

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 679**

51 Int. Cl.:

C12P 21/08 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2008 E 08867535 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 2237803**

54 Título: **Tratamiento y profilaxis de la amiloidosis**

30 Prioridad:

28.12.2007 US 7544 P
10.09.2008 US 95932 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.09.2015

73 Titular/es:

PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED (100.0%)
25-28 North Wall Quay
Dublin 1, IE

72 Inventor/es:

SCHENK, DALE B.;
SEUBERT, PETER A.;
WALL, JONATHAN y
SALDANHA, JOSE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 544 679 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento y profilaxis de la amiloidosis

5 Antecedentes de la invención

La amiloidosis es un término general que describe varias enfermedades caracterizadas por la existencia de formas patológicas de proteínas amiloides, que implican con frecuencia la deposición extracelular de fibrillas proteicas, que forman numerosos “depósitos amiloides” o “placas amiloides”, que pueden aparecer en sitios locales o de forma sistémica. Estos depósitos o placas están compuestos principalmente de una proteína o un péptido soluble de origen natural, ensamblado en depósitos insolubles extensivos de 10-100 µm de diámetro en una diversidad de sitios tisulares. Los depósitos se componen de agregados en general laterales de fibrillas que son de aproximadamente 10-15 nm de diámetro. Las fibrillas amiloides producen una birrefringencia verde manzana característica en luz polarizada, cuando se tiñen con colorante Rojo Congo. En general, la composición fibrilar de estos depósitos es una característica identificativa de las diversas formas de enfermedad amiloide.

Los péptidos o proteínas que forman los depósitos de placas se producen con frecuencia a partir de una proteína precursora mayor. Más específicamente, la patogénesis de agregados amiloides tales como depósitos de fibrillas generalmente implica la escisión proteolítica de una proteína precursora “anómala” en fragmentos que se agregan en láminas plegadas en β antiparalelas.

La composición fibrilar de estos depósitos es una característica identificativa de las diversas formas de enfermedad amiloide. Por ejemplo, los depósitos intracerebrales y cerebrovasculares compuestos principalmente de fibrillas de péptido beta amiloide (3-AP) son característicos de la enfermedad de Alzheimer (formas tanto familiares como esporádicas), el péptido proteico amiloide de islotes (IAPP; amilina) es característico de las fibrillas en depósitos amiloides de células de islotes pancreáticos asociados con la diabetes de tipo II, y β2-microgloublina es un componente principal de los depósitos de amiloides que se forman como consecuencia de tratamiento con hemodiálisis a largo plazo. Más recientemente, las enfermedades asociadas con priones, tales como enfermedad de Creutzfeld-Jacob, también se han reconocido como enfermedades amiloides.

En general, las amiloidosis primarias de la enfermedad se caracterizan por la presencia de fibrillas de proteínas “de tipo cadena ligera amiloide” (tipo AL), llamadas así por la homología de la región N terminal de las fibrillas AL con el fragmento variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (kappa o lambda).

Las diversas formas de enfermedad se han dividido en clases, principalmente basándose en si la amiloidosis se asocia con una enfermedad sistemática subyacente. Por lo tanto, se considera que ciertos trastornos son amiloidosis primarias, en las que no hay prueba de enfermedad preexistente o coexistente. En amiloidosis secundaria o reactiva (tipo AA) caracterizada por la presencia de deposición de fibrillas de proteína amiloide A (AA), existe una patología inflamatoria o infecciosa crónica asociada o subyacente.

Las amiloidosis heredofamiliares pueden tener depósitos neuropáticos, renales o cardiovasculares asociados del tipo transtiretina ATTR. Otras amiloidosis heredofamiliares incluyen otros síndromes y pueden tener diferentes componentes amiloides (por ejemplo, la fiebre mediterránea familiar que se caracteriza por fibrillas AA). Otras formas de amiloidosis incluyen formas locales, caracterizadas por depósitos focales, con frecuencia de tipo tumor, que aparecen en órganos aislados. Otras amiloidosis se asocian con el envejecimiento, y se caracterizan habitualmente por la formación de placas en el corazón o el cerebro. También son habituales depósitos amiloides asociados con hemodiálisis a largo plazo. Estas y otras formas de enfermedad amiloide se resumen en la Tabla 1 (Tan, S. Y. y Pepys, *Histopathology* 25: 403-414, 1994; Harrison’s Handbook of Internal Medicine, 13ª Ed., Isselbacher, K. J., *et al*, eds, McGraw-Hill, San Francisco, 1995) y se describen en las Patentes de Estados Unidos N° 6.875.434, 6.890.535, 6.913.745, 6.923.964 y 6.936.246.

TABLA 1 Clasificación de Enfermedades Amiloides			
Proteína/ Péptido Amiloide	Proteína Precursora	Variantes Proteicas	Clínica
AA	Proteína Amiloide A del Suero (ApoSSA)		Amiloidosis Reactiva (secundaria): Fiebre Mediterránea Familiar Nefropatía amiloide familiar con urticaria y sordera (síndrome de Muckle-Wells)
AA	Proteína amiloide A del suero (ApoSSA)		Amiloidosis sistémica reactiva asociada con enfermedades inflamatorias sistémicas

TABLA 1 Clasificación de Enfermedades Amiloides			
Proteína/ Péptido Amiloide	Proteína Precursora	Variantes Proteicas	Clínica
AL	Cadenas ligeras de inmunoglobulina monoclonal (kappa, lambda)	Ak, A, (por ejemplo, AkIII)	Amiloidosis idiopática (primaria): asociada con mieloma o macroglobulinemia; amiloidosis sistémica asociada con discrasia inmunocítica; gammapatía monoclonal; discrasia oculta; amiloidosis nodular local asociada con enfermedades inflamatorias crónicas
AH	IgG (1(γ1))	A _γ 1	Amiloidosis de cadena pesada asociada con varias discrasias inmunocíticas
ATTR	Transtiretina (TTR)	Al menos 30 mutaciones puntuales conocidas	Polineuropatía amiloide familiar (por ejemplo, Met 30, Portuguesa)
ATTR	Transtiretina (TTR)	Por ejemplo, Met 111	Cardiomiopatía amiloide familiar (Danesa)
ATTR	Transtiretina (TTR)	TTR de tipo silvestre o Ile 122	Amiloidosis senil sistémica
AapoAI	ApoAI	Arg 26	Polineuropatía amiloide familiar
Agel	Gelsolina	Asn 187	Amiloidosis familiar (Finlandesa)
Acys	Cistatina C	Gln 68	Hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (Islandesa)
Aβ	Precursor de proteína amiloide β (por ejemplo β-APP ₆₉₅)	Varias: Gln 618,	Amiloidosis de hemorragia cerebral Hereditaria de síndrome de Down de enfermedad de Alzheimer (Holandesa) Miositis de cuerpos de inclusión de angiopatía amiloide cerebral esporádica
AB ₂ M	Microglobulina beta ₂		Asociada con hemodiálisis crónica
Acal	(Pro)calcitonina	(Pro)calcitonina	Carcinoma medular de tiroides
AANF Aβ SVEP ^a AB ₂ M	Factor natriurético auricular Proteína precursora de β amiloide - Microglobulina beta ₂		Amiloidosis Seniles Focales: Amiloide auricular aislado Cerebro Vesículas seminales Próstata
	Queratina		Amiloide cutánea localizada primaria (macular, papular)
PrP	Proteína precursora priónica (forma celular de 33-35 kDa)	Proteína de tembladera 27-30 kDa	Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob Esporádica Kuru (encefalopatías espongiiformes transmisibles, enfermedades priónicas)
AIAPP	Polipéptido amiloide de islote (IAPP)		Islotes de Langerhans Diabetes de tipo II, Insulinoma
Hormonas peptídicas, fragmentos	Por ejemplo, precalcitonina		Amiloidosis exocrina, asociada con APUDomas
^a Proteína exocrina de vesícula seminal			

Con frecuencia, las fibrillas que forman el grueso de un depósito amiloide derivan de una o más proteínas o péptidos precursores primarios, y se asocian habitualmente con glucosaminoglucanos sulfatados. Además, los depósitos amiloides pueden incluir proteínas y péptidos menores de diversos tipos, junto con otros componentes, tales como proteoglucanos, gangliósidos y otros azúcares, como se describe en más detalle en las secciones a continuación.

5

Las fibrillas AA están compuestas de fragmentos peptídicos cuyo tamaño varía pero son generalmente de aproximadamente 8000 dalton (péptido o proteína AA) formados por escisión proteolítica de proteína amiloide A del suero (SSA), una apolipoproteína en circulación que está presente en partículas HDL y que se sintetiza en hepatocitos en respuesta a citocinas tales como interleucina (IL)-1 e IL-6, así como factor de necrosis tumoral α.

10

Véase Husby, G. *et al.* Amyloid 1, 119-137 (1994). La escisión proteolítica da como resultado la deposición patológica de dos tercios N terminales de ~76 restos de la proteína SAA. En seres humanos, la concentración en plasma de SAA es normalmente de ~0,1 mg/ml pero puede aumentar a más de 1.000 veces en respuesta a un estímulo inflamatorio. Como parte de este proceso, la molécula SAA se somete a proteólisis y el producto de escisión N terminal se deposita de forma sistémica como fibrillas AA en órganos vitales, incluyendo el hígado, el bazo, los riñones y las glándulas adrenales. La deposición también es habitual en el corazón y el tracto gastrointestinal.

En general, la amiloidosis AA es una manifestación de enfermedades que provocan una respuesta de fase aguda sostenida. Dichas enfermedades incluyen trastornos inflamatorios crónicos, infecciones microbianas locales o sistémicas crónicas, y neoplasias malignas. Las enfermedades amiloides de AA incluyen, pero sin limitación enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondilitis anquilosante, psoriasis, artropatía psoriásica, síndrome de Reiter, enfermedad de Still del Adulto, síndrome de Behcet y enfermedad de Crohn. También se producen depósitos AA como resultado de infecciones microbianas crónicas, tales como lepra, tuberculosis, bronquiectasia, úlceras por decúbito, pielonefritis crónica, osteomielitis y enfermedad de Whipple. Ciertas neoplasias malignas también pueden dar como resultado depósitos amiloides de fibrillas AA. Estos incluyen afecciones tales como linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas del intestino, pulmón y tracto urogenital, carcinoma de células basales y leucemia por tricoleucitos. La enfermedad amiloide AA también puede resultar de enfermedades inflamatorias heredadas tales como Fiebre Mediterránea Familiar. Adicionalmente, la enfermedad amiloide AA puede resultar de trastornos linfoproliferativos tales como Enfermedad de Castleman.

La amiloidosis AA es insidiosa y progresiva. Los síntomas se presentan en general en estadios tardíos de la enfermedad. Frecuentemente no se diagnostica al paciente hasta que se ha producido un daño orgánico significativo. Se depositan fibrillas AA en órganos vitales lo que conduce a disfunción orgánica y posteriormente a la muerte. La tasa de supervivencia a cinco años es del 45-50 %. La mediana de la supervivencia después del diagnóstico es de 4-8 años. La Enfermedad Renal de estadio final es la causa de muerte en el 40-60 % de los casos. Véase Gillmore J. D. *et al.*, Lancet 358: 24-9 (2001).

Malle E. *et al.*, Stand. J. Immunol. 48: 557-561 (1998) describe el mapeo de determinantes antigénicos de proteínas amiloides A del suero humanas, purificadas, sin lípidos.

En la actualidad, no hay tratamientos específicos, dirigidos a amiloides, aprobados, para ninguna de las enfermedades amiloides, incluyendo Amiloidosis AA. Véase Gillmore J. D. *et al.*, Lancet 358: 24-9 (2001). Cuando hay una patología subyacente o asociada, la terapia se dirige a reducir la producción de proteína amiloidogénica tratando la enfermedad subyacente. Por ejemplo, la estrategia de tratamiento actual para la amiloidosis AA es dirigirse a la inflamación subyacente, reduciendo los niveles de ApoSSA por debajo de 10 mg/l. Las terapias empleadas en la actualidad incluyen quimioterapia (clorambucilo y MTX), inmunosupresores (azatioprina), fármacos antiinflamatorios (colchicina) e inhibidores de TNF. La invención cumple por lo tanto una necesidad duradera de regímenes terapéuticos para prevenir o aliviar los efectos de la amiloidosis AA.

Sumario

La invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, que es una versión humanizada o quimérica del anticuerpo 2A4, en el que el anticuerpo 2A4 puede obtenerse del Número de Referencia de la ATCC PTA-9662.

Se describen en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende una o más regiones de complementariedad de una región variable de cadena ligera de 2A4 expuesta como los restos 20-131 de SEC ID N°: 152 o una o más regiones de complementariedad de una región variable de cadena ligera 7D8 expuesta como los restos 20-131 de SEC ID N°: 153. También se describen en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende dos regiones de complementariedad de una región variable de cadena ligera 2A4 expuesta como los restos 20-131 de SEC ID N°: 152 o dos regiones de complementariedad de una región variable de cadena ligera 7D8 expuesta como los restos 20-131 de SEC ID N°: 153. Los anticuerpos adicionales y fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento comprenden una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones de complementariedad de una región variable de cadena ligera 2A4 expuesta como los restos 20-131 de SEC ID N°: 152 o tres regiones de complementariedad de una región variable de cadena ligera 7D8 expuesta como los restos 20-131 de SEC ID N°: 153. Las versiones humanizadas de un anticuerpo 2A4 o 7D8 pueden comprender al menos un resto marco conservado de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste en L87 y L90 (convención de numeración de Kabat), que está ocupado por Y y F, respectivamente, y en el que el resto de la región variable de cadena ligera está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento pueden comprender al menos un resto marco conservado de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste en +7, +14, +15, +17, +18, +50, +75, +88, + 92 y +109 (numeración lineal), que está ocupado por T, S, L, D, Q, K, Y, L, F y L, respectivamente, y en el que el resto de la región variable de cadena ligera está ocupado por un resto correspondiente en una región variable de cadena

5 ligera de inmunoglobulina aceptora humana. Por ejemplo, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno pueden comprender al menos un resto marco conservado de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste en +75 y +92 (numeración lineal), que está ocupado por Y y F, respectivamente, y en el que el resto de la región variable de cadena ligera está ocupado por un resto correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana. En otros anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno, la región variable de cadena ligera comprende un resto marco conservado en +105 (numeración lineal) ocupado por Q.

10 Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la divulgación incluyen los que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende un resto marco conservado en +7 (numeración lineal) ocupado por T, en el que el resto de la región variable de cadena ligera está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende un resto marco conservado en +14 (numeración lineal) ocupado por S, en el que el resto de la región variable de cadena ligera está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende un resto marco conservado en +15 (numeración lineal) ocupado por L, en el que el resto de la región variable de cadena ligera está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende un resto marco conservado en +17 (numeración lineal) ocupado por D, en el que el resto de la región variable de cadena ligera está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende un resto marco conservado en +18 (numeración lineal) ocupado por Q, en el que el resto de la región variable de cadena ligera está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende un resto marco conservado en +50 (numeración lineal) ocupado por K, en el que el resto de la región variable de cadena ligera está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende un resto marco conservado en +75 (numeración lineal) ocupado por Y, en el que el resto de la región variable de cadena ligera está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende un resto marco conservado en +88 (numeración lineal) ocupado por L, en el que el resto de la región variable de cadena ligera está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende un resto marco conservado en +92 (numeración lineal) ocupado por F, en el que el resto de la región variable de cadena ligera está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende un resto marco conservado en +109 (numeración lineal) ocupado por L, en el que el resto de la región variable de cadena ligera está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana; y anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende un resto marco conservado en +105 (numeración lineal) ocupado por Q, en el que el resto de la región variable de cadena ligera está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana.

45 Las regiones variables de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana incluyen región variable de cadena ligera de subgrupo 2 kappa humana (convención de Kabat), por ejemplo, región variable de cadena ligera de subgrupo 2 humano de línea germinal humana VKIIA19/A3, tal como región variable de cadena ligera Vk que comprende una secuencia expuesta como SEC ID N°: 166 o 167. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno pueden comprender una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta como los restos 20-131 de SEC ID N°: 152, los restos 20-131 de SEC ID N°: 153, o expuesta como SEC ID N°: 155, 156, 157, 158, 159, 160, 174, 175 o 176.

50 Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno representativos también incluyen los que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende una o más regiones de complementariedad de una región variable de cadena pesada 2A4 expuesta como los restos 20-138 de SEC ID N°: 154, por ejemplo, una región variable de cadena pesada que comprende dos regiones de complementariedad de una región variable de cadena pesada 2A4 expuesta como los restos 20-138 de SEC ID N°: 154, o una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones de complementariedad de una región variable de cadena pesada 2A4 expuesta como los restos 20-138 de SEC ID N°: 154. Los anticuerpos 2A4 y 7D8 humanizados representativos y fragmentos de unión a antígeno comprenden al menos un resto marco conservado de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en H37, H49, H70 y H93 (convención de numeración de Kabat), que está ocupado por I, A, F o V, respectivamente, y en el que el resto de la región variable de cadena pesada está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana. Los anticuerpos humanizados representativos y fragmentos de unión a antígeno comprenden al menos un resto marco conservado de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en +10, +15, +19, +37, +49, +73, +78, +79, +80, +87, +95, +99, +119 (numeración lineal),

que está ocupado por R, K, K, I, A, F, Q, S, M, N, M, V o A, respectivamente, y en el que el resto de la región variable de cadena pesada está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana. Por ejemplo, los anticuerpos humanizados representativos y fragmentos de unión a antígeno comprenden al menos un resto marco conservado de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en +37, +49, +73 y +99 (numeración lineal), que está ocupado por I, A, F o V, respectivamente, y en el que el resto de la región variable de cadena pesada está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana.

Por ejemplo, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno incluyen los que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende un resto marco conservado en +10 (numeración lineal) ocupado por R, en el que el resto de la región variable de cadena pesada está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende un resto marco conservado en +15 (numeración lineal) ocupado por K, en el que el resto de la región variable de cadena pesada está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende un resto marco conservado en +19 (numeración lineal) ocupado por K, en el que el resto de la región variable de cadena pesada está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende un resto marco conservado en +37 (numeración lineal) ocupado por I, en el que el resto de la región variable de cadena pesada está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende un resto marco conservado en +49 (numeración lineal) ocupado por A, en el que el resto de la región variable de cadena pesada está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende un resto marco conservado en +73 (numeración lineal) ocupado por F, en el que el resto de la región variable de cadena pesada está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende un resto marco conservado en +78 (numeración lineal) ocupado por Q, en el que el resto de la región variable de cadena pesada está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende un resto marco conservado en +79 (numeración lineal) ocupado por S, en el que el resto de la región variable de cadena pesada está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende un resto marco conservado en +80 (numeración lineal) ocupado por M, en el que el resto de la región variable de cadena pesada está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende un resto marco conservado en +87 (numeración lineal) ocupado por N, en el que el resto de la región variable de cadena pesada está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende un resto marco conservado en +95 (numeración lineal) ocupado por M, en el que el resto de la región variable de cadena pesada está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende un resto marco conservado en +99 (numeración lineal) ocupado por V, en el que el resto de la región variable de cadena pesada está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; y anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende un resto marco conservado en +109 (numeración lineal) ocupado por A, en el que el resto de la región variable de cadena pesada está ocupada por un resto correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana.

Las regiones variables de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana incluyen una región variable de cadena pesada de subgrupo gamma 3 humano (convención de Kabat), por ejemplo, región variable de cadena pesada de subgrupo gamma 3 humano que comprende una secuencia expuesta como SEC ID N°: 165, tal como una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta como los restos 20-138 de SEC ID N°: 154 o expuesta como SEC ID N°: 161, 162 o 163.

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno representativos adicionales comprenden una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de una región variable de cadena ligera 2A4 expuesta como los restos 20-131 de SEC ID N°: 152 o tres regiones de complementariedad de una región variable de cadena ligera 7D8 expuesta como los restos 20-131 de SEC ID N°: 153, y una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones de complementariedad de una región variable de cadena pesada 2A4 expuesta como los restos 20-138 de SEC ID N°: 154. Por ejemplo, dichos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno incluyen los que tienen una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad expuestas como SEC ID N°: 168, 169 y 170, y una región variable de cadena pesada que

que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 162; o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 176, una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 163.

5 También se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican un anticuerpo humano, humanizado o quimérico, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente con un epítipo dentro de los restos 70-76 del péptido amiloide A humano, incluyendo todos estos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que se han descrito anteriormente en el presente documento. Se proporcionan además células que expresan dichos ácidos nucleicos.

10 En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente con un epítipo que comprende X_1EDX_2 en una proteína amiloide agregada, en el que X_1 y X_2 son cualquier aminoácido. Dichos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno incluyen anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, por ejemplo, los que se unen específicamente con un epítipo dentro de los restos 70-76 de péptido amiloide A humano.

15 Los anticuerpos representativos adicionales y fragmentos de unión a antígeno incluyen en los que X_1 es H, T, F, S, P, A, L, C, Q, R, E, K, D, G, V, Y, I o W, y en los que X_2 es T, S, E, R, I, V, F, D, A, G, M, L, N, P, C, K, Y o Q; o X_1 es H, T, F, S, P o A y en los que X_2 es T, S, E, R, I, V, F, D o A; o X_1 es H, T, F o A; o X_2 es T, S, E, D o A; o X_1 es H, T, F o A y X_2 es T, S, E, D o A; o X_1 es H, T o A y X_2 es T, S, E o A; o X_1 es H o A y X_2 es T, S o A; o X_1 es H y X_2 es T o A; o X_1 es A y X_2 es S, T, E o V; o X_1 es A y X_2 es S, T o E; o X_1 es T y X_2 es E; o X_1 es F y X_2 es D; o X_1 es S y X_2 es E, F o A; o X_1 es P y X_2 es E, I o F. Por ejemplo, dichos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno se unen con un epítipo que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en GHEDT (SEC ID N°: 3), HEDT (SEC ID N°: 12), AEDS (SEC ID N°: 13), AEDT (SEC ID N°: 14), HEDA (SEC ID N°: 15), TEDE (SEC ID N°: 16), FEDD (SEC ID N°: 17), SEDE (SEC ID N°: 18), AEDE (SEC ID N°: 19), PEDE (SEC ID N°: 20), PEDI (SEC ID N°: 21), PEDF (SEC ID N°: 22), AEDV (SEC ID N°: 23), SEDF (SEC ID N°: 24) y SEDA (SEC ID N°: 25); o un epítipo que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en GHEDT (SEC ID N°: 3), HEDT (SEC ID N°: 12), AEDS (SEC ID N°: 13), AEDT (SEC ID N°: 14), HEDA (SEC ID N°: 15), TEDE (SEC ID N°: 16), FEDD (SEC ID N°: 17), SEDE (SEC ID N°: 18), AEDE (SEC ID N°: 19), PEDE (SEC ID N°: 20), PEDI (SEC ID N°: 21), PEDF (SEC ID N°: 22), SEDF (SEC ID N°: 24) y SEDA (SEC ID N°: 25); o un epítipo que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en GHEDT (SEC ID N°: 3), HEDT (SEC ID N°: 12), AEDS (SEC ID N°: 13), AEDT (SEC ID N°: 14), HEDA (SEC ID N°: 15) y TEDE (SEC ID N°: 16). Los epítipos desvelados pueden encontrarse en una proteína amiloide agregada, por ejemplo, un epítipo que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en GHGAEDS (SEC ID N°: 4), GHDAEDS (SEC ID N°: 5), GDHAEDS (SEC ID N°: 7), STVIEDS (SEC ID N°: 8) y GRGHEDT (SEC ID N°: 9); o un epítipo que comprende una secuencia de aminoácidos GHGAEDS (SEC ID N°: 4); o un epítipo que comprende los aminoácidos HEDT (SEC ID N°: 12); o un epítipo que comprende los aminoácidos HEDA (SEC ID N°: 15); o un epítipo que comprende los aminoácidos AEDS (SEC ID N°: 13) o un epítipo que comprende los aminoácidos AEDT (SEC ID N°: 14); o un epítipo que comprende los aminoácidos TEDE (SEC ID N°: 16); o un epítipo que comprende la secuencia de aminoácidos AEDV (SEC ID N°: 23); o un epítipo que comprende la secuencia de aminoácidos SEDF (SEC ID N°: 24) o PEDF (SEC ID N°: 22); o un epítipo que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en PEDS (SEC ID N°: 26), PEDL (SEC ID N°: 27), TEDV (SEC ID N°: 28), AEDE (SEC ID N°: 19), SEDI (SEC ID N°: 29) y TEDT (SEC ID N°: 30); o un epítipo que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en LEDG (SEC ID N°: 31), AEDM (SEC ID N°: 32), HEDS (SEC ID N°: 33), CEDD (SEC ID N°: 34), QEDS (SEC ID N°: 35), REDS (SEC ID N°: 36), TEDG (SEC ID N°: 16), QEDR (SEC ID N°: 38), TEDL (SEC ID N°: 39), PEDN (SEC ID N°: 40), EEDP (SEC ID N°: 41), LEDL (SEC ID N°: 42), KEDA (SEC ID N°: 43), SEDC (SEC ID N°: 44), EEDD (SEC ID N°: 45), SEDK (SEC ID N°: 46), DEDD (SEC ID N°: 47), DEDG (SEC ID N°: 13), LEDE (SEC ID N°: 49), GEDA (SEC ID N°: 13), VEDF (SEC ID N°: 51), YEDE (SEC ID N°: 52), IEDL (SEC ID N°: 53), WEDY (SEC ID N°: 54), DEDW (SEC ID N°: 55), SEDL (SEC ID N°: 56), YEDQ (SEC ID N°: 57), LEDW (SEC ID N°: 58), YEDR (SEC ID N°: 59) y PEDK (SEC ID N°: 60).

