminal truncado incluyendo amiloide-beta 3-42 piroglutamado, moléculas anti-inflamatorias, “antipsicóticos atípicos” tal como, por ejemplo, clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina o inhibidores de colinesterasa (ChEI) tal como tacrina, rivastigmina, donepezil, y/o galantamina, agonistas de M1 y otros fármacos incluyendo cualquier fármaco modificador de amiloide o tau y complementos nutritivos tal como por ejemplo, vitamina B12, cisteína, un precursor de acetilcolina, lecitina, colina, Ginkgo biloba, acetil-L-carnitina, idebenona, propentofilina, o un derivado de xantina, conjuntamente con un anticuerpo de acuerdo a la presente invención, y opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente y/o un excipiente y procedimientos para el tratamiento de enfermedades.

La materia proteínica farmacéuticamente activa puede estar presente en cantidades entre 1 ng y 10 mg por dosis. En general, el régimen de administración debe estar en el intervalo de entre 0.1 μg y 10 mg del anticuerpo de acuerdo a la invención, particularmente en un intervalo de 1.0 μg a 1.0 mg, y de manera más particular en un intervalo de entre 1.0 μg y 100 μg, con todos los miembros individuales que caen dentro de estos intervalos. Si la administración se presenta a través de infusión continua, una dosis más

apropiada puede estar en el intervalo de entre 0.01 μg y 10 mg unidades por kilogramo de peso corporal por hora con todos los números individuales que caen dentro de estos intervalos.

La administración en general será de manera parenteral, por ejemplo de manera intravenosa. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas, estériles. Los solventes no acuosos incluyen sin que se limite a esto, propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tal como oleato de etilo. Se pueden elegir solventes acuosos del grupo que consiste de agua, soluciones acuosas/alcohol, emulsiones o suspensiones incluyendo solución salina y medios amortiguados. Los medios parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactado, o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen re-abastecedores de nutrientes y fluidos, re-abastecedores de electrolitos (tal como aquellos basados en dextrosa de Ringer) y otros. Los conservadores también pueden estar presentes tal como por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes queladores, gases inertes, etc.

La composición farmacéutica puede comprender además portadores proteínicos tal como por ejemplo, albúmina sérica o inmunoglobulina, particularmente de origen humano. Adicionalmente, los agentes biológicamente activos pueden estar presentes en la composición farmacéutica de la invención dependiendo de su uso propuesto.

Cuando el objetivo de unión está localizado en el cerebro, se describe en esta memoria el anticuerpo o fragmento activo del mismo para atravesar la barrera sanguínea del cerebro. Se asocian ciertas enfermedades neurodegenerativas con un incremento en la permeabilidad de la barrera sanguínea del cerebro, de tal forma que el anticuerpo o fragmento activo del mismo se puede introducir fácilmente al cerebro. Cuando la barrera sanguínea del cerebro permanece intacta, existen varios planteamientos conocidos en la técnica para transportar moléculas a través de la misma, que incluyen, pero no se limitan a, métodos físicos, métodos basados en lípidos, y métodos basados en receptores y canales.

Los métodos físicos para transportar el anticuerpo o fragmento activo del mismo a través de la barrera sanguínea del cerebro incluyen circunvalar completamente la barrera sanguínea del cerebro, o crear aberturas en la barrera sanguínea del cerebro. Los métodos de circunvolución incluyen inyección directa en el cerebro (ver, por ejemplo, Papanastassiou et al., Gene Therapy 9:398-406 (2002)) e implantar un dispositivo de distribución en el cerebro (ver, por ejemplo, Gill et al., Nature Med. 9:589-595 (2003); y Gliadel Wafers^{MR}, Guildford Pharmaceutical). Los métodos para crear aberturas en la barrera incluyen ultrasonido (ver, por ejemplo, Publicación de Patente de los Estados Unidos Número 2002/0038086), presión osmótica (pro ejemplo, por administración de manitol hipertónico (Neuwelt, E.A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N.Y. (1989))), permeabilización por ejemplo por bradiquidina o permeabilizador A-7 (ver, por ejemoplo, Patentes de los Estados Unidos Números 5.112.596; 5.268.164; 5.506.206 y 5.686.416), y transfección de neuronas que montan la barrera sanguínea del cerebro con vectores que contienen genes que codifican para el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (ver, por ejemplo, Publicación de Patente de los Estados Unidos Número 2003/0083299).

Los métodos basados en lípidos para transportar el anticuerpo o fragmento activo del mismo a través de la barrera sanguínea del cerebro incluyen, pero no se limitan a, encapsular el anticuerpo o fragmento activo del mismo en liposomas que se acoplan a fragmentos de unión del anticuerpo que se unen a los receptores en el endotelio vascular de la barrera sanguínea del cerebro (ver, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Número 20020025313), y revestir el anticuerpo o fragmento activo del mismo en partículas de lipoproteína de baja densidad (ver, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Número 20040204354) o apolipoproteína E (ver, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Número 20040131692).

Los métodos basados en receptores y canales para transportar el anticuerpo o fragmento activo del mismo a través de la barrera sanguínea del cerebro incluyen, pero no se limitan a usar bloqueadores de glucocorticoides para incrementar la permeabilidad en la barrera sanguínea del cerebro (ver, por ejemplo, Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Números 2002/0065259, 2003/0162695, y 2005/0124533); activación de canales de potasio (ver, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Número 2005/0089473), inhibir los transportadores de fármacos ABC (ver, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Número 2003/0073713); revestir anticuerpos con una transferrina y modular la actividad de uno o más receptores de transferrina (ver, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Número 2003/0129186), y cationizar los anticuerpos (ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Número 5.004.697).

DETECCIÓN/DIAGNOSIS

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona métodos y kits para la detección y

diagnosis de enfermedades o condiciones asociadas a amiloides. Estos métodos incluyen métodos inmunológicos conocidos comúnmente usados para detectar o cuantificar sustancias en muestras biológicas o en una condición *in situ*.

La diagnosis de una condición o enfermedad asociada a amiloide en un paciente se puede lograr al detectar la unión inmunoespecífica de un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo del mismo a un epítopo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ*, que incluye poner la muestra sospechosa de contener la proteína amiloide, en contacto con un anticuerpo que se une a un epítopo de la proteína amiloide, permitiendo que la proteína se una a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico, detectar la formación del complejo inmunológico y correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra.

Las muestras biológicas que se pueden usar en la diagnosis de una enfermedad o afección asociada a amiloides son, por ejemplo, fluidos tal como suero, plasma, saliva, secreciones gástricas, moco, fluido cerebroespinal, fluido linfático y similares o muestras de tejido o células obtenidas de un organismo tal como tejido neural, cerebral, cardiaco o vascular. Para determinar la presencia o ausencia de la proteína amiloide en una muestra se puede usar cualquier inmunoensayo conocido por los expertos en la técnica, (ver Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988 555-612)) tal como por ejemplo, ensayos que utilizan métodos de detección indirecta que usan reactivos secundarios para detección, ELISA y ensayos de inmunoprecipitación y aglutinación. Se da una descripción detallada de estos ensayos, por ejemplo, en la WO96/13590 de Maertens y Stuyver, Zrein et al. (1998) y WO96/29605.

Para la diagnosis *in situ*, el anticuerpo o cualquier parte activa y funcional del mismo se puede administrar a un organismo que se va a diagnosticar por métodos conocidos en la técnica tal como por ejemplo, inyección intravenosa, intranasal, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial de tal forma que pueda presentarse una unión específica entre el anticuerpo de acuerdo a la invención con una región epitópica en la proteína amiloide. El complejo de anticuerpo/antígeno se puede detectar a través de una marca unida al anticuerpo o un fragmento funcional del mismo.

Los inmunoensayos usados en aplicaciones de diagnóstico dependen típicamente de antígenos, anticuerpos o reactivos secundarios, marcados, para detección. Estas proteínas o reactivos se pueden marcar con compuestos conocidos en general por los expertos en la técnica que incluyen enzimas, radioisótopos, y sustancias fluorescentes, luminiscentes y cromogénicas incluyendo partículas coloreadas, tal como oro coloidal y cuantas de látex. De estos, se puede usar marcación radioactiva para casi todos los tipos de ensayos y con muchas variaciones. Las marcas conjugadas a enzimas son particularmente útiles cuando se debe evitar la radioactividad o cuando se necesiten resultados rápidos. Los fluorocromos, aunque requieren kit costoso para su uso, proporcionan un método muy sensible de detección. Los anticuerpos útiles en estos ensayos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, y anticuerpos policlonales purificados por afinidad.

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

Los expertos en la técnica conocerán de estas y otras marcas adecuadas que se pueden emplear de acuerdo con la presente invención la unión de estas marcas a anticuerpos o fragmentos de los mismos se puede lograr usando técnicas normales comúnmente conocidas por los expertos en la técnica. Las técnicas típicas se describen por Kennedy, J. H., et al., 1976 (Clin. Chim. Acta 70:1-31), y Schurs, A. H. W. M., et al., 1977 (Clin. Chim Acta 81:1-40). Las técnicas de acoplamiento mencionadas en lo anterior son el método de glutaraldehído, el método de periodato, el método de dimaleimida, y otros.

Las inmunoensayos actuales utilizan un método de doble anticuerpo para detectar la presencia de un analito, en donde el anticuerpo se marca de manera indirecta por reactividad con un segundo anticuerpo que se ha marcado con una marca detectable. El segundo anticuerpo es preferentemente uno que se une a anticuerpos del animal del cual se deriva el anticuerpo monoclonal. En otras palabras, si el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo de ratón, entonces el segundo anticuerpo marcado es un anticuerpo anti-ratón. Para el anticuerpo monoclonal que se va a usar en el ensayo descrito más adelante, esta marca es preferentemente una cuenta revestida con anticuerpo, particularmente una cuenta magnética. Para el anticuerpo policlonal que se va a emplear en el inmunoensayo descrito en la presente, la marca es de manera preferente una molécula detectable tal como una molécula radioactiva, fluorescente o electroquimioluminiscente.

Un sistema alternativo de doble anticuerpo referido frecuentemente como sistemas de formato rápido debido a que se adaptan a determinaciones rápidas de la presencia de un analito, también se puede emplear dentro del alcance de la presente invención. El sistema requiere alta afinidad entre el anticuerpo y el analito. De acuerdo a una modalidad de la presente invención, se determina la presencia de la proteína amiloide usando un par de anticuerpos, cada uno específico para la proteína amiloide. Uno de los pares de anticuerpos se refiere en la presente como un "anticuerpo detector" y el otro del par de anticuerpos se refiere en la presente como un "anticuerpo de captura". El anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede usar ya sea como un anticuerpo de captura o como un anticuerpo detector. El anticuerpo monoclonal de la presente invención también se puede usar tanto como un anticuerpo de captura como un anticuerpo detector, conjuntamente en un ensayo único. Así, se describen en esta memoria usos del método de intercalación de doble anticuerpo para detectar proteína amiloide en una muestra de fluido biológico. En este método, el analito (proteína amiloide) se intercala entre el anticuerpo detector y el anticuerpo de captura, el anticuerpo de captura que se inmoviliza de manera irreversible en un soporte sólido. El anticuerpo detector contendrá una marca detectable, a fin de identificar la presencia de la intercalación anticuerpo-analito y de esta manera la presencia del analito.

Las sustancias de fase sólida de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, placas de microtítulo, tubos de prueba de poliestireno, cuentas magnéticas, de plástico o de vidrio y portaobjetos que son bien conocidos en el campo de radioinmunoensayos e inmunoensayos enzimáticos. Los métodos para acoplar anticuerpos a fases sólidas también son bien conocidos por los expertos en la técnica. Más recientemente, se han empleado como soportes sólidos varios materiales porosos tal como nilón, nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio y otros polímeros porosos.

La presente invención también se refiere a un kit de diagnóstico para detectar proteína amiloide en una muestra biológica que comprende una composición como se define anteriormente. Además, la presente invención se refiere a este último kit de diagnóstico que, además de una composición como se define anteriormente, también comprende un reactivo de detección como se define anteriormente. El término "kit de diagnóstico" se refiere en general a cualquier kit de diagnóstico conocido en la técnica. De manera más específica, este último término se refiere a un kit de diagnóstico como se describe en Zrein et al. (1998).

También se describen en esta memoria nuevas inmunosondas y kits de prueba para la detección y diagnosis de enfermedades y afecciones asociadas a amiloides, que comprenden anticuerpos de acuerdo a la presente invención. Para inmunosondas, los anticuerpos se unen de manera directa o indirectamente a una molécula indicadora adecuada, por ejemplo, una enzima o un radionúclido. El kit de prueba incluye un recipiente que retiene uno o más anticuerpos de acuerdo a la presente invención e instrucciones para el uso de los anticuerpos para el propósito de unirse a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico y para detectar la formación del complejo inmunológico de tal forma que la presencia o ausencia del complejo inmunológico correlacione con la presencia o ausencia de la proteína amiloide.

EJEMPLOS

Materiales

El desarrollo y preparación del anticuerpo monoclonal de ratón ACI-01-Ab7C2 (llamado "mC2" y hC2 para el anticuerpo C2 humanizado, a todo lo largo de la solicitud) se describe en la solicitud co-pendiente EP 05 02 7092.5 presentada el 12.12.2005.

Células de hibridoma FP-12H3-C2, que producen el anticuerpo monoclonal de ratón ACI-01-Ab7C2 (llamado "mC2" y hC2 para el anticuerpo C2 humanizado, a todo lo largo de la solicitud) se depositaron el 01 de diciembre de 2005 en la solicitud co-pendiente no. EP05027092.5 con la "Deutche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, bajo las provisiones del Tratado de Budapest y se le dio el número de acceso DSM ACC2750.

Se cultivaron células de hibridoma en Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal al 10% y antibióticos (Penicilina/Estreptomicina). El isotipo del anticuerpo producido se verificó y se encontró que es IgG2b/kappa de ratón, como se espera.

Ensayo

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

Elección de regiones constantes humanas

Puesto que no es deseable el reclutamiento del sistema inmunitario para el candidato de anticuerpo clínico, la región constante humana seleccionada para la cadena pesada fue IgG4 humana, modificada para cambiar serina en la posición 228 en la región de articulación a prolina (HulgG4 Ser-Pro). Esta mutación estabiliza el enlace de disulfuro inter-cadena e impide la formación de medias moléculas que pueden presentarse en preparaciones de IgG4 humanas nativas. El anticuerpo expresado de las líneas celulares de producción también tendrá la lisina terminal removida. Las secuencias de las regiones constantes humanas HulgG4 Ser Pro y kappa humana se dan en SEQ ID NO: 17 y 14, respectivamente.

Ejemplo 1.- Clonación y Secuenciación de Regiones Variables de Anticuerpo

Se preparó ARN total a partir de 3 x 10^6 células de hibridoma (un matraz T175) usando el mini kit Qiagen RNeasy (Número de Catálogo: 74104). El ARN se eluyó en 50 μl de agua y se verificó en gel de agarosa al 1.2%. El medio acondicionado de las células se retuvo y se usó una muestra para la prueba en el ensayo de actividad de anticuerpo.

Se prepararon los ADNc de V_H y V_K usando trascriptasa inversa con IgG de ratón y cebadores de región constante κ. Los ADNc de primera hebra se amplificaron por PCR usando un gran conjunto de cebadores de secuencia de señal. Los ADN amplificados se purificaron en gel y se clonaron en el vector pGem^{MR} T Easy (Promega). Los clones de V_H y V_K obtenidos se examinaron para las inserciones del tamaño esperado por PCR y la secuencia de ADN de los clones seleccionados se determinó por secuenciación automatizada de ADN. Las ubicaciones de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) en las secuencias se determinaron con determinaron con referencia a otras secuencias de anticuerpo (Kabat EA et al., 1991). La convención de numeración de Kabat para las regiones variables de anticuerpo se usa a todo lo largo de esta solicitud; por lo tanto los números de residuo pueden diferir del número lineal estricto.

La secuencia de ADN y la secuencia deducida de aminoácidos para mC2 V_K se muestra en SEQ ID NO: 29 y 27, respectivamente. Cuatro clones dieron esta secuencia productiva idéntica. Una secuencia V_K anormal no productiva que surge del compañero de fusión de hibridoma también se encontró en varios clones.

Para mC2 V_H, se aislaron dos diferentes secuencias productivas. La secuencia mC2 V_H AF (ver SEQ ID NO: 30) se encontró en un total de 29 clones, con 14 cambio individuales de pares de base en los clones individuales. La secuencia mC2 V_H B se encontró en un total de 8 clones. Cinco de estos representaron la mayoría de la secuencia, con los otros 3 clones que son variaciones en esta. Es posible que estas secuencias V_H B similares surjan como un artefacto de la amplificación por PCR. Una V_H anormal no productiva también se obtuvo del hibridoma C2 y se atribuye a la unión V-D-J defectuosa.

A fin de determinar que es la mC2 V_H activa, correcta, se prepararon dos anticuerpos quiméricos con las dos diferentes secuencias V_H, AF y B, combinadas con la mC2 V_K, que se van a probar para la actividad correcta del anticuerpo.

Ejemplo 2.- Construcción de Genes de Anticuerpos Quiméricos (sólo para referencia)

Un anticuerpo quimérico humano en su forma más común consiste de regiones constantes humanas enlazadas a regiones variables murinas (u otras no humanas). Un anticuerpo quimérico proporciona una herramienta muy útil, primeramente para la confirmación que se han identificado regiones variables correctas, segundo para el uso como un anticuerpo de control en ensayos de unión a antígeno con las mismas funciones efectoras y utilizando los mismos reactivos de detección secundaria como un anticuerpo humanizado o manejado, y también se puede usar para investigar la farmacocinética y otras propiedades de las regiones constantes humanas con referencia al objetivo particular para el anticuerpo.

Se construyeron dos vectores quiméricos de expresión de cadena pesada que consisten de las regiones variables mC2 V_H AF o mC2 V_H B enlazadas a la región constante HulgG4 (Ser-Pro) en el vector de expresión *pSVgpt* (ver Figura 1). Esto se basa en *pSV$_2$gpt* (Mulligan y Berg, 1980) e incluye el gen de resistencia a ampicilina para la selección en células bacterianas, el gen *gpt* para la selección en células mamíferas, la región intensificadora de inmunoglobulina de cadena pesada murina, la secuencia genómica que codifica para el gen de región constante y las secuencias de SV40 poli A. la región variable de cadena pesada para la expresión se inserta como un fragmento de *HindIII* a *BamHI*.

Se construyó un vector quimérico de cadena ligera que consiste de C2 VK enlazada a la región constante C Kappa humana en el vector de expresión pSVhyg (Figura 2). pSVhyg incluye el gen de resistencia a ampicilina para la selección en células bacterianas, y el gen *hyg* para la selección en células mamíferas, la región intensificadora de inmunoglobulina de cadena pesada murina, la secuencia genómica que codifica para el gen de región constante kappa y que incluye el intensificador kappa y las secuencias de

SV 40 poli A. La región variable de cadena ligera para la expresión se inserta con un fragmento de *HindIII* a *BamHI*.

Se construyeron casetes de expresión para las secuencias murinas C2 VH y VK por la adición de la secuencia flanqueadora 5' que incluye el péptido de señal guía, el intrón guía y el promotor de inmunoglobulina murina, y la secuencia flanqueadora 3' que incluye el sitio de empalme y la secuencia de intrón, usando los vectores VH-PCR1 y CK-PCR1 como plantillas (Riechmann et al., 1988). La secuencia de ADN se confirmó que es la correcta para la VH y VK en los vectores quiméricos de expresión. El ADN y las secuencias de aminoácidos de los genes de VH y VK en los casetes de expresión se muestran en las Figuras 3 y 4.

Ejemplo 3.- Expresión de Anticuerpos Quiméricos (sólo para referencia)

3.1 Expresión en líneas celulares estables

La línea de células hospedadoras para la expresión del anticuerpo fue NS0, un mieloma de ratón no productor de inmunoglobulina, obtenida de la Colección Europea de Cultivos de Células Animales, Porton, Reino Unido (ECACC No 85110503). Los vectores de expresión de cadena pesada y ligera se co-transfectaron en células NS0 por electroporación. Las colonias que expresan el gen *gpt* se seleccionaron de Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal al 10% (FBS), 0.8 μg/ml de ácido micofenólico y 250 μg/ml de xantina. Los clones celulares transfectados se examinaron para la producción del anticuerpo monoclonal por ELISA para IgG humana. Las líneas celulares que segregan el anticuerpo se expandieron y los productores más altos se seleccionaron y congelaron en nitrógeno líquido. Las mejores líneas celulares productoras para cada anticuerpo se expandieron en el medio como antes pero con sólo FBS al 5%. Los anticuerpos quiméricos se purificaron usando Prosep^{MR}-A (Bioprocessing Ltd). La concentración se determinó por ELISA para el anticuerpo IgGκ humano. Los anticuerpos también se analizaron por SDS-PAGE.

3.2 Expresión transiente de anticuerpos quiméricos

Para acelerar la prueba de los diferentes anticuerpos quiméricos, se usó expresión transiente para producir rápidamente pequeñas cantidades de sobrenadante celular que contiene el anticuerpo recombinante para prueba. Los casetes de expresión de V_H y V_K de mC2 se transfirieron a vectores en base a pcDNA3.1 (Invitrogen) para expresión transiente. El vector de cadena pesada incluyó una región constante de IgG humana. El vector de cadena ligera incluyó una región constante kappa humana. Tanto mC2 V_H AF y mC2 V_H B se transfectaron con mC2 V_K en células de riñón embriónico humano (HEK 298) con el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen Cat No: 11668) de acuerdo al protocolo suministrado por el fabricante. Se recolectó el medio acondicionado de las células 3 días después de la transfección. La cantidad del anticuerpo producido se determinó por ELISA para el anticuerpo IgGκ humano.

Ejemplo 4.- Actividad de Anticuerpos C2 Quiméricos (sólo para referencia)

4.1 Actividad de anticuerpos C2 quiméricos producidos por transfección transiente

Las muestras del medio acondicionado de transfección transiente para los dos anticuerpos quiméricos diferentes se probaron en ELISA para la unión a Amiloide-Beta. Los resultados indican claramente que la C2 CH AF es la secuencia correcta. El anticuerpo quimérico C2 V_H AF/C2 V_K se une bien en el ensayo, pero en C2 V_H B/C2 V_K no muestra ninguna unión para nada. El anticuerpo de control murino Chemicon 1560 mostró buena unión, pero la unión por el anticuerpo C2 murino purificado suministrado fue baja. Se debe señalar que se empleó un anticuerpo secundario diferente para los anticuerpos murinos con las regiones constantes de ratón en comparación a los anticuerpos quiméricos con regiones constantes humanas, de modo que los resultados no son directamente comparables. El medio acondicionado del hibridoma C2 se encontró después que da un buen resultado en el ensayo.

4.2 Actividad de anticuerpos C2 quiméricos purificados

Los dos anticuerpos quiméricos C2 diferentes se purificaron a partir de líneas de células NS0 estables como se describe y prueba usando el ELISA de amiloide-beta. Los resultados obtenidos son de acuerdo con los resultados obtenidos con el anticuerpo transientemente expresado. El anticuerpo C2 ChVH AF/ChVK se une bien en el ELISA y el anticuerpo C2 ChVH B/ChVK no se une para nada.

Ejemplo 5.- Diseño de Genes de Anticuerpo C2 Humanizado

Las secuencias de aminoácido mC2 V_H y V_K se compararon a las secuencias V_H y V_K de anticuerpo de ratón en las bases de datos NCBI y Kabat.

5.1 Región variable de cadena ligera

El gen de línea germinal de ratón de correspondencia más cercana a mC2 V_K es bb1, Locus MMU231201, (Schable et al, 1999). Solo dos aminoácidos difieren de esta secuencia de línea germinal, ambos localizados dentro de CDRL1. Se encuentran anticuerpos murinos maduros con secuencia similar, pero no idéntica. Varios tienen una CDRL2 idéntica y CDRL3 idéntica, pero la CDRL1 de mC2 parece única. mC2 V_K se puede asignar al subgrupo Mu V_KII de Kabat. La posición 87 de mC2 V_K es F en lugar de la Y que es más común en el subgrupo, indicando que este residuo de región menos variable puede ser importante para la actividad del anticuerpo. La comparación con las secuencias V_K de línea germinal humana muestra que los genes del subgrupo V_KII son la mejor correspondencia para mC2 V_K (Cox et al, 1994). La secuencia DPK15 junto con la región J humana HUJ_K1 se seleccionó para proporcionar las secuencias de regiones menos variables aceptadoras para la V_K humanizada.

Se diseñaron cuatro secuencias V_K humanizadas. C2HuVK1 consiste de las CDR de mC2 V_K con regiones menos variables de DPK15 y J_K1 humana. En las versiones 2, 3 y 4, se han sustituido los residuos murinos en la región menos variable en las posiciones 45 u 87 o ambas. El residuo 45 puede estar comprendido en el soporte de la conformación de la CDR. El residuo 87 está localizado en la entrecara de los dominios V_H y V_K. Por lo tanto, estos residuos pueden ser críticos para el mantenimiento de la unión del anticuerpo.

Las posiciones y cambios que se han hecho en las regiones menos variables de cadena ligera se muestran en la Tabla 1. Una comparación de las secuencias humanizadas con la secuencia mC2 V_K y con DPK15 y J_K1 humana.

5.2 Región variable de cadena pesada

El gen de línea germinal de ratón de correspondencia más cercana a mC2 V_H AF es VH7183, Locus AF120466, (Langdon et al, 2000). La comparación se muestra en la Figura 5. Nueve aminoácidos difieren de esta secuencia de línea germinal, que está más localizada dentro de CDR2. Los anticuerpos murinos maduros con CDR1 idéntica o similar (un residió diferente) o con CDR2 similar (un residió diferente) se encuentran, pero ninguno con las tres CDR idénticas a mC2 V_H AF. La CDR3 del anticuerpo mC2 es inusualmente corta, que consiste de sólo tres residuos. Sin embargo, se encuentran otros anticuerpos en la base de datos con CDR3 de esta longitud. Se puede asignar mC2 V_H AF al subgrupo MuV_HIIID de Kabat. El residuo 47 de mC2 V_H es L en lugar de la W más común, y el residuo 94 es S en lugar de la R normal, indicando que estos residuos de región menos variable pueden ser importantes para la actividad del anticuerpo. La comparación con las secuencias V_H de línea germinal humana muestra que los genes del subgrupo V_HIII son la mejor correspondencia para mC2 V_H. La secuencia DP54 junto con la región J humana HUJ_H6 se seleccionó para proporcionar las secuencias de regiones menos variables aceptadoras para la V_H humanizada.

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

Las posiciones y cambios que se han hecho en las regiones menos variables de cadena pesada se muestran en la Tabla 2.

Ejemplo 6.- Construcción de Genes de Anticuerpo Humanizado

Las regiones variables modificadas se construyeron por el método de recombinación por PCR de traslape. Los casetes de expresión para el anticuerpo quimérico, C2 ChV_H AF y C2 ChV_K, se usaron como plantillas para mutagénesis de las regiones menos variables a las secuencias requeridas. Los conjuntos de pares de cebadores mutagénicos se sintetizaron que abarcan las regiones que se van a alterar. Los casetes de expresión de V_H y V_K humanizadas producidos se clonaron en pUC19 y la secuencia de ADN completa se confirmó que es la correcta para cada V_H y V_K. Los genes de la región V de cadena pesada y ligera, modificados, se escindieron de pUC19 como casetes de expresión de *HindIII* a *BamHI*. Estos se transfirieron a los vectores de expresión pSV*gpt* y pSV*hyg* que incluyen las regiones constante κ o de Ser-Pro de IgG4 humana, respectivamente, como para los vectores de anticuerpo quimérico. La secuencia de ADN se confirmó que es la correcta para la V_H y V_K humanizada en los vectores de expresión.

Ejemplo 7.- Expresión de Anticuerpos Humanizados

7.1 Expresión en línea de células estables

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

7.2 Expresión transiente de anticuerpos humanizados

Para acelerar la prueba en las construcciones V_H y V_K humanizadas, diferentes, los casetes de expresión de V_H y V_K humanizadas de C2 también se transfirieron a los vectores para expresión transiente descrita en la sección 7.2. Las cuatro construcciones de V_K de C2 humanizadas se co-transfectaron con la construcción híbrida C2 V_H en células HEK293. De manera similar, las cuatro construcciones humanizadas C2 V_H se co-transfectaton con la construcción C2 V_K híbrida en células HEK293. Se recolectó el medio acondicionado de células tres días después de la transfección. La cantidad de anticuerpo producido se determinó por ELISA para el anticuerpo de IgGκ humano.

Ejemplo 8.- Actividad de Anticuerpos C2 Humanizados

8.1 Actividad de anticuerpos C2 humanizados producidos por transfección transiente

Se probaron muestras de medio acondicionado de la transfección transiente en el ELISA de amiloide-beta. Los resultados obtenidos indican claramente que las construcciones de VH humanizada C2 HuVH AF versiones 2 y 4 son funcionales cuando se combinan con la cadena C2 kappa híbrida, y son comparables al anticuerpo C2 quimérico en el ensayo. En contraste, los anticuerpos que contienen C2 HuVH AF versiones 1 y 3 combinadas con la cadena C2 kappa híbrida no muestran unión para nada en el ensayo. Esto indica que la sustitución del residuo murino en la posición 94 es esencial para la actividad del anticuerpo. Los anticuerpos que contienen la cadena pesada C2 híbrida combinada con las cuatro cadenas C2 kappa humanizadas mostraron todos buena unión, comparable al anticuerpo quimérico, en el ELISA.

8.2 Actividad de Anticuerpos C2 Humanizados, Purificados

Se purificaron ocho anticuerpos C2 humanizados diferentes que comprenden todas las combinaciones de las dos cadenas pesadas humanizadas y cuatro cadenas ligeras humanizadas a partir de las líneas de células NS0 estables como se describen y se prueba usando el ELISA de amiloide-Beta (Figura 6).

Los resultados obtenidos indican claramente que los anticuerpos C2 HuVH4 se desempeñan mejor en el ensayo que los anticuerpos C2 HuVH2. De los anticuerpos C2 HuVH2, C2 HuVH2/HuVK3 muestra la mejor actividad de unión, pero esto es aproximadamente dos veces reducido en comparación al anticuerpo de control quimérico C2 ChVHAF/ChVK. La actividad de C2 HuVH2/HuVK2 es de cuatro a cinco veces reducida en comparación al control. Las actividades de los anticuerpos que comprenden C2HuVH4 con las cuatro cadenas ligeras humanizadas diferentes son similares. La actividad más alta se observa para C2HuVH4/HuVK1 y todos los cuatro anticuerpos están cercanos al anticuerpo quimérico de control en el ensayo.

Ejemplo 9.- Modificaciones a CDRL2

9.1 Diseño de cadena ligera con CDR 2 modificada

Como se señala anteriormente, muchos anticuerpos comparten la misma secuencia de CDRL2 (“KVSNRFS”) como el anticuerpo C2. Se decidió probar si CDRL2 se modificó ligeramente sin afectar de manera adversa la actividad del anticuerpo. Se seleccionaron dos sustituciones conservadoras: R por K en la posición 50 y S por N en la posición 53. Las dos secuencias alternativas de CDRL2 son por lo tanto “RVSNRFS” y “KVSSRFS”. Estas se incorporaron en la secuencia V_K murina sin otros cambios, como mC2 VK-R y mC2 VK-S, respectivamente.

9.2 Expresión transiente de anticuerpo de CDRL2 modificado

Las dos construcciones de cadena ligera de C2 con CDRL2 modificado, descritas en la Sección 11.2.1 se clonaron en el vector de cadena ligera para expresión transiente. Cada una se co-transfectó con el vector C2 V_H quimérico en células HEK293. Se recolectó el medio acondicionado de las células tres días después de la transfección. La cantidad de anticuerpo producido se determinó por ELISA para el anticuerpo IgGκ humano.

9.3 Actividad del anticuerpo C2 con CDRL2 modificada

Las muestras del medio acondicionado de la transfección transiente de mC2 V_K con CDRL2 modificado, combinado con mC2 V_H se probaron en el ELISA de Amiloide-Beta. (Figura 7). Tanto los anticuerpos de VK-R como de VK-S fueron comparables al anticuerpos C2 quimérico, indicando que las modificaciones individuales a CDRL2 elegida no afectan de manera marcada la actividad del anticuerpo del ensayo.

Ejemplo 10.- Determinación de Afinidad

Para valorar la especificidad de unión y la afinidad de los anticuerpos quiméricos de ratón (ACI-01-Ab-7-C2) (AF) y humanizados (H4K1; H4K4), se realizó el análisis BIACORE^{MR} usando fibras y monómeros de amiloide-beta 1-42 como antígeno inmovilizado en un chip CM5. La tecnología BIACORE^{MR} utiliza cambios en el índice de refracción al nivel de superficie en unión del anticuerpo al antígeno inmovilizado en la capa. La unión se detecta por resonancia de plasmón superficial (SPR) de luz láser que se refleja de la superficie. El análisis de la constante de asociación y la constante de disociación cinética de señal permite la discriminación entre interacción no específica y específica. La concentración del anticuerpo se usó en el intervalo de 0.05 iM a 1.0 iM.

	Monómeros			**Fibras**		
	ka(1/Ms)	K_d (1/s)	KD (M)	K_a(1/Ms)	K_d (1/s)	KD (M)
ACI-01-Ab-7-C2 de ratón	1.8E+04	2.7E-03	1.5E-07	2.4E+04	9.9E-04	4.1E-08
AF quimérico	4.7E+04	9.5E-04	2E-08	5.1E+04	3.3E-04	6.5E-09
H4K1 humanizado	5.0E+04	9.5E-04	1.9E-08	4.9E+04	2.3E-04	4.7E-09
H4K4 humanizado	2.5E+04	4.4E-04	1.8E-08	1.3E+05	3.0E-04	2.3E-09

Ejemplo 11.- Ensayo de Unión Inmunohistoquímica

11.1 Secciones de cerebro humano

Los cerebros de pacientes con AD y pre-AD, sin demencia, saludables se obtuvieron en la Universitätsklinik en Bonn después de la aprobación ética. Los cerebros se fijaron en formaldehido y se deshidrató la región del hipocampo, se incrustó en parafina y se cortaron secciones de 5 μm con un micrótomo. Las secciones de parafina se almacenaron a temperatura ambiente hasta el uso. Para material fresco, se cortaron crio-secciones de 5 μm con un crioestato y las secciones se almacenaron a -80ºC hasta el uso.

11.2 Inmunohistoquímica

Las secciones de parafina se desparafinaron y re-hidrataron al bañar los portaobjetos en xileno seguido por etanol al 100%, etanol al 90%, y etanol al 70%. El fondo se disminuyó por incubación de 30 minutos en H_2O_2 al 10%, metanol al 10% en agua. Se obtuvo recuperación del antígeno al incubar los portaobjetos en ácido fórmico al 100% durante 3 minutos. Después de 3 lavados en solución amortiguada con Tris (TBS, pH 7.5), se bloqueo la marcación no específica por una incubación de 2 horas de los portaobjetos en BSA al 10%, Tritón X-100 al 0.25% en TBS. Después del lavado (3 lavados en TBS) se realizó el bloqueo de los anticuerpos endógenos al adicionar una IgG no marcada anti-humana (Biomeda) e incubando los portaobjetos en cámaras húmedas durante la noche a temperatura ambiente. Después de otros 3 lavados, el anticuerpo humano anti-amiloide, primario se adicionó a los portaobjetos y se incubó otras 24 horas a temperatura ambiente. Después del lavado, se adicionó una IgG anti-humana, secundaria, marcada con fosfatasa alcalina (Sigma) a los portaobjetos y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado, los portaobjetos se revelaron con rojo permanente líquido (Dakocytomation) se lavaron con agua y se secaron con aire antes del montaje con medio de montaje permanente (corbitbalsam).

La crio-sección se fijó en metanol durante 30 minutos a -80ºC y el fondo se disminuyó por la adición de H_2O_2 al metanol frío a una concentración final de 10% e incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados en solución salina amortiguada con Tris (TBS, pH 7.5), se bloqueo la marcación no específica por una incubación de 2 horas de los portaobjetos en BSA al 10%, Tritón X-100 al 0.25% en TBS como antes y el mismo procedimiento de tinción como antes se llevó a cabo.