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento incluyen los que se unen con la proteína amiloide en una forma monomérica con una afinidad menor de aproximadamente $10^7 M^{-1}$. Las proteínas amiloides representativas incluyen proteína amiloide A del suero (SAA), proteína de cadena ligera de inmunoglobulina (tal como $V\lambda 6$ Wil y $V\kappa$), polipéptido precursor amiloide de islotes humanos (IAPP), péptido beta amiloide, transtiretina (TTR) y ApoA1.

También se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente con un epítipo que comprende X_1EDX_2 en una proteína amiloide agregada, en el que X_1 y X_2 son cualquier aminoácido, incluyendo todos los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno tales como se han descrito anteriormente en el presente documento. Se proporcionan además células que expresan dichos ácidos nucleicos.

La presente divulgación proporciona además tratamiento terapéutico o tratamiento profiláctico de un sujeto que tiene amiloidosis AA usando un anticuerpo humano, humanizado o quimérico, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente con un epítipo dentro de los restos 70-76 del péptido amiloide A humano, por ejemplo,

un epítipo dentro de los restos 70-76 de SEC ID N°: 2. Los sujetos que pueden beneficiarse de los productos terapéuticos desvelados para tratar la amiloidosis AA incluyen los sujetos que padecen una enfermedad amiloide seleccionada del grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondilitis anquilosante, psoriasis, artropatía psoriásica, síndrome de Reiter, enfermedad de Still del Adulto, síndrome de Behcet, enfermedad de Crohn, lepra, tuberculosis, bronquiectasia, úlceras por decúbito, pielonefritis crónica, osteomielitis, enfermedad de Whipple, linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas del intestino, pulmón y tracto urogenital, carcinoma de células basales, leucemia por tricoleucitos, Fiebre Mediterránea Familiar y Enfermedad de Castleman. Los sujetos que pueden beneficiarse de los tratamientos profilácticos desvelados incluyen los sujetos susceptibles de o en riesgo de desarrollar cualquiera de los trastornos anteriores.

También se proporcionan tratamiento terapéutico o tratamiento profiláctico de un sujeto que tenga amiloidosis asociada con una proteína amiloide agregada que comprende la secuencia de aminoácidos ED usando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente con un epítipo que comprende X_1EDX_2 en una proteína amiloide agregada, en el que X_1 y X_2 son cualquier aminoácido. Los sujetos que pueden beneficiarse de las terapias desveladas para tratar la amiloidosis asociada con una proteína amiloide agregada incluyen los sujetos que padecen amiloidosis AA, amiloidosis AL, enfermedad de Alzheimer, Deterioro Cognitivo Leve, polineuropatía amiloide, fiebre Mediterránea, síndrome de Muckle-Wells, amiloidosis sistémica reactiva asociada con enfermedades inflamatorias sistémicas, mieloma o amiloidosis asociada con macroglobulinemia, amiloidosis asociada con discrasia inmunocítica, gammapatía monoclonal, discrasia oculta y amiloidosis nodular local asociada con enfermedades inflamatorias crónicas. Los sujetos que pueden beneficiarse de los tratamientos profilácticos desvelados incluyen los sujetos susceptibles de o en riesgo de desarrollar cualquiera de los trastornos anteriores. En un aspecto de la divulgación, la proteína amiloide comprende la secuencia AEDV (SEC ID N°: 23), y la enfermedad amiloidogénica tratada terapéutica o profilácticamente usando los métodos desvelados es la amiloidosis AA, amiloidosis AL, polineuropatía amiloide, fiebre Mediterránea, síndrome de Muckle-Wells, amiloidosis sistémica reactiva asociada con enfermedades inflamatorias sistémicas, amiloidosis asociada con mieloma o macroglobulinemia, amiloidosis asociada con discrasia inmunocítica, gammapatía monoclonal, discrasia oculta y amiloidosis nodular local asociada con enfermedades inflamatorias crónicas.

Los tratamientos terapéuticos y profilácticos desvelados son útiles para tratar a sujetos humanos.

Los índices representativos de tratamiento terapéutico eficaz incluyen ralentización de la progresión de amiloidosis, inhibición de la deposición de agregados de fibrillas amiloides y/o eliminación de agregados de fibrillas amiloides. Los índices representativos de tratamiento profiláctico eficaz incluyen retardo de la aparición de amiloidosis y/o reducción del riesgo de amiloidosis.

Se desvelan además métodos para detectar un depósito amiloide asociado con amiloidosis AA en un sujeto, que comprende el uso de un anticuerpo humano, humanizado o quimérico, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente con un epítipo dentro de los restos 70-76 del péptido amiloide A humano, estando dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno unido con un marcador detectable, y detectando después el marcador detectable en el sujeto. Los métodos adicionales comprenden detectar una proteína amiloide agregada que comprende la secuencia de aminoácidos ED usando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente con un epítipo que comprende X_1EDX_2 en una proteína amiloide agregada, en el que X_1 y X_2 son cualquier aminoácido. Los métodos de detección anteriores pueden usarse, por ejemplo, para controlar la aparición o progresión de enfermedad o terapia en cualquiera de las enfermedades y trastornos anteriormente indicados. Con respecto a los métodos de tratamiento desvelados en el presente documento, dicho control puede realizarse en seres humanos así como en sujetos no humanos. Los marcadores detectables útiles incluyen radiomarcadores, tales como ^{125}I . En la realización de dichos métodos de detección, la etapa para detectar el marcador detectable puede conseguirse mediante técnicas no invasivas, tales como captura de imágenes de SPECT/CT y espectroscopia de RMN.

Se describen además métodos de inmunoterapia activa de un sujeto que tiene amiloidosis AA usando un agente que induce una respuesta inmunitaria a los restos 70-76 de péptido amiloide A eficaz para inducir una respuesta inmunitaria que comprende anticuerpos contra los restos 70-76 de un péptido amiloide A. Los agentes representativos para inducir la respuesta inmunitaria incluyen restos 70-76 del péptido amiloide A o un subfragmento de al menos 3 restos contiguos de los mismos que tienen menos de 20 aminoácidos contiguos de un péptido AA. Estos métodos son útiles de forma terapéutica y/o de forma profiláctica para tratamiento de los sujetos descritos en el presente documento anteriormente con respecto a inmunoterapia pasiva, es decir, administrando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente con los restos 70-76 de péptido amiloide A. Los índices de eficacia terapéutica y profiláctica también son como se ha indicado anteriormente en el presente documento con respecto a inmunoterapia pasiva.

Anteriormente se han resumido aspectos particulares de la divulgación, y se describen en el presente documento aspectos adicionales.

Breve descripción de los dibujos

- Figura 1: alineamiento de secuencias de SAA1 humano, SAA2 humano, SAA3 humano y SAA4 humano.
 Figura 2: alineamiento de secuencias de SAA1 humano y AA1 humano.
 5 Figura 3: alineamiento de secuencias de SAA2 humano y AA2 humano.
 Figura 4: alineamiento de secuencias de SAA3 humano y AA3 humano.
 Figura 5: alineamiento de secuencias de SAA4 humano y AA4 humano.
 Figura 6: alineamiento de secuencias de AA1 humano, AA2 humano, AA3 humano y AA4 humano.
 10 Figura 7: alineamiento de secuencias de los últimos siete restos de AA1 humano, AA2 humano, AA3 humano y AA4 humano.
 Figura 8: alineamiento de secuencias de SAA1 de ratón, SAA2 de ratón, SAA3 de ratón y SAA4 de ratón.
 Figura 9: alineamiento de secuencias de SAA1 de ratón y AA1 de ratón.
 Figura 10: alineamiento de secuencias de SAA2 de ratón y AA2 de ratón.
 15 Figura 11: alineamiento de secuencias de SAA3 de ratón y AA3 de ratón.
 Figura 12: alineamiento de secuencias de SAA4 de ratón y AA4 de ratón.
 Figura 13: alineamiento de secuencias de AA1 de ratón, AA2 de ratón, AA3 de ratón y AA4 de ratón.
 Figura 14: alineamiento de secuencias de los últimos siete restos de AA1 de ratón, AA2 de ratón, AA3 de ratón, AA4 de ratón.
 20 Figura 15: alineamiento de secuencias de SAA1 humano y SAA1 de ratón.
 Figura 16: alineamiento de secuencias de AA1 humano y AA1 de ratón.
 Figura 17: alineamiento de secuencias de SAA1 humano y fragmento de SAA1 de ratón.
 Figura 18: alineamiento de secuencias de SAA1 alfa humano, SAA1 beta humano y SAA1 gamma humano.
 Figura 19: alineamiento de secuencias de SAA2 alfa humano y SAA2 beta humano.
 25 Figura 20: comparación de secuencias de proteínas SAA. La región peptídica usada para generar 2A4, 8G9 y 7D8 se muestra en líneas discontinuas. El inserto de 8 aminoácidos entre las posiciones 67 y 68 en la secuencia Shar Pei se indica por el subrayado y la flecha. El alineamiento se realizó con CLUSTALW.
 Figura 21: secuencias de línea germinal de cadenas ligeras V_{κ} .
 Figura 22: secuencias de línea germinal de cadenas ligeras V_{λ} .
 30 Figura 23: secuencia de aminoácidos de $V_{\lambda 6}$ Wil.
 Figura 24: cristalografía de rayos X de $V_{\lambda 6}$ Wil que muestra la posición de Glu50-Asp51.
 Figura 25: cristalografía de rayos X de $V_{\lambda 6}$ Wil que muestra la posición de Glu81-Asp82.
 Figura 26: cinética de unión de mAb Elan con fibrillas $V_{\lambda 6}$ Wil. Mediciones por BIAcore de la interacción de los mAb 2A4, 7D8 y 8G9 a 6,6 nM con fibrillas $V_{\lambda 6}$ Wil inmovilizadas. La KD calculada para cada interacción fue de ~ 1 nM.
 35 Figura 27: cinética de unión dependiente de concentración de mAb 7D8 con fibrillas $V_{\lambda 6}$ Wil sintéticas. La interacción de anticuerpos a una concentración de 6,6 – 33,3 nM con fibrillas $V_{\lambda 6}$ Wil inmovilizadas se midió por BIAcore.
 Figura 28: cinética de unión de mAb 7D8 con fibrillas $V_{\lambda 6}$ sintéticas en presencia de los péptidos p39 y p41. La interacción del mAb 7D8 a 6,6 nM con fibrillas $V_{\lambda 6}$ Will inmovilizadas se midió por BIAcore en presencia de péptidos p39 y p41 a 1 o 20 $\mu\text{g/ml}$.
 40 Figura 29: reactividad de anticuerpos monoclonales con depósitos amiloides tisulares AL λ .
 Figura 30: biodistribución de mAb 7D8 marcado con ^{125}I en ratones que portan un amiloidoma AL λ humano.
 Figura 31: interacción de anti AA de sobrenadantes de cultivo con fibrillas AA derivadas de ratón. Los resultados de sobrenadantes de cultivo de mAb que se unen con AEF AA murino. Los paneles superior e inferior son datos sobre la primera y segunda recogidas de fluido de cultivo, respectivamente.
 45 Figura 32: análisis de SDS-PAGE de mAb 2A4, 8G9 y 7D8 purificados con proteína A.
 Figura 33: unión de mAb purificados con péptido inmunizador (p N° 39) y de control (p N° 41).
 Figura 34: unión con extracto amiloide AA murino (AEF).
 50 Figura 35: unión de mAb purificados con extracto amiloide AA renal humano.
 Figuras 36A-36E: secuencias de regiones variables de cadena ligera y cadena pesada 2A4, 7D8 y 8G9 murinas (Figura 36A); secuencias de regiones variables de cadena ligera 2A4/8G9 y 7D8 humanizadas (Figuras 36B-36C); secuencias de regiones variables de cadena ligera humana usadas como marcos conservados aceptores (Figura 36D); secuencias de regiones variables de cadena pesada 2A4/7D8/8G9 humanizadas y regiones variables de cadena pesada humanas usadas como marcos conservados aceptores (Figura 36E). Subrayado, CDR; doble subrayado, secuencias líder; minúscula, retromutaciones.

Descripción detallada

60 La divulgación proporciona un anticuerpo aislado de fragmentos de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente con un epítipo que incluye $X_1\text{EDX}_2$ en una proteína amiloide agregada, en la que X_1 y X_2 son cualquier aminoácido.

65 Los anticuerpos representativos también incluyen anticuerpos o fragmentos de los mismos que (a) compiten por la unión con un epítipo que incluye $X_1\text{EDX}_2$ con un anticuerpo 2A4, 7D8 u 8G9; (b) se unen con el mismo epítipo que incluye $X_1\text{EDX}_2$ que un anticuerpo 2A4, 7D8 u 8G9; (c) incluyen un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo

2A4, 7D8 u 8G9; o (d) incluyen las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo 2A4, 7D8 u 8G9.

5 La divulgación también proporciona una región variable de anticuerpo aislada que incluye (a) una región variable de cadena ligera de un anticuerpo derivado de un anticuerpo 2A4, 7D8 o 8G9; o (b) una región variable de cadena pesada de un anticuerpo derivado de un anticuerpo 2A4, 7D8 u 8G9.

10 La divulgación también proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una región variable de cadena ligera o región variable de cadena pesada de anticuerpo que incluye (a) una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena ligera o de cadena pesada de un anticuerpo 7D8, 2A4 u 8G9; (b) una secuencia de nucleótidos que es idéntica a una secuencia de nucleótidos de un anticuerpo 7D8, 2A4 u 8G9 que codifica una región variable de cadena ligera o cadena pesada; (c) una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleótidos de (a) o (b); o (d) un ácido nucleico que hibrida específicamente con un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que es el complemento de una secuencia nucleótidos de (a) o (b) en condiciones de hibridación rigurosas.

También se proporcionan células que expresan los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno. La divulgación proporciona además células que expresan ácidos nucleicos como se describen en el presente documento.

20 La divulgación también incluye el tratamiento de enfermedades amiloides y de profilaxis de enfermedades amiloides usando los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la divulgación. En la actualidad, no hay tratamientos dirigidos a amiloides específicos aprobados para ninguna de las enfermedades amiloides, incluyendo Amiloidosis AA y amiloidosis AL. Véase Gillmore J.D. *et al.*, *Lancet* 358: 24-9 (2001). Cuando hay una patología subyacente o asociada, la terapia se dirige a reducir la producción de proteína amiloidogénica tratando la enfermedad subyacente.

25 Por ejemplo, la estrategia del tratamiento actual para Amiloidosis AA es dirigirse a la inflamación subyacente, reduciendo los niveles de ApoSSA por debajo de 10 mg/l. Las terapias empleadas en la actualidad incluyen quimioterapia (clorambucilo y MTX), inmunosupresores (azatioprina), fármacos antiinflamatorios (colchicina) e inhibidores de TNF. La divulgación proporciona composiciones farmacéuticas y métodos para tratar varias enfermedades amiloides, incluyendo amiloidosis, tales como, por ejemplo, amiloidosis AA y amiloidosis AL. De acuerdo con un aspecto, la divulgación incluye composiciones farmacéuticas que incluyen, como un principio activo, un agente que es eficaz para inducir una respuesta inmunitaria en un paciente contra un componente amiloide. El agente puede ser un péptido que comprende un fragmento que consiste en la secuencia de aminoácidos X₁EDX₂ derivada de una proteína amiloide. El agente puede ser un anticuerpo que se une específicamente con un epítipo que comprende X₁EDX₂. En otras realizaciones de la divulgación, el agente puede ser un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo. Dichas composiciones generalmente también incluirán excipientes y en realizaciones preferidas pueden incluir adyuvantes. En realizaciones preferidas adicionales, los adyuvantes incluyen, por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, MPL[™], QS-21 (STIMULON[™]) o adyuvante incompleto de Freund. De acuerdo con una realización relacionada, dichas composiciones farmacéuticas pueden incluir una pluralidad de agentes eficaces para inducir una respuesta inmunitaria contra más de un componente amiloide en el paciente.

40 En una realización relacionada, el agente es eficaz para producir una respuesta inmunitaria dirigida contra una proteína amiloide agregada, tal como un componente amiloide de péptido o proteína de fibrilla. Preferentemente, dicho péptido o proteína de fibrilla deriva de una proteína precursora de fibrilla que se sabe que está asociada con ciertas formas de enfermedades amiloides, como se describe en el presente documento. Dichas proteínas precursoras incluyen, pero sin limitación, proteína Amiloide A del Suero (ApoSSA), cadena ligera de inmunoglobulina, cadena pesada de inmunoglobulina, ApoAI, transtiretina, lisozima, cadena α de fibrógeno, gelsolina, cistatina C, precursor de proteína Amiloide β (β -APP), Beta₂ microglobulina, proteína precursora de príon (PrP), factor natriurético auricular, queratina, polipéptido amiloide de islotes, una hormona peptídica y sinucleína. Dichos precursores también incluyen proteínas mutantes, fragmentos proteicos y péptidos proteolíticos de dichos precursores. En una realización preferida, el agente es eficaz para inducir una respuesta inmunitaria dirigida contra un neoepítipo formado por una proteína o un péptido de fibrilla, con respecto a una proteína precursora de fibrilla. Es decir, como se describe en más detalle en el presente documento, muchos péptidos o proteínas formadores de fibrillas son fragmentos de dichas proteínas precursoras, tales como las enumeradas anteriormente. Cuando se forman dichos fragmentos, tal como por escisión proteolítica, pueden revelarse epítopos que no están presentes en el precursor y por lo tanto no están inmunológicamente disponibles para el sistema inmunitario cuando el fragmento es una parte de la proteína precursora. Los agentes dirigidos a dichos epítopos pueden ser agentes terapéuticos preferidos, ya que puede ser menos probable que induzcan una respuesta autoinmunitaria en el paciente. Preferiblemente, dichos agentes producen preferentemente una respuesta inmunitaria dirigida contra una forma patológica de la proteína amiloide, por ejemplo, una proteína amiloide agregada, en relación con formas no patológicas de la proteína amiloide.

65 De acuerdo con una realización relacionada, las composiciones farmacéuticas incluyen agentes dirigidos a agregados amiloides tales como los seleccionados del grupo que incluye, pero sin limitación, los siguientes péptidos o proteínas agregados (por ejemplo, fibrilla): AA, AL, ATTR, AApoA1, Alys, Agel, Acys, A β , AB₂M, AScr, Acal, AIAPP y fragmento de sinucleína-NAC. Los nombres completos y composiciones de estos péptidos se describen en el presente documento. Dichos péptidos pueden prepararse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica,

como se describen en el presente documento.

Los tratamientos comprenden administrar al paciente una dosificación eficaz de un anticuerpo que se une específicamente con un epítipo que comprende X_1EDX_2 en una proteína amiloide, en el que X_1 es H, T, F, S, P, A o cualquier otro resto de aminoácido inmediatamente antes de ED en dicha proteína amiloide; y en el que X_2 es T, S, E, R, I, V, F, A o cualquier otro resto de aminoácido inmediatamente después de ED en dicha proteína amiloide. En algunos casos, el paciente padece una amiloidosis asociada con una proteína amiloide agregada que comprende la secuencia de aminoácidos ED. Algunos anticuerpos se unen específicamente con un epítipo que consiste en dicho X_1EDX_2 . En algunos anticuerpos, X_1 es H, T, F, S, P o A y X_2 es T, S, E, D, R, I, V, F o A. En algunos de dichos anticuerpos, cuando X_1 es H, X_2 es T o A; cuando X_1 es A, X_2 es S, T, E o V; cuando X_1 es T, X_2 es E; cuando X_1 es F, X_2 es D; cuando X_1 es S, X_2 es E, F o A; y cuando X_1 es P, X_2 es E, I o F. En algunas realizaciones, X_1 es H, T, F, S, P o A y X_2 es T, S, E, D, R, I, V, F o A, a condición de que si X_1 es A, X_2 no es V. En algunos anticuerpos, cuando X_1 es A, X_2 es S, T o E.

Algunos anticuerpos se unen específicamente con un epítipo que comprende la secuencia de aminoácidos GHEDT, (SEC ID N°: 3), HEDT, (SEC ID N°: 12), AEDS, (SEC ID N°: 13), AEDT, (SEC ID N°: 14), HEDA, (SEC ID N°: 15), TEDE, (SEC ID N°: 16), FEDD, (SEC ID N°: 17), SEDE, (SEC ID N°: 18), AEDE, (SEC ID N°: 19), PEDE, (SEC ID N°: 20), PEDI, (SEC ID N°: 21), PEDF, (SEC ID N°: 22), AEDV, (SEC ID N°: 23), SEDF (SEC ID N°: 24) o SEDA, (SEC ID N°: 25).

Algunos anticuerpos se unen específicamente con un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en GHEDT, (SEC ID N°: 3), HEDT, (SEC ID N°: 12), AEDS, (SEC ID N°: 13), AEDT, (SEC ID N°: 14), HEDA, (SEC ID N°: 15), TEDE, (SEC ID N°: 16), FEDD, (SEC ID N°: 17), SEDE, (SEC ID N°: 18), AEDE, (SEC ID N°: 19), PEDE, (SEC ID N°: 20), PEDI, (SEC ID N°: 21), PEDF, (SEC ID N°: 22), SEDF, (SEC ID N°: 24) y SEDA, (SEC ID N°: 25). Algunos anticuerpos se unen específicamente con un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en GHEDT, (SEC ID N°: 3), HEDT, (SEC ID N°: 12), AEDS, (SEC ID N°: 13), AEDT, (SEC ID N°: 14), HEDA, (SEC ID N°: 15) y TEDE, (SEC ID N°: 16).

Algunos anticuerpos se unen específicamente con un epítipo dentro de los restos 70 a 76 de AA. Algunos anticuerpos se unen específicamente con un epítipo dentro de los restos 71 a 75 de AA. Algunos anticuerpos se inducen para un péptido que comprende GHEDT, (SEC ID N°: 3).

Algunos anticuerpos se unen específicamente con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos PEDS, (SEC ID N°: 26), PEDL, (SEC ID N°: 27), TEDV, (SEC ID N°: 28), AEDE, (SEC ID N°: 19), SEDI, (SEC ID N°: 29) y TEDT, (SEC ID N°: 30). Algunos anticuerpos se unen específicamente con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos LEDG, (SEC ID N°: 31), AEDM, (SEC ID N°: 32), HEDS, (SEC ID N°: 33), CEDD, (SEC ID N°: 34), QEDS, (SEC ID N°: 35), REDS, (SEC ID N°: 36), TEDG, (SEC ID N°: 37), QEDR, (SEC ID N°: 38), TEDL, (SEC ID N°: 39), PEDN, (SEC ID N°: 40), EEDP, (SEC ID N°: 41), LEDL, (SEC ID N°: 42), KEDA, (SEC ID N°: 43), SEDC, (SEC ID N°: 44), EEDD, (SEC ID N°: 45), SEDK, (SEC ID N°: 46), DEDD, (SEC ID N°: 47), DEDG, (SEC ID N°: 48), LEDE, (SEC ID N°: 49), GEDA, (SEC ID N°: 50), VEDF, (SEC ID N°: 51), YEDE, (SEC ID N°: 52), IEDL, (SEC ID N°: 53), WEDY, (SEC ID N°: 54), DEDW, (SEC ID N°: 55), SEDL, (SEC ID N°: 56), YEDQ, (SEC ID N°: 57), LEDW, (SEC ID N°: 58), YEDR, (SEC ID N°: 59) y PEDK, (SEC ID N°: 60).

Algunos anticuerpos se unen específicamente con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos AEDV, (SEC ID N°: 23). Algunos anticuerpos se unen específicamente con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEDF, (SEC ID N°: 24) o PEDF, (SEC ID N°: 22). Algunos anticuerpos se unen específicamente con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos AEDS, (SEC ID N°: 13). Algunos anticuerpos se unen específicamente con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos PEDI, (SEC ID N°: 21), AEDV, (SEC ID N°: 23), SEDF, (SEC ID N°: 24), SEDA, (SEC ID N°: 25), SEDE, (SEC ID N°: 18), AEDE, (SEC ID N°: 19) y PEDE, (SEC ID N°: 20). Algunos anticuerpos se unen con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos TEDE, (SEC ID N°: 16).

Algunos anticuerpos se unen específicamente con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos AEDV, (SEC ID N°: 23). Algunos anticuerpos se unen específicamente con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEDF, (SEC ID N°: 24) o PEDF, (SEC ID N°: 22). Algunos anticuerpos se unen específicamente con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos AEDS, (SEC ID N°: 13). Algunos anticuerpos se unen específicamente con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos PEDI, (SEC ID N°: 21), AEDV, (SEC ID N°: 23), SEDF, (SEC ID N°: 24), SEDA, (SEC ID N°: 25), SEDE, (SEC ID N°: 18), AEDE, (SEC ID N°: 19) y PEDE, (SEC ID N°: 20). Algunos anticuerpos se unen específicamente con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos TEDE, (SEC ID N°: 16).