Las secciones se examinaron con un microscopio Leica DMLB y se fotografió usando una cámara Leica DC500 y el software Leica FireCam 1.2.0.

Los dos anticuerpos A y C humanos marcaron las placas de cerebros de los pacientes con enfermedad de AD (Figura 8). Se marcaron placas tanto difusas como de núcleo. Además las placas difusas en los pacientes con pre-AD sin demencia también se pueden detectar por los anticuerpos A y C. El amiloide en la angiopatía amiloide cerebral (CAA) se marcó con ambos anticuerpos y también se detectó alguna tinción de las neuronas que puede corresponder a amiloide intracelular. No se vio marcación en los cerebros de control de pacientes saludables. Se pueden detectar las placas en secciones de parafina pre-

tratadas con ácido fórmico pero no se marcaron las placas en secciones de parafina sin pre-tratamiento de ácido fórmico y en criosecciones fijadas en metanol. El anticuerpo B humano no detecta placas en las secciones de parafina y el anticuerpo de ratón no tiñe ni la parafina ni las criosecciones de cerebros humanos.

Abreviaturas:
A = anticuerpo AF quimérico de unión (IgG4)
B = anticuerpo B quimérico no de unión (IgG4)
C = anticuerpo H4K1 humanizado de unión (IgG4)

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

Ejemplo 12.- Funcionalidad de mC2 en Fibras Amiloides

12.1 Modificación de la Conformación de Fibras Aä1-42 e Inicio de la Desagregación Después de la Unión del Anticuerpo mC2

A fin de evaluar el mecanismo por el cual el anticuerpo es capaz de desagregar las fibras beta-amiloides ($A\beta_{1-42}$) preformadas, se realizó una comparación minuciosa del ensayo fluorescente de Tioflavina-T (Th-T) que mide la desagregación y la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de estado sólido de péptido Aβ1-42 marcado con U-^{13}C Tirosina 10 y Valina 12 que analiza la conformación secundaria (figura 9A). El anticuerpo mC2 solubilizó 35.4% de las fibras Aβ1-42 preformadas e indujo simultáneamente un cambio en la conformación secundaria de la beta-hoja a la espiral aleatoria. La reducción en al población de la conformación de beta-hoja con respecto a la espiral aleatoria es del orden de 35% y por lo tanto está en acuerdo cercano con aquel medido usando el ensayo de fluorescencia de Th-T (figura 9B). Estos datos indican que la unión del anticuerpo mC2 inicia una transición de la estructura secundaria que provoca de manera potencial una desestabilización del arreglo intermolecular paralelo de las beta-hojas afectando una interrupción de fibras alargadas en fragmentos más pequeños.

12.2 Afinidad de Unión Dependiente de Conformación del Anticuerpo mC2

Puesto que es bien conocido en literatura científica que se puede usar una proporción de la energía de unión de anticuerpo-antígeno para la modificación dependiente de energía de la conformación de un antígeno (Blond y Goldberg, 1987), se realizó un experimento de comparación de la afinidad de unión del anticuerpo C2 a la proteína $A\beta_{1-42}$ completa y a un péptido más pequeño, de nueve aminoácidos de largo que comprende el epítopo del anticuerpo (figura 10). Para esta comparación, se analizaron las afinidades del anticuerpo C2 humanizado por ELISA usando péptidos biotinilados que convierten la secuencia completa de aminoácidos del epítopo de C2 (producido por Mimotopes y comprado de ANAWA Trading SA) y un péptido Aβ1-42 completo biotinilado (Bachem). El análisis se hizo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Mimotopes). Como se muestra en la Figura 10, el anticuerpo se une con una afinidad superior de 36.0% al péptido que comprende su epítopo específico (aminoácidos 13-21 de la secuencia de $A\beta_{1-42}$) con respecto a la proteína Aβ1-42 completa. Por lo tanto, se sugiere que la diferencia en la energía de afinidad de unión se usó para la transición consumidora de energía de la conformación secundaria de la proteína amiloide para presentar el antígeno en una posición más aceptable para la interacción con el anticuerpo. Esto explica porque la afinidad del anticuerpo es menor para la nativa (la proteína amiloide completa) que para la subunidad aislada.

Ejemplo 13.- Efectos del hC2 anti-amiloide en la agregación del péptido amiloide-beta 1-42

Para evaluar la capacidad del anticuerpo hC2 monoclonal anti-amiloide-beta humano para mediar los efectos anti-agregatorios y de desagregatorios en amiloide-beta (Aβ), se realizó un ensayo de espectro fluorescencia de tioflavina T.

13.1 Inhibición del ensayo de Agregación

Se re-constituyó polvo liofilizado de Aβ1-42 en hexafluoroisopropanol (HFIP) a 1 mM. La solución peptídica se trató con ultrasonido durante 15 minutos a temperatura ambiente, se agitó durante la noche, y las alícuotas se hicieron en tubos de microcentrífuga no tratados con silicón. El HFIP entonces se evaporó bajo una corriente de argón. La película peptídica resultante se secó al vacío durante 10 minutos y se almacenó a -80ºC hasta que se usó.

Para valorar la inhibición mediada por anticuerpo del a agregación de Aβ1-42, el anticuerpo hC2 se pre-diluyó en PBS y se hizo una solución de ensayo que contiene los siguientes componentes en un tubo de incubación sin silicón: anticuerpo pre-diluido 3.3 o 0.33 mM, tioflavina T 10 mM, Aβ1-42 33 mM, y DMSO al 8.2%. Por lo tanto, las relaciones molares finales del anticuerpo a Aβ1-42 fueron 1:10 y 1:100. También se prepararon soluciones apropiadas de control. Las soluciones entonces se incubaron durante 4 horas a 37ºC, y la espectrofluorescencia (unidades relativas de fluorescencia; RFU) se leyeron en seis réplicas en

placas negras de 384 concavidades (Perkin-Elmer) en un espectrofluorómetro de Perkin-Elmer FluoroCount. La espectrofluorescencia entonces se midió y se calculó el % de desagregación como se describe más adelante.

13.2 Ensayo de Desagregación

Para valorar la desagregación mediada por anticuerpo de Aβ1-42 pre-agregado, se produjo un Aβ1-42 de bajo peso molecular, preparado como se describe anteriormente, como una solución de 110 en DMSO al 27% y PBS 1 x. esta solución entonces se dejó agregar a 37ºC durante 24 horas después de lo cual se adicionaron los siguientes: anticuerpo pre-diluido 3.3 o 0.33 mM y tioflavina T 10 mM. Esto dio por resultado una relación molar de anticuerpo 1:10 y 1:100 a Aβ1-42. Esta solución entonces se incubó durante 24 horas adicionales a 37ºC. La espectro fluorescencia entonces se midió y se calculó el % de desagregación como se describe más adelante.

13.3 Cálculo

La inhibición de la agregación o desagregación se expresa como % de inhibición media o % de desagregación media, respectivamente, ± erro estándar de la media (SEM) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{RFU de control positivo-RFU de control negativo})-(\text{RFU de muestra con Aβ1-42-RFU de muestra sin Aβ1-42})}{(\text{RFU de control positivo-RFU de control negativo})} \times 100\%$$

13.4 Resultados

13.4.1 Inhibición de la agregación de Aβ1-42

La inhibición de la agregación de Aβ1-42 usando el anticuerpo hC2 se muestra en la Tabla 1 y la Figura 18. A una relación molar de anticuerpo a Aβ1-42 de 1:100, la inhibición promedió 30% (2 experimentos independientes), en tanto que a una relación molar de 1:10, la inhibición fue de 80% (2 experimentos independientes; ver Tabla 1).

Tabla 1. Inhibición mediada por hC2 de la agregación de Aβ1-42 a relaciones molares de anticuerpo a Aβ1-42 de 1:100 y 1:10.

Anticuerpo	Relación molar (anticuerpo a Aβ1-42)	
	1:100	1:10
hC2	30.0 ± 4.1%	80.4 ± 6.9%

13.4.2 Desagregación de Aβ1-42 pre-agregado

La desagregación de Aβ1-42 pre-agregado usando el anticuerpo hC2 se muestra en la Tabla 2 y Figura 19. A una relación molar de anticuerpo a Aβ1-42 de 1:100, la desagregación promedió 24%, en tanto que a una relación molar 1:10, la desagregación fue de 32% (3 experimentos independientes; ver Tabla 2).

Tabla 2. Desagregación mediada por hC2 de Ab1-42 pre-agregado a relaciones molares de anticuerpo a Aβ1-42 de 1:100 y 1:10.

Anticuerpo	Relación molar (anticuerpo a Aβ1-42)	
	1:100	1:10
hC2	23.9 ± 4.4%	31.9 ± 3.5%

Usando el ensayo de tioflavina T, se pueden demostrar las propiedades bifuncionales del anticuerpo hC2 humanizado anti-Aβ, específicamente para inhibir la agregación de Aβ1-42 en conformación protofibrilar patógena y además para desagregar las protofibrillas Aβ1-42 preformadas. hC2 inhibió la agregación de Aβ1-42 por 80% a una relación molar de anticuerpo a Aβ1-42 de 1:10. La capacidad de hC2 para desagregar las protofibrillas pre-agregadas de Aβ1-42 a una relación molar de 1:10 se mostró que es de 32%.

Ejemplo 14.- Unión específica de la conformación de mC2 a diferentes clases de proteína amiloide

A fin de evaluar la especificidad de mC2 a diferentes etapas de proteína amiloide polimerizada, amiloide monómerico, polimérico, soluble y fibrilado, se realizó un ELISA revestido con estas diferentes etapas de beta-amiloide polimérico (figura 11). Los monómeros se prepararon de acuerdo a un método modificado, publicado por (Klein 2002), el amiloide-beta polimérico soluble de acuerdo a (Barghorn et al., 2005), en tanto que las fibras se realizaron por incubación del amiloide (Bachem, Suiza) con una concentración final

de 1 μg/μl en Tris/HCl, pH 7.4 a 37ºC durante 5 días seguido por un paso de centrifugación (10000 rpm durante 5 minutos). Entonces los polímeros amiloides se revistieron en placas de ELISA con una concentración final de 55 μg/ml y se realizó un ELISA de afinidad de unión al usar un anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón (Jackson) marcado con fosfatasa alcalina. Como se demuestra en la Figura 11, el anticuerpo mC2 se une con mayor afinidad a amiloide-beta polimérico soluble que a otras fibras y con lo menor a monómeros. Estos datos indican que la unión del anticuerpo se ve influenciada por el epítopo del amiloide y por la conformación de los diferentes agregados amiloides.

Ejemplo 15: Correlación de epítopos del anticuerpo monoclonal hC2 de AC Inmune

Se realizó la correlación de epítopos del anticuerpo monoclonal humanizado hC2 por ELISA usando tres diferentes bibliotecas de péptidos. Una biblioteca comprendió un total de 33 péptidos biotinilados que cubren la secuencia completa de aminoácidos (aa) de Aβ1-42 (producido por Mimotopes y comprado de ANAWA Trading SA), la segunda biblioteca contiene péptidos biotinilados usando el péptido 12 (aa12-20 de Aβ) de la primera biblioteca de péptidos y sustituyendo cada aa en la secuencia por una alanina (ver Tabla 3 posterior), y la tercera biblioteca contiene los péptidos biotinilados 13, 14 o 15 (aa 13-21, 14-22 o 15-23 Aβ) y sustituyendo en cada caso los últimos aminoácidos a una alanina o a una glicina para el aa 21 que es ya una alanina (ver tabla 4 posterior). Se usó un péptido Aβ1-42 completo biotinilado como control positivo (Bachem). Se realizó la correlación de epítopos de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Mimotopes). De forma breve, se bloquearon placas revestidas con estreptavidina (NUNC) con BSA al 0.1% en PBS durante la noche a 4ºC. Después del lavado con PBS-Tween 20 al 0.05%, las placas se revistieron durante 1 hora a temperatura ambiente con los diferentes péptidos de la biblioteca, se diluyeron en BSA al 0.1%, Azida Sódica al 0.1% en PBS a una concentración final de 10 μm. Después del lavado, las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo hC2 o con un anticuerpo de IgG4, quimérico, de unión a Aβ diluido a 200 ng/ml en BSA al 2%, Azida Sódica al 0.1% en PBS. Las placas se lavaron nuevamente y se incubaron con IgG anti-humano de cabra conjugada con fosfatasa alcalina durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado final, las placas se incubaron con sustrato de fosfatasa (pNPP) y se leyeron a 405 nm usando un lector de placas ELISA.

Se muestra que el anticuerpo monoclonal humanizado hC2 se unió específicamente a los péptidos 12, 13, 14, 15 y 16 de la primera biblioteca de péptidos. Estos péptidos comprenden aa 12-20, 13-21, 14-22, 15-23 y 16-24, respectivamente de Aβ1-42, sugiriendo que el epítopo está en la región 12-24 de Aβ. Se usó una segunda biblioteca con sustituciones de alanina para determinar los aa críticos para la unión a Aβ1-42 (VHHQKLVFF). La unión del anticuerpo hC2 se pierde completamente cuando los aminoácidos 16, 17, 19 o 20 se sustituyen por una alanina, indicando que estos aa son absolutamente críticos para la unión del anticuerpo Aβ. La unión del anticuerpo hC2 se pierde parcialmente cuando se sustituyen los aa 15 y 18.

La unión también casi se pierde completamente cuando aa 14 se sustituye por una alanina, indicando que aa 14 también es muy importante para la unión.

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

Ejemplo 16.- Neuropotección por el anticuerpo hC2

La capacidad del anticuerpo hC2 para proteger las neuronas de la degeneración inducida por oligómero de Abeta se valoró en un ensayo in vitro. Se aislaron neuronas corticales de ratón de 16.5-17.5 días, embriónicos, se disociaron y cultivaron in vitro en el medio N3-F12. Las células se cultivaron durante 9 días en total, y se alimentaron el día 3 y el día en que se adicionó el oligómero de Abeta, o el oligómero de Abeta más el anticuerpo hC2 anti-Abeta. En el día cinco ("4 días de Abeta") o en el día seis ("3 días de Abeta"), ciertas concavidades de las células se trataron con ya sea oligómero de Abeta 2 μM solo o una combinación de oligómero de Abeta 2 μM y 50 μg/ml de anticuerpo hC2 anti-Abeta.

El oligómero de Abeta se preparó al disolver Abeta 1-42 (rPéptido) en HFIP, de lo cual los péptidos de Abeta se pusieron en alícuotas de 10 μl a 1 mg/ml y luego se evaporaron en una campana de humo durante 30 minutos y se almacenaron películas peptídicas a -80ºC hasta el uso. En el uso, la película peptídica se disolvió en 10 μl de DMSO, luego 78.6 μl de HAMS F12, y la solución de péptido de Abeta se incubó a 4ºC durante 24-48 horas (concentración final de 25 μM de Abeta).

Para células de control, se adicionó DMSO-F12 solo al mismo volumen como Abeta-DMSO en el día 5, las células se cultivaron durante 4 días adicionales sin ningún tratamiento adicional. En el día 9, las neuronas de todas las condiciones de cultivo se fijaron y se tiñeron con Tuj1 (un anticuerpo anti-beta-

tubilina), seguido por tinción con anticuerpos secundarios marcados con FITC para visualizar los microtúbulos, y de esta manera los procesos neuronales en general. Los resultados se muestran en la Figura 20. Las neuronas corticales embriónicas no tratadas de ratón mostraron morfología normal después de nueve días de cultivo (Figura 20, panel a la izquierda). El tratamiento de las células con el oligómero de Abeta durante tres días indujo degeneración de axones y provocó una disminución en el número total de axones (Figura 20, panel central inferior), y este efecto fue aun más pronunciado a los cuatro días del tratamiento (Figura 20, panel central superior). En contraste, las células tratadas con la combinación de oligómero de Abeta y anticuerpo hC2 anti-Abeta, pareció similar a las células de control (Figura 20, paneles derechos superior e inferior). Estos resultados indican que el anticuerpo hC2 anti-Abeta fue capaz de proteger neuronas corticales embriónicas de ratón de la degeneración inducida por el oligómero de Abeta.

Tabla 1.- Posiciones y cambios hechos en las regiones menos variables de cadena ligera C2 humanizada

Posición, cadena ligera	45	87	50	53
$C2V_K$ de ratón	K	F	K	N
$C2HuV_K1$ humanizado	Q	Y	K	N
$C2HuV_K2$ humanizado	Q	F	K	N
$C2HuV_K3$ humanizado	K	Y	K	N
$C2HuV_K4$ humanizado	K	F	K	N
dpk15 de línea germinal humana	Q	Y	L	N
$C2V_K$-R de ratón			R	
$C2V_K$-S de ratón				S

Tabla 2.- Posiciones y cambios hechos en las regiones menos variables de cadena pesada C2 humanizada

Posición, cadena pesada	47	94
C2VHAF de ratón	L	S
C2HuVHAF1 humanizada	W	R
C2HuVHAF2 humanizada	W	S
C2HuVHAF3 humanizada	L	R
C2HuVHAF4 humanizada	L	S
DP-54 de línea germinal humana	W	R

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

Tabla 3.- Resumen de péptidos usados en la segunda biblioteca
aa que son importantes para la unión se marcan en cursivas y subrayados y aa absolutamente críticos para la unión se marcan en cursivas y negritas.

p12-20	V	H	H	Q	K	L	V	F	F
A12	**A**	H	H	Q	K	L	V	F	F
A13	V	**A**	H	Q	K	L	V	F	F
A14	V	H	**A**	Q	K	L	V	F	F
A15	V	H	H	**A**	K	L	V	F	F
A16	V	H	H	Q	**A**	L	V	F	F
A17	V	H	H	Q	K	**A**	V	F	F
A18	V	H	H	Q	K	L	**A**	F	F
A19	V	H	H	Q	K	L	V	**A**	F
A20	V	H	H	Q	K	L	V	F	**A**
aa no.	12	13	***14***	*15*	***16***	***17***	*18*	***19***	***20***

Tabla 2.- Resumen de péptidos usados en la tercera biblioteca.
aa que son importantes para la unión se marcan en cursivas y subrayados y aa absolutamente críticos para la unión se marcan en cursivas y negritas.

p13-21		H	H	Q	K	L	V	F	F	A		
p13-21	G21	H	H	Q	K	L	V	F	F	**G**		
p14-22			H	Q	K	L	V	F	F	A	E	

p14-22	A22		H	Q	K	L	V	F	F	A	**A**	
p15-23				Q	K	L	V	F	F	A	E	D
p15-23	A23			Q	K	L	V	F	F	A	E	**A**
aa no.		13	***14***	*15*	***16***	***17***	*18*	***19***	***20***	21	22	*23*

Lista de referencias

Barghorn S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, Keller P, Janson B, Bahr M, Schmidt M, Bitner RS, Harlan J, Barlow E, Ebert U, Hillen H (2005) Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. J Neurochem 95:834-847.

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

Cox JPL, Tomlinson IM y Winter G. Eur. J. Immunol. 1994; 24: 827-836. A directory of human germ-line V_K segments reveals a strong bias in their usage.

Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of protein of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, 1991.

Klein WL (2002) Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular soluble polymeric amyloid beta (ADDLs) as new vaccine and drug targets. Neurochem Int 41(5):345-352.

Langdon SD, Inaioki M, Kelsoe G. y Tedder TF. Immunogenetics 2000; 51: 241-245. Germline sequences of V(H)7183 gene family members in C57BL/6 mice demonstrate natural selection of particular sequences during recent evolution.

Mulligan RC y Berg P. Science 1980; 209: 1422-1427. Expression of a bacterial gene in mammalian cells.

Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G, Nature 1988; 332: 323-327. Reshaping human antibodies for therapy.

Schable KF, Thiebe R, Bensch A, Brensing-Kueppers J, Heim V, Kirschbaum T, Lamm R, Ohnrich M, Pourrajabi S, Roschenthaler F, Schwendinger J, Wichelhaus D, Zocher I and Zachau HG. Eur. J. Immunol. 1999; 29: 2082-2086. Characteristics of the immunoglobulin V kappa genes, pseudogenes, relics and orphons in the mouse genome.

Tomlinson IM, Walter G, Marks JD, Llewelyn MB and Winter G, J. Mol. Biol. 1992; 227: 776-798. The repertoire of human germline V_H sequences reveals about 50 groups of V_H segments with different hypervariable loops.

SECUENCIAS

<110> AC Immune

<120> Anticuerpo Humanizado
<130> M1967 EP S3
<160> 32
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<223> región variable de cadena pesada humanizada (CDR1) C2 HuVH AF 4
<400> 1
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
1 5 10
<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<223> región variable de cadena pesada humanizada (CDR2) C2 HuVH AF 4
<400> 2
Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 3
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<223> región variable de cadena pesada humanizada (CDR3) C2 HuVH AF 4
<400> 3
Gly Asp Tyr
1
<210> 4
<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

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

<400> 4

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> región variable de cadena ligera humanizada (CDR2) C2 HuVK 1

<400> 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> región variable de cadena ligera humanizada (CDR3) C2 HuVK 1

<400> 6

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> epítopo, región 2 de Aβ

<400> 7

Val Phe Phe Ala Glu Asp

1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
<223> epítopo, región 1 de A β
<400> 8
His Gln Lys Leu Val
1 5
<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(1)
<223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, o Ile
<220>
<221> misc_característica
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, Ser o Ile
<220>
<221> misc_característica
<222> (5)..(5)
<223> Xaa puede ser Glu o Asp
<220>
<221> misc_característica
<222> (6)..(6)
<223> Xaa puede ser Glu o Asp
<400> 9
Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
1 5
<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(1)
<223> Xaa puede ser His, Asn, Gln Lys, o Arg
<220>
<221> misc_característica

<222> (2)..(2)

<223> Xaa puede ser Asn o Gln

<220>

<221> misc_característica

<222> (5)..(5)

<223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, o Ile

<400> 10

Xaa Xaa Lys Leu Xaa

1 5

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_característica

<222> (1)..(1)

<223> Xaa puede ser His, Asn, Gln Lys, o Arg

<220>

<221> misc_característica

<222> (2)..(2)

<223> Xaa puede ser Asn o Gln

<220>

<221> misc_característica

<222> (5)..(5)

<223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, o Ile

<220>

<221> misc_característica

<222> (8)..(8)

<223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, Ser o Ile

<220>

<221> misc_característica

<222> (9)..(9)

<223> Xaa puede ser Glu o Asp

<220>

<221> misc_característica

<222> (10)..(10)

<223> Xaa puede ser Glu o Asp

<400> 11

Xaa Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena ligera variable C2 HuVK 1 humanizada artificial

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13

<211> 219

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera C2 humanizada artificial

<400> 13

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

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

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

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95
Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 14
<211> 107
<212> PRT
<213> secuencia artificial
<220>
<223> región constante ligera C2 humanizada artificial
<400> 14

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

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

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

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 16

<211> 439

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada C2 humanizada artificial

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
180 185 190

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
195 200 205

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
210 215 220

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
245 250 255

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
275 280 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
305 310 315 320

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
325 330 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

355 360 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

370 375 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

385 390 395 400

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser

405 410 415

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

420 425 430

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435

<210> 17

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> región de cadena C gamma-4 de Ig - modificada

<400> 17

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly
325

<210> 18
<211> 51
<212> ADN
<213> Mus musculus
<220>
<223> región variable de cadena pesada humanizada (CDR2) C2 HuVH AF 4
<400> 18
agcatcaata gtaatggtgg tagcacctat tatccagaca gtgtgaaggg c 51
<210> 19
<211> 9
<212> ADN
<213> Mus musculus
<220>

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

<400> 19

ggtgactac 9

<210> 20

<211> 49

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

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

<400> 20

agatctagtc agagccttgt atatagtaat ggagacacct atttacatt 49

<210> 21

<211> 635

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera variable C2 Hu VK 1 humanizada artificial

<400> 21

gatattgtga tgacccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctcctggtga gcctgcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta tttacattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctcctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttcct 300

tggacgttcg gccaaggcac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 22

<211> 657

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera C2 humanizada artificial

<400> 22

gatattgtga tgacccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctcctggtga gcctgcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta tttacattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctcctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttcct 300
tggacgttcg gccaaggcac caaggtggaa atcaaaagga ctgtggctgc accatctgtc 360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 23
<211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
<223> región constante de cadena ligera C2 humanizada artificial
<400> 23

aggactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 24
<211> 798
<212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>
<223> cadena pesada variable C2 HuVH AF humanizada artificial
<400> 24

gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccaggct 120
ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180
ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctccctgtac 240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtggtgac 300
tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctca 336

<210> 25
<211> 1317

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada C2 humanizada artificial

<400> 25

gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccaggct 120

ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180

ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctccctgtac 240

ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtggtgac 300

tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctcagctt ccaccaaggg cccatccgtc 360

ttccccctgg cgccctgctc cagatcgacc tccgagagca cagccgccct gggctgcctg 420

gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 480

ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg 540

gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag 600

cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gagtccaaat atggtccccc gtgtccccca 660

tgcccagcac ctgagttcct gggggggacca tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag 720

gacactctca tgatctcccg gacccctgag gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccag 780

gaagaccccg aggtccagtt caactggtac gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag 840

acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 900

ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc 960

ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg 1020

tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1080

gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1140

aacaactaca agaccacgcc tcccgtcctc gattccgacg gctccttctt cctctacagc 1200

aggctaaccg tggacaagag caggtggcag gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg 1260

catgaggctc tgcacaacca ctacacacag aagagcctct ccctgtctct gggtaaa 1317

<210> 26

<211> 981

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> región constante de cadena pesada C2 humanizada artificial

<400> 26

gcttccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccagatc gacctccgag 60

agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 300
aaatatggtc ccccgtgtcc cccatgccca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 360
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420
tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccccat cccaggagga gatgaccaag 720
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt cctcgattcc 840
gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 900
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960
ctctccctgt ctctgggtaa a 981

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

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

<210> 28
<211> 112
<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

<210> 29

<211> 336

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 29

gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta tttacattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcct 300

tggacgttcg gtggaggcac caagctagaa atcaaa 336

<210> 30

<211> 417

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 30

atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttcctgcttc agcagtgat 60

gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120

tcttgcagat ctagtcagag ccttgtatat agtaatggag acacctattt acattggtac 180

ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240

ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc 300

agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccttgg 360

acgttcggtg gaggcaccaa gctagaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgta 417

<210> 31

<211> 336

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 31

gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120

ccagacaaga ggctggaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180

ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagtggtgac 300

tactggggcc aaggctccac tctcacagtc tcctca 336

<210> 32

<211> 408

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 32

atgrasttsg ggytcagmtt grttttcctt gcccttattt taaaaggtgt ccaatgtgag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtccct gaaactctcc 120

tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tatggcatgt cttgggttcg ccagactcca 180

gacaagaggc tggaattggt cgcaagcatc aatagtaatg gtggtagcac ctattatcca 240

gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300

caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag tggtgactac 360

tggggccaag gctccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacaccc 408

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, capaz de unirse específicamente a beta amiloide, en donde el anticuerpo humanizado o el fragmento del mismo comprende una región variable de la cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una región variable de la cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y en donde el anticuerpo humanizado o el fragmento del mismo comprende la variante D265A de la región Fc de IgG1.

2. El anticuerpo humanizado o el fragmento del mismo de la reivindicación 1, en donde la variante D265A resulta en una función de efector reducida.

3. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo humanizado o el fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1.

4. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3, que comprende secuencias de nucleótidos seleccionadas de: (a) una secuencia que codifica SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, que representa las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDRs) 2 y 3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR), respectivamente, (b) una secuencia que codifica SEQ ID NO: 4, que representa CDR 1 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR); (c) SEQ ID NO: 18; (d) SEQ ID NO: 19; (e) SEQ ID NO: 20; (f) una secuencia de SEQ ID NO: 22 que codifica la cadena ligera, (g) una secuencia de SEQ ID NO: 21 que codifica la región variable de la cadena ligera, (h) una secuencia de SEQ ID NO: 24 que codifica la región variable de la cadena pesada e (i) una secuencia de SEQ ID NO: 21 que codifica la región variable de la cadena ligera.

5. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3 ó 4.

6. Una célula que comprende un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5.

7. Una composición que comprende el anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en una cantidad terapéuticamente eficaz y que comprende además, opcionalmente, un soporte farmacéuticamente aceptable.

8. Una composición que comprende el anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 y, opcionalmente, que comprende, además, una sustancia biológicamente activa adicional en una cantidad terapéuticamente eficaz y/o un soporte y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde la sustancia biológicamente activa adicional se selecciona de un agente terapéutico utilizado en el tratamiento de amiloidosis provocada por amiloide beta, compuestos contra estrés oxidativo, compuestos anti-apoptóticos, queladores metálicos, inhibidores de la reparación del ADN tal como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de α-secretasa, inhibidores de β- y γ-secretasa, proteínas tau, neurotransmisores, interruptores de la lámina β, atrayentes de componentes celulares de depuración/agotamiento de amiloide-β, inhibidores de amiloide-beta N-terminal truncado incluyendo amiloide beta 3-42 piroglutamado, moléculas anti-inflamatorias, inhibidores de colinesterasa (ChEI) tales como tacrina, rivastigmina, donepezil y/o galantamina, agonistas de M1, fármacos modificadores de amiloide o tau y complementos nutritivos.

9. El anticuerpo humanizado o el fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en una cantidad terapéuticamente eficaz, para uso en un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de una o más enfermedades relacionadas con la amiloidosis, seleccionadas de amiloidosis, trastornos neurológicos tal como Enfermedad de Alzheimer (AD), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Holandés); complejo de Parkinson-Demencia de Guam; parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), Diabetes de Comienzo en Adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, degradación de neuronas inducida por Aβ o afección asociada a amiloide caracterizada por una pérdida de capacidad de memoria cognitiva y degeneración macular en un sujeto que los necesita.

10. Una composición terapéutica que comprende el anticuerpo humanizado o el fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, para uso en un método de tratamiento de la amiloidosis en un sujeto que lo necesita.

11. Un método de diagnosis de una enfermedad o afección asociada a amiloides, que comprende:

(a) poner en contacto una muestra de tejido de un sujeto sospechoso de contener la proteína amiloide,

con el anticuerpo humanizado o el fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, anticuerpo que se une con un epítopo de la proteína amiloide;

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

(c) detectar la formación del complejo inmunológico; y

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

12. Un método para determinar el grado de carga de placas amiloidogénicas en una muestra de tejido y/o fluidos corporales de un sujeto, que comprende:

(a) someter a ensayo dicha muestra en cuanto a la presencia de proteína amiloide con el anticuerpo humanizado o el fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2;

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

(c) calcular la carga de placas en el tejido y/o fluidos corporales del sujeto.

13. Un kit de prueba para la detección y diagnosis de enfermedades y afecciones asociadas a amiloides que comprenden el anticuerpo humanizado o el fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 y, opcionalmente, que comprende, además, instrucciones para utilizar los anticuerpos con el fin de unirlos a proteína amiloide para formar un complejo inmunológico y detectar la formación del complejo inmunológico de modo que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de proteína amiloide.

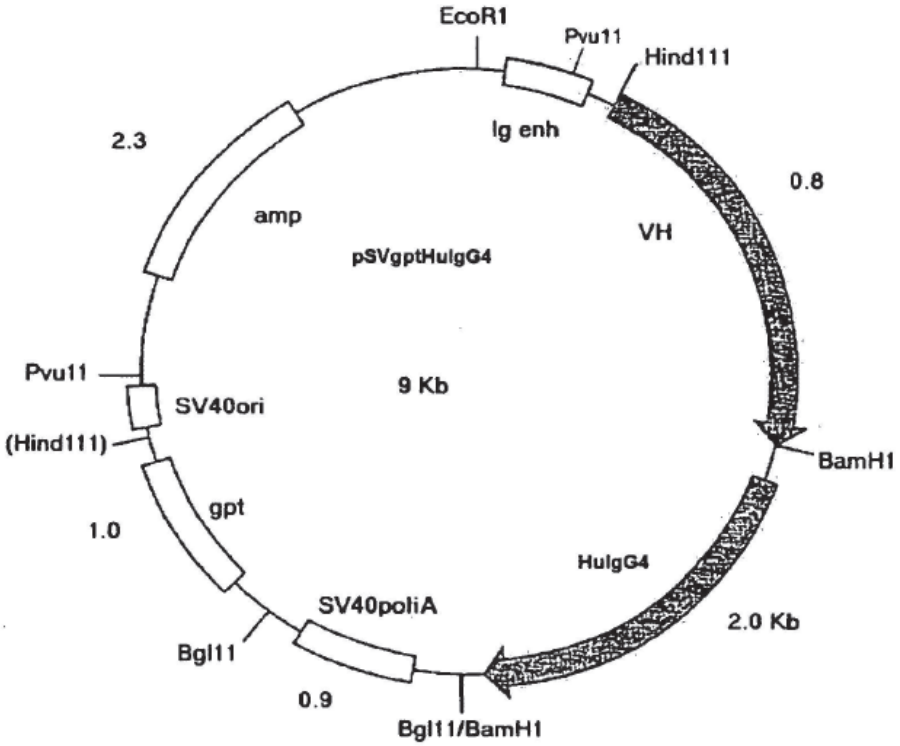


FIG 1
(ejemplo 2)

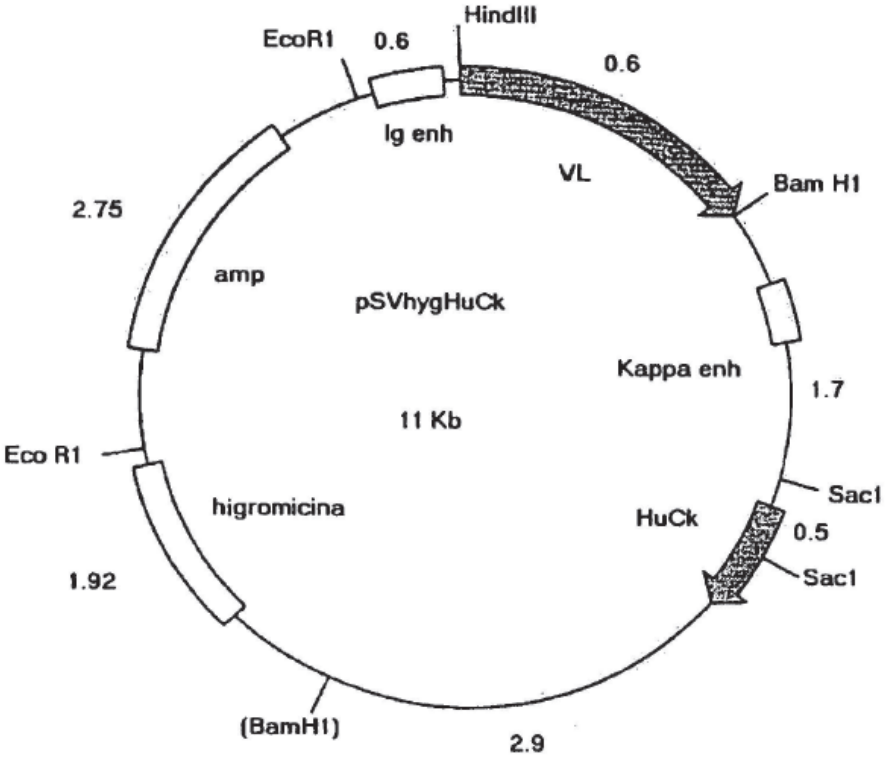


FIG 2
(Ejemplo 2)