Cualquiera de los anticuerpos descrito anteriormente puede administrarse en los tratamientos descritos anteriormente para tratar o efectuar profilaxis de una enfermedad caracterizada por la deposición de una proteína amiloide, tal como, por ejemplo, una proteína amiloide que comprende la secuencia de aminoácidos ED. En algunos casos, si la proteína amiloide comprende la secuencia de aminoácidos AEDV (SEC ID N°: 23), entonces el anticuerpo no se administra para tratar o efectuar profilaxis de enfermedad de Alzheimer o Deterioro Cognitivo Leve.

La proteína amiloide puede ser cualquiera de proteína amiloide A del suero, proteína de cadena ligera de inmunoglobulina, tal como, por ejemplo, V λ 6 Wil o V κ , polipéptido precursor amiloide de islotes humanos (IAPP), péptido beta amiloide, transtiretina (TTR) o ApoA1.

5 Opcionalmente, el paciente es un ser humano. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente con un péptido cuyos restos consisten en SEC ID N° 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente con un epítipo dentro de los restos 70-76 de (SEC ID N°: 2). Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo humano, anticuerpo humanizado o anticuerpo quimérico. Opcionalmente, el anticuerpo humano es del isotipo humano IgG1, IgG4, IgG2 o IgG3. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es de isotipo humano IgG1, IgG4, IgG2 o IgG3. Opcionalmente, el anticuerpo quimérico es de isotipo humano IgG1, IgG4, IgG2 o IgG3. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo de ratón. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

15 En algunos tratamientos, el anticuerpo comprende dos copias del mismo par de cadenas ligeras y pesadas. En otros, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer par de cadena ligera y pesada que se une específicamente con el epítipo de A β y un segundo par de cadena ligera y pesada que se une específicamente con un receptor de Fc en células microgliales. En otros, una cadena del anticuerpo se fusiona con un polipéptido heterólogo.

20 En algunos tratamientos, la dosificación del anticuerpo es de al menos 1 mg/kg de peso corporal del paciente. En otros, la dosificación del anticuerpo es de al menos 10 mg/kg de peso corporal del paciente.

25 En algunos tratamientos, el anticuerpo se administra con un vehículo como una composición farmacéutica. En otros, el anticuerpo es un anticuerpo humano para AA preparado a partir de linfocitos B de un ser humano inmunizado con un péptido AA. Opcionalmente, el ser humano inmunizado con péptido AA es el paciente. En algunos casos, el anticuerpo se administra por vía intraperitoneal, por vía oral, por vía intranasal, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía tópica o por vía intravenosa.

30 En algunos tratamientos, el anticuerpo se administra administrando un polinucleótido que codifica al menos una cadena de anticuerpo al paciente y el polinucleótido se expresa para producir la cadena de anticuerpo en el paciente. Opcionalmente, el polinucleótido codifica cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo y el polinucleótido se expresa para producir las cadenas pesadas y ligeras en el paciente.

35 Algunos de los tratamientos anteriores comprenden además administrar una dosificación eficaz de al menos otro anticuerpo que se une con un epítipo diferente de AA. Algunos de los tratamientos anteriores comprenden además controlar al paciente con respecto al nivel de anticuerpo administrado en la sangre del paciente. En otros, el anticuerpo se administra en múltiples dosificaciones durante un periodo de al menos seis meses. En otros, el anticuerpo se administra como una composición de liberación sostenida.

40 La divulgación proporciona además profilaxis de amiloidosis de AA en un paciente susceptible a amiloidosis de AA. Esto comprende administrar al paciente una dosificación eficaz de un anticuerpo que se une específicamente con un epítipo dentro de los restos 70 a 76 de AA. Opcionalmente, el paciente es humano. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente con un péptido cuyos restos consisten en las SEC ID N° 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente con un epítipo dentro de los restos 70-76 de (SEC ID N°: 2).

45 En algunos casos, el paciente padece una enfermedad amiloide subyacente seleccionada del grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondilitis anquilosante, psoriasis, artropatía psoriásica, síndrome de Reiter, enfermedad de Still del Adulto, síndrome de Behcet, enfermedad de Crohn, lepra, tuberculosis, bronquiectasia, úlceras por decúbito, pielonefritis crónica, osteomielitis, enfermedad de Whipple, linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas del intestino, pulmón y tracto urogenital, carcinoma de células basales, leucemia por tricoleucitos, Fiebre Mediterránea Familiar y Enfermedad de Castleman.

50 La divulgación proporciona además un anticuerpo humano, humanizado o quimérico que se une específicamente con un epítipo dentro de los restos 70 a 76 de AA. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado se une específicamente con un epítipo dentro de los restos 70 a 76 de AA. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es una versión humanizada del anticuerpo 7D8 (Número de Referencia de ATCC PTA-9468). Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es una versión humanizada del anticuerpo 7D29. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es una versión humanizada del anticuerpo 7D19. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es una versión humanizada del anticuerpo 7D47. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es una versión humanizada del anticuerpo 7D39. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es una versión humanizada del anticuerpo 7D66.

55 Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es una versión humanizada del anticuerpo 8G9. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es una versión humanizada del anticuerpo 8G3. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es una versión humanizada del anticuerpo 8G4. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es una versión humanizada del anticuerpo 8G51. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es una versión humanizada del anticuerpo 8G22. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es una versión humanizada del anticuerpo 8G30.

65 Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es una versión humanizada del anticuerpo 8G46. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es una versión humanizada del anticuerpo 2A4 (Número de Referencia de ATCC PTA-

9662). Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es una versión humanizada del anticuerpo 2A20. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es una versión humanizada del anticuerpo 2A44. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es una versión humanizada del anticuerpo 2A77. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es una versión humanizada del anticuerpo 2A13. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es una versión humanizada del anticuerpo 2A14.

La divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas comprenden un anticuerpo que se une específicamente con un epítipo dentro de los restos 70 a 76 de AA, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Algunas composiciones farmacéuticas comprenden un anticuerpo humano, humanizado o quimérico que se une específicamente con un epítipo dentro de los restos 70 a 76 de AA, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otras composiciones farmacéuticas comprenden un anticuerpo que se une específicamente con un epítipo dentro de los restos 70 a 76 de AA y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el isotipo del anticuerpo es IgG1 humano, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas composiciones farmacéuticas el isotipo del anticuerpo es IgG2, IgG3 o IgG4 humano. El anticuerpo es humano. En algunas composiciones farmacéuticas el anticuerpo es humano. En algunas composiciones farmacéuticas el anticuerpo es humanizado. El anticuerpo es quimérico. En algunas composiciones farmacéuticas el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En algunas composiciones farmacéuticas el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En algunas composiciones farmacéuticas el anticuerpo comprende dos copias del mismo par de cadenas ligeras y pesadas. En algunas composiciones farmacéuticas el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer par de cadenas ligera y pesada que se une específicamente con el epítipo de AA y un segundo par de cadenas ligera y pesada que se une específicamente con un receptor de Fc en células microgliales. En algunas composiciones farmacéuticas una cadena del anticuerpo se fusiona con un polipéptido heterólogo. En algunas composiciones farmacéuticas el vehículo es un diluyente fisiológicamente aceptable para administración parenteral. Algunas composiciones farmacéuticas se adaptan para administrarse por vía intraperitoneal, por vía oral, por vía intranasal, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía tópica o por vía intravenosa. Algunas composiciones farmacéuticas se adaptan para administrarse en múltiples dosificaciones durante un periodo de al menos seis meses. Algunas composiciones farmacéuticas se adaptan para administrarse como una composición de liberación sostenida. Algunas composiciones farmacéuticas comprenden además al menos otro anticuerpo que se une con un epítipo diferente de AA.

La divulgación posibilita el tratamiento de la amiloidosis AA en un paciente. Los tratamientos comprenden administrar un agente que induce una respuesta inmunitaria a AA70-76 en un régimen eficaz para inducir una respuesta inmunitaria que comprende anticuerpos contra AA70-76 en un régimen eficaz para inducir una respuesta inmunitaria que comprende los anticuerpos contra AA70-76. En algunos métodos el paciente es humano. Opcionalmente, el agente comprende AA70-76 o un subfragmento de al menos 3 restos contiguos del mismo y tienen menos de 20 aminoácidos contiguos de un péptido AA. Opcionalmente, el agente es un péptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N° 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 y subfragmentos de al menos 3 restos contiguos del mismo y tienen menos de 20 aminoácidos de un péptido AA. Opcionalmente, el agente está unido en sus extremos N y C terminal con primer y segundo polipéptidos heterólogos. Opcionalmente, el agente está unido en su extremo N terminal con un polipéptido heterólogo, y en su extremo C terminal con al menos una copia adicional del segmento N terminal. En algunos casos, el polipéptido heterólogo induce una respuesta de linfocitos T contra el polipéptido heterólogo y por lo tanto una respuesta de linfocitos B contra AA. En algunos casos el polipéptido comprende además al menos una copia adicional de AA. Opcionalmente, el polipéptido comprende del extremo N terminal al C terminal, AA, una pluralidad de copias adicionales de AA, y el segmento de aminoácidos heterólogo.

En algunos tratamientos el polipéptido se administra con un adyuvante que potencia una respuesta inmunitaria para el segmento N terminal. Opcionalmente, el adyuvante y el polipéptido se administran juntos como una composición. Opcionalmente, el adyuvante se administra antes que el polipéptido. Opcionalmente, el adyuvante se administra después del polipéptido. En algunos casos el adyuvante es alumbre. En algunos casos el adyuvante es MPL. En algunos casos el adyuvante es QS-21. En algunos casos el adyuvante es adyuvante incompleto de Freund. En algunos casos la respuesta inmunitaria comprende linfocitos T que se unen con el péptido AA como un componente de un complejo de MHC I o MHC II.

La divulgación posibilita la profilaxis de amiloidosis AA en un paciente. Esto comprende administrar un agente que induce una respuesta inmunitaria a AA70-76 en un régimen eficaz para inducir una respuesta inmunitaria que comprende anticuerpos contra AA70-76 en un régimen eficaz para inducir una respuesta inmunitaria que comprende anticuerpos contra AA70-76. En algunos casos el paciente es humano. En algunos casos el paciente es asintomático. En algunos casos el paciente padece una enfermedad amiloide subyacente seleccionada del grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondilitis anquilosante, psoriasis, artropatía psoriásica, síndrome de Reiter, enfermedad de Still del Adulto, síndrome de Behcet, enfermedad de Crohn, lepra, tuberculosis, bronquiectasia, úlceras por decúbito, pielonefritis crónica, osteomielitis, enfermedad de Whipple, linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas del intestino, pulmón y tracto urogenital, carcinoma de células basales, leucemia por tricoleucitos, Fiebre Mediterránea Familiar y Enfermedad de Castleman.

En algunos casos de consecución de profilaxis, el agente comprende AA70-76 o un subfragmento de al menos 3 restos contiguos del mismo y tiene menos de 20 aminoácidos contiguos de un péptido AA. Opcionalmente, el agente es un péptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N° 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 y subfragmentos de al menos 3 restos contiguos del mismo y tiene menos de 20 aminoácidos de un péptido AA. Opcionalmente, el agente está unido en sus extremos N y C terminal con primer y segundo polipéptidos heterólogos. Opcionalmente, el agente está unido en su extremo N terminal con un polipéptido heterólogo, y en su extremo C terminal con al menos una copia adicional del segmento N terminal. En algunos casos, el polipéptido heterólogo induce una respuesta de linfocitos T contra el polipéptido heterólogo y de este modo una respuesta de linfocitos B contra AA. En algunos casos el polipéptido comprende además al menos una copia adicional de AA. Opcionalmente, el polipéptido comprende del extremo N terminal al C terminal, AA, una pluralidad de copias adicionales de AA, y el segmento de aminoácidos heterólogo.

La divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas comprenden un fragmento AA que consiste en los restos que comienzan en el resto 70 de AA y terminan en el resto 76 de AA. Opcionalmente, el fragmento AA está unido en su extremo C terminal con un polipéptido heterólogo. Opcionalmente, el fragmento AA está unido en su extremo N terminal con un polipéptido heterólogo. Opcionalmente, el fragmento AA está unido en sus extremos N y C terminales con primer y segundo polipéptidos heterólogos. Opcionalmente, el fragmento AA está unido en su extremo n terminal con un polipéptido heterólogo, y en su extremo C terminal con al menos una copia adicional del segmento N terminal. Opcionalmente, el polipéptido comprende además al menos una copia adicional del segmento N terminal. Opcionalmente, el polipéptido comprende del extremo N terminal al C terminal, AA, una pluralidad de copias adicionales del segmento N terminal, y el segmento de aminoácidos heterólogo. En algunas composiciones farmacéuticas el polipéptido heterólogo induce una respuesta de linfocitos T contra el polipéptido heterólogo y de este modo una respuesta de linfocitos B contra el segmento N terminal.

Algunas composiciones farmacéuticas comprenden además un adyuvante que potencia una respuesta inmunitaria a AA. Opcionalmente, el adyuvante es alumbre. Opcionalmente, el adyuvante es MPL. Opcionalmente, el adyuvante es QS-21. Opcionalmente, el adyuvante es adyuvante incompleto de Freund. Opcionalmente, el adyuvante comprende además GM-CSF. Opcionalmente, el adyuvante es M-CSF. Opcionalmente, la composición comprende más de 10 microgramos del polipéptido.

La divulgación posibilita el tratamiento de la amiloidosis AA en un paciente. Esto comprende administrar un agente eficaz para inducir una respuesta inmunitaria contra un componente peptídico de un depósito amiloide en el paciente y un agente diferente que trata una enfermedad subyacente, y de este modo tratar la amiloidosis AA en el paciente. En algunos casos la enfermedad subyacente se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondilitis anquilosante, psoriasis, artropatía psoriásica, síndrome de Reiter, enfermedad de Still del Adulto, síndrome de Behcet, enfermedad de Crohn, lepra, tuberculosis, bronquiectasia, úlceras por decúbito, pielonefritis crónica, osteomielitis, enfermedad de Whipple, linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas del intestino, pulmón y tracto urogenital, carcinoma de células basales, leucemia por tricoleucitos, Fiebre Mediterránea Familiar y Enfermedad de Castleman.

La divulgación posibilita la profilaxis de amiloidosis AA en un paciente. Esto comprende administrar un agente eficaz para inducir una respuesta inmunitaria contra un componente peptídico de un depósito amiloide en el paciente y un agente diferente que trata una enfermedad subyacente, y de este modo tratar la amiloidosis AA en el paciente. En algunos casos la enfermedad subyacente se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondilitis anquilosante, psoriasis, artropatía psoriásica, síndrome de Reiter, enfermedad de Still del Adulto, síndrome de Behcet, enfermedad de Crohn, lepra, tuberculosis, bronquiectasia, úlceras por decúbito, pielonefritis crónica, osteomielitis, enfermedad de Whipple, linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas del intestino, pulmón y tracto urogenital, carcinoma de células basales, leucemia por tricoleucitos, Fiebre Mediterránea Familiar y Enfermedad de Castleman.

La divulgación posibilita la exploración de un anticuerpo con respecto a actividad en el tratamiento de un paciente que tiene amiloidosis AA. Esto comprende poner en contacto el anticuerpo con un péptido AA y determinar si el anticuerpo se une específicamente con AA, proporcionando la unión específica un indicio de que el anticuerpo tiene actividad en el tratamiento de la amiloidosis AA.

La divulgación posibilita la exploración de anticuerpo con respecto a actividad en la eliminación de una entidad biológica físicamente asociada con un antígeno. Esto comprende combinar la entidad biológica asociada con antígeno, el anticuerpo y células fagocíticas que portan receptores de Fc en un medio; y controlar la cantidad de la entidad biológica asociada a antígeno restante en el medio, indicando una reducción en la cantidad de la entidad biológica asociada a antígeno que el anticuerpo tiene actividad de eliminación contra el antígeno. En algunos casos la etapa de control controla la cantidad del antígeno restante en el medio. En algunos casos, la combinación comprende añadir entidad biológica asociada a antígeno al medio, y poner en contacto el medio con las células fagocíticas que portan receptores de Fc. En algunos casos la entidad biológica asociada a antígeno se proporciona como una muestra tisular. En algunos casos el antígeno es la entidad biológica. En algunos casos la muestra tisular comprende un depósito amiloide. Opcionalmente, la muestra tisular es del paciente o un mamífero que tiene patología de amiloidosis AA. En algunos métodos, el antígeno es AA. En algunos casos, las células fagocíticas son

células microgliales. En algunos casos la muestra tisular se selecciona del grupo que consiste en una muestra tisular cancerosa, una muestra tisular infectada por virus, una muestra tisular que comprende células inflamatorias, un crecimiento celular anómalo no maligno, y una muestra tisular que comprende una matriz extracelular anómala.

5 La divulgación posibilita la detección de un depósito amiloide en un paciente. Esto comprende administrar al paciente un anticuerpo que se une específicamente con un epítipo dentro de los aminoácidos 70-76 de AA y detectar la presencia del anticuerpo en el paciente. Opcionalmente, el anticuerpo está marcado. Opcionalmente, el anticuerpo está marcado con un marcador paramagnético. Opcionalmente, el anticuerpo marcado se detecta por resonancia magnética nuclear. Opcionalmente, el anticuerpo marcado se detecta con captura de imágenes por
10 SPECT/CT. En algunos casos, el anticuerpo carece de capacidad para inducir una respuesta de eliminación tras unirse con un depósito amiloide en el paciente.

La divulgación proporciona kits de diagnóstico. Los kits comprenden un anticuerpo que se une específicamente con un epítipo con los restos 70-76 de AA. Algunos kits comprenden además una etiqueta que describe el uso del anticuerpo para diagnóstico *in vivo* o control de una enfermedad asociada con depósitos amiloides de AA en un
15 paciente. En algunos pacientes, los kits incluyen instrucciones para uso del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en la detección de AA.

La divulgación proporciona además un método para diagnosticar amiloidosis en un sujeto que comprende: (a) administrar al sujeto un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une con un marcador detectable, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se une específicamente con un epítipo que comprende X_1EDX_2 en una proteína amiloide agregada, en el que X_1 y X_2 son cualquier aminoácido; y (b) detectar la presencia o ausencia del anticuerpo unido o fragmento del mismo, en el que la presencia del anticuerpo unido o fragmento indica un diagnóstico de amiloidosis AA.
20

Se proporciona además en el presente documento un tratamiento o profilaxis de la amiloidosis usando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente con un epítipo que comprende X_1EDX_2 en una proteína amiloide agregada, en el que X_1 y X_2 son cualquier aminoácido.
25

La presente divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente con un epítipo que comprende X_1EDX_2 , en una proteína amiloide agregada, en el que X_1 y X_2 son cualquier aminoácido. Por ejemplo, X_1 incluye H, T, F, S, P, A, L, C, Q, R, E, K, D, G, V, Y, I o W, tal como H, T, F, S, P o A, o tal como H, T, F o A. X_2 incluye T, S, E, R, I, V, F, D, A, G, M, L, N, P, C, K, Y o Q, tal como T, S, E, R, I, V, F, D o A, o tal como T, S, E, D o A. En otros ejemplos, X_1 es H, T o A y X_2 es T, S, E o A, tal como X_1 es H o A y X_2
30 es T, S o A. En más ejemplos adicionales, X_1 es H y H_2 es T o A; o X_1 es A y X_2 es S, T, E o V, tal como X_1 es A y X_2 es S, T, o E, o X_1 es T y X_2 es E, o X_1 es F y X_2 es D, o X_1 es S y X_2 es E, F, o A; o X_1 es P y X_2 es E, I, o F.
35

En particular, los epítipos incluyen secuencias de aminoácidos tales como las expuestas en SEC ID N°: 3 a SEC ID N°: 25, tales como SEC ID N°: 3, 12, 13, 14, 15 y 16. Los ejemplos adicionales incluyen SEC ID N°: 4, 5, 7, 8 y 9, tales como SEC ID N°: 4. Los anticuerpos de la divulgación que se unen con los epítipos, tal como con SEC ID N°: 3, incluyen los anticuerpos 2A4, 7D8 y 8G9.
40

Las proteínas amiloides agregadas con las que se unen los anticuerpos son proteínas no monoméricas. Dichas proteínas amiloides agregadas incluyen proteína amiloide A del suero (SAA), proteína de cadena ligera de inmunoglobulina, polipéptido precursor amiloide de islotes humanos (IAPP), péptido beta amiloide, transtiretina (TTR) y ApoA1, tal como SAA.
45

La divulgación proporciona además anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que (a) compiten por la unión con un epítipo que incluye X_1EDX_2 con un anticuerpo 2A4, 7D8 o 8G9; (b) se unen con el mismo epítipo que incluye X_1EDX_2 que un anticuerpo 2A4, 7D8 u 8G9; (c) tienen un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo 2A4, 7D8 u 8G9; o (d) incluyen las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo 2A4, 7D8 u 8G9. La divulgación también proporciona versiones quiméricas o humanizadas de un anticuerpo 2A4, 7D8 u 8G9.
50

Los anticuerpos representativos, que se unen específicamente con un epítipo que incluye X_1EDX_2 , también incluyen anticuerpos que tienen una, dos, o tres de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una cadena ligera de un anticuerpo 2A4, 7D8 u 8G9. Los anticuerpos de la divulgación, que se unen específicamente con un epítipo que incluye X_1EDX_2 , también incluyen anticuerpos que tienen al menos uno, dos o tres de las CDR de una cadena pesada de un anticuerpo 2A4, 7D8 u 8G9.
55

Las CDR pueden identificarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, son de uso común sistemas de numeración para identificar CDR. La definición de Kabat se basa en la variabilidad de secuencia, y la definición de Chothia se basa en la localización de las regiones de bucles estructurales. La definición de AbM es un compromiso entre los enfoques de Kabat y Chothia. Las CDR de la región variable de cadena ligera se unen con los restos en las posiciones 24 y 34 (CDR1-L), 50 y 56 (CDR2-L), y 89 y 97 (CDR3-L) de acuerdo con el algoritmo de Kabat, Chothia o AbM. De acuerdo con la definición de Kabat, las CDR de la región variable de cadena pesada se
60
65

- unen con los restos en las posiciones 31 y 35B (CDR1-H), 50 y 65 (CDR2-H), y 95 y 102 (CDR3-H) (numeración de acuerdo con Kabat). De acuerdo con la definición de Chothia, las CDR de la región variable de cadena pesada se unen con los restos en las posiciones 26 y 32 (CDR1-H), 52 y 56 (CDR2-H), y 95 y 102 (CDR3-H) (numeración de acuerdo con Chothia). De acuerdo con la definición de AbM, las CDR de la región variable de cadena pesada se unen con los restos en las posiciones 26 y 35B (CDR1-H), 50 y 58 (CDR2-H), y 95 y 102 (CDR3-H) (numeración de acuerdo con Kabat). Véase Martin *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9268-9272; Martin *et al.* (1991) Methods Enzymol. 203: 121-153; Pedersen *et al.* (1992) Immunomethods 1: 126; y Rees *et al.* (1996) En Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, pp. 141-172.
- 10 Los anticuerpos de la divulgación incluyen además un anticuerpo que se une específicamente con un epítipo que comprende X_1EDX_2 , en una proteína amiloide agregada, en el que X_1 y X_2 son cualquier aminoácido, que tiene regiones variables derivadas de regiones variables de un anticuerpo 2A4, 7D8 u 8G9. También se incluyen anticuerpos que tienen regiones variables de anticuerpos 2A4, 7D8 u 8G9.
- 15 Los anticuerpos de la divulgación incluyen además anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos tetaméricos, anticuerpos tetravalentes, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos específicos de dominio, anticuerpos con dominio suprimido o proteínas de fusión.
- 20 También se proporcionan fragmentos de los anticuerpos. Los fragmentos pueden ser fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fv o fragmentos ScFv. Dichos anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden acoplarse con un agente citotóxico, un agente radioterapéutico o un marcador detectable.
- 25 La divulgación también proporciona una región variable de anticuerpo aislada que comprende (a) una región variable de cadena ligera derivada de una región variable de cadena ligera de anticuerpo 7D8, 2A4 u 8G9, o (b) una región variable de cadena pesada derivada de una región variable de cadena ligera de anticuerpo 7D8, 2A4 u 8G9. También se proporcionan regiones variables aisladas que tienen una región variable de cadena ligera o cadena pesada de un anticuerpo 7D8, 2A4 u 8G9. Las regiones variables de anticuerpo aisladas son útiles en la producción de anticuerpos.
- 30 La divulgación también proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican una región variable de cadena ligera o una región variable de cadena pesada de anticuerpo que tienen (a) una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena ligera o cadena pesada de un anticuerpo 7D8, 2A4 u 8G9; (b) una secuencia de nucleótidos que es idéntica a una secuencia de nucleótidos de un anticuerpo 7D8, 2A4 u 8G9 que codifica una región variable de cadena ligera o pesada; o (c) una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica, es decir, al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99 % a una secuencia de nucleótidos de (a) o (b); o (d) un ácido nucleico que hibrida específicamente con un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que es el complemento de una secuencia de nucleótidos de (a) o (b) en condiciones de hibridación rigurosas, por ejemplo, condiciones de lavado final de SSC 0,1x a 65 °C.
- 40 La presente divulgación proporciona además células y líneas celulares que expresan los anticuerpos o ácidos nucleicos descritos en el presente documento. Las células hospedadoras representativas incluyen células de mamíferos y humanas, tales como células CHO, células HEK-293, células HeLa, células CV-1 y células COS. Se conocen en la técnica métodos para generar una línea celular estable después de transformación de una construcción heteróloga en una célula hospedadora. Las células hospedadoras no mamíferas representativas incluyen células de insecto (Potter *et al.* (1993) Int. Rev. Immunol. 10(2-3): 103-112). También producirse anticuerpos en animales transgénicos (Houdebine (2002) Curr. Opin. Biotechnol. 13(6): 625-629) y plantas transgénicas (Schillberg *et al.* (2003) Cell Mol. Life. Sci. 60(3): 433-45).
- 45 La divulgación también posibilita el tratamiento o la consecución de profilaxis de amiloidosis asociada usando fragmentos inmunogénicos de una proteína amiloide que comprende X_1EDX_2 , en la que X_1 es H, T, F, S, P, A o cualquier otro resto de aminoácidos inmediatamente antes de ED en dicha proteína amiloide; y en la que X_2 es T, S, E, R, I, V, F, A o cualquier otro resto de aminoácido inmediatamente antes de ED en dicha proteína amiloide. Sin desear quedar ligado a una teoría particular, se cree que un epítipo que comprende X_1EDX_2 puede exponerse cuando una proteína amiloide se agrega, o experimenta fibrillogénesis o entra de otro modo en una estructura fibrilar, bien por escisión a partir de una proteína precursora mayor o bien por cambio conformacional. Por ejemplo, el tratamiento o la profilaxis de amiloidosis AA representativo incluye administración de fragmentos de AA 70-76 o fragmentos inmunogénicos de los mismos. La divulgación también posibilita el tratamiento o la consecución de profilaxis de amiloidosis asociada con la deposición de proteína amiloide usando anticuerpos reactivos con X_1EDX_2
- 60 en una proteína amiloide agregada, en la que X_1 es H, T, F, S, P, A o cualquier otro resto de aminoácido inmediatamente antes de ED en dicha proteína amiloide agregada; y en la que X_2 es T, S, E, R, I, V, F, A o cualquier otro resto de aminoácido inmediatamente después de ED en dicha proteína amiloide agregada. Preferentemente, dichos anticuerpos son preferentemente reactivos con proteína amiloide agregada en relación con proteína amiloide no patológica. Por ejemplo, el tratamiento o profilaxis de amiloidosis AA asociada con fibrillas AA puede incluir la administración de anticuerpos específicos para región C terminal de fibrillas AA (~ restos 70-76 de AA). Los anticuerpos pueden inhibir la formación de agregados de AA (por ejemplo, fibrillas) o dar como resultado su
- 65

disgregación y eliminación, tratando o realizando de este modo profilaxis de la amiloidosis AA.

I. Definiciones

5 La expresión "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean de forma óptima, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten al menos 65 por ciento de la identidad de secuencia, preferentemente al menos 80 o 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia o más (por ejemplo, 99 por ciento de identidad de secuencia o mayor). Preferentemente, las posiciones de restos que no son idénticas difieren en sustituciones de aminoácidos conservativas.

15 Para comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros de programa de algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula después el porcentaje de identidad de secuencias para la secuencia o las secuencias de ensayo en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros de programas designados.

20 Puede realizarse alineamiento óptimo de secuencias para comparación, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Na'tl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (véase en general Ausubel *et al.*, mencionado anteriormente). Un ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990). Está disponible públicamente software para realizar análisis de BLAST a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Típicamente, pueden usarse parámetros de programas por defecto para realizar la comparación de secuencias, aunque también pueden usarse parámetros adaptados. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10915 (1989)).

35 Para fines de clasificar las sustituciones de aminoácidos como conservativas o no conservativas, los aminoácidos se agrupan de la siguiente manera: grupo I (cadenas laterales hidrófobas): norleucina, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (restos que influyen en la orientación de cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservativas implican sustituciones entre aminoácidos en la misma clase. Las sustituciones no conservativas constituyen intercambiar un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

40 La expresión "todo D" se refiere a péptidos que tienen $\geq 75\%$, $\geq 80\%$, $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$ y 100% de aminoácidos en configuración D.

45 El término "agente" se usa para describir un compuesto que tiene o puede tener una actividad farmacológica. Los agentes incluyen compuestos que son fármacos conocidos, compuestos para los que se ha identificado actividad farmacológica pero que se someten a evaluación terapéutica adicional, y compuestos que son miembros de colecciones y bibliotecas que van a explorarse para una actividad farmacológica.

50 "Enfermedad amiloide" o "amiloidosis" se refiere a cualquier variedad de trastornos que tengan como síntoma o como parte de su patología la acumulación o formación de placas amiloides. Una "placa amiloide" es un depósito extracelular compuesto principalmente de fibrillas proteicas. Generalmente, las fibrillas están compuestas de una proteína o un péptido dominante; sin embargo, la placa también puede incluir componentes adicionales que son moléculas peptídicas o no peptídicas, como se describe en el presente documento.

55 Una "proteína amiloide" o un "péptido amiloide" es una proteína o un péptido capaz de experimentar escisión, cambio conformacional, agregación o fibrillogénesis, dando como resultado la formación de oligómeros patológicos, fibrillas amiloides, placas amiloides y/o componentes amiloides.

60 Un "componente amiloide" es cualquier entidad molecular que está presente en una placa amiloide incluyendo partes antigénicas de dichas moléculas. Los componentes amiloides incluyen pero sin limitación proteínas, péptidos, proteoglicanos y carbohidratos.

65 Un "agente antiamiloides" es un agente que es capaz de producir una respuesta inmunitaria contra un componente de placa amiloide en un sujeto vertebrado, cuando se administra por técnicas de inmunización activa o pasiva.

Una "proteína AA" o "péptido AA" se refiere a la forma de proteína A de proteína amiloide o péptido formado por escisión proteolítica de proteína amiloide A del suero (SAA), bien monomérica o bien agregada, soluble o insoluble.

Una "proteína amiloide agregada" o un "péptido amiloide agregado" o "agregado amiloide" se refiere a una forma patológica, no monomérica, agregada de una proteína amiloide o un péptido amiloide. Las proteínas amiloides agregadas y péptidos amiloides pueden ser solubles o insolubles. Algunas proteínas amiloides agregadas y péptidos amiloides agregados pueden formar oligómeros, fibrillas y/o placas amiloides. Se proporcionan en el presente documento ejemplos de dichas proteínas amiloides agregadas y péptidos amiloides, incluyendo péptidos y proteínas de fibrillas.

Un "agregado AA" se refiere a una forma agregada de AA.

Los agentes terapéuticos son típicamente sustancialmente puros con respecto a contaminantes no deseados. Esto significa que un agente tiene típicamente al menos aproximadamente 50 % p/p (peso/peso) de pureza, así como está sustancialmente sin proteínas de interferencia y contaminantes. En ocasiones los agentes tienen aproximadamente 80 % p/p y, más preferentemente al menos 90 o aproximadamente 95 % p/p de pureza. Sin embargo, usando técnicas de purificación de proteínas convencionales, pueden obtenerse péptidos homogéneos de al menos 99 % p/p. Los agentes terapéuticos pueden prevenir, efectuar profilaxis de, o tratar una enfermedad asociada con depósitos amiloides.

La unión específica entre dos entidades significa que las entidades tienen una afinidad mutua entre sí que es al menos 10, 100 o 100 veces mayor que la afinidad de una de las entidades por un control, tal como un antígeno o anticuerpo no relacionado por un antígeno diferente. La afinidad mutua de las dos entidades entre sí es habitualmente al menos 10^7 M^{-1} , 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} o 10^{10} M^{-1} . Se prefieren afinidades mayores de 10^8 M^{-1} .

El término "inmunoglobulina" o "anticuerpo" (usados indistintamente en el presente documento) se refiere a una proteína de unión a antígeno que tiene una estructura básica de cuatro cadenas polipeptídicas que consiste en dos cadenas pesadas y dos ligeras, estando dichas cadenas estabilizadas, por ejemplo, por enlaces disulfuro intercatenarios, que tienen la capacidad para unirse específicamente con antígeno. Las cadenas tanto pesadas como ligeras se pliegan en dominios. El término "dominio" se refiere a una región globular de un polipéptido de cadena pesada o ligera que comprende bucles peptídicos (por ejemplo, que comprende 3 a 4 bucles peptídicos) estabilizados, por ejemplo, por una lámina plegada en β y/o un enlace disulfuro intracatenario. Los dominios se denominan adicionalmente en el presente documento "constante" o "variable", basándose en la falta relativa de variación de secuencia dentro de los dominios de diversos miembros de la clase en el caso de un dominio "constante", o la variación significativa dentro de los dominios de diversos miembros de la clase en el caso de un dominio "variable". Los dominios "constantes" en la cadena ligera se denominan indistintamente "regiones constantes de cadena ligera", "dominios constantes de cadena ligera", regiones "CL" o dominios "CL". Los dominios "constantes" en la cadena pesada se denominan de forma intercambiable "regiones constantes de cadena pesada", "dominios constantes de cadena pesada", regiones "CH" o dominios "CH". Los dominios "variables" en la cadena ligera se denominan indistintamente "regiones variables de cadena ligera", "dominios variables de cadena ligera", regiones "VL" o dominios "VL". Los dominios "variables" en la cadena pesada se denominan indistintamente "regiones constantes de cadena pesada", "dominios constantes de cadena pesada", regiones "CH" o dominios "CH".

El término "región" se refiere a una parte o porción de una cadena de anticuerpo e incluye dominios constantes o variables como se definen en el presente documento, así como partes o porciones más discretas de dichos dominios. Por ejemplo, los dominios de regiones variables de cadena ligera incluyen "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR" intercaladas entre "regiones marco conservadas" o "FR", como se define en el presente documento.

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

"Unión específica" de un anticuerpo significa que el anticuerpo muestra afinidad apreciable por un antígeno o un epítipo preferido y, preferentemente, no muestra reactividad cruzada significativa. Unión "apreciable" o preferida incluye unión con una afinidad de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 M^{-1} o 10^{10} M^{-1} . Se prefieren más afinidades mayores de 10^7 M^{-1} , preferentemente mayores de 10^8 M^{-1} . También se pretende que valores intermedios a los expuestos anteriormente en el presente documento estén dentro del alcance de la presente invención y puede indicarse una afinidad de unión preferida como un intervalo de afinidades, por ejemplo, 10^6 a 10^{10} M^{-1} , preferentemente 10^7 a 10^{10} M^{-1} , más preferentemente 10^8 a 10^{10} M^{-1} . Un anticuerpo que "no muestra reactividad cruzada significativa" es uno que no se unirá de forma apreciable con una entidad no deseable (por ejemplo, una entidad proteica no deseable).

Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente con AA se unirá de forma apreciable con AA pero no reaccionará significativamente con proteínas o péptidos no AA (por ejemplo, proteínas o péptidos no AA incluidos en las placas). Un anticuerpo específico para un epítipo preferido, por ejemplo, no reaccionará significativamente de forma cruzada con epítopos remotos en la misma proteína o el mismo péptido. La unión específica puede determinarse de acuerdo con cualquier medio reconocido en la técnica para determinar dicha unión. Preferentemente, la unión específica se determina de acuerdo con el análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva.

Se producen fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno 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, monocatenarios y anticuerpos monocatenarios. Los fragmentos de anticuerpo adicionales y variantes de función efectora se analizan en el presente documento en la sección titulada "anticuerpos". Aparte de las inmunoglobulinas o los anticuerpos "bienespecíficos" o "bifuncionales", se entiende que una inmunoglobulina o un anticuerpo tienen cada uno de sus sitios de unión idénticos. Un "anticuerpo bienespecífico" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Pueden producirse anticuerpos bienespecíficos por una diversidad de métodos incluyendo fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

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

La expresión "sustancialmente de una inmunoglobulina o un anticuerpo humano" o "sustancialmente humano" significa que cuando se alinea con una secuencia de aminoácidos de anticuerpo o inmunoglobulina humano para fines de comparación, la región comparte al menos 80-90 %, preferentemente 90-95 %, más preferentemente 95-99 % de identidad (es decir, identidad de secuencia local) con la secuencia de región marco conservada o constante humana, permitiendo, por ejemplo, sustituciones conservativas, sustituciones de secuencia consenso, sustituciones de línea germinal, retromutaciones y similares. La introducción de sustituciones conservativas, sustituciones de secuencia consenso, sustituciones de línea germinal, retromutaciones y similares, se denominan con frecuencia "optimización" de un anticuerpo o cadena humanizado. La expresión "sustancialmente de una inmunoglobulina o un anticuerpo no humano" o "sustancialmente no humano" significa que tiene una secuencia de inmunoglobulina o anticuerpo al menos 80-95 %, preferentemente 90-95 %, más preferentemente, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la de un organismo no humano, por ejemplo, un mamífero no humano.

En consecuencia, todas las regiones o los restos de una inmunoglobulina o un anticuerpo humanizado, o de una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las regiones o restos correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulina nativas humanas. La expresión "región correspondiente" o "resto correspondiente" se refiere a una región o resto en una segunda secuencia de aminoácidos o nucleótidos que ocupa la misma (es decir equivalente) posición que una región o resto en una primera secuencia de aminoácidos o nucleótidos, cuando la primera y segunda secuencias se alinean de forma óptima para fines de comparación.

No se pretende que las expresiones "inmunoglobulina humanizada" o "anticuerpo humanizado" abarquen inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, como se define posteriormente. Aunque las inmunoglobulinas o los anticuerpos humanizados son quiméricos en su construcción (es decir, comprenden regiones de más de una especie de proteínas), incluyen elementos adicionales (es decir, regiones variables que comprenden restos CDR donantes y restos marco conservados aceptores) no hallados en inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, como se define en el presente documento.

La expresión "inmunoglobulina quimérica" o anticuerpo se refiere a una inmunoglobulina o un anticuerpo cuyas regiones variables derivan de una primera especie y cuyas regiones constantes derivan de una segunda especie. Pueden construirse inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, por ejemplo mediante ingeniería genética, a partir de segmentos génicos de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies.

Un “antígeno” es una entidad (por ejemplo, una entidad proteica o un péptido) con la que se une un anticuerpo de forma específica.

La expresión “epítipo” o “determinante antigénico” se refiere a un sitio en un antígeno con el que se une específicamente una inmunoglobulina o un anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo). Pueden formarse epítipos tanto a partir de aminoácidos contiguos como a partir de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente se conservan tras su exposición a disolventes desnaturizantes mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario típicamente se pierden tras su tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo incluye típicamente al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de epítipos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

Los anticuerpos representativos incluyen un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente con un epítipo que incluye X₁EDX₂ en una proteína amiloide agregada, que se une con el epítipo que incluye X₁EDX₂ que también se une, por ejemplo, con un anticuerpo 2A4, 7D8 u 8G9. Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo pueden identificarse en un inmunoensayo sencillo que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo con un antígeno diana, es decir, un ensayo de unión competitiva. La unión competitiva se determina en un ensayo en el que la inmunoglobulina que se ensaya inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia con un antígeno común, tal como Aβ. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto de fase sólida (RIA), inmunoensayo enzimático directo o indirecto de fase sólida (EIA), ensayo de competición de tipo sándwich (véase Stahli *et al.*, Methods in Enzymology 9: 242 (1983)); EIA de biotina-avidina directo de fase sólida (véase Kirkland *et al.*, J. Immunol. 137: 3614 (1986)); ensayo marcado directo de fase sólida, ensayo de tipo sándwich marcado directo de fase sólida (véase Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de marcaje directo de fase sólida usando marcador 1-125 (véase Morel *et al.*, Mol. Immunol. 25(1): 7 (1988)); EIA de biotina-avidina directo de fase sólida (Cheung *et al.*, Virology 176: 546 (1990)); y RIA marcado directo (Moldenhauer *et al.*, Stand. J. Immunol. 32: 77 (1990)). Típicamente, dicho ensayo implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que portan uno de estos, una inmunoglobulina de ensayo no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido con la superficie sólida o células en presencia de la inmunoglobulina de ensayo. Habitualmente la inmunoglobulina de ensayo está presente en exceso. Habitualmente, cuando un anticuerpo competidor está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia con un antígeno común en al menos 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 % 70-75 % o más.

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

El término “neopítipo” se refiere a un sitio nuevo y/o único en un antígeno al que responden los linfocitos B y/o T.

La expresión “anticuerpos de neopítipos” se refieren a anticuerpos que reconocen específicamente una nueva secuencia de aminoácidos N o C terminal expuesta por escisión proteolítica de una molécula, pero no se unen con dicho epítipo en la molécula nativa (no escindida). La expresión “anticuerpos de neopítipos” puede referirse a anticuerpos que reconocen específicamente una nueva secuencia de aminoácidos N o C terminal expuesta por escisión proteolítica de SAA, pero no se unen con dicho epítipo en la molécula de SAA nativa (no escindida). Algunos anticuerpos de neopítipos se unen con AA soluble o insoluble y dan como resultado la disociación de agregados de AA, incluyendo fibrillas de AA. Un “anticuerpo de neopítipos” puede ser también un anticuerpo que reconoce específicamente un nuevo epítipo que solamente está disponible para unirse con un anticuerpo después de que una proteína experimente un cambio conformacional, por ejemplo, como en el caso de amiloidosis AL y cadena ligera, cuando solamente se expresa la cadena ligera y forma amiloide.

La expresión respuesta “inmunológica” o “inmunitaria” es el desarrollo de una respuesta humoral (mediada por anticuerpo) y/o celular (mediada por linfocitos T específicos de antígeno o sus productos de secreción) beneficiosa dirigida contra un péptido amiloide en un paciente receptor. Dicha respuesta puede ser una respuesta activa inducida por administración de inmunógeno o una respuesta pasiva inducida por administración de anticuerpo o linfocitos T sensibilizados. Se induce una respuesta inmunitaria celular por la presentación de epítipos polipeptídicos en asociación con moléculas del MHC de Clase I o Clase II para activar linfocitos T auxiliares CD4⁺ específicos de antígeno y/o linfocitos T citotóxicos CD8⁺. La respuesta también puede implicar la activación de monocitos, macrófagos, linfocitos NK, basófilos, células dendríticas, astrocitos, células microgliales, eosinófilos u otros componentes de la inmunidad innata. La presencia de una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse por ensayos de proliferación (linfocitos T CD4⁺) o ensayos de CTL (linfocitos T citotóxicos) (véase Burke, mencionado anteriormente; Tigges, mencionado anteriormente). Las contribuciones relativas de respuestas humorales y celulares al efecto protector o terapéutico de un inmunógeno pueden distinguirse aislando por separado anticuerpos y linfocitos T de un animal singénico inmunizado y midiendo el efecto protector o terapéutico en un

segundo sujeto.

Un “agente inmunogénico” o “inmunógeno” es capaz de inducir una respuesta inmunológica contra sí mismo tras su administración a un mamífero, opcionalmente junto con un adyuvante.

La expresión “polinucleótido desnudo” se refiere a un polinucleótido que no forma complejo con materiales coloidales. Los polinucleótidos desnudos en ocasiones se clonan en un vector plasmídico.

El término “adyuvante” se refiere a un compuesto que cuando se administra junto con un antígeno aumenta la respuesta inmunitaria al antígeno, pero cuando se administra solo no genera una respuesta inmunitaria al antígeno. Los adyuvantes pueden aumentar una respuesta inmunitaria por varios mecanismos incluyendo reclutamiento de linfocitos, estimulación de linfocitos B y/o T, y estimulación de macrófagos.

La expresión “dosis eficaz” o “dosificación eficaz” se define como una cantidad suficiente para conseguir o conseguir al menos parcialmente el efecto deseado. La expresión “dosis terapéuticamente eficaz” se define como una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya padece la enfermedad. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la infección y el estado general del sistema inmunitario propio del paciente.

El término “paciente” incluye sujetos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento bien profiláctico o bien terapéutico.

La divulgación proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente con un epítipo que incluye X_1EDX_2 en una proteína amiloide agregada, y que compite por la unión con el epítipo que comprende X_1EDX_2 con, por ejemplo, un anticuerpo 2A4, 7D8 u 8G9. La competición entre anticuerpos se determina por un ensayo en el que la inmunoglobulina que se ensaya inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia con un antígeno común, tal como AA. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo (RIA) directo o indirecto de fase sólida, inmunoensayo enzimático directo o indirecto de fase sólida (EIA), ensayo de competición de tipo sándwich (véase Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology*, 9: 242-253 (1983)); EIA de biotina-avidina directo de fase sólida (véase Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137: 3614 (1986)); ensayo marcado directo de fase sólida, ensayo de tipo sándwich marcado directo de fase sólida (véase Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA con marcaje directo de fase sólida usando marcador 1-125 (véase Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1): 7 (1988)); EIA de biotina-avidina directo de fase sólida (Cheung *et al.*, *Virology* 176: 546 (1990)); y RIA marcado directo (Moldenhauer *et al.*, *Stand. J. Immunol.* 32: 77 (1990)). Típicamente, dicho ensayo implica el uso de antígeno purificado unido con una superficie sólida o células que expresan el antígeno, una inmunoglobulina de ensayo no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido con la superficie sólida o células en presencia de la inmunoglobulina de ensayo. Habitualmente la inmunoglobulina de ensayo está presente en exceso. Los anticuerpos identificados por ensayo de competición (anticuerpos competidores) incluyen anticuerpos que se unen con el mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen con un epítipo adyacente suficientemente próximo al epítipo unido con el anticuerpo de referencia para que se produzca impedimento estérico. Habitualmente, cuando un anticuerpo competidor está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia con un antígeno común en al menos 50 % a 75 %.

Un anticuerpo que se une específicamente con una proteína amiloide significa un anticuerpo que se une con la proteína amiloide con una afinidad de al menos $10^7 M^{-1}$. Algunos anticuerpos se unen con la proteína amiloide con afinidades entre $10^8 M^{-1}$ y $10^{11} M^{-1}$.

Un anticuerpo que se une específicamente con proteína amiloide agregada tal como AA agregada sin unirse específicamente con proteína amiloide monomérica significa un anticuerpo que se une con proteína amiloide agregada, tal como, por ejemplo fibrillas (por ejemplo, AA en forma de lámina plegada en β agregada tal como de un cadáver de un paciente con amiloidosis AA previo o un modelo de animal transgénico) como se ha descrito anteriormente y tiene una afinidad de unión específica por formas monoméricas de la proteína amiloide al menos diez veces y habitualmente al menos 100 veces menor. Por ejemplo, dicho anticuerpo puede unirse con AA soluble con una afinidad de $10^9 M^{-1}$ y con placas con una afinidad menor de $10^7 M^{-1}$. La afinidad de dichos anticuerpos por placas es habitualmente menor de 10^7 o $10^6 M^{-1}$. Dichos anticuerpos se definen adicionalmente o como alternativa por intensidad de fluorescencia en relación con un anticuerpo de control irrelevante (por ejemplo, un anticuerpo o mezcla de anticuerpos policlonales para un péptido AA reversímero) cuando los anticuerpos están en contacto con fibrillas y la unión se evalúa por marcaje con fluorescencia. La intensidad de fluorescencia de anticuerpos que se unen con péptido AA soluble sin unirse con placas está dentro de un factor de cinco, en ocasiones dentro de un factor de dos y en ocasiones es indistinguible dentro del error experimental de la del anticuerpo de control.

Las composiciones o métodos “que comprenden” uno o más elementos enumerados pueden incluir otros elementos no enumerados específicamente. Por ejemplo, una composición que comprende péptido AA abarca tanto un péptido AA aislado como un péptido AA como un componente de una secuencia polipeptídica mayor.

II. Enfermedades amiloides

1. Visión de conjunto y patogénesis

5 Las enfermedades amiloides o amiloidosis incluyen varias patologías que tienen una amplia diversidad de síntomas externos. Estos trastornos tienen en común la presencia de depósitos extracelulares anómalos de fibrillas proteicas, conocidos como “depósitos amiloides” o “placas amiloides” que son habitualmente de aproximadamente 10-100 µm de diámetro y se localizan en órganos o regiones tisulares específicos. Dichas placas están compuestas principalmente de una proteína o un péptido soluble de origen natural. Estos depósitos insolubles se componen de
10 agregados en general laterales de fibrillas que son de aproximadamente 10-15 nm de diámetro. Las fibrillas amiloides producen una birrefringencia verde manzana característica en luz polarizada, cuando se tiñen con colorante Rojo Congo. Los trastornos se clasifican basándose en los componentes de fibrilla principales que forman los depósitos de placas, como se analizan posteriormente.

15 Los péptidos o proteínas que forman los depósitos de placa se producen con frecuencia a partir de una proteína precursora mayor. Más específicamente la patogénesis de los depósitos de fibrillas amiloides generalmente implica escisión proteolítica de una proteína precursora “anómala” en fragmentos. Estos fragmentos generalmente se agregan en láminas plegadas en β antiparalelas; sin embargo, se ha indicado que ciertas formas no degradadas de proteína precursora se agregan y forman fibrillas en polineuropatía amiloide familiar (fibrillas de transtiretina
20 variantes) y amiloidosis relacionada con la diálisis (fibrillas de β₂ microglobulina) (Tan, *et al.*, 1994, mencionado anteriormente).