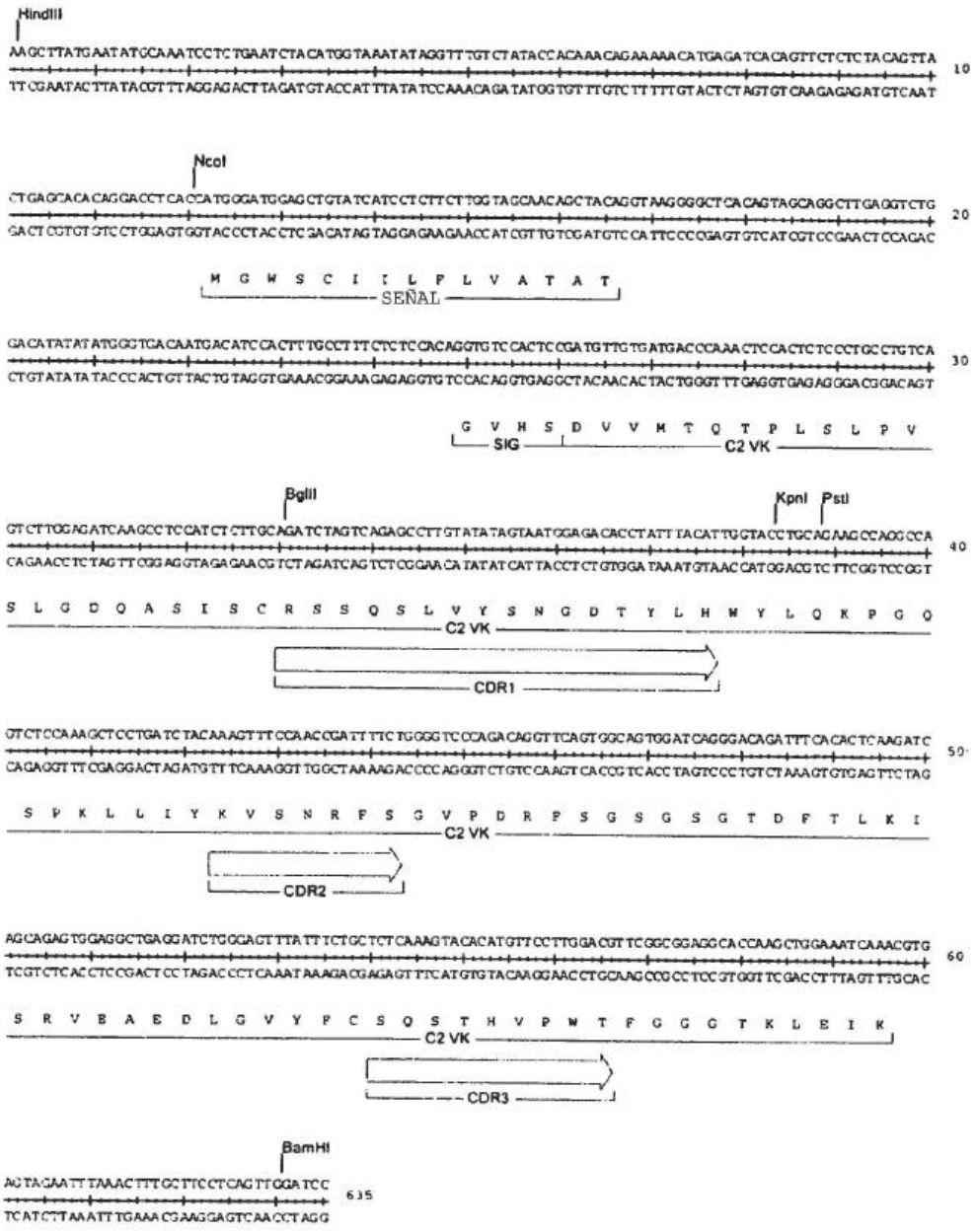


FIG 3
(Ejemplo 2)

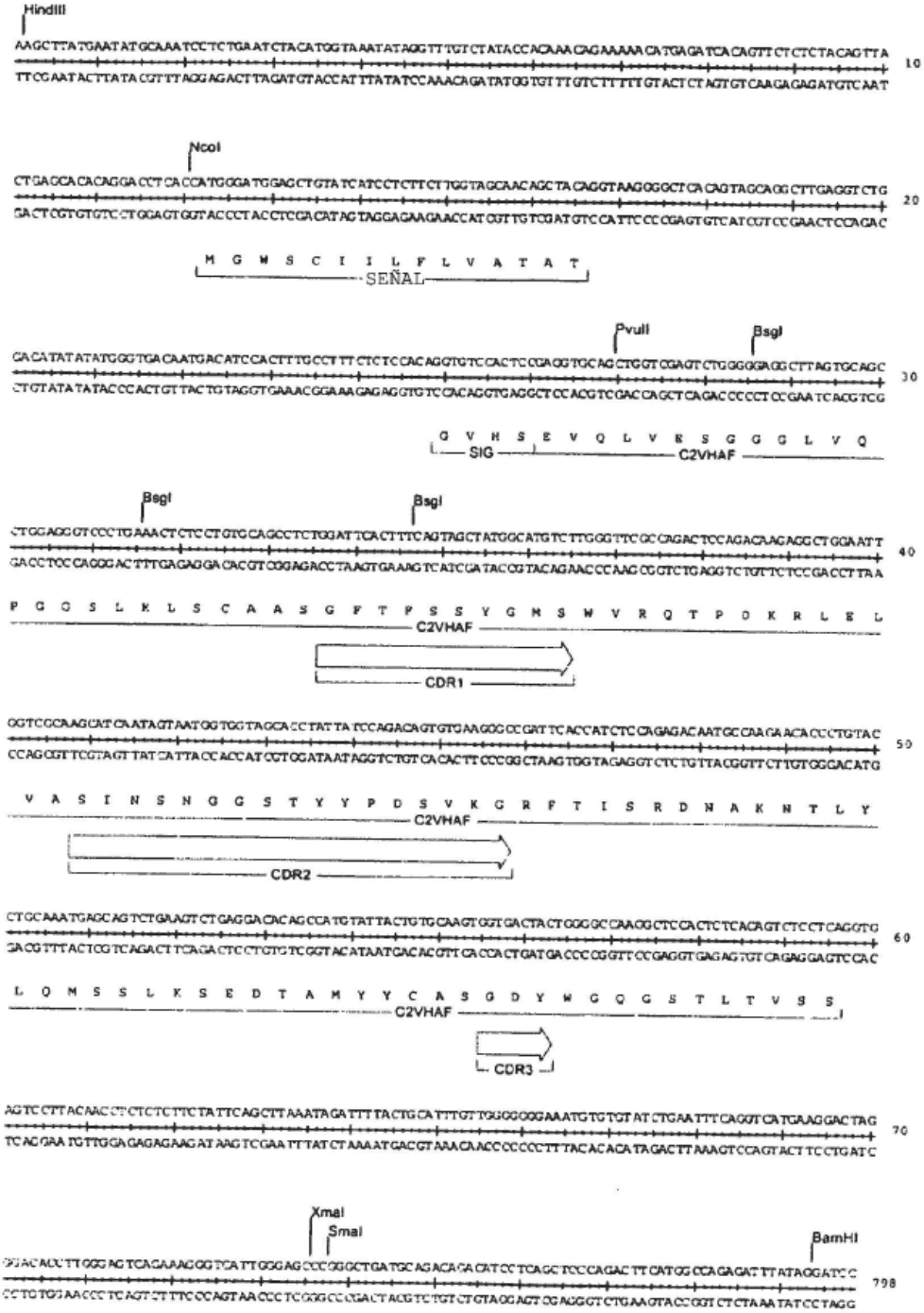


FIG 4

(Ejemplo 2)

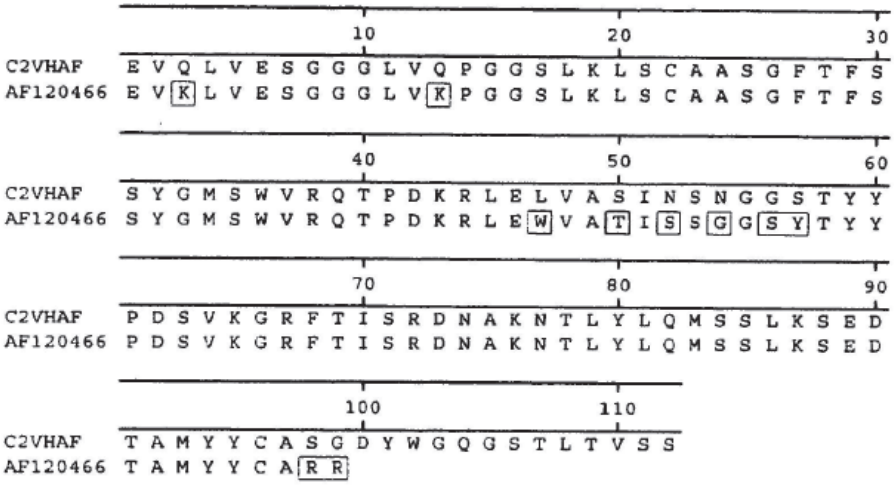
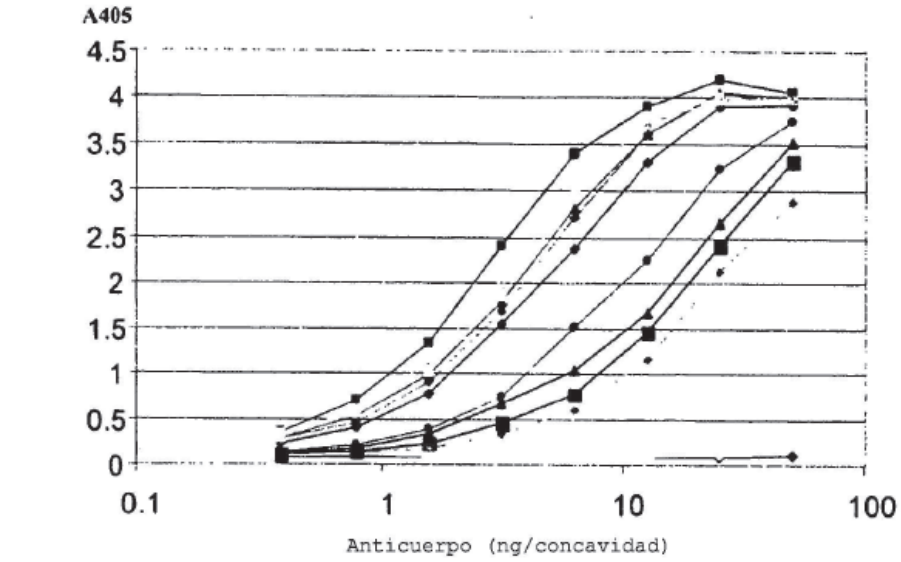


FIG 5

(Ejemplo 5.2)



Control negativo

chVHAF/CHVK quimérico

AF/HuIgG4 quimérico

B HuIgG4 quimérico

HuVHv2/HuVKv1

HuVHv2/HuVKv2

HuVHv2/HuVKv3

HuVHv2/HuVKv4

HuVHv4/HuVKv1

HuVHv4/HuVKv2

HuVHv4/HuVKv3

HuVHv4/HuVKv4

FIG 6

(Ejemplo 8)

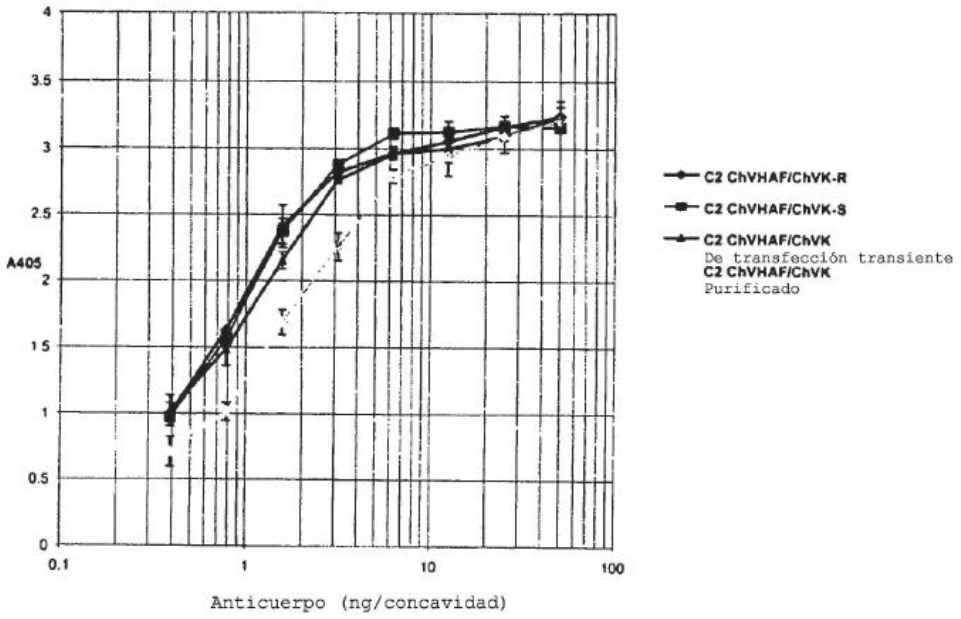


FIG 7

(Ejemplo 9)

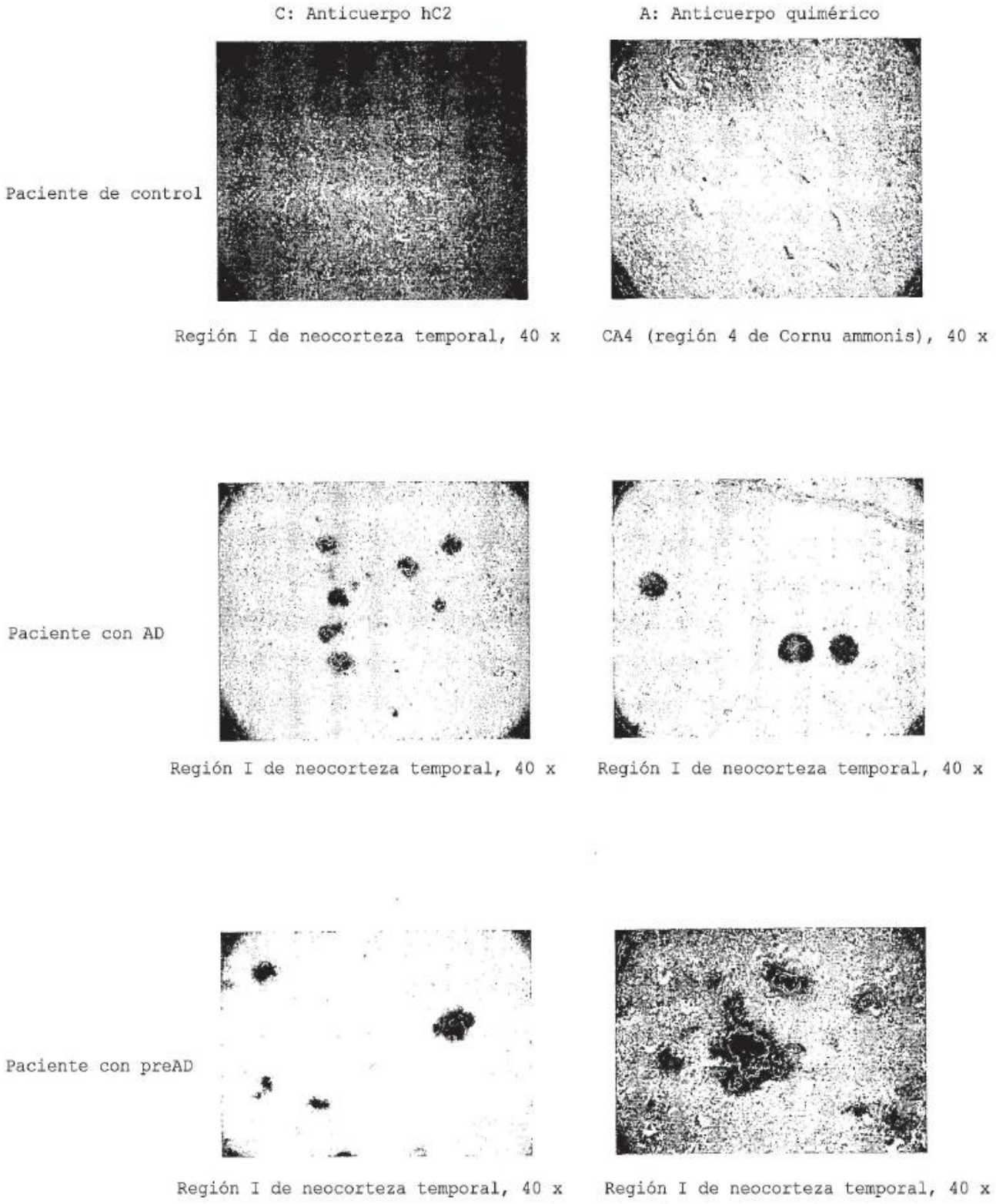


FIG. 8
(Ejemplo 11)

Figura 9A

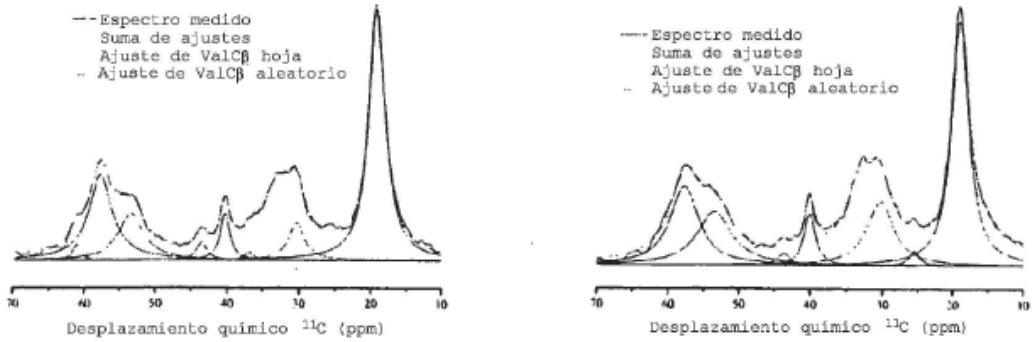


Figura 9B

Resonancia	PBS			C2 de ratón		
	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	% de Intensidad Integral	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	% de Intensidad Integral
Val Cβ - hoja	32.60	479	81.7	33.09	366	53 5
Val Cβ - aleatorio	30.27	200	18.3	30.27	340	46.5

A) Comparación de espectros de 13C CPMAS y ajustes para fibras amiloides β1-42 marcadas con U-13C Tyr10 y Val12 incubadas con PBS (izquierda; sirve como control) o ACI-7-C2 (derecha) durante 24 horas y luego liofilizados. Los ajustes para las dos conformaciones de Val2 Cβ se muestran en verde (hoja) y azul (espiral aleatoria). El pico en c33 ppm corresponde a la conformación de beta-hoja de las fibras en tanto que a 30 ppm es un resultado de la conformación de espiral aleatoria.
B): Comparación de parámetros ajustados para las dos conformaciones de Val 12 Cβ. Los desplazamientos químicos ajustados para las dos conformaciones son bastante similares pero son muy diferentes las intensidades integrales, que reflejan una reducción en la conformación de beta-hoja original por aproximadamente 35% (1-(53.5/81.7)). Este es un arreglo muy cerrado con el valor que se obtuvo de la medición de fluorescencia.