2. Síndromes clínicos

25 Esta sección proporciona descripciones de tipos importantes de amiloidosis, incluyendo sus composiciones de fibrillas de placas características. Es un descubrimiento general de la presente invención que las enfermedades amiloides pueden tratarse administrando agentes que sirven para estimular una respuesta inmunitaria contra un componente o componentes de los diversos depósitos amiloides específicos de enfermedad. Como se analiza en
30 más detalle en la Sección C posterior, dichos componentes son preferentemente constituyentes de las fibrillas que forman las placas. Las secciones a continuación sirven para ejemplificar formas importantes de amiloidosis y no se pretende que limiten la invención.

a. Amiloidosis AL

35 La deposición amiloide AL se asocia en general con casi cualquier discrasia del linaje de linfocitos B, variando de tumor maligno de células plasmáticas (mieloma múltiple) a gammapatía monoclonal benigna. En ocasiones, la presencia de depósitos amiloides puede ser un indicador primario de la discrasia subyacente.

40 Las fibrillas de depósitos amiloides AL se componen de cadenas ligeras de inmunoglobulina monoclonales o fragmentos de las mismas. Más específicamente, los fragmentos derivan de la región N terminal de la cadena ligera (kappa o lambda) y contienen todo o parte del dominio variable (V_L) de la misma. Se producen depósitos generalmente en los tejidos mesenquimales, provocando neuropatía periférica y autónoma, síndrome del túnel carpiano, macroglosia, cardiomiopatía restrictiva, artropatía de articulaciones grandes, discrasias inmunitarias, mielomas, así como discrasias ocultas. Sin embargo, debería observarse que casi cualquier tejido, particularmente
45 órganos viscerales tales como el corazón, puede estar implicado.

b. Amiloidosis sistémicas hereditarias

50 Existen muchas formas de amiloidosis sistémicas hereditarias. Aunque son afecciones relativamente poco comunes, la aparición en adultos de síntomas y sus patrones de herencia (habitualmente autosómico dominante) conduce a la persistencia de dichos trastornos en la población general. En general, los síndromes son atribuibles a mutaciones puntuales en la proteína precursora que conducen a la producción de péptidos o proteínas amiloidogénicas variantes. La Tabla 2 resume la composición de fibrillas de formas ejemplares de estos trastornos.

55

Tabla 2

Amiloidosis Hereditarias ^a		
Péptido/Proteína de Fibrilla	Variante genética	Síndrome clínico
Transtiretina y fragmentos (ATTR)	Met30, muchos otros	Polineuropatía amiloide familiar (FAP), (principalmente nervios periféricos)
Transtiretina y fragmentos (ATTR)	Thr45, Ala60, Ser84, Met111, Ile122	Implicación cardiaca predominante sin neuropatía
Fragmento N terminal de Apolipoproteína A1 (apoA1)	Arg 26	Polineuropatía amiloide familiar (FAP), (principalmente nervios periféricos)

Amiloidosis Hereditarias ^a		
Péptido/Proteína de Fibrilla	Variante genética	Síndrome clínico
Fragmento N terminal de Apolipoproteína A1 (ApoA1)	Arg26, Arg50, Arg 60, otros	Tipo Ostertag, no neuropático (predominantemente implicación visceral)
Lisozima (Alys)	Thr56, His67	Tipo Ostertag, no neuropático (predominantemente implicación visceral)
Fragmento de cadena α de fibrógeno	Leu554, Val 526	Tipo Ostertag, no neuropático (predominantemente implicación visceral)
Fragmento de gelsolina (Agel)	Asn187, Tyr187	Neuropatía craneal con distrofia corneana reticular
Fragmento de cistatina C	Glu68	Hemorragia cerebral hereditaria (angiopatía amiloide cerebral) - tipo islandés
Proteína β amiloide (A β) derivada de Proteína Precursora Amiloide (APP)	Gln693	Hemorragia cerebral hereditaria (angiopatía amiloide cerebral) - tipo holandés
Proteína β amiloide (A β) derivada de Proteína Precursora Amiloide (APP)	Ile717, Phe717, Gly717	Enfermedad de Alzheimer Familiar
Proteína β amiloide (A β) derivada de Proteína Precursora Amiloide (APP)	Asn670, Leu671	Demencia Familiar - probable Enfermedad de Alzheimer
Proteína Priónica (PrP) derivada del inserto de proteína precursora de PrP 51-91	Leu102, Val167, Asn178, Lys200	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob familiar, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (encefalopatías espongiiformes hereditarias, enfermedades priónicas)
AA derivado de proteína amiloide A del Suero (ApoSSA)		Fiebre Mediterránea Familiar, implicación renal predominante (autosómica recesiva)
AA derivado de proteína amiloide A del Suero (ApoSSA)		Síndrome de Muckle-Well, nefropatía, sordera, urticaria, dolor de las articulaciones
Desconocido		Cardiomiopatía con paralización auricular
Desconocido		Depósitos cutáneos (ampollosos, papulares, pustulodérmicos)

^aDatos derivados de Tan y Pepys, 1994, mencionado anteriormente.

Los datos proporcionados en la Tabla 2 son ejemplares y no se pretende que limiten el alcance de la invención. Por ejemplo, se han descrito más de 40 mutaciones puntuales separadas en el gen de transtiretina, todas las cuales dan lugar a formas clínicamente similares de polineuropatía amiloide familiar.

5

La transtiretina (TTR) es una proteína de 14 kilodalton que se denomina en ocasiones también prealbúmina. Se produce por el hígado y plexo coroide, y actúa en el transporte de hormonas tiroideas y vitamina A. Al menos 50 formas variantes de la proteína, cada una caracterizada por un cambio de un único aminoácido son responsables de diversas formas de polineuropatía amiloide familiar. Por ejemplo, la sustitución de leucina por prolina en la posición 55 da como resultado una forma particularmente progresiva de neuropatía; la sustitución de leucina por metionina en la posición 111 dio como resultado una cardiopatía grave en pacientes Daneses. Los depósitos amiloides aislados de tejido cardíaco de pacientes con amiloidosis sistémica han revelado que los depósitos están compuestos de una mezcla heterogénea de TTR y fragmentos del mismo, denominados colectivamente ATTR, cuyas secuencias de longitud completa se han caracterizado. Pueden extraerse componentes de fibrillas ATTR de dichas placas y determinarse su secuencia y estructura de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Gustavsson, A., *et al.*, Laboratory Invest. 73: 703-708, 1995; Kametani, F., *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 125: 622-628, 1984; Pras, M., *et al.*, PNAS 80: 539-42, 1983).

10

15

20

Las personas que tienen mutaciones puntuales en la molécula apolipoproteína A1 (por ejemplo, Gly \rightarrow Arg26; Trp \rightarrow Arg50; Leu \rightarrow Arg60) muestran una forma de amiloidosis ("tipo Östertag") caracterizada por depósitos de la proteína apolipoproteína A1 o fragmentos de la misma (AApoA1). Estos pacientes tienen bajos niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL) y presentan una neuropatía periférica o insuficiencia renal.

25

Una mutación en la cadena alfa de la enzima lisozima (por ejemplo, Ile \rightarrow Thr56 o Asp \rightarrow His57) es la base de otra forma de amiloide hereditario no neuropático de tipo Östertag presentado en familias Inglesas. Aquí, se depositan fibrillas de la proteína lisozima mutante (Alys), y los pacientes muestran en general función renal alterada. Esta proteína, a diferencia de la mayoría de las proteínas formadoras de fibrilla descritas en el presente documento, está habitualmente presente en forma completa (no fragmentada) (Benson, M.D., *et al.* CIBA Fdn. Symp. 199: 104-131, 1996).

30

El péptido β amiloide ($A\beta$) es un péptido de 39-43 aminoácidos derivado por proteólisis de una proteína grande conocida como proteína precursora β amiloide (β APP). Las mutaciones en β APP dan como resultado formas familiares de enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down y/o demencia senil, caracterizadas por deposición cerebral de placas compuestas de fibrillas $A\beta$ y otros componentes, que se describen en más detalle posteriormente.

5 Se producen mutaciones conocidas en APP asociadas con enfermedad de Alzheimer cerca de los sitios de escisión de secretasa β o γ , o dentro de $A\beta$. Por ejemplo, la posición 717 está próxima al sitio de escisión de γ secretasa de APP en su procesamiento a $A\beta$, y las posiciones 670/671 están próximas al sitio de escisión de β -secretasa. Las mutaciones en cualquiera de estos restos puede dar como resultado enfermedad de Alzheimer, supuestamente provocando un aumento de la cantidad de la forma de 42/43 aminoácidos de $A\beta$ generada a partir de APP. La estructura y secuencia de péptidos $A\beta$ de diversas longitudes se conoce bien en la técnica. Dichos péptidos pueden realizarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Glenner y Wong, *Biochem Biophys. Res. Comm.* 129: 885-890, 1984; Glenner y Wong, *Biochem Biophys. Res. Comm.* 122: 1131-1135, 1984). Además, están disponibles en el mercado diversas formas de los péptidos.

15 La sinucleína es una proteína asociada a sinapsis que se asemeja a una alipoproteína y es abundante en citosol neuronal y terminales presinápticas. Un fragmento peptídico derivado de α -sinucleína, denominado NAC, también es un componente de placas amiloides de enfermedad de Alzheimer (Clayton, *et al.*, 1998). Este componente también actúa como una diana para tratamientos de base inmunológica de la presente invención, como se detalla posteriormente.

20 La gelsolina es una proteína de unión a calcio que se une con y fragmenta fragmentos de actina. Las mutaciones en la posición 187 (por ejemplo, Asp \rightarrow Asn; Asp \rightarrow Tyr) de la proteína dan como resultado una forma de amiloidosis sistémica hereditaria, habitualmente hallada en pacientes de Finlandia, así como personas de origen Holandés o Japonés. En individuos aquejados, las fibrillas formadas a partir de fragmentos de gelsolina (Agel), habitualmente consisten en los aminoácidos 173-243 (fragmento carboxilo terminal de 68 kDa) y se depositan en vasos sanguíneos y membranas basales, dando como resultado distrofia corneana y neuropatía craneal que progresa a neuropatía periférica, cambios cutáneos distróficos y deposición en otros órganos. (Kangas, H., *et al.* *Human Mol. Genet.* 5(9): 1237-1243, 1996).

25 Otras proteínas mutadas, tales como cadena alfa mutante de fibrinógeno (AfibA) y cistatina mutante C (Acys) también forman fibrillas y producen trastornos hereditarios característicos. Las fibrillas AfibA forma depósitos característicos de un amiloide hereditario no neuropático con enfermedad renal; los depósitos Acys son característicos de una angiopatía amiloide cerebral hereditaria presentan en Islandia (Isselbacher, *et al.*, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill, San Francisco, 1995; Benson, *et al.*, mencionado anteriormente). En al menos algunos casos, se ha mostrado que los pacientes con angiopatía amiloide cerebral (CAA) tienen fibrillas amiloides que contienen una forma no mutante de cistatina C junto con proteína beta (Nagai, A., *et al.* *Molec. Chem. Neuropathol.* 33: 63-78, 1998).

30 Ciertas formas de enfermedades priónicas se consideran ahora heredables, y representan hasta el 15 % de los casos, que se creía previamente que eran de naturaleza predominantemente infecciosa (Baldwin, *et al.*, en *Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders*, John Wiley and Sons, Nueva York, 1995). En dichos trastornos priónicos, los pacientes desarrollan placas compuestas de isoformas anómalas de la proteína priónica normal (PrP^c). Una isoforma mutante predominante, PrP^{Sc}, también denominada AScr, difiere de la proteína celular normal en su resistencia a degradación por proteasa, insolubilidad después de extracción de detergente, deposición en liposomas secundarios, síntesis postraduccional y alto contenido de lámina plegada en β . Se ha establecido un enlace genético para al menos cinco mutaciones que dan como resultado enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (CJD), síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) e insomnio familiar letal (FFI). (Baldwin) Se conocen en la técnica métodos para extraer péptidos de fibrillas de fibrillas de tembladera, determinar secuencias y preparar dichos péptidos (por ejemplo, Beekes, M., *et al.* *J. Gen. Virol.* 76: 2567-76, 1995).

35 Por ejemplo, una forma de GSS se ha ligado a una mutación de PrP en el codón 102, mientras que GSS telencefálico se segrega con una mutación en el codón 117. Las mutaciones en los codones 198 y 217 dan como resultado una forma de GSS en la que placas neuríticas características de enfermedad de Alzheimer contienen PrP en lugar de péptido $A\beta$. Ciertas formas de CJD familiar se han asociado con mutaciones en los codones 200 y 210; se han descubierto mutaciones en los codones 129 y 178 tanto en CJD familiar como en FFI (Baldwin, mencionado anteriormente).

c. Amiloidosis sistémica senil

40 La deposición de amiloides, bien sistémica o bien focal, aumenta con la edad. Por ejemplo, se encuentran habitualmente fibrillas de transtiretina de tipo silvestre (TTR) en el tejido cardiaco de individuos ancianos. Estos pueden ser asintomáticos, clínicamente silenciosos o pueden dar como resultado insuficiencia cardiaca. También pueden producirse depósitos focales fibrilares asintomáticos en el cerebro ($A\beta$), cuerpos amiláceos de la próstata (microglobulina $A\beta_2$), articulaciones y vesículas seminales.

d. Amiloidosis cerebral

La deposición local de amiloides es habitual en el cerebro, particularmente en individuos ancianos. El tipo más frecuente de amiloide en el cerebro está compuesto principalmente de fibrillas de péptido A β , que da como resultado demencia o enfermedad de Alzheimer esporádica (no hereditaria). De hecho, la incidencia de enfermedad de Alzheimer esporádica excede en gran medida las formas que se ha mostrado que son hereditarias. Los péptidos de fibrillas que forman estas placas son muy similares a los descritos anteriormente, con referencia a formas hereditarias de enfermedad de Alzheimer (AD).

e. Amiloidosis relacionada con la diálisis

Se desarrollan habitualmente placas compuestas de fibrillas de microglobulina β_2 (A β_2 M) en pacientes que reciben hemodiálisis o diálisis peritoneal a largo plazo. La microglobulina β_2 es un polipéptido de 11,8 kilodalton y es la cadena ligera de antígenos del MHC de Clase I, que están presentes en todas las células nucleadas. En circunstancias normales, se desprenden continuamente de membranas celulares y se filtran normalmente por el riñón. La ausencia de eliminación, tal como en el caso de función renal alterada, conduce a deposición en el riñón y otros sitios (principalmente en tejidos ricos en colágeno de las articulaciones). A diferencia de otras proteínas de fibrilla, las moléculas de A β_2 M están generalmente presentes en forma no fragmentada en las fibrillas (Benson, mencionado anteriormente).

f. Amiloidosis derivadas de hormonas

Los órganos endocrinos pueden albergar depósitos amiloides, particularmente en individuos envejecidos. Los tumores secretores de hormonas también pueden contener placas amiloides derivadas de hormonas, cuyas fibrillas están compuestas de hormonas polipeptídicas tales como calcitonina (carcinoma medular del tiroides), polipéptido amiloide de islotes (amilina; que aparece en la mayoría de los pacientes con diabetes de Tipo II) y péptido natriurético auricular (amiloidosis auricular aislada). Se conocen bien en la técnica secuencias y estructuras de estas proteínas.

g. Amiloidosis misceláneas

Existe una diversidad de formas adicionales de enfermedad amiloide que se manifiestan normalmente como depósitos localizados de amiloides. En general, estas enfermedades son probablemente el resultado de la producción localizada y/o falta de catabolismo de precursores de fibrillas específicos o una predisposición de un tejido particular (tal como la articulación) para deposición de fibrillas. Los ejemplos de dicha deposición idiopática incluyen amiloide AL nodular, amiloide cutáneo, amiloide endocrino y amiloide relacionado con el tumor.

III. Enfermedades amiloides AA

Amiloidosis AA, anteriormente denominada amiloidosis secundaria o reactiva porque se desarrolla secundaria a una enfermedad preexistente o coexistente. Dichas enfermedades incluyen, pero sin limitación enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondilitis anquilosante, psoriasis, artropatía psoriásica, síndrome de Reiter, enfermedad de Still del Adulto, síndrome de Behcet y enfermedad de Crohn. También se producen depósitos de AA como resultado de infecciones microbianas crónicas, tales como lepra, tuberculosis, bronquiectasia, úlceras por decúbito, pielonefritis crónica, osteomielitis y enfermedad de Whipple. Ciertas neoplasias malignas también pueden dar como resultado depósitos amiloides de fibrilla AA. Estas incluyen afecciones tales como linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas del intestino, pulmón y tracto urogenital, carcinoma de células basales y leucemia por tricoleucitos. La enfermedad amiloide AA también puede resultar de enfermedades inflamatorias heredadas tales como Fiebre Mediterránea Familiar. Adicionalmente, la enfermedad amiloide AA puede resultar de trastornos linfoproliferativos tales como Enfermedad de Castleman.

1. Enfermedades inflamatorias asociadas con amiloidosis AA

La artritis reumatoide es una enfermedad sistémica crónica principalmente de las articulaciones. Los síntomas de la artritis reumatoide se caracterizan por cambios inflamatorios en las membranas sinoviales y estructuras articulares (articulaciones) y por atrofia y rarefacción (reducciones de la densidad del hueso) de los huesos. En estadios tardíos de artritis reumatoide, se desarrollan deformidad y anquilosis (inmovilidad de la articulación). Puede inducirse un modelo de artritis reumatoide en ratones o ratas administrando colágeno de tipo II en adyuvante completo de Freund.

La artritis crónica juvenil aparece en muchas formas; siendo la más común la artritis reumatoide juvenil. Puede aparecer en niños a cualquier edad, pero aparece por primera vez más habitualmente entre las edades de 2 y 6 años. Hay tres tipos restantes de artritis reumatoide juvenil, concretamente, artritis pauciarticular, artritis poliarticular, y artritis sistémica (también conocida como enfermedad de Still). La artritis pauciarticular afecta típicamente a 4 o menos articulaciones, habitualmente las mayores tales como las rodillas. Puede estar acompañada de rigidez, provocando que el niño cojee. La artritis poliarticular se caracteriza por 5 o más articulaciones que están afectadas,

más habitualmente las articulaciones menores en las manos y los pies. Los niños con artritis poliarticular tienen con frecuencia una forma más grave de la enfermedad. La artritis sistémica se caracteriza por hinchazón de las articulaciones en combinación con fiebre y una erupción rosa. Las articulaciones pueden no empezar a hincharse hasta algunos meses o años después de comenzar las fiebres. También puede afectar a órganos internos tales como el hígado, corazón, bazo y ganglios linfáticos, y es habitual la anemia. Aunque la artritis sistémica tiende a disminuir por sí sola, un pequeño porcentaje de estos niños pueden tener artritis grave que continua hasta la adultez.

La espondilitis anquilosante es una enfermedad reumática que provoca artritis de las articulaciones de la columna y sacro ilíacas y puede provocar inflamación de los ojos, pulmones y válvulas cardíacas. Varía de episodios intermitentes de dolor de espalda que aparecen a lo largo de la vida hasta una enfermedad crónica grave que ataca a la columna, articulaciones periféricas y otros órganos del cuerpo, dando como resultado rigidez de las articulaciones y la espalda grave, pérdida de movimiento y deformidad a medida que continúa la vida.

La psoriasis es una dermatosis escamosa, crónica, común, marcada por agravamiento y remisiones y que tiene un patrón de herencia poligénica. Los síntomas de la psoriasis están marcados por la presencia de manchas escamadas secas, redondeadas, de diversos tamaños, cubiertas por escamas de color blanco grisáceo o blanco plateado que tienen una predilección por las superficies extensoras, uñas, cuero cabelludo, genitales y la región lumbosacra.

La artropatía psoriásica es un trastorno en el que la psoriasis está ligada al desarrollo de artritis. El trastorno puede mostrarse de diversas maneras. La artritis es generalmente leve e implica solamente algunas articulaciones. En algunos pacientes, la enfermedad es grave y habitualmente afecta a los dedos y la columna. Cuando se ve afectada la columna, los síntomas son muy parecidos a los de la espondilitis anquilosante.

El síndrome de Reiter es un grupo de síntomas que consisten en artritis, uretritis (inflamación del tracto urogenital), conjuntivitis (inflamación del revestimiento del ojo) y lesiones de la piel y las membranas mucosas. El síndrome de Reiter también se denomina artritis reactiva, que significa que la artritis aparece como una "reacción" a una infección que comenzó en otra parte del cuerpo. La *Chlamydia trachomatis* es la bacteria más frecuentemente asociada con el síndrome de Reiter adquirido mediante contacto sexual. Varias bacterias diferentes están asociadas con síndrome de Reiter adquirido a través del tracto digestivo, incluyendo *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* y *Campylobacter*.

La enfermedad de Still del Adulto, también denominada Enfermedad de Still de Aparición en el Adulto es una afección inflamatoria poco común que ataca a órganos internos, articulaciones y otras partes del cuerpo. Puede aparecer y desaparecer repentinamente. En casos muy graves, la enfermedad de Still del adulto se hace crónica y extremadamente debilitante, provocando terrible dolor y rigidez. Después de muchos años, la enfermedad paraliza órganos vitales tales como el corazón y los pulmones.

El síndrome de Behçet es un trastorno multisistémico que presenta ulceraciones orales y/o genitales recurrentes, uveítis recidivante crónica que puede provocar ceguera y alteraciones neurológicas. Está caracterizada por 4 síntomas principales: úlceras aftosas orales, lesiones cutáneas, síntomas oculares y úlceras genitales, y ocasionalmente por inflamación en tejidos y órganos en todo el cuerpo, incluyendo el tracto gastrointestinal, sistema nervioso central, sistema vascular, pulmones y riñones. La artritis del síndrome de Behçet es habitualmente intermitente, autolimitada, no deformante y localizada en las rodillas y los tobillos.

La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria granulomatosa crónica (cuerpo o crecimiento de tipo grano pequeño) que implica cualquier parte del tracto gastrointestinal de la boca al ano; pero que implica habitualmente el íleo (los tres quintos inferiores del intestino delgado) con cicatrización y engrosamiento de la pared del intestino. Los síntomas de la enfermedad de Crohn incluyen la presencia de diarrea crónica, sonidos intestinales aumentados, calambres, posiblemente reflejado por pérdida de peso y aversión al alimento.

2. Enfermedades de infección microbiana crónicas asociadas con amiloidosis AA

La lepra es una enfermedad infecciosa caracterizada por úlceras cutáneas desfigurantes, daño a los nervios periféricos y debilitamiento progresivo. La lepra está provocada por el organismo *Mycobacterium leprae*, que no es muy contagioso y tiene un periodo de incubación largo. La lepra tiene dos formas comunes, tuberculoides y lepromatosa. Ambas formas producen úlceras en la piel, pero la forma lepromatosa es más grave, produciendo nódulos desfigurantes, grandes (protuberancias y bultos). La lepra provoca con el tiempo daño neurológico periférico. Los pacientes con lepra a largo plazo pueden perder el uso de sus manos o pies debido a lesión repetida resultante de la falta de sensación.

La tuberculosis es una infección bacteriana contagiosa provocada por *Mycobacterium tuberculosis*. La enfermedad se caracteriza por el desarrollo de granulomas (tumores granulares) en los tejidos infectados. Están implicados principalmente los pulmones, pero la infección puede extenderse a otros órganos.

La bronquiectasia es una destrucción anómala y dilatación de las vías aéreas grandes. La bronquiectasia está causada con frecuencia por inflamación recurrente o infección de las vías respiratorias. Una bacteria clásica que se

ve en pacientes con bronquiectasia es *Pseudomonas aeruginosa*, que es notablemente difícil de erradicar. Las infecciones repetidas de las vías respiratorias por esta bacteria pueden conducir a la colonización de los bronquios por este organismo que predispone a dichas personas a neumonías por *Pseudomonas*, que requiere antibióticos especiales para tratar.

La úlcera por decúbito también conocida como úlcera de presión o escara es una ulceración de la piel y tejidos subyacente provocada por presión prolongada sobre el área afectada. Comienzan como piel enrojecida pero empeoran progresivamente, formando una ampolla, después una úlcera abierta y finalmente un cráter. Estas ulceraciones habitualmente suceden sobre prominencias óseas tales como talones, área del coxis de la nalga y la nuca.

La pielonefritis crónica es una infección del riñón y los uréteres (conductos que transportan la orina desde el riñón). La pielonefritis se produce más frecuentemente como resultado de infección del tracto urinario, particularmente en presencia de reflujo ocasional o persistente de orina de la vejiga urinaria a los uréteres o la pelvis renal.

La osteomielitis es una infección ósea aguda o crónica, habitualmente provocada por bacterias. Con frecuencia la infección se inicia en otra parte del cuerpo y se extiende al hueso a través de la sangre. Cuando el hueso se infecta, se produce pus dentro del hueso, que puede dar como resultado un absceso. El absceso después priva al hueso de su aporte sanguíneo. La osteomielitis crónica resulta cuando el tejido óseo muere como resultado de la pérdida de aporte sanguíneo. La infección crónica puede persistir de forma intermitente durante años.

La enfermedad de Whipple es una afección poco común que provoca absorción inadecuada de nutrientes del tracto intestinal debido a infección del intestino. Está provocada por las bacterias, *Tropheryma whippelii*. Los síntomas incluyen diarrea, hemorragia intestinal, dolor abdominal, pérdida de apetito, pérdida de peso, fatiga y debilidad. Pueden aparecer artritis y fiebre con frecuencia varios años antes de que se desarrollen los síntomas intestinales. Los pacientes pueden experimentar también síntomas neurológicos. El diagnóstico se basa en síntomas y los resultados de una biopsia de tejido del intestino delgado u otros órganos que están afectados. Cuando se reconoce y se trata, la enfermedad de Whipple puede habitualmente curarse. Sin tratamiento, la afección es habitualmente letal.

3. Neoplasias malignas asociadas con amiloidosis AA

El linfoma de Hodgkin es un cáncer de tejido linfático hallado en los ganglios linfáticos, bazo, hígado y médula ósea. La primera señal de este cáncer es con frecuencia un ganglio linfático agrandado. La enfermedad puede propagarse a ganglios linfáticos cercanos y después puede propagarse a los pulmones, el hígado o a la médula ósea.

El carcinoma renal es cáncer del riñón. Las células cancerosas se encuentran en el revestimiento de los túbulos en el riñón. El primer síntoma es habitualmente sangre en la orina. En ocasiones están implicados ambos riñones. El cáncer se propaga fácilmente, más frecuentemente a los pulmones y otros órganos. El carcinoma de células renales es el tipo más común de cáncer de riñón seguido de carcinoma de células renales papilar, carcinoma renal cromóforo y carcinoma renal de conductos de recogida. Aproximadamente el 5 % del carcinoma renal no está clasificado debido a que su apariencia no se ajusta a ninguna de las otras categorías.

Los carcinomas del intestino incluyen cánceres gastrointestinales tales como colorrectal, pancreático, de estómago y esofágico. El cáncer colorrectal es cáncer que se inicia en el intestino delgado o el recto. Casi todos los cánceres colorrectales comienzan como pólipos benignos que, durante un periodo de muchos años, se desarrollan a cánceres. La mayoría de los casos de cáncer colorrectal no tienen síntomas. El cáncer pancreático es un tumor maligno del páncreas. Los síntomas incluyen dolor abdominal, pérdida de apetito, pérdida de peso significativa e ictericia indolora. El cáncer de estómago, también denominado cáncer gástrico, puede desarrollarse en cualquier parte del estómago y puede propagarse por todo el estómago y a otros órganos; particularmente el esófago y el intestino delgado. También puede propagarse, a través de la pared del estómago, a ganglios linfáticos y órganos cercanos tales como el hígado, páncreas y los pulmones, o a órganos distantes tales como los ganglios linfáticos por encima de la clavícula, el colon y los ovarios. El cáncer de estómago es con frecuencia asintomático. El cáncer esofágico es un tumor maligno del esófago. Los síntomas incluyen disfagia (dificultad al tragar), dolor y pérdida de peso sustancial.

Los carcinomas del pulmón son un cáncer de los pulmones caracterizado por la presencia de tumores malignos. Hay dos tipos principales de cáncer de pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas. Los síntomas dependen del tipo específico de cáncer, pero pueden incluir tos crónica, tos con sangre, apnea, sibilancia, dolor en el pecho, pérdida de apetito, pérdida de peso y fatiga.

Los carcinomas del tracto urogenital incluyen pero sin limitación cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer endometrial, cáncer del cuello uterino y cáncer ovárico. El cáncer de próstata implica un crecimiento tumoral maligno dentro de la glándula prostática. Los síntomas pueden incluir micción frecuente, dificultad para iniciar y mantener una corriente de orina estable, sangre en la orina, micción dolorosa, dificultar para conseguir una erección o eyaculación dolorosa. El cáncer de vejiga se refiere a cualquiera de varios tipos de crecimientos malignos de la

vejiga urinaria. Los síntomas incluyen sangre en la orina, micción frecuente, micción dolorosa y urgencia urinaria. El cáncer endometrial implica crecimientos cancerosos del endometrio (revestimiento del útero). Aparece principalmente después de la menopausia, y presenta hemorragia vaginal. El cáncer del cuello uterino es un tumor maligno del cuello uterino. Los estadios tempranos del cáncer del cuello uterino pueden ser completamente asintomáticos. La hemorragia vaginal puede indicar la presencia de tumor maligno. En estadios avanzados, pueden estar presentes metástasis en el abdomen, los pulmones o en otra parte. El cáncer ovárico es una neoplasia maligna de los ovarios. Los síntomas de cáncer ovárico son con frecuencia vagos y no específicos, que incluyen incomodidad abdominal inferior vaga, sensación de pesadez pélvica, ciclo menstrual anómalo, hemorragia vaginal, aumento o pérdida de peso, síntomas gastrointestinales no específicos. Los cánceres ováricos desprenden células cancerosas que con frecuencia se implantan en el útero, la vejiga, el intestino y el revestimiento de la pared intestinal. Estas células cancerosas pueden comenzar a formar nuevos crecimientos tumorales antes de que incluso se sospeche un cáncer.

El carcinoma de células basales es tumor cutáneo de crecimiento lento que implica cambios cancerosos en células cutáneas basales. Los síntomas incluyen lesiones cutáneas localizadas en la cara, el oído, el cuello, el pecho, la espalda o el cuero cabelludo; vasos sanguíneos visibles en la lesión o piel adyacente; y úlceras persistentes, que no se curan. Este cáncer permanece habitualmente local y casi nunca se propaga a partes distantes del cuerpo, pero puede continuar creciendo e invadir tejidos y estructuras cercanos, incluyendo los nervios, huesos y cerebro.

La leucemia por tricoleucitos es un cáncer de linfocitos (linfocitos B) que conduce a bajos recuentos sanguíneos. La enfermedad está provocada por los linfocitos B de forma anómala con proyecciones similares a pelos. Los síntomas son con frecuencia vagos. Los recuentos sanguíneos bajos provocados por la leucemia por tricoleucitos pueden conducir a infecciones, fatiga y hemorragia excesiva.

4. Enfermedad inflamatoria heredada asociada con AA

La Fiebre Mediterránea Familiar es un trastorno heredado caracterizado por fiebre recurrente e inflamación, que implica con frecuencia el abdomen o el pulmón. Los síntomas incluyen inflamación en el revestimiento de la cavidad abdominal, cavidad torácica, piel o articulaciones, junto con fiebres altas que habitualmente alcanzan un máximo en de 12 a 24 horas. Los ataques pueden variar en la gravedad de sus síntomas, y las personas habitualmente no tienen síntomas entre ataques. Esta enfermedad es muy poco común. Los factores de riesgo incluyen un historial familiar de Fiebre Mediterránea Familiar o que tienen ascendencia Mediterránea.

5. Trastornos linfoproliferativos asociados con amiloidosis AA

La Enfermedad de Castleman es una forma de trastorno linfoproliferativo caracterizado patológicamente por la presencia de hiperplasia de ganglios linfáticos gigantes con infiltración de células plasmáticas. Los pacientes con Enfermedad de Castleman tienen con frecuencia fiebre, anemia, hipergammaglobulinemia y un aumento en las concentraciones en suero de proteínas reactivas de fase aguda, todos los cuales se atribuyen a la gran cantidad de IL-6 producida en los ganglios linfáticos.

IV. Amiloide A del suero

1. Amiloide A del suero humano

El amiloide A del suero (SAA) es el precursor en circulación de la proteína amiloide A, el componente fibrilar de los depósitos amiloides. Los estudios estructurales han mostrado que el SAA humano es heterogéneo y representa una familia de genes de SAA polimórficos y productos proteicos. La superfamilia del gen de SAA comprende un grupo de genes estrechamente ligados localizados en 11p15.1. Véase Sellar, GC *et al.* Genomics 19: 221-227 (1994). Se han descrito en seres humanos cuatro genes de SAA. Se ilustran en la Figura 1 secuencias de aminoácidos representativas de proteínas codificadas por los cuatro genes de SAA. Dos genes (*SAA1* y *SAA2*) codifican amiloide A de suero de fase aguda (A-SAA) y se inducen de forma coordinada en respuesta a inflamación. *SAA1* y *SAA2* comparten 95 % de identidad de secuencia en las regiones tanto codificantes como no codificantes. Hay isoformas alfa, beta y gamma de *SAA1* humano en isoformas alfa y beta de *SAA2* humano como se ilustra en las Figuras 18 y 19. *SAA3* es un pseudogen. *SAA4* codifica SAA constitutivo y es mínimamente inducible. Véase Cunnane G. Bailliere's Clin. Rheumatol. 13(4): 615-628. Todas las moléculas SAA/AA contienen una secuencia tetrapeptídica de unión a calcio teórica, Gly-Pro-Gly-Gly, de posible importancia para autoagregación y con restos extrafibrilares de amiloides en fibrilogénesis. Véase Fykse, E. M. *et al.* Biochem. J. 256: 973-980 (1988) y Turnell *et al.* Mol. Biol. Med. 3: 387-407 (1986). La parte N terminal de SAA/AA es fuertemente hidrófoba, probablemente importante para autoagregación y otros componentes en depósitos amiloides. Véase Husby *et al.* Clin. Immunol. Immunopathol. 70(1): 2-9 (1994). La secuencia de cada isoforma de AA y su relación con su isoforma de SAA correspondiente se ilustra en las Figuras 2-5. Por ejemplo, la isoforma alfa de *SAA1* humano tiene la secuencia:

H₂N-Met-Lys-Leu-Leu-Thr-Gly-Leu-Val-Phe-Cys-Ser-Leu-Val-Leu-Gly-Val-Ser-Ser-Arg-Ser-Phe-Phe-Ser-Phe-Leu-Gly-Glu-Ala-Phe-Asp-Gly-Ala-Arg-Asp-Met-Try-Arg-Ala-Tyr-Ser-Asp-Met-Arg-Glu-Ala-Asn-Tyr-Ile-Gly-Ser-Asp-Lys-Tyr-Phe-His-Ala-Arg-Gly-Asn-Tyr-Asp-Ala-Ala-Lys-Arg-Gly-Pro-Gly-Gly-Ala-Try-Ala-Ala-Glu-Val-Ile-Ser-Asp-Ala-Arg-Glu-Asn-Ile-Gln-Arg-Phe-Phe-Gly-His-Gly-Ala-Glu-Asp-Ser-Leu-Ala-Asp-Gln-Ala-Ala-Asn-Glu-Try-Gly-

Arg-Ser-Gly-Lys-Asp-Pro-Asn-His-Phe-Arg-Pro-Ala-Gly-Leu-Pro-Glu-Lys-Tyr-OH (SEC ID N°: 1)

AA, que es un fragmento proteolítico de SAA, también es heterogéneo. El péptido AA humano predominante consiste en 76 aminoácidos. Un ejemplo de AA tiene la secuencia: H₂N-Arg-Ser-Phe-Phe-Ser-Phe-Leu-Gly-Glu-Ala-Phe-Asp-Gly-Ala-Arg-Asp-Met-Try-Arg-Ala-Tyr-Ser-Asp-Met-Arg-Glu-Ala-Asn-Tyr-Ile-Gly-Ser-Asp-Lys-Tyr-Phe-His-Ala-Arg-Gly-Asn-Tyr-Asp-Ala-Ala-Lys-Arg-Gly-Pro-Gly-Gly-Ala-Try-Ala-Ala-Glu-Val-Ile-Ser-Asp-Ala-Arg-Glu-Asn-Ile-Gln-Arg-Phe-Phe-Gly-His-Gly-Ala-Glu-Asp-Ser-OH (SEC ID N°:2).

AA70-76 se refiere a un fragmento de AA que comienza en el resto 70 y termina en el resto 76 de (SEC ID N°: 2) que consiste en la secuencia GHGAEDS, (SEC ID N°: 4), o segmento correspondiente de otra proteína AA de origen natural de un ser humano u otra especie cuando la secuencia de esa proteína se alinea de forma máxima con SEC ID N°:2.

2. Amiloide A de suero murino

En el ratón, se han descrito cuatro genes de SAA. Se ilustran en la Figura 8 secuencias de aminoácidos representativas de proteínas codificadas por los cuatro genes de SAA murino. La familia de los genes de SAA de ratón comprende cuatro miembros que están estrechamente ligados en el cromosoma 7. Dos de estos genes que codifican isotipos de SAA de ratón principales (SAA1 y SAA2) comparten alta identidad de secuencia no solamente en exones sino también en intrones y regiones flanqueantes y se inducen en cantidades aproximadamente iguales en respuesta a modelos de inducción amiloides. Estos dos isotipos difieren solamente en 9 de 103 restos de aminoácidos; sin embargo, solamente SAA2 se deposita de forma selectiva en fibrillas amiloides. Véase de Beer M. C. *Biochem J.* 1991 280(Pt 1): 45-49 (1991); Hoffman J. S. *et al. J Exp Med.* 159: 641-646 (1984); Shiroo M *et al. Scand J. Immunol.* 26: 709-716 (1987). SAA3 es una apolipoproteína HDL menor y produjo de forma periférica fase aguda. SAA4 es una subfamilia constitutiva que es una apolipoproteína HDL normal menor que comprende más del 90 % del SAA durante la homeostasis. Véase Stearman R. S. *et al. Nucleic Acids Research*, 14(2)797-809 (1986) y de Beer M.C. *Genomics*, 34(1): 139-42 (1996).

El AA murino que es un fragmento proteolítico de SAA también es heterogéneo. La secuencia de cada isoforma murina de AA y su relación con su isoforma de SAA correspondiente se ilustra en las Figuras 9-12. Se ilustra en la Figura 13 un alineamiento de secuencias de AA1, AA2, AA3 y AA4 murinos.

AA1 murino es el equivalente murino de AA1 humano. Véase Figura 16. En particular, los restos 69-75 de AA1 murino (GRGHEDT, SEC ID N°: 9) se alinean de forma máxima con los restos 70-76 de AA1 humano (GHGAEDS, SEC ID N°: 4). Véase también Figura 17.

3. Amiloide A de suero de Shar Pei

La secuencia de Shar Pei se indica en la Figura 20. Resulta interesante que la región homóloga en la proteína SAA humana -AEDS, (SEC ID N°: 13) contiene una sustitución de Thr a Ser conservada en la posición 76, así como una cadena lateral significativamente diferente del resto en la posición 73 (His a Ala; Figura 1). La secuencia -AEDS, (SEC ID N°: 13), también se observa en especies Shar Pei de perro, una raza que es particularmente susceptible a amiloidosis AA y podría proporcionar un modelo de origen natural de AA sistémico en el que evaluar nuevas aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas de anticuerpos específicos de amiloide AA y otros compuestos.

4. El segmento N terminal de la proteína AA determina su propiedad fibrillogénica

La proteína AA de fibrilla amiloide consiste en una parte N terminal larga variante de la proteína precursora AA del suero. Las pruebas muestran que la parte amiloidogénica de la molécula es el segmento de 10-15 aminoácidos de longitud N terminal. Las sustituciones de aminoácidos en esta parte de la molécula pueden explicar por qué solamente una de las dos isoformas de SAA de ratón es amiloidogénica. Véase Westermarck G. T. *Biochem Biophys Res Commun.* 182(1): 27-33 (1992).

V. Otras proteínas amiloidogénicas humanas

Los Números de Referencia de Genbank y secuencias de X₁EDX₂ se proporcionan a continuación en la Tabla 3 para varias proteínas amiloidogénicas humanas, incluyendo algunas de las enumeradas anteriormente en la Tabla 2.

5

Tabla 3

Proteínas Amiloidogénicas Humanas		
Proteína amiloidogénica humana	Secuencia consenso	Número de Referencia de GenBank
SAA1	AEDS, (SEC ID N°: 13)	
SAA2	AEDS, (SEC ID N°: 13)	
SAA3	AEDS, (SEC ID N°: 13)	
SAA4	AEDS, (SEC ID N°: 13)	
región V de cadena ligera kappa de inmunoglobulina anti Sm; cadena kappa de anticuerpo monoclonal 4B4	AEDV, (SEC ID N°: 23)	AAB26897
región variable de inmunoglobulina usada por la cadena ligera kappa de ITC52 (subgrupo V kappa III)	PEDS, (SEC ID N°: 26)	AAC61608
región variable de inmunoglobulina usada por la cadena ligera kappa de ITC48 (subgrupo V kappa IV)	AEDV, (SEC ID N°: 23)	AAC61606
precursor de cadena ligera kappa de T 125 monoclonal anti RhD	SEDF, (SEC ID N°: 24)	AAW82027
precursor de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	AEDV, (SEC ID N°: 23)	CAA45496
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAT44350
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAT44349
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAT44348
cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	CAA09185
cadena ligera kappa de inmunoglobulina	SEDF, (SEC ID N°: 24)	CAA09181
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	SEDF, (SEC ID N°: 24)	AAU14891
cadena ligera kappa de inmunoglobulina SOJA anti rabia	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAO17825
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina anti estreptocócica/anti miosina	SEDF, (SEC ID N°: 24)	AAB68786
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina anti estreptocócica/anti miosina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAB68785
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina anti HLA A2/anti HLA A28	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAC99644
región V cadena ligera kappa de inmunoglobulina; anticuerpo anti ADN 18/2	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAB62946
cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	BAF75949
cadena ligera kappa de inmunoglobulina 48d anti gp120 de VIH-1	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAR88370
cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDL, (SEC ID N°: 27)	BAA97671
cadena ligera kappa de inmunoglobulina anti <i>Entamoeba histolytica</i>	PEDF, (SEC ID N°: 22)	BAA82105
cadena ligera kappa de inmunoglobulina anti <i>Entamoeba histolytica</i>	TEDV, (SEC ID N°: 28)	BAA82102
cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAC41705

ES 2 544 679 T3

Proteínas Amiloidogénicas Humanas		
Proteína amiloidogénica humana	Secuencia consenso	Número Referencia GenBank de de
región variable de cadena ligera kappa monoclonal de IgM anti gangliósido GM2	AEDV, (SEC ID N°: 23)	AAC26480
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina anti SARS-CoV	PEDV, (SEC ID N°: 151)	AAT51719
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina anti SARS-CoV	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAT51718
región VLJ de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	BAD27502
región VLJ de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	SEDF, (SEC ID N°: 24)	BAD27497
cadena ligera kappa de inmunoglobulina 47e anti gp120 de VIH-1	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAR88378
cadena ligera kappa de inmunoglobulina 16c anti gp120 de VIH-1	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAR88374
cadena ligera kappa de inmunoglobulina 411g anti gp120 de VIH-1	SEDF, (SEC ID N°: 24)	AAR88372
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAF14212
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAF14211
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAF14210
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAF14209
cadena ligera kappa de región V de inmunoglobulina	PEDI, (SEC ID N°: 21)	AAR02415
cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAM46647
cadena ligera kappa de inmunoglobulina	AEDV, (SEC ID N°: 23)	AAM46643
cadena ligera kappa de inmunoglobulina anti <i>Entamoeba histolytica</i>	PEDF, (SEC ID N°: 22)	BAA82103
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDV, (SEC ID N°: 23)	AAL65723
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAL65718
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	SEDF, (SEC ID N°: 24)	AAL65717
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	SEDF, (SEC ID N°: 24)	AAL65716
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAL65714
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAL65713
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAL65712
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAL65711
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAL65710
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	LEDG, (SEC ID N°: 31) PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAL65709
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	LEDG, (SEC ID N°: 31) PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAL65708

ES 2 544 679 T3

Proteínas Amiloidogénicas Humanas		
Proteína amiloidogénica humana	Secuencia consenso	Número Referencia GenBank de de
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAL65707
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAL65706
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAL65705
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAL65704
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAL65703
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	SEDF, (SEC ID N°: 24)	AAC64146
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	SEDF, (SEC ID N°: 24)	AAC64144
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	ABI64139
cadena ligera kappa de inmunoglobulina anti polisacárido capsular neumocócico	AEDV, (SEC ID N°: 23)	AAL04535
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDV, (SEC ID N°: 23)	AAL65722
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDV, (SEC ID N°: 23)	AAL65720
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	BAA19563
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDE, (SEC ID N°: 19)	BAA19562
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDE, (SEC ID N°: 19)	BAA19561
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	BAA19560
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	BAA19559
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDV, (SEC ID N°: 23)	BAA19558
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDI, (SEC ID N°: 21)	BAA19556
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	AAA71907
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	AEDV, (SEC ID N°: 23)	AAA71905
región variable de cadena ligera Fab de inmunoglobulina G1	AEDV, (SEC ID N°: 23)	BAF49281
región variable de cadena ligera Fab de inmunoglobulina G1	PEDF, (SEC ID N°: 22)	BAF48998
región variable de cadena ligera Fab de inmunoglobulina G1	PEDF, (SEC ID N°: 22)	BAF48996
región V de cadena ligera kappa	AEDM, (SEC ID N°: 32)	CAA37675
región variable de cadena ligera Fab de inmunoglobulina G1	SEDF, (SEC ID N°: 24)	BAF48994
región variable de cadena ligera Fab de inmunoglobulina G1	PEDF, (SEC ID N°: 22)	BAF48992
región V-J-C precursora de cadena kappa Ig	AEDV, (SEC ID N°: 23)	A53261
región V precursora de cadena kappa Ig	AEDV, (SEC ID N°: 23)	A49137
región V-I precursora de cadena kappa Ig	SEDI, (SEC ID N°: 29)	PN0445

ES 2 544 679 T3

Proteínas Amiloidogénicas Humanas		
Proteína amiloidogénica humana	Secuencia consenso	Número de Referencia GenBank
región V-III precursora de cadena kappa Ig (EVI-15)	PEDF, (SEC ID N°: 22)	A32274
región V-IV de cadena kappa Ig (Dep)	AEDV, (SEC ID N°: 23)	A34153
región V-IV de cadena kappa Ig (Fue)	AEDV, (SEC ID N°: 23)	B34153
región V-II de cadena kappa Ig (Pec)	AEDV, (SEC ID N°: 23)	C34153
Fragmento Fab Igg, Cadena L (Unión con Cd25).	AEDA, (SEC ID N°: 62)	1 MIM L
Fragmento Fab Igg, Cadena H (Unión con Cd25).	HEDS, (SEC ID N°: 33)	1 MIM H
región C de cadena mu de Ig, forma de corte y empalme secretada	CEDD, (SEC ID N°: 34)	MHHU
región VJ de cadena kappa de inmunoglobulina	AEDV, (SEC ID N°: 23)	AAA58923
región variable de cadena ligera kappa de anticuerpo monoclonal recombinante IgM 12	PEDF, (SEC ID N°: 22)	ABA41551
cadena ligera de inmunoglobulina	AEDE, (SEC ID N°: 19)	CAA65054
región variable lambda de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDE, (SEC ID N°: 19)	AAL65769
región variable lambda de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDE, (SEC ID N°: 19)	AAL65767
región variable lambda de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDE, (SEC ID N°: 19)	AAL65765
región variable lambda de cadena ligera de inmunoglobulina	TEDE, (SEC ID N°: 16)	AAL65764
región variable lambda de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDE, (SEC ID N°: 19)	AAL65763
región variable lambda de cadena ligera de inmunoglobulina	SEDE, (SEC ID N°: 18)	AAL65762
región variable lambda de cadena ligera de inmunoglobulina	SEDE, (SEC ID N°: 18)	AAL65761
región variable lambda de cadena ligera de inmunoglobulina	SEDE, (SEC ID N°: 18)	AAL65760
región variable lambda de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDE, (SEC ID N°: 19)	AAL65759
región variable lambda de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDE, (SEC ID N°: 19)	AAL65758
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	BAA19563
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDE, (SEC ID N°: 19)	BAA19562
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDE, (SEC ID N°: 19)	BAA19561
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	BAA19560
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEC ID N°: 22)	BAA19559
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDV, (SEC ID N°: 23)	BAA19558
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDI, (SEC ID N°: 21)	BAA19556
región variable de cadena ligera de inmunoglobulina 30-lambda	AEDE, (SEC ID N°: 19)	AAK95335
PREDICHO: similar al precursor del receptor II-a de región Fc de inmunoglobulina gamma de baja afinidad (Fc-gamma RII-a) (FcRII-a) (receptor IIa de Fc IgG) (Fc-gamma-RIIa) (antígeno CD32) (CDw32)	QEDS, (SEC ID N°: 35)	XP_001129584