FIG 9

(Ejemplo 12)

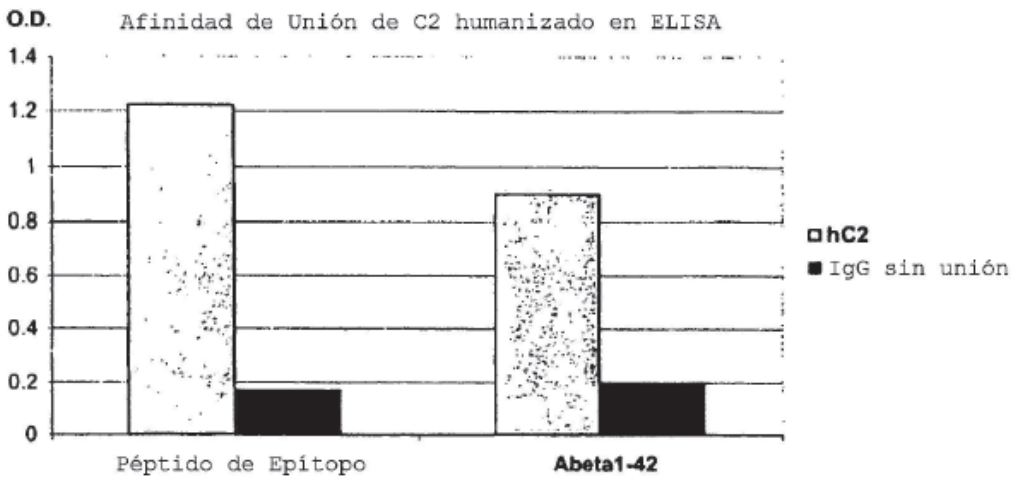


FIG 10
(Ejemplo 12)

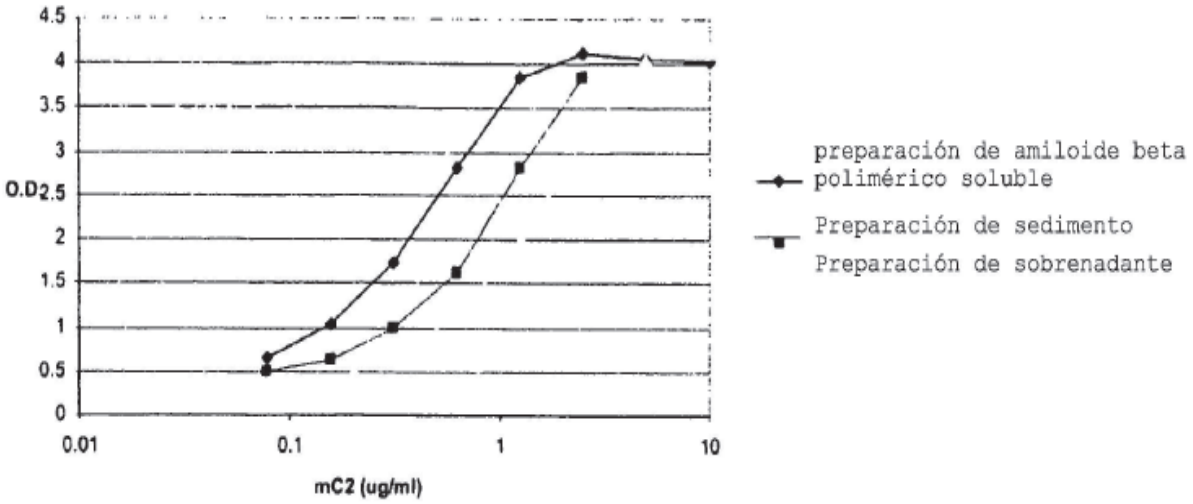


FIG 11

(Ejemplo 13)

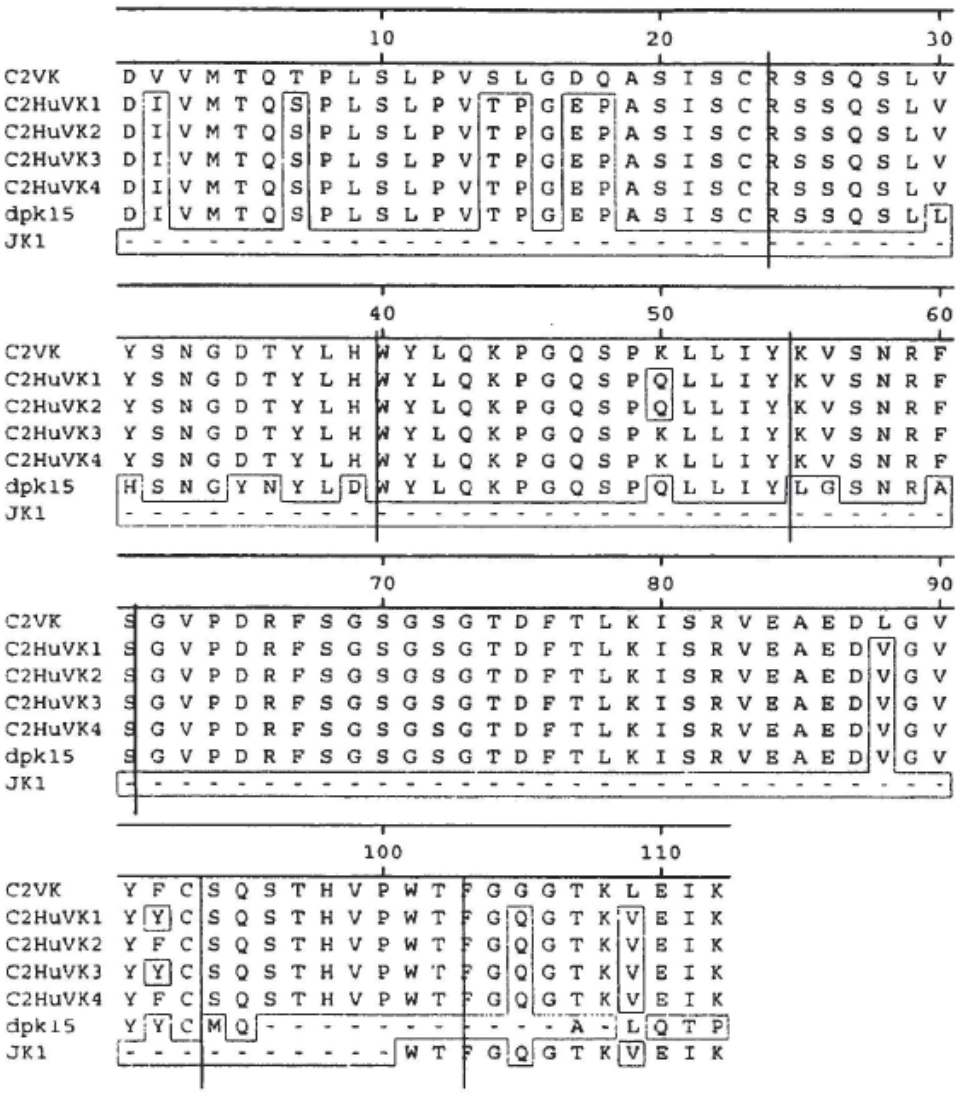

10 20 30
C2VK D V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S L V
C2HuVK1 D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V
C2HuVK2 D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V
C2HuVK3 D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V
C2HuVK4 D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V
dpk15 D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L L
JK1 -
40 50 60
C2VK Y S N G D T Y L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F
C2HuVK1 Y S N G D T Y L H W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F
C2HuVK2 Y S N G D T Y L H W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F
C2HuVK3 Y S N G D T Y L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F
C2HuVK4 Y S N G D T Y L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F
dpk15 H S N G Y N Y L D W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L G S N R A
JK1 -
70 80 90
C2VK S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V
C2HuVK1 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V
C2HuVK2 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V
C2HuVK3 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V
C2HuVK4 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V
dpk15 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V
JK1 -
100 110
C2VK Y F C S Q S T H V P W T F G G G T K L E I K
C2HuVK1 Y Y C S Q S T H V P W T F G Q G T K V E I K
C2HuVK2 Y F C S Q S T H V P W T F G Q G T K V E I K
C2HuVK3 Y Y C S Q S T H V P W T F G Q G T K V E I K
C2HuVK4 Y F C S Q S T H V P W T F G Q G T K V E I K
dpk15 Y Y C M Q - - - - - - - - - - A - L Q T P
JK1 - - - - - - - - - W T F G Q G T K V E I K

FIG 12.

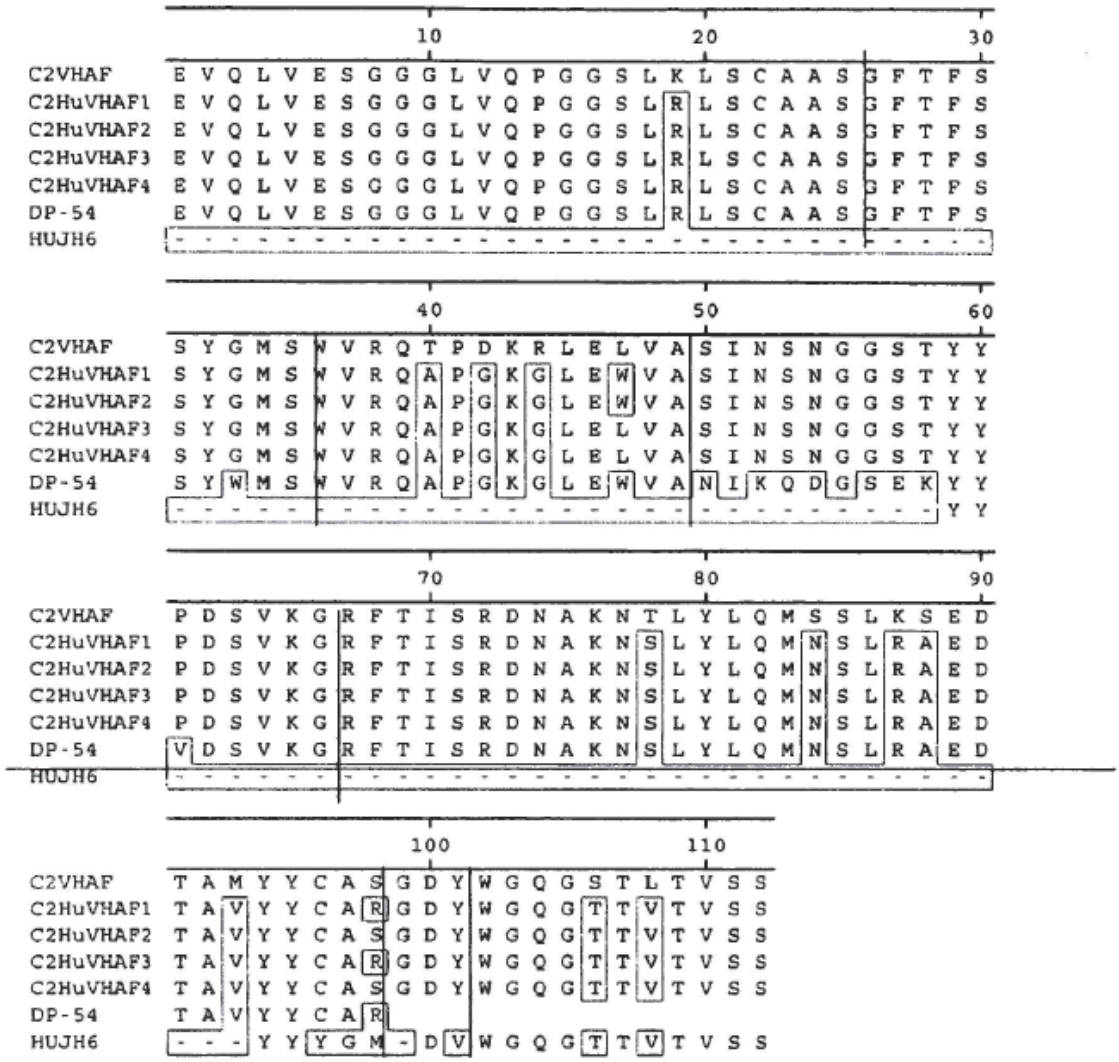

10 20 30
C2VHAF E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F S
C2HuVHAF1 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S
C2HuVHAF2 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S
C2HuVHAF3 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S
C2HuVHAF4 E V Q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

FIG 13.

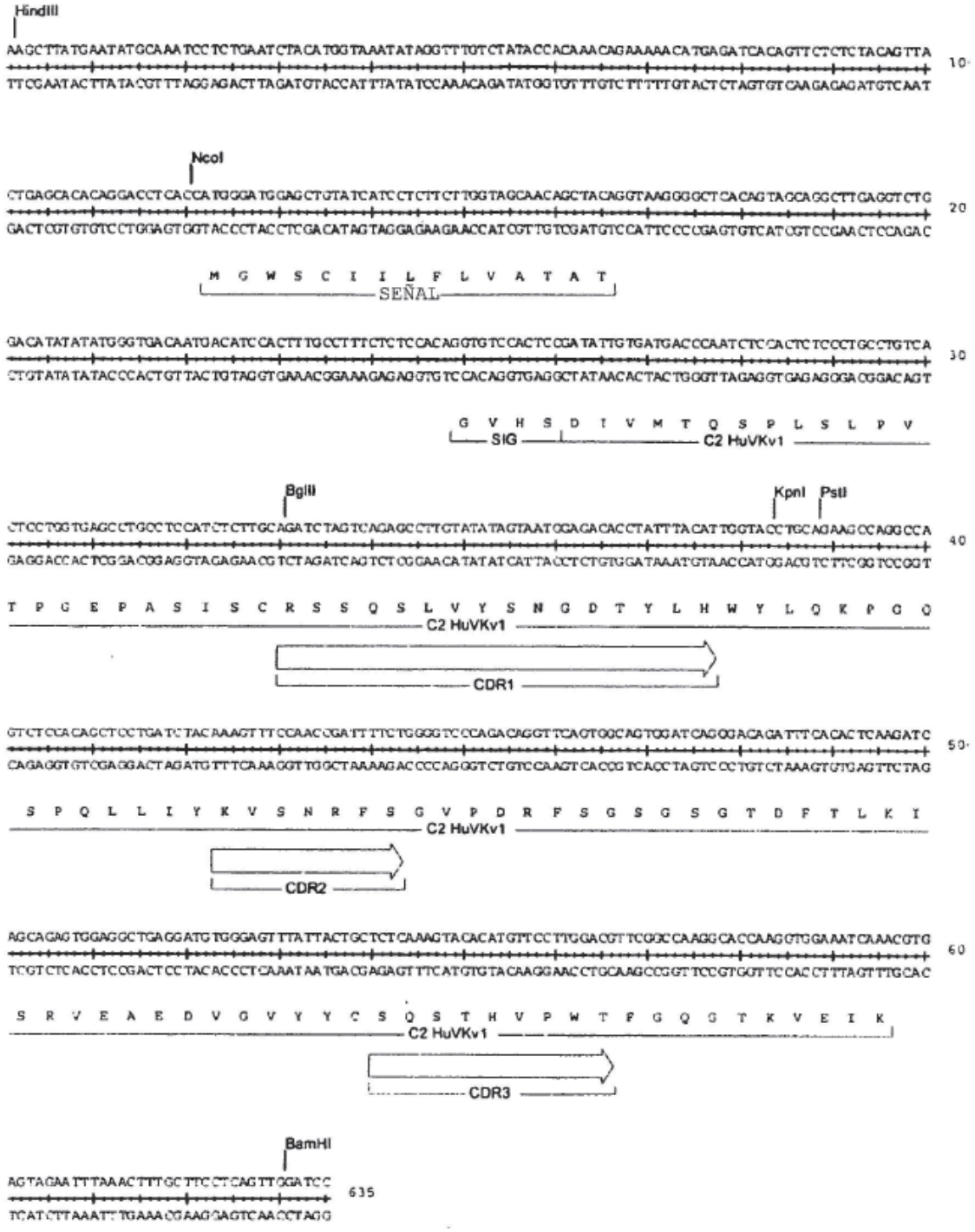

HindIII
NcoI
M G W S C I I L F L V A T A T
SEÑAL
G V H S D I V M T Q S P L S L P V
SIG
C2 HuVKv1
BglI
KpnI
PstI
T P G E P A S I S C R S S Q S L V Y S N G D T Y L H W Y L Q K P G Q
C2 HuVKv1
CDR1
S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
C2 HuVKv1
CDR2
S R V E A E D V G V Y Y C S Q S T H V P W T F G Q G T K V E I K
C2 HuVKv1
CDR3
BamHI