ES 2 544 679 T3

Proteínas Amiloidogénicas Humanas		
Proteína amiloidogénica humana	Secuencia consenso	Número de Referencia GenBank
fragmento Fc de IgG, alta afinidad Ia, receptor (CD64)	REDS, (SEC ID N°:36) TEDG, (SEC ID N°: 37) QEDR, (SEC ID N°: 38)	NP 000557
fragmento Fc de IgG, baja afinidad IIb, receptor para la isoforma 2 (CD32)	QEDS, (SEC ID N°: 35)	NP_001002273 XP_943944
fragmento Fc de IgG, baja afinidad IIb, receptor para la isoforma (CD32)	QEDS, (SEC ID N°: 35)	NP_003992
fragmento Fc de IgG, baja afinidad IIb, receptor para la isoforma 4 (CD32)	QEDS, (SEC ID N°: 35)	NP_001002275
fragmento Fc de IgG, baja afinidad IIb, receptor para la isoforma 3 (CD32)	QEDS, (SEC ID N°: 35)	NP_001002274 XP_001129592
fragmento Fc de IgG, alta afinidad Ib, receptor (CD64) isoforma a	QEDR, (SEC ID N°: 38)	NP_001017986
fragmento Fc de IgG, alta afinidad Ib, receptor (CD64) isoforma b	QEDR, (SEC ID N°: 38)	NP_001004340 XP_496386
fragmento Fc de IgG, baja afinidad IIa, receptor (CD32)	QEDS, (SEC ID N°: 35)	NP_067674 XP_943942
precursor III-B de receptor de región Fc de inmunoglobulina gamma de baja afinidad	TEDL, (SEC ID N°: 39) PEDN, (SEC ID N°: 40) EEDP, (SEC ID N°: 41)	NP_000561
fragmento Fc de IgG, baja afinidad IIIa, receptor para (CD16)	TEDL, (SEC ID N°: 39) PEDN, (SEC ID N°: 40) EEDP, (SEC ID N°: 41)	NP_000560 XP_001133750
Precursor del receptor IIa de región Fc de inmunoglobulina gamma de baja afinidad (Fc-gamma RII-a) (FcRII-a) (receptor II-a de Fc IgG) (Fc-gamma-RIIa) (antígeno CD32) (CDw32)	QEDS, (SEC ID N°: 35)	P12318
Precursor del receptor III-B de región Fc de inmunoglobulina gamma de baja afinidad (receptor III-1 de Fc de IgG) (Fc-gamma RIII-beta) (Fc-gamma RIIIb) (FcRIIIb) (Fc-gamma RIII) (FcRIII) (FcR-10) (antígeno CD16b)	TEDL, (SEC ID N°: 39) PEDN, (SEC ID N°: 40) EEDP, (SEC ID N°: 41)	075015
Precursor del receptor III-A de región Fc de inmunoglobulina gamma de baja afinidad (receptor III-2 de Fc de IgG) (Fc-gamma RIII-alfa) (Fc-gamma RIIIa) (FcRIIIa) (Fc-gamma RIII) (FcRIII) (FcR-10) (antígeno CD16a)	TEDL, (SEC ID N°: 39) PEDN, (SEC ID N°: 40) EEDP, (SEC ID N°: 41)	P08637
Precursor del receptor I de Fc de inmunoglobulina gamma de alta afinidad (Fc-gamma RI) (FcRI) (receptor I de Fc IgG) (antígeno CD64).	REDS, (SEC ID N°: 36) TEDG, (SEC ID N°: 37) QEDR, (SEC ID N°: 38)	P12314
constante pesada de inmunoglobulina Gamma 1 IGHG1 (marcador GIm)	AEDT, (SEC ID N°: 14)	Q6PJA4
apoAI [<i>Homo sapiens</i>]	LEDL, (SEC ID N°: 42)	CAA01253
precursor de apolipoproteína C-III [<i>Homo sapiens</i>]	AEDA, (SEC ID N°: 62)	NP 000031

ES 2 544 679 T3

Proteínas Amiloidogénicas Humanas		
Proteína amiloidogénica humana	Secuencia consenso	Número de Referencia GenBank
precursor de apolipoproteína A-IV [<i>Homo sapiens</i>].	AEDV, (SEC ID N°: 23)	NP_000473
gelsolina (amiloidosis, tipo Finlandés) [<i>Homo sapiens</i>]	TEDT, (SEC ID N°: 30) KEDA, (SEC ID N°: 43) SEDC, (SEC ID N°: 44) QEDL, (SEC ID N°: 63)	CAM20459
gelsolina (amiloidosis, Tipo Finlandés) [<i>Homo sapiens</i>]	TEDT, (SEC ID N°: 30) KEDA, (SEC ID N°: 43) SEDC, (SEC ID N°: 44) QEDL, (SEC ID N°: 63)	CAI14413
gelsolina (amiloidosis, Tipo Finlandés), isoforma CRA_c [<i>Homo sapiens</i>].	TEDT, (SEC ID N°: 30) KEDA, (SEC ID N°: 43) SEDC, (SEC ID N°: 44) QEDL, (SEC ID N°: 63)	EAW87491
gelsolina (amiloidosis, Tipo Finlandés), isoforma CRA_b [<i>Homo sapiens</i>]	TEDT, (SEC ID N°: 30) KEDA, (SEC ID N°: 43) SEDC, (SEC ID N°: 44) QEDL, (SEC ID N°: 63)	EAW87490
gelsolina (amiloidosis, Tipo Finlandés), isoforma CRA_a [<i>Homo sapiens</i>]	TEDT, (SEC ID N°: 30) KEDA, (SEC ID N°: 43) SEDC, (SEC ID N°: 44) QEDL, (SEC ID N°: 63)	EAW87489
proteína precursora amiloide; APP [<i>Homo sapiens</i>].	AEDV, (SEC ID N°: 23)	AAB23646
proteína precursora amiloide; APP [<i>Homo sapiens</i>].	AEDV, (SEC ID N°: 23)	AAB19991
péptido amiloide	AEDV, (SEC ID N°: 23)	AAA51768
Precursor de proteína amiloide beta A4 (APP) (ABPP) (proteína amiloide de enfermedad de Alzheimer) (péptido amiloide vascular Cerebral) (CVAP) (Proteasa nexina-II) (PN-II) (APPI) (PreA4) [Contiene: APP-alfa Soluble (S-APP-alfa); APP-beta Soluble (S-APP-beta); C99; proteína Beta amiloide 42 (Beta-APP42); proteína Beta amiloide 40 (Beta-APP40); C83; P3(42); P3(40); Gamma-CTF(59) (fragmento 59 C terminal de Gamma-secretasa) (dominio intracelular amiloide 59) (AID(59)) (AICD-59); Gamma-CTF(57) (fragmento 57 C terminal de Gamma-secretasa) (dominio intracelular amiloide 57) (AID(57)) (AICD-57); Gamma-CTF(50) (fragmento 50 C terminal de Gamma-secretasa) (dominio 50 intracelular Amiloide) (AID(50)) (AICD-50); C31].	EEDD, (SEC ID N°:45) SEDK, (SEC ID N°: 46) DEDD, (SEC ID N°: 47) DEDG, (SEC ID N°: 48) AEDV, (SEC ID N°: 23)	P05067

ES 2 544 679 T3

Proteínas Amiloidogénicas Humanas		
Proteína amiloidogénica humana	Secuencia consenso	Número Referencia GenBank de de
proteína APP [<i>Homo sapiens</i>].	EEDD, (SEC ID N°: 45) SEDK, (SEC ID N°: 46) DEDD, (SEC ID N°: 47) DEDG, (SEC ID N°: 48)	AAH65523
proteína APP [<i>Homo sapiens</i>].	EEDD, (SEC ID N°: 45) SEDK, (SEC ID N°: 46) DEDD, (SEC ID N°: 47) DEDG, (SEC ID N°: 48)	AAH04369
proteína precursora beta amiloide (A4) (proteasa nexina-II, enfermedad de Alzheimer) [<i>Homo sapiens</i>].	EEDD, (SEC ID N°: 45) SEDK, (SEC ID N°: 46) DEDD, (SEC ID N°: 47) DEDG, (SEC ID N°: 48) AEDV, (SEC ID N°: 23)	AAW82435
Calcitonina	SEDE, (SEC ID N°: 18)	AAA58403
precursor de calcitonina	SEDE, (SEC ID N°: 18)	AAA35501
preprocalcitonina [<i>Homo sapiens</i>]	SEDE, (SEC ID N°: 18)	CAA25103
Preprocalcitonina	SEDE, (SEC ID N°: 18)	AAA51913
Precursor de calcitonina [Contiene: Calcitonina; Katalcalcina (Péptido carboxilo terminal de calcitonina) (CCP) (PDN-21)]	SEDE, (SEC ID N°: 18)	P01258
preproteína de calcitonina isoforma CALCA [<i>Homo sapiens</i>].	SEDE, (SEC ID N°: 18)	NP_001029124
preproteína de calcitonina isoforma CALCA [<i>Homo sapiens</i>].	SEDE, (SEC ID N°: 18)	NP_001732
preproteína de calcitonina isoforma CGRP [<i>Homo sapiens</i>].	SEDE, (SEC ID N°: 18)	NP_001029125
Precursor de péptido 1 relacionado con el gen de calcitonina (Péptido I relacionado con gen de calcitonina) (CGRP-I) (CGRP de tipo Alfa).	SEDE, (SEC ID N°: 18)	P06881
factor natriurético auricular	LEDE, (SEC ID N°: 49)	AAA35528
propéptido de factor natriurético auricular [<i>Homo sapiens</i>].	LEDE, (SEC ID N°: 49)	CAA25700
factor natriurético auricular	LEDE, (SEC ID N°: 49)	1101403A
Precursor de factor natriurético auricular (ANF) (péptido natriurético auricular) (ANP) (Prepronatriodilatina) (CDD-ANF) [Contiene: péptido relacionado con cardiodilatina (CDP)].	LEDE, (SEC ID N°: 49)	P01160
factor natriurético auricular	LEDE, (SEC ID N°: 49)	AAA35529
queratina [<i>Homo sapiens</i>]	GEDA, (SEC ID N°: 50)	AAB30058

ES 2 544 679 T3

Proteínas Amiloidogénicas Humanas		
Proteína amiloidogénica humana	Secuencia consenso	Número Referencia GenBank de de
queratina [<i>Homo sapiens</i>].	VEDF, (SEC ID N°: 51) YEDE, (SEC ID N°: 52)	CAA31695
Queratina	IEDL, (SEC ID N°: 53) GEDA, (SEQ ID NO: 50)	AAB59562
Queratina, tipo II citoesquelético 6C (Citoqueratina-6C) (CK 6C) (K6c queratina) (Citoqueratina-6E) (CK 6E) (Queratina K6h).	VEDL, (SEC ID N°: 64) YEDE, (SEC ID N°: 52) LEDA, (SEC ID N°: 65)	P48668
fibrinógeno [<i>Homo sapiens</i>]	WEDY, (SEC ID N°: 54)	CAA50740
precursor de la subunidad alfa de fibrinógeno [<i>Homo sapiens</i>].	DEDW, (SEC ID N°: 55) SEDL, (SEC ID N°: 56) YEDQ, (SEC ID N°: 57) SEDG, (SEC ID N°: 66) LEDW, (SEC ID N°: 58)	AAC97142
Cadena alfa de fibrinógeno [<i>Homo sapiens</i>]	DEDW, (SEC ID N°: 55) SEDL, (SEC ID N°: 56) YEDQ, (SEC ID N°: 57) SEDG, (SEC ID N°: 66)	AAI01936
Cadena alfa de fibrinógeno [<i>Homo sapiens</i>]	DEDW, (SEC ID N°: 55) SEDL, (SEC ID N°: 56) YEDQ, (SEC ID N°: 57) SEDG, (SEC ID N°: 66)	AAH98280
cadena alfa de fibrinógeno, isoforma CRA_b [<i>Homo sapiens</i>].	DEDW, (SEC ID N°: 55) SEDL, (SEC ID N°: 56) YEDQ, (SEC ID N°: 57) SEDG, (SEC ID N°: 66) LEDW, (SEC ID N°: 58)	EAX04926
cadena alfa de fibrinógeno, isoforma CRA_c [<i>Homo sapiens</i>].	DEDW, (SEC ID N°: 55) SEDL, (SEC ID N°: 56) YEDQ, (SEC ID N°: 57) SEDG, (SEC ID N°: 66)	EAX04928

Proteínas Amiloidogénicas Humanas		
Proteína amiloidogénica humana	Secuencia consenso	Número de Referencia GenBank
cadena alfa de fibrinógeno, isoforma CRA_a [<i>Homo sapiens</i>]	DEDW, (SEC ID N°: 55) SEDL, (SEC ID N°: 56)	EAX04924
precursor de proteína priónica; PRNP [<i>Homo sapiens</i>]	YEDR, (SEC ID N°: 59)	AAC62750
precursor de proteína priónica mayor (PrP) (PrP27-30) (PrP33-35C) (ASCR) (antígeno CD230)	YEDR, (SEC ID N°: 59)	P04156
preproteína de proteína priónica [<i>Homo sapiens</i>].	YEDR, (SEC ID N°: 59)	NP 000302
prolactina [<i>Homo sapiens</i>]	PEDK, (SEC ID N°: 60)	CAA38264
Prolactina [<i>Homo sapiens</i>].	PEDK, (SEC ID N°: 60)	AAH88370

VI. Péptidos amiloides para inmunización activa

5 Son agentes terapéuticos para uso de acuerdo con la divulgación los péptidos inmunogénicos, tales como péptidos AA y péptidos AL, que tras su administración a un paciente generan anticuerpos que se unen específicamente con uno o más epítomos que comprenden X₁EDX₂, tales como, por ejemplo, epítomos entre los restos 70-76 de AA (“agentes AA”). Los ejemplos adicionales de agentes incluyen péptidos inmunogénicos que comprenden un fragmento que consiste en X₁EDX₂ derivado de otras proteínas amiloides (“fragmentos X₁EDX₂”), tales como fragmentos AL V_K que consisten en la secuencia de aminoácidos PEDI, (SEC ID N°: 21), PEDF, (SEC ID N°: 22), AEDV, (SEC ID N°: 23), SEDF, (SEC ID N°: 24), o SEDA, (SEC ID N°: 25), y fragmentos AL V_λ que consisten en la secuencia de aminoácidos SEDE, (SEC ID N°: 18), AEDE, (SEC ID N°: 19), TEDE, (SEC ID N°: 16) o PEDE, (SEC ID N°: 20). También puede usarse un fragmento V_λ que consiste en la secuencia de aminoácidos FEDD, (SEC ID N°: 17). Algunas proteínas amiloides adecuadas incluyen proteína amiloide A del suero, proteína de cadena ligera de inmunoglobulina, polipéptido precursor amiloide de islote humano (IAPP), péptido beta amiloide, transtiretina (TTR), ApoA1 y otras proteínas amiloides enumeradas en la Tabla 1 y que comprenden la secuencia X₁EDX₂. En algunos agentes X₁ es H, T, F, S, P, A o cualquier otro resto de aminoácido inmediatamente antes de ED en una proteína amiloide; y X₂ es T, S, E, R, I, V, F, D, A o cualquier otro resto de aminoácido inmediatamente después de ED en dicha proteína amiloide. En algunos agentes, X₁ es H, T, F, S, P, o A y X₂ es T, S, E, D, R, I, V, F o A. En algunos de dichos agentes, cuando X₁ es H, X₂ es T o A; cuando X₁ es A, X₂ es S, T, E o V; cuando X₁ es T, X₂ es E; cuando X₁ es F, X₂ es D; cuando X₁ es S, X₂ es E, F o A; y cuando X₁ es P, X₂ es E, I o F. En algunos agentes, X₁ es H, T, F, S, P o A y X₂ es T, S, E, D, R, I, V, F o A, a condición de que si X₁ es A, X₂ no es V. En algunos agentes, cuando X₁ es A, X₂ es S, T o E.

25 Algunos agentes comprenden la secuencia de aminoácidos GHEDT, (SEC ID N°: 3), HEDT, (SEC ID N°: 12), AEDS, (SEC ID N°: 13), AEDT, (SEC ID N°: 14), HEDA, (SEC ID N°: 15), TEDE, (SEC ID N°: 16), FEDD, (SEC ID N°: 17), SEDE, (SEC ID N°: 18), AEDE, (SEC ID N°: 19), PEDE, (SEC ID N°: 20), PEDI, (SEC ID N°: 21), PEDF, (SEC ID N°: 22), AEDV, (SEC ID N°: 23), SEDF, (SEC ID N°: 24) o SEDA, (SEC ID N°: 25). Algunos agentes consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en GHEDT, (SEC ID N°: 3), HEDT, (SEC ID N°: 12), AEDS, (SEC ID N°: 13), AEDT, (SEC ID N°: 14), HEDA, (SEC ID N°: 15), TEDE, (SEC ID N°: 16), FEDD, (SEC ID N°: 17), SEDE, (SEC ID N°: 18), AEDE, (SEC ID N°: 19), PEDE, (SEC ID N°: 20), PEDI, (SEC ID N°: 21), PEDF, (SEC ID N°: 22), AEDV, (SEC ID N°: 23), SEDF, (SEC ID N°: 24), o SEDA, (SEC ID N°: 25), unida a un vehículo para formar un conjugado. Algunos agentes comprenden la secuencia de aminoácidos GHEDT, (SEC ID N°: 3), HEDT, (SEC ID N°: 12), AEDS, (SEC ID N°: 13), AEDT, (SEC ID N°: 14), HEDA, (SEC ID N°: 15), TEDE, (SEC ID N°: 16), FEDD, (SEC ID N°: 17), SEDE, (SEC ID N°: 18), AEDE, (SEC ID N°: 19), PEDE, (SEC ID N°: 20), PEDI, (SEC ID N°: 21), PEDF, (SEC ID N°: 22), AEDV, (SEC ID N°: 23), SEDF, (SEC ID N°: 24) y SEDA, (SEC ID N°: 25), unida con un vehículo para formar un conjugado. Algunos agentes comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en GHEDT, (SEC ID N°: 3), HEDT, (SEC ID N°: 12), AEDS, (SEC ID N°: 13), AEDT, (SEC ID N°: 14), HEDA, (SEC ID N°: 15) y TEDE, (SEC ID N°: 16).

45 Son fragmentos AA preferidos los restos 70-76 de la isoforma alfa de AA1 humano (HAA1) (GHGAEDS, SEC ID N°: 4), los restos 70-76 de la isoforma beta de HAA1 (GHDAEDS, SEC ID N°:5), los restos 70-76 de la isoforma gamma de HAA1 (GHDAEDS, SEC ID N°: 5), los restos 70-76 de las isoformas alfa y beta de HAA2 (GHGAEDS, SEC ID N°:

4), los restos 70-76 de HAA3 (GDHAEDS, SEC ID N°: 7), los restos 78-84 de HAA4 (STVIEDS, SEC ID N°:8), los restos 69-75 de AA1 de ratón (MAA1) (GRGHEDT, SEC ID N°: 9), los restos 69-75 de MAA2 (GRGHEDT, SEC ID N°: 9), los restos 62-68 de MAA3 (GHGAEDS, SEC ID N°: 10) y los restos 76-82 de MAA4 (NHGLETL, SEC ID N°: 11) o subfragmentos de al menos tres aminoácidos contiguos de cualquiera de estos. Algunos fragmentos AA no contienen restos de un péptido de amiloidosis AA distinto del segmento designado anteriormente. Otros fragmentos AA contienen restos flanqueantes adicionales de un péptido de amiloidosis AA pero no contienen más de 20 o preferentemente no más de 10 restos contiguos en total de un péptido de amiloidosis AA. Los fragmentos X₁EDX₂ y AL preferidos adicionales incluyen GHEDT, (SEC ID N°: 3), HEDT, (SEC ID N°: 12), AEDS, (SEC ID N°: 13), AEDT, (SEC ID N°: 14), HEDA, (SEC ID N°: 15), y TEDE, (SEC ID N°: 16).

Los agentes terapéuticos para uso de acuerdo con la divulgación también incluyen péptidos AA inmunogénicos que tras su administración a un paciente generan anticuerpos que se unen específicamente con epítopos N terminales de AA. Los agentes preferidos inducen una respuesta inmunogénica dirigida a un epítipo dentro de los restos 1-15 de AA humano.

Preferentemente, el fragmento de AA o AL u otros agentes tales como fragmentos de X₁EDX₂ administrados carecen de un epítipo que generaría una respuesta de linfocitos T al fragmento. En general, los epítopos de linfocitos T son mayores de 10 aminoácidos contiguos. Por lo tanto, los fragmentos preferidos de proteína amiloide tales como fragmentos AA o X₁EDX₂ son de un tamaño de 4-10 o preferentemente 7-10 aminoácidos contiguos; es decir, suficiente longitud para generar una respuesta de anticuerpos sin generar una respuesta de linfocitos T. La ausencia de epítopos de linfocitos T se prefiere porque estos epítopos no son necesarios para la actividad inmunogénica de fragmentos, y pueden provocar una respuesta inflamatoria indeseada en un subconjunto de pacientes (Anderson *et al.*, (2002) *J. Immunol.* 168, 3697-3701; Senior (2002) *Lancet Neurol.* 1, 3).

Son fragmentos AA preferidos los restos 70-76 de la isoforma alfa de AA1 humana (HAA1) (GHGAEDS) (SEC ID N°: 4), los restos 70-76 de la isoforma beta de HAA1 (GHDAEDS, SEC ID N°: 5), los restos 70-76 de la isoforma gamma de HAA1 (GHDAEDS, SEC ID N°: 5), los restos 70-76 de las isoformas alfa y beta de HAA2 (GHGAEDS, SEC ID N°: 4), los restos 70-76 de HAA3 (GDHAEDS) (SEC ID N°: 7), los restos 78-84 de HAA4 (STVIEDS) (SEC ID N°:8), los restos 69-75 de AA1 de ratón (MAA1) (GRGHEDT) (SEC ID N°:9), los restos 69-75 de MAA2 (GRGHEDT, SEC ID N°: 9), los restos 62-68 de MAA3 (GHGAEDS) (SEC ID N°: 10) y los restos 76-82 de MAA4 (NHGLETL) (SEC ID N°: 11) o subfragmentos de al menos tres aminoácidos contiguos de cualquiera de estos. Algunos fragmentos AA no contienen restos de un péptido de amiloidosis AA distinto del segmento designado anteriormente. Otros fragmentos AA contienen restos flanqueantes adicionales de un péptido de amiloidosis AA pero no contienen más de 20 o preferentemente no más de 10 restos contiguos en total de un péptido de amiloidosis AA. Los fragmentos X₁EDX₂ y AL preferidos adicionales incluyen GHEDT, (SEC ID N°: 3), HEDT, (SEC ID N°: 12), AEDS, (SEC ID N°: 13), AEDT, (SEC ID N°: 14), HEDA, (SEC ID N°: 15), y TEDE, (SEC ID N°: 16).

También pueden usarse análogos de los péptidos de amiloidosis AA natural, amiloidosis AL y otras amiloidosis para inducir una respuesta inmunitaria. Los análogos incluyen variantes alélicas, de especie e inducidas. Los análogos de AA inducen anticuerpos que se unen específicamente con un péptido AA 70-76 natural. Algunos de dichos análogos no consiguen inducir anticuerpos que se unan específicamente con epítopos fuera de AA 70-76. Los análogos de AA típicamente difieren de péptidos de origen natural en hasta el 30 % de las posiciones de aminoácidos en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 cambios de posición. Cada delección o sustitución de un resto de aminoácido natural se considera un cambio de posición como también la inserción de un resto sin sustitución. Las sustituciones de aminoácidos son con frecuencia sustituciones conservativas.

Algunos análogos de fragmentos AA o AL o fragmentos AL o AL u otros fragmentos de proteínas amiloide tales como fragmentos X₁EDX₂ también incluyen aminoácidos no naturales o modificaciones de aminoácidos N o C terminales en una, dos, cinco, diez o incluso todas las posiciones. Por ejemplo, el resto de ácido aspártico natural puede reemplazarse con ácido isoaspártico. Los ejemplos de aminoácidos no naturales son aminoácidos D, alfa, alfa disustituidos, N-alquil aminoácidos, ácido láctico, 4-hidroxi prolina, gamma-carboxiglutamato, épsilon-N,N,N-trimetilisina, épsilon-N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxisina, omega-N-metilarginina, β-alanina, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, tiroxina, ácido gamma-amino butírico, homoserina, citrulina y ácido isoaspártico. Algunos agentes terapéuticos son péptidos todo D, por ejemplo AA todo D o fragmentos AA todo D y análogos peptídicos todo D. Algunos agentes terapéuticos son 90 % péptidos todo D, por ejemplo, 90 % AA todo D o 90 % fragmentos AA todo D y 90 % análogos peptídicos todo D. Algunos agentes terapéuticos son 80 % péptidos todo D, por ejemplo, 80 % AA todo D u 80 % fragmentos de AA todo D y el 80 % análogos peptídicos todo D. Los fragmentos y análogos pueden explorarse con respecto a eficacia profiláctica o terapéutica en modelos animales transgénicos en comparación con controles no tratados o de placebo como se describe posteriormente.

AA, AL, sus fragmentos y análogos y fragmentos X₁EDX₂ y sus análogos pueden sintetizarse por síntesis peptídica de fase sólida o expresión recombinante, o pueden obtenerse de fuentes naturales. Están disponibles en el mercado sintetizadores peptídicos automáticos de numerosos proveedores, tales como Applied Biosystems, Foster City, California. La expresión recombinante puede ser en bacterias, tales como *E. coli*, levadura, células de insecto o células de mamífero. Se describen procedimientos para expresión recombinante en Sambrook *et al.*, Molecular

Cloning: A Laboratory Manual (C.S.H.P. Press, NY 2ª ed., 1989).