FIG 14

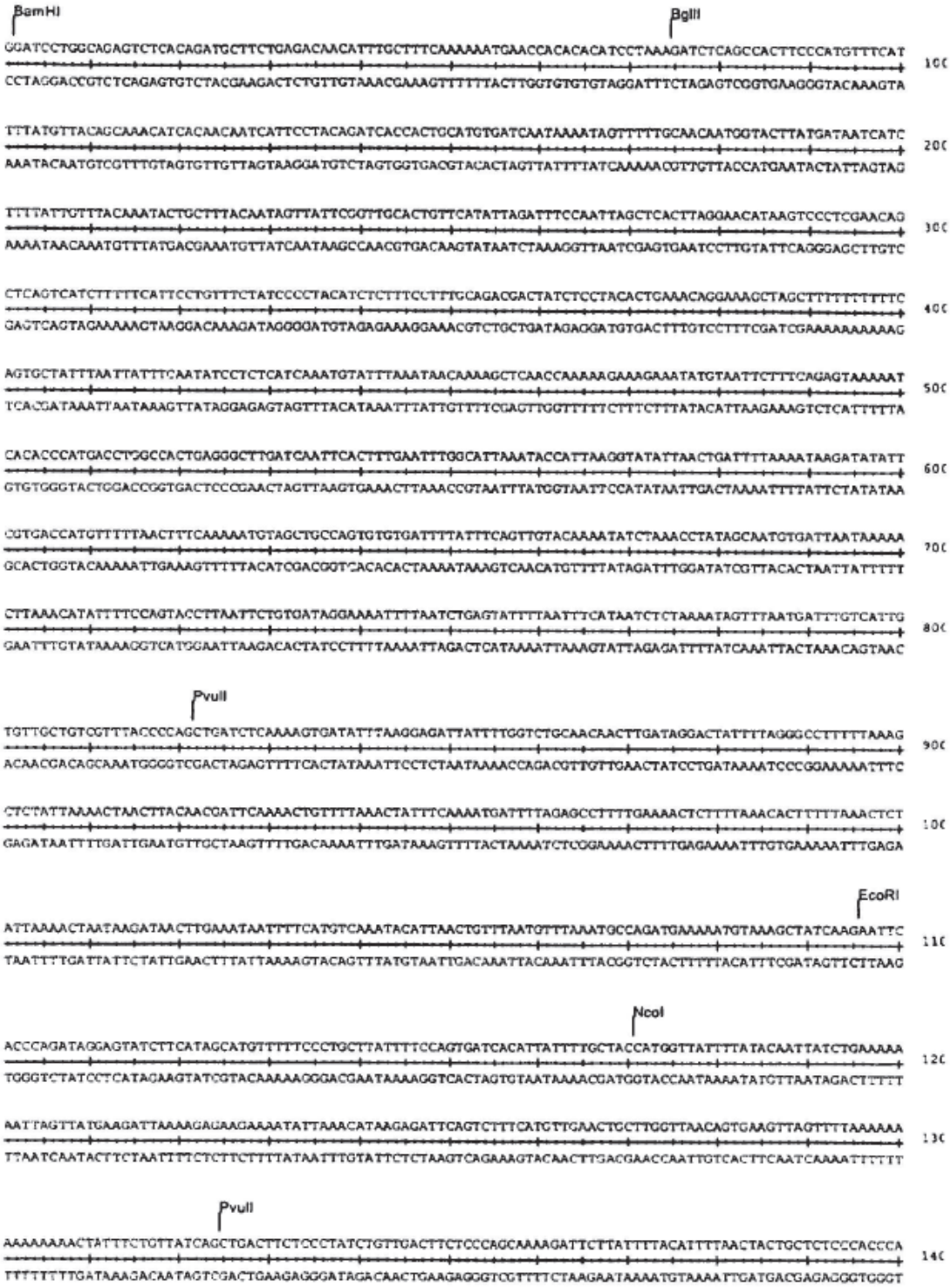


FIG 15-1

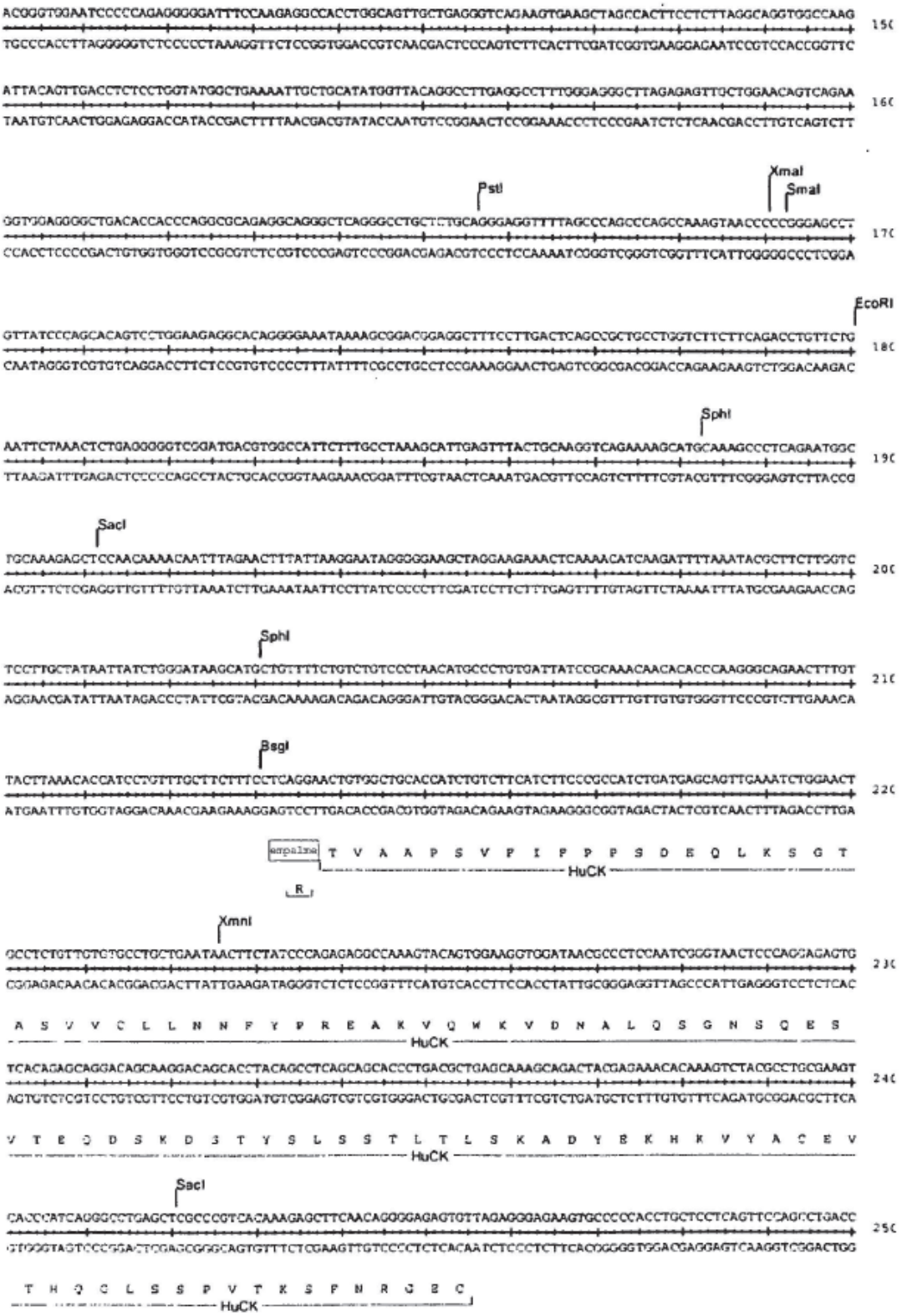

PstI
XmaI
SmaI
EcoRI
SphI
SacI
SphI
BsgI
HuCK
XmnI
HuCK
HuCK
SacI
HuCK

FIG 15-2

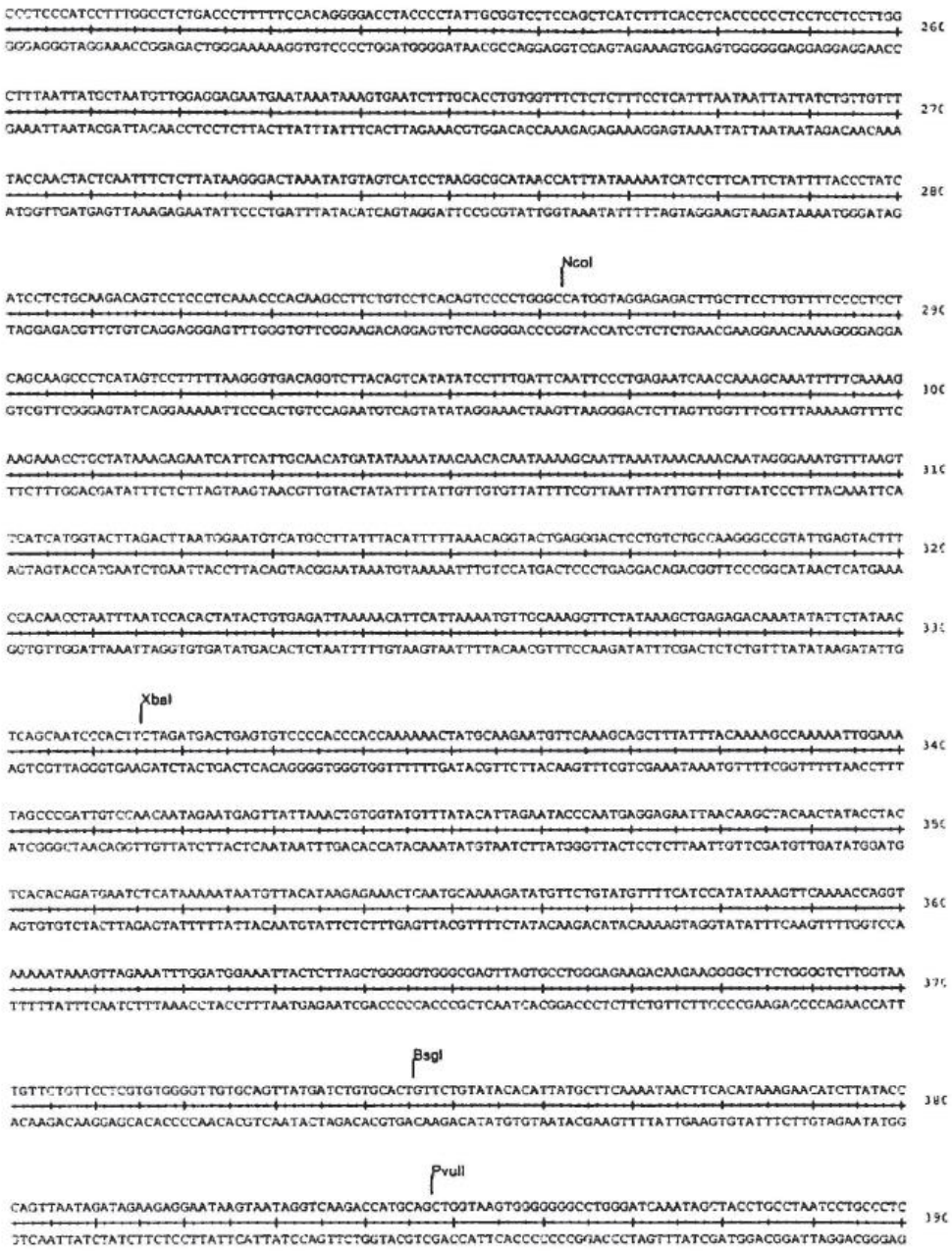


FIG 15-3

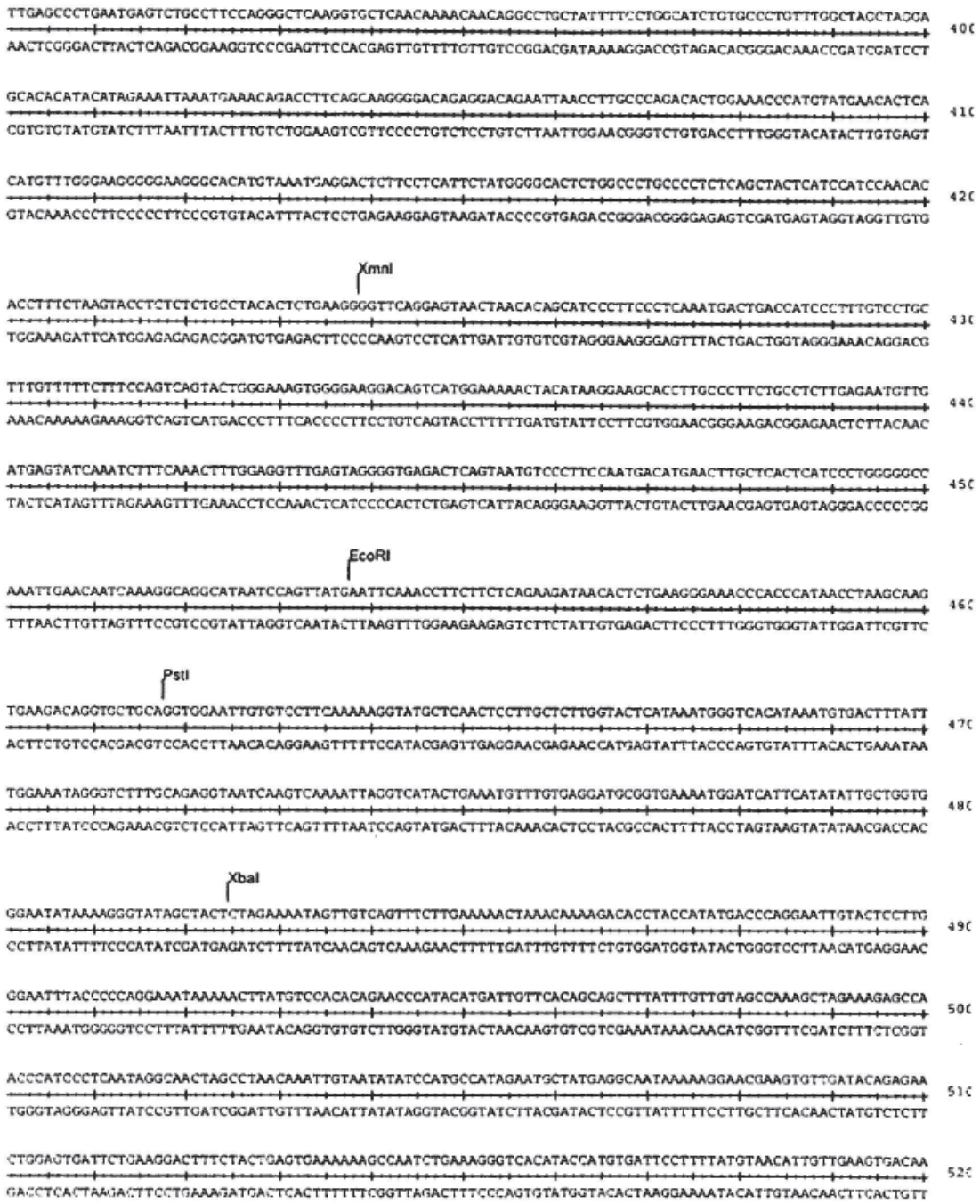


FIG 15-4

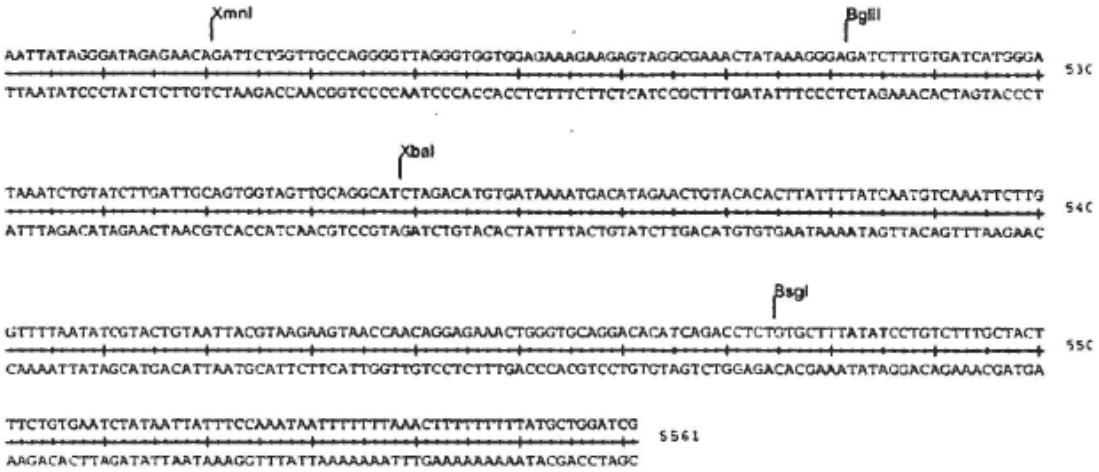

XmnI
BglII
AATTATAGGGATAGAGAACAGATTCTGGTTGCCAGGGGTTAGGGTGGTGGAGAAAGAAGAGTAGGCGAAACTATAAAGGGAGATCTTTGTGATCATGGGA
TTAATATCCCTATCTCTTGTCTAAGACCAACGGTCCCCAATCCCACCACCTCTTTCTTCTCATCCGCTTTGATATTTCCCTCTAGAAACACTAGTACCCT
530
XbaI
TAAATCTGTATCTTGATTGCAGTGGTAGTTGCAGGCATCTAGACATGTGATAAAATGACATAGAACTGTACACACTTATTTTATCAATGTCAAATTCTTG
ATTTAGACATAGAACTAACGTCACCATCAACGTCCGTAGATCTGTACACTATTTTACTGTATCTTGACATGTGTGAATAAAATAGTTACAGTTTAAGAAC
540
BsgI
GTTTTAATATCGTACTGTAATTACGTAAGAAGTAACCAACAGGAGAAACTGGGTGCAGGACACATCAGACCTCTGTGCTTTATATCCTGTCTTTGCTACT
CAAAATTATAGCATGACATTAATGCATTCTTCATTGGTTGTCCTCTTTGACCCACGTCCTGTGTAGTCTGGAGACACGAAATATAGGACAGAAACGATGA
550
TTCTGTGAATCTATAATTATTTCCAAATAATTTTTTTAAACTTTTTTTTTATGCTGGATCG
AAGACACTTAGATATTAATAAAGGTTTATTAAAAAAATTTGAAAAAAAAATACGACCTAGC
5561

FIG 15-5

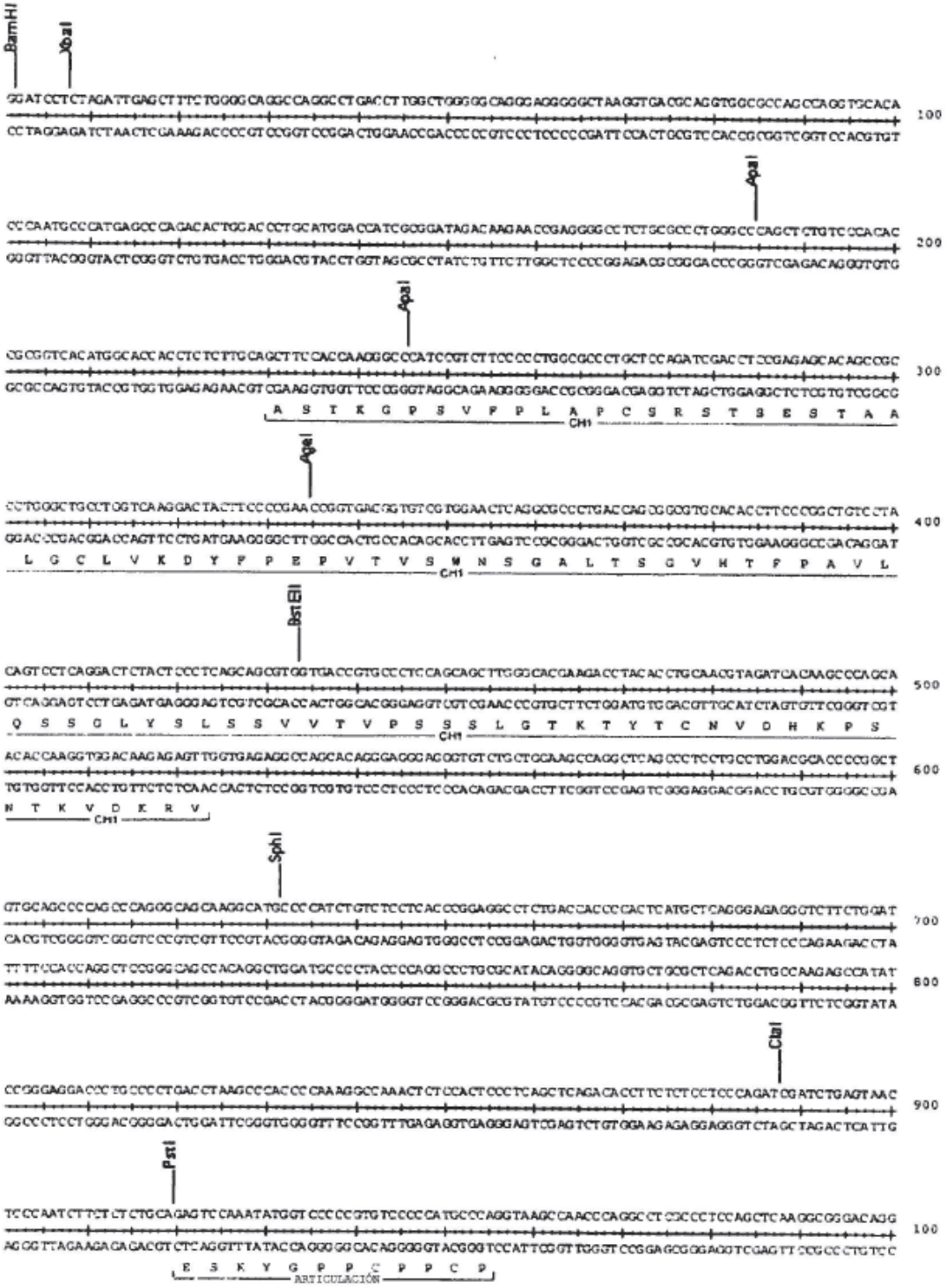

BamHI
XbaI
ApaI
ApaI
AgeI
BstEII
SphI
ClaI
PstI
CH1
CH1
CH1
ARTICULACIÓN

FIG 16 -1

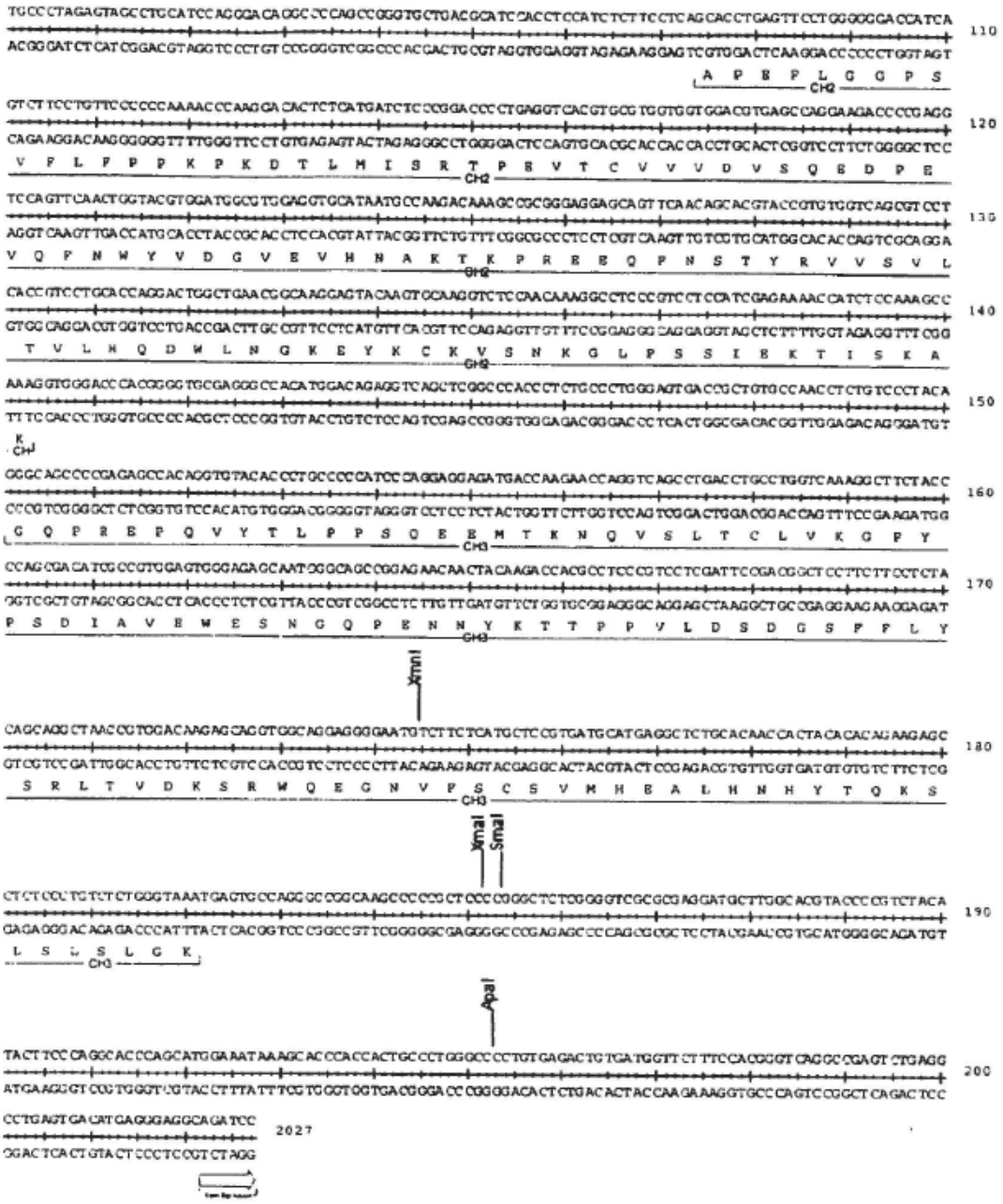


FIG 16 -2

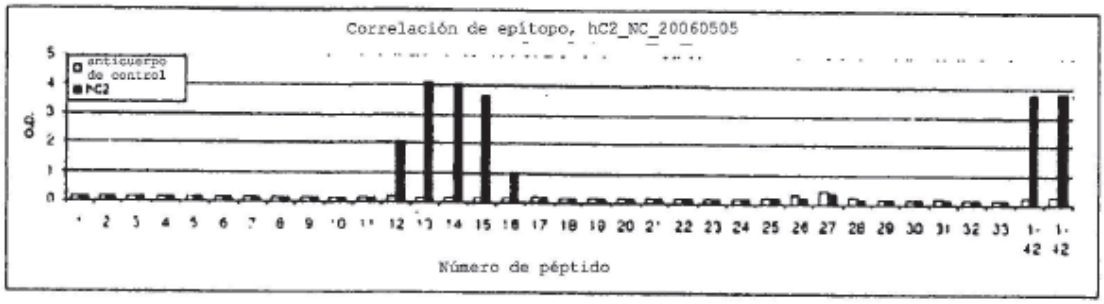


Figura 17-1. hC2 se une a los péptidos 12, 13, 14, 15 y 16 de la biblioteca de péptidos Aβ1-42. Unión de hC2 a péptidos de traslape de Aβ1-42 se analizó por ELISA. Unión al Aβ1-42 completo y unión de anticuerpo quimérico sin unión (anticuerpo de control) se usó como controles positivos y negativos, respectivamente. El número de péptido corresponde al aminoácido en la secuencia de Aβ1-42 en la cual empieza el péptido. Los resultados se expresan como OD.

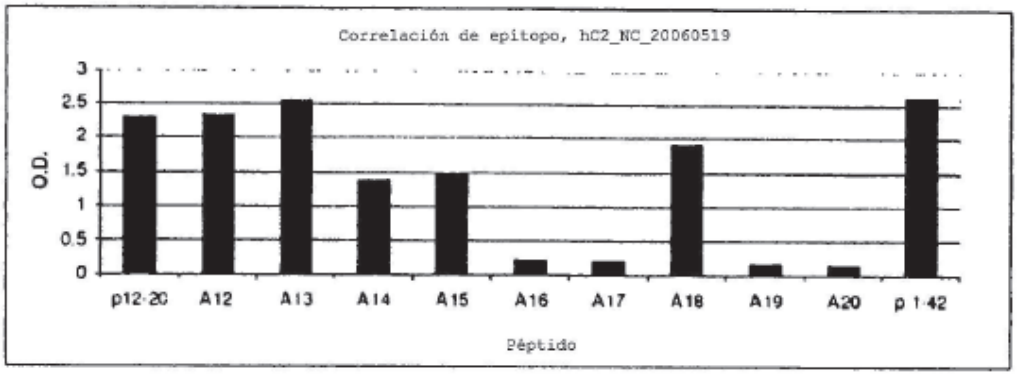


Figura 17-2.- Unión de hC2 a Aβ12-20 es completamente dependiente en aa 16, 17 ,19 y 20 y parcialmente dependiente en aa 14, 15 y 18
Unión de hC2 a Aβ 12-20 y Aβ 12-20 sustituido con alanina se analizó con ELISA. Unión a Aβ 1-42 completo se usó como control positivo. El número corresponde a el aa al aa que se sustituye por alanina. Los resultados se expresan como OD.

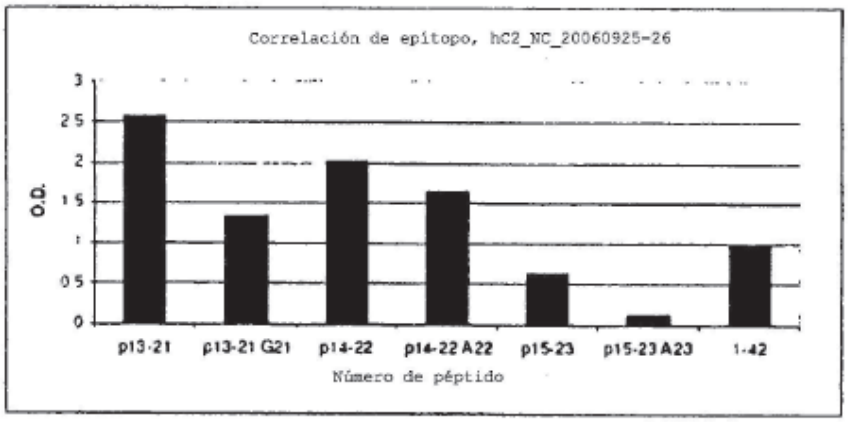


Figura 17-3.- Unión de hC2 a Aβ 15-23 es dependiente de aa 23 y parcialmente de aa 21 y ligeramente dependiente de aa 22.
Unión de hC2 a AB 13-21, 14-22 o 15-23 y a 13-21G21, 14-22A22 o 15-23A23 se analizó por ELISA.
Unión a Aβ 1-42 completo se usó como control positivo. Los resultados se expresan como OD.

Fig 17:

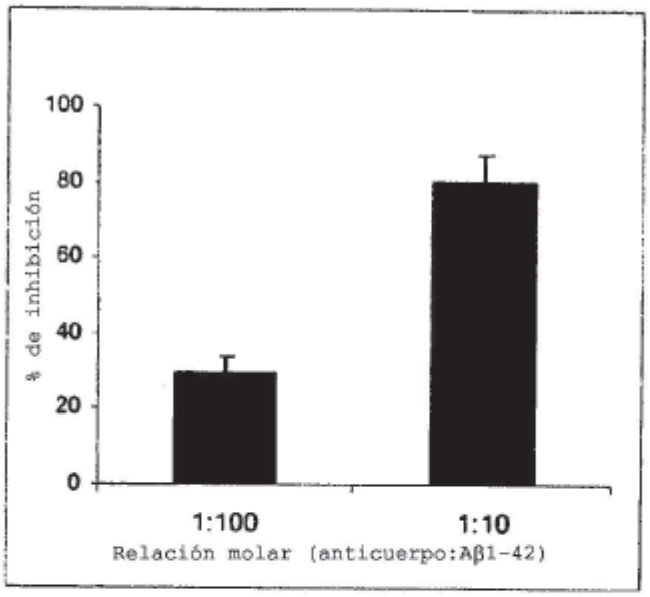

100
80
60
40
20
0
% de inhibición
1:100
1:10
Relación molar (anticuerpo:Aβ1-42)

Fig 18

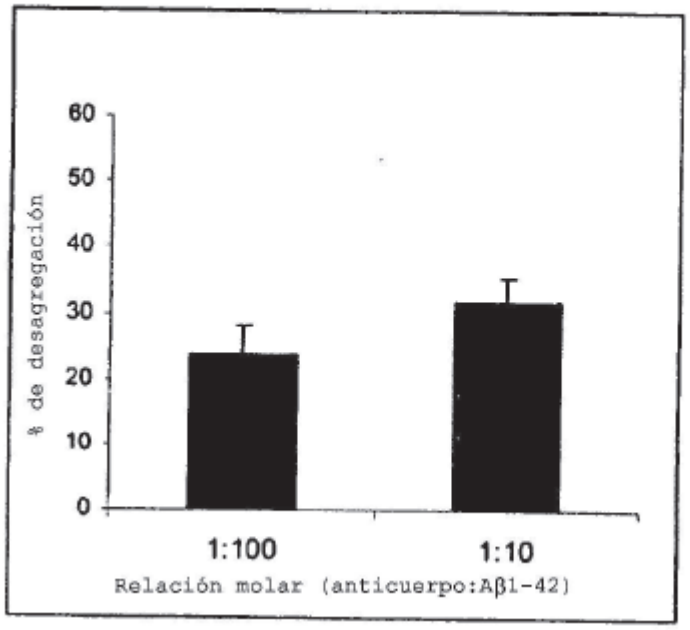

60
50
40
30
20
10
0
% de desagregación
1:100
1:10
Relación molar (anticuerpo:Aβ1-42)

FIG 19

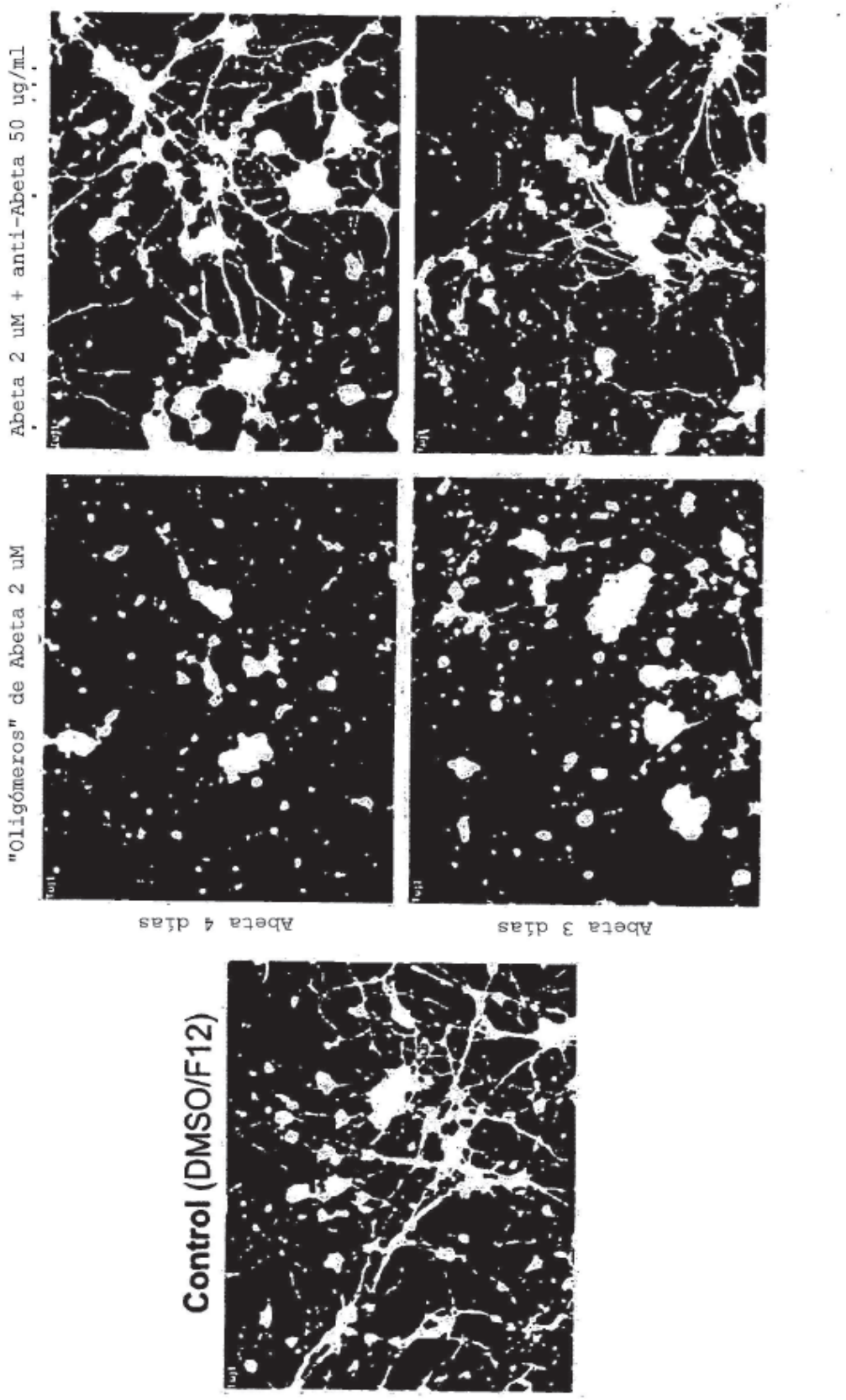

Abeta 2 uM + anti-Abeta 50 ug/ml
"Oligómeros" de Abeta 2 uM
Abeta 4 dias
Abeta 3 dias
Control (DMSO/F12)

FIG 20