5 Los agentes terapéuticos también incluyen polipéptidos más largos que incluyen, por ejemplo, un fragmento inmunogénico del péptido AA, péptido AL o un fragmento X₁EDX₂, junto con uno o más aminoácidos adicionales que flanquean el péptido AA, péptido AL o fragmento X₁EDX₂ en uno o ambos laterales. Por ejemplo, los agentes preferidos incluyen proteínas de fusión que comprenden un segmento de AA, AL o fragmento X₁EDX₂ fusionado con una secuencia de aminoácidos heteróloga que induce una respuesta de linfocitos T auxiliares contra la secuencia de aminoácidos heteróloga y de este modo una respuesta de linfocitos B contra el segmento AA, segmento AL o fragmento X₁EDX₂. Pueden usarse también uno o más aminoácidos heterólogos flanqueantes para cubrir un péptido AA o AL o fragmento X₁EDX₂ para protegerlo de la degradación en la fabricación, el almacenamiento o el uso. Dichos polipéptidos pueden explorarse con respecto a eficacia profiláctica o terapéutica en modelos animales en comparación con controles no tratados o de placebo como se describe posteriormente. Los agentes terapéuticos incluyen un fragmento inmunogénico de AA o AL o fragmento X₁EDX₂ flanqueado por secuencias de polilisina. Las secuencias de polilisina pueden fusionarse con el extremo N terminal, el extremo C terminal, o los extremos tanto N como C terminales de AA o AL o un fragmento inmunogénico de AA o AL o fragmento X₁EDX₂. El péptido AA o AL, fragmento X₁EDX₂, análogo, fragmento activo de AA u otro polipéptido puede administrarse en forma asociada o multimérica o en forma disociada. Los agentes terapéuticos también incluyen multímeros de agentes inmunogénicos monoméricos.

20 En una variación adicional, un fragmento inmunogénico de AA o AL o fragmento X₁EDX₂ pueden presentarse por un virus o una bacteria como parte de una composición inmunogénica. Un ácido nucleico que codifica el péptido inmunogénico se incorpora en un genoma o episoma del virus o la bacteria. Opcionalmente, el ácido nucleico se incorpora de tal manera que el péptido inmunogénico se exprese como una proteína secretada o como una proteína de fusión con una proteína de superficie externa de un virus o una proteína transmembrana de una bacteria de modo que se presente el péptido. Los virus o bacterias usados en dichos métodos deberían ser no patogénicos o atenuados. Los virus adecuados incluyen adenovirus, VHS, virus de la encefalitis equina Venezolana y otros virus alfa, virus de la estomatitis vesicular y otros rabdo virus, vaccinia y viruela aviar. Las bacterias adecuadas incluyen *Salmonella* y *Shigella*. La fusión de un péptido inmunogénico con HBsAg de VHB es particularmente adecuada.

30 Los agentes terapéuticos también incluyen péptidos y otros compuestos que no tienen necesariamente una similitud de secuencia de aminoácidos significativa con AA o AL o fragmento X₁EDX₂ pero no obstante actúan como miméticos de AA o AL o fragmento X₁EDX₂ e inducen una respuesta inmunitaria similar. Por ejemplo, cualquier péptido y proteína que forma láminas plegadas en β puede explorarse con respecto a idoneidad. También pueden usarse anticuerpos antiidiotípicos contra anticuerpos monoclonales para AA o AL u otros péptidos amiloidogénicos tales como fragmentos X₁EDX₂. Dichos anticuerpos anti Id imitan al antígeno y generan una respuesta inmunitaria a él (véase *Essential Immunology* (Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, 6ª ed.), p. 181). Agentes distintos de los péptidos AA deberían inducir una respuesta inmunogénica contra uno o más de los segmentos preferidos de AA enumerados anteriormente (por ejemplo, AA70-76 o GHEDT, (SEC ID N°: 3) o un AL o fragmento X₁EDX₂ enumerado anteriormente, tal como, por ejemplo, HEDT, (SEC ID N°: 12), AEDS, (SEC ID N°: 13), AEDT, (SEC ID N°: 14), HEDA, (SEC ID N°: 15) y TEDE, (SEC ID N°: 16).

45 Preferentemente, dichos agentes inducen una respuesta inmunogénica que se dirige específicamente a uno de estos segmentos sin dirigirse a otros segmentos de AA o AL o proteína amiloide de la que derivó el fragmento X₁EDX₂.

50 También pueden explorarse con respecto a idoneidad bibliotecas aleatorias de péptidos u otros compuestos. Pueden producirse bibliotecas combinatorias para muchos tipos de compuestos que pueden sintetizarse por etapas. Dichos compuestos incluyen polipéptidos, miméticos de giro beta, polisacáridos, fosfolípidos, hormonas, prostaglandinas, esteroides, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, benzodiazepinas, glicinas oligoméricas N sustituidas y oligocarbamatos. Pueden construirse bibliotecas combinatorias grandes de los compuestos por el método de bibliotecas sintéticas codificadas (ESL) descrito en Affymax, documento WO 95/12608, Affymax, documento WO 93/06121, Universidad de Columbia, documento WO 94/08051, Pharmacopeia, documento WO 95/35503 y Scripps, documento WO 95/30642. También pueden generarse bibliotecas peptídicas por métodos de presentación de fagos. Véase, por ejemplo, Devlin, documento WO 91/18980.

55 Se exploran inicialmente bibliotecas combinatorias y otros compuestos con respecto a idoneidad determinando su capacidad para unirse específicamente con anticuerpos o linfocitos (B o T) que se sabe que son específicos para AA u otros péptidos amiloidogénicos. Por ejemplo, pueden realizarse exploraciones iniciales con cualquier suero policlonal o anticuerpo monoclonal para AA o AL o un fragmento del mismo o para un fragmento X₁EDX₂. Los compuestos pueden explorarse después con respecto a unión específica con un epítipo específico dentro de AA (por ejemplo, AA70-76 o GHEDT, (SEC ID N°: 3) o AL o para un fragmento X₁EDX₂ enumerado anteriormente, tal como, por ejemplo, HEDT, (SEC ID N°: 12), AEDS, (SEC ID N°: 13), AEDT, (SEC ID N°: 14), HEDA, (SEC ID N°: 15) y TEDE, (SEC ID N°: 16).

65 Los compuestos pueden ensayarse por los mismos procedimientos descritos para mapear especificidades de epítopos de anticuerpo. Los compuestos identificados por dichas exploraciones se analizan adicionalmente con

respecto a su capacidad para inducir anticuerpos o linfocitos reactivos para AA o AL o fragmentos de los mismos o para un fragmento X₁EDX₂. Por ejemplo, pueden ensayarse múltiples diluciones de sueros en placas de microtitulación que se han recubierto previamente con AA o AL o un fragmento de los mismos o un fragmento X₁EDX₂ y puede realizarse un ELISA convencional para ensayar con respecto a anticuerpos reactivos para AA o AL o el fragmento o al fragmento X₁EDX₂. Los compuestos pueden ensayarse después con respecto a eficacia profiláctica y terapéutica en animales transgénicos predispuestos a la amiloidosis, tales como, por ejemplo, amiloidosis AA o amiloidosis AL. Puede usarse el mismo enfoque de exploración en otros agentes potenciales, análogos de AA, análogos de AL y péptidos más largos, incluyendo fragmentos de AA, AL y fragmentos X₁EDX₂, descritos anteriormente.

VII. Conjugados

Algunos agentes para inducir una respuesta inmunitaria contienen el epítipo apropiado para inducir una respuesta inmunitaria contra AA pero son demasiado pequeños para ser inmunogénicos. En esta situación, puede unirse un inmunógeno peptídico con una molécula vehículo adecuada para formar un conjugado que ayuda a inducir una respuesta inmunitaria. Un único agente puede unirse con un único vehículo, múltiples copias de un agente pueden unirse con múltiples copias de un vehículo, que a su vez se unen entre sí, múltiples copias de un agente pueden unirse con una única copia de un vehículo, o una única copia de un agente puede unirse con múltiples copias de un vehículo, o diferentes vehículos. Los vehículos adecuados incluyen albúminas del suero, hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina, toxoide del tétanos o un toxoide de otras bacterias patógenas, tales como difteria, *E. coli*, cólera o *H. pylori*, o un derivado de toxina atenuado. Los epítipos de linfocitos T también son moléculas vehículo adecuadas. Algunos conjugados pueden formarse uniendo agentes de la divulgación con una molécula polimérica inmunoestimuladora (por ejemplo, tripalmitoil-S-glicerina cisteína (Pam₃Cys), manano (un polímero de manosa) o glucano (un polímero beta 1→2)), citocinas (por ejemplo, IL-1, péptidos de IL-1 alfa y beta, IL-2, INF gamma, IL-10, GM-CSF) y quimiocinas (por ejemplo MIP1alfa y beta y RANTES). Los agentes inmunogénicos también pueden unirse con péptidos que potencian el transporte entre tejidos, como se describe en O'Mahony, documentos WO 97/17613 y WO 97/17614. Los inmunógenos pueden unirse a los vehículos con o sin aminoácidos espaciadores (por ejemplo, gly-gly).

Algunos conjugados pueden formarse uniendo agentes de la divulgación con al menos un epítipo de linfocitos T. Algunos epítipos de linfocitos T son promiscuos mientras que otros epítipos de linfocitos T son universales. Los epítipos de linfocitos T promiscuos son capaces de potenciar la inducción de inmunidad de linfocitos T en una amplia diversidad de sujetos que presentan diversos tipos de HLA. A diferencia de los epítipos de linfocitos T promiscuos, los epítipos de linfocitos T universales son capaces de potenciar la inducción de inmunidad de linfocitos T en un gran porcentaje, por ejemplo, al menos 75 %, de los sujetos que presentan diversas moléculas de HLA codificadas por diferentes alelos de HLA-DR.

Existe un gran número de epítipos de linfocitos T de origen natural tales como, toxoide del tétanos (por ejemplo, los epítipos P2 y P30), antígeno de superficie de Hepatitis B, pertussis, toxoide, proteína F del virus del sarampión, proteína de membrana externa mayor de *Chlamydia trachomatis*, toxoide diftérico (por ejemplo, CRM197), circumsporocito T de *Plasmodium falciparum*, antígeno CS de *Plasmodium falciparum*, triosa fosfato isomerasa de *Schistosoma mansoni*, TraT de *Escherichia coli* y hemaglutinina (HA) del virus de la gripe. Los péptidos inmunogénicos de la divulgación también pueden conjugarse con los epítipos de linfocitos T descritos en Sinigaglia F. *et al.*, Nature, 336: 778-780 (1988); Chicz R. M. *et al.*, J. Exp. Med., 178: 27-47 (1993); Hammer J. *et al.*, Cell 74: 197-203 (1993); Falk K. *et al.*, Immunogenetics, 39: 230-242 (1994); documento WO 98/23635; Southwood S. *et al.* J. Immunology; 160: 3363-3373 (1998); y, Giannini, G. *et al.* Nucleic Acids Res. 12: 4063-4069 (1984). Ejemplos adicionales incluyen:

Hemaglutinina de la Gripe: HA₃₀₇₋₃₁₉

CS de Malaria: epítipo T3 EKKIAKMEKASSVFNV, (SEC ID N°: 67).

Antígeno de superficie de Hepatitis B: HBsAg₁₉₋₂₈ FLLLRILTI, (SEC ID N°: 68).

Proteína de Choque Térmico 65: hsp65₁₅₃₋₁₇₁ DQSIGDLIAEAMDKVGN, (SEC ID N°: 69).

bacilo de Calmette-Guerin QVHFQPLPPAVVKL, (SEC ID N°: 70).

Toxoide del tétanos: TT₈₃₀₋₈₄₄ QYIKANSKFIGITEL, (SEC ID N°: 71).

Toxoide del tétanos: TT₉₄₇₋₉₆₇ FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE, (SEC ID N°: 72).

gp120 T1 de VIH: KQIINMWQEVGKAMYA, (SEC ID N°: 73).

Toxoide del tétanos: TT₉₄₇₋₉₆₇ FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

gp120 T1 de VIH: KQIINMWQEVGKAMYA.

Como alternativa, los conjugados pueden formarse uniendo agentes de la divulgación con al menos un epítipo de linfocito T artificial capaz de unirse con una gran proporción de moléculas del MHC de Clase II, tal como el epítipo pan DR ("PADRE"). PADRE se describe en los documentos US 5.736.141, WO 95/07707, y Alexander J *et al.*, Immunity, 1: 751-761 (1994). Un péptido PADRE preferido es AKXVAAWTLKAAA, (SEC ID N°: 74), (restos comunes en negrita) en el que X es preferentemente ciclohexilalanina tirosina o fenilalanina, prefiriéndose más la ciclohexilalanina.

Los agentes inmunogénicos pueden unirse a vehículos por reticulación química. Las técnicas para unir un inmunógeno con un vehículo incluyen la formación de enlaces disulfuro usando N-succinimidil-3-(2-piridiltio) propionato (SPDP) y succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) (si el péptido carece de un grupo sulfhidrilo, este puede proporcionarse por la adición de un resto de cisteína). Estos reactivos crean un enlace disulfuro entre ellos mismos y restos de cisteína del péptido en una proteína y un enlace de amida a través del amino épsilon en una lisina, u otro grupo amino libre en otros aminoácidos. Se describe una diversidad de dichos agentes formadores de amida/disulfuro en *Immun. Rev.* 62, 185 (1982). Otros agentes de acoplamiento bifuncionales forman un tioéter en lugar de un enlace disulfuro. Muchos de estos agentes formadores de tioéter están disponibles en el mercado e incluyen ésteres reactivos de ácido 6-maleimidocaproico, ácido 2-bromoacético y ácido 2-yodoacético, ácido 4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1-carboxílico. Los grupos carboxilo pueden activarse combinándolos con succinimida o ácido 1-hidroxil-2-nitro-4-sulfónico, sal sódica.

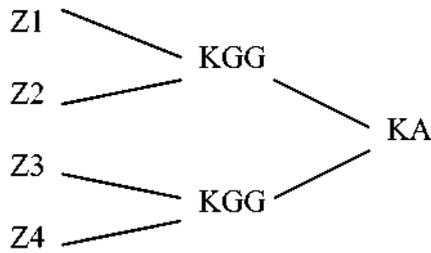
La inmunogenicidad puede mejorarse mediante la adición de restos espaciadores (por ejemplo, Gly-Gly) entre el epítipo T_h y el inmunógeno peptídico de la invención. Además de separar físicamente el epítipo T_h del epítipo de linfocitos B (es decir, el inmunógeno peptídico), los restos de glicina pueden alterar cualquier estructura secundaria artificial creada por la unión del epítipo T_h con el inmunógeno peptídico, y eliminar de este modo la interferencia entre las respuestas de linfocitos T y/o B. La separación conformacional entre el epítipo auxiliar y el dominio inductor de anticuerpos permite interacciones más eficaces entre el inmunógeno presentado y los linfocitos B y T_h apropiados.

Para potenciar la inducción de inmunidad de linfocitos T en un gran porcentaje de sujetos que presentan diversos tipos de HLA para un agente de la presente invención, puede prepararse una mezcla de conjugados con diferentes epítopos de linfocitos T_h . La mezcla puede contener una mezcla de al menos dos conjugados con diferentes epítopos de linfocitos T_h , una mezcla de al menos tres conjugados con diferentes epítopos de linfocitos T_h o una mezcla de al menos cuatro conjugados con diferentes epítopos de linfocitos T_h . La mezcla puede administrarse con un adyuvante.

Los péptidos inmunogénicos también pueden expresarse como proteínas de fusión con vehículos (es decir, péptidos heterólogos). El péptido inmunogénico puede unirse en su extremo amino terminal, su extremo carboxilo terminal o ambos con un vehículo. Opcionalmente, pueden estar presentes múltiples repeticiones del péptido inmunogénico en la proteína de fusión. Opcionalmente, un péptido inmunogénico puede unirse a múltiples copias de un péptido heterólogo, por ejemplo, en los extremos tanto N como C terminales del péptido. Opcionalmente, pueden unirse múltiples copias de un péptido inmunogénico con múltiples copias de un péptido heterólogo que están unidas entre sí. Algunos péptidos vehículo actúan para inducir una respuesta de linfocitos T auxiliares contra el péptido vehículo. Los linfocitos T auxiliares inducidos a su vez inducen una respuesta de linfocitos B contra el péptido inmunogénico unido al vehículo.

Se muestran posteriormente algunos ejemplos de proteínas de fusión adecuadas para uso en la invención. Algunas de estas proteínas de fusión comprenden segmentos de AA unido a epítopos de toxoide del tétanos tal como se describe en los documentos US 5.196.512, EP 378.881 y EP 427.347. Algunas proteínas de fusión comprenden segmentos de AA unidos con al menos un péptido PADRE descrito en el documento US 5.736.142. Algunos péptidos heterólogos son epítopos de linfocitos T promiscuos, mientras que otros péptidos heterólogos son epítopos de linfocitos T universales. En algunos métodos, el agente para administración es simplemente una única proteína de fusión con un segmento AA unido con un segmento heterólogo en configuración lineal. Los agentes terapéuticos de la divulgación pueden representarse usando una fórmula. Por ejemplo, en algunos métodos, el agente es multímero de proteínas de fusión representado por la fórmula 2^x , en la que x es un número entero de 1 a 5. Preferentemente x es 1, 2 o 3, siendo más preferido el 2. Cuando x es dos, dicho multímero tiene cuatro proteínas de fusión unidas en una configuración preferida denominada MAP4 (véase documento US 5.229.490).

La configuración de MAP4 se muestra a continuación, en la que se producen estructuras ramificadas iniciando la síntesis peptídica en las aminas tanto N terminales como de cadena lateral de lisina. Dependiendo del número de veces que se incorpora lisina en la secuencia y se permite que se ramifique, la estructura resultante presentará múltiples extremos N terminales. En este ejemplo, se han producido cuatro extremos N terminales idénticos en el núcleo que contiene lisina ramificado. Dicha multiplicidad potencia en gran medida la sensibilidad de linfocitos B afines. En los ejemplos posteriores, Z se refiere a un fragmento inmunogénico de AA, AL o un fragmento X_1EDX_2 y Z1-4 se refiere a un fragmento o fragmentos inmunogénicos de AA, AL o un fragmento X_1EDX_2 . Los fragmentos pueden ser iguales entre sí o diferentes.



Otros ejemplos de proteínas de fusión incluyen:

5 toxoide del tétanos **Z** 830-844 en una configuración MAP4:

Z-QYIKANSKFIGITEL, (SEC ID N°: 71)

10 toxoide del tétanos **Z** 947-967 en una configuración MAP4:

Z-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE, (SEC ID N°: 72)

toxoide del tétanos **Z** 830-844 en una configuración MAP4:

15 **Z-QYIKANSKFIGITEL**, (SEC ID N°: 71)

toxoide del tétanos **Z** 830-844 + 947-967 en una configuración lineal:

Z-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE, (SEC ID N°: 75).

20 El péptido PADRE (todos en configuraciones lineales), en el que X es preferentemente ciclohexilalanina, tirosina o fenilalanina, prefiriéndose más ciclohexilalanina- **Z**:

AKXVAAWTLKAAA-Z, (SEC ID N°: 74).

25 Péptido PADRE **Z x 3**:

Z-Z-Z-AKXVAAWTLKAAA, (SEC ID N°: 74).

30 Ovoalbúmina **Z** 323-339 en una configuración lineal:

Z-ISQAVHAAHAEINEAGR, (SEC ID N°: 76).

Los ejemplos adicionales de proteínas de fusión incluyen:

35 **AKXVAAWTLKAAA-Z-Z-Z**, (SEC ID N°: 74).

Z-AKXVAAWTLKAAA, (**Z**-(SEC ID N°: 74).

PKYVKQNTLKLAT-Z-Z-Z, (SEC ID N°: 77).

Z-PKYVKQNTLKLAT-Z, (SEC ID N°: 77).

40 **Z-Z-Z-PKYVKQNTLKLAT**, (SEC ID N°: 77).

Z-Z-PKYVKQNTLKLAT, (**Z-Z**-(SEC ID N°: 77)

Z-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-(SEC ID N°: 78)

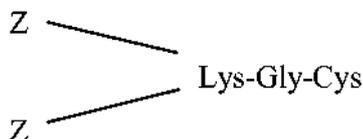
45 **Z-Z-Z-QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE**, (SEC ID N°: 79).

Z-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-Z, (SEC ID N°: 79).

QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-Z, (SEC ID N°: 79)

Z-QYIKANSKFIGITEL, (SEC ID N°: 71) en una resina de 2 ramas: los fragmentos pueden ser iguales entre sí o diferentes.

50



Pueden usarse las mismas proteínas vehículo o similares y métodos de escisión para generar inmunógenos para usar en la generación de anticuerpos contra AA o un fragmento inmunogénico de AA, AL o un fragmento X₁EDX₂. Por ejemplo, AA o un fragmento inmunogénico de AA, AL o un fragmento X₁EDX₂ unido con un vehículo puede administrarse a un animal de laboratorio en la producción de anticuerpos monoclonales para AA o un fragmento

5

VIII. Ácido nucleico que codifica agentes terapéuticos

Los agentes terapéuticos de la divulgación también incluyen ácidos nucleicos. También pueden inducirse respuestas inmunitarias contra depósitos amiloides mediante administración de ácidos nucleicos que codifican segmentos de péptido AA, y fragmentos de los mismos, otros inmunógenos peptídicos tales como fragmentos X₁EDX₂, o anticuerpos y sus cadenas componentes, tales como anticuerpos 2A4, 8G9 y 7D8, usados para inmunización pasiva. Dichos agentes incluyen ácidos nucleicos que codifican péptidos AA que tras su administración a un paciente generan anticuerpos que se unen específicamente con uno o más epítomos entre los restos 70-76 de AA, AL o ácidos nucleicos que codifican péptidos que comprenden fragmentos X₁EDX₂. Dichos agentes también incluyen ácidos nucleicos que codifican anticuerpos que se unen específicamente con un neoepítomo C terminal de AA o con X₁EDX₂. En particular, dichos ácidos nucleicos codifican anticuerpos que se unen específicamente con la isoforma alfa de HAA1 dentro de los restos 70-76 (GHGAEDS, SEC ID N°: 4), isoforma beta de HAA1 dentro de los restos 70-76 (GHDAEDS, SEC ID N°: 5), la isoforma gamma de HAA1 dentro de los restos 70-76 (GHDAEDS, SEC ID N°: 5), isoformas alfa y beta de HAA2 dentro de los restos 70-76 (GHGAEDS, SEC ID N°: 4), HAA3 dentro de los restos 70-76 (GDHAEDS, SEC ID N°: 7), HAA4 dentro de los restos 78-84 (STVIEDS, SEC ID N°: 8), AA1 de ratón (MAA1) dentro de los restos 69-75 (GRGHEDT, SEC ID N°: 9), MAA2 dentro de los restos 69-75 (GRGHEDT, SEC ID N°: 9), MAA3 dentro de los restos 62-68 (GHGAEDS, SEC ID N°: 4) y MAA4 dentro de los restos 76-82 (NHGLETL, SEC ID N°: 11). Dichos ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN. Los ácidos nucleicos preferidos adicionales codifican anticuerpos que se unen específicamente con HEDT, (SEC ID N°: 12), AEDS, (SEC ID N°: 13), AEDT, (SEC ID N°: 14), HEDA, (SEC ID N°: 15) o TEDE, (SEC ID N°: 16) u otros péptidos X₁EDX₂ enumerados anteriormente. Un segmento de ácido nucleico que codifica un inmunógeno está típicamente unido a elementos reguladores, tales como un promotor y potenciador, que permiten la expresión del segmento de ADN en las células diana pretendidas de un paciente. Para expresión en células sanguíneas, según sea deseable para inducción de una respuesta inmunitaria, los elementos promotores y potenciadores de genes de inmunoglobulina de cadena ligera o pesada o el promotor intermedio temprano mayor y potenciador de CMV son adecuados para dirigir la expresión. Los elementos reguladores unidos y secuencias codificantes se clonan con frecuencia en un vector. Para administración de anticuerpos bicatenarios, las dos cadenas pueden clonarse en el mismo vector o vectores separados. Los ácidos nucleicos codifican agentes terapéuticos también pueden codificar al menos un epítomo de linfocitos T. Las divulgaciones del presente documento que se refieren al uso de adyuvantes y el uso de vehículos se aplican cambiando lo que deba cambiarse a su uso con los ácidos nucleicos que codifican los agentes terapéuticos.

10

15

20

25

30

35

Están disponibles varios sistemas de vectores virales incluyendo sistemas retrovirales (véase, por ejemplo, Lawrie y Tumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3, 102-109 (1993)); vectores adenovirales (véase, por ejemplo, Bett *et al.*, *J. Virol.* 67, 5911 (1993)); vectores de virus adenoasociados (véase, por ejemplo Zhou *et al.*, *J. Exp. Med.* 179, 1867 (1994)), vectores virales de la familia de la viruela incluyendo virus vaccinia y los virus de la viruela aviar, vectores virales del género de virus alfa tales como los derivados de virus Sindbis y del Bosque de Semliki (véase, por ejemplo, Dubensky *et al.*, *J. Virol.* 70, 508-519 (1996)), virus de la encefalitis equina venezolana (véase documento US 5.643.576) y rabdovirus, tales como virus de la estomatitis vesicular (véase documento WO 96/34625) y papilomavirus (Ohe *et al.*, *Human Gene Therapy* 6, 325-333 (1995); Woo *et al.*, documento WO 94/12629 y Xiao y Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24, 2630-2622 (1996)).

40

45

El ADN que codifica un inmunógeno, o un vector que lo contiene, puede empaquetarse en liposomas. Se describen lípidos adecuados y análogos relacionados en los documentos US 5.208.036, 5.264.618, 5.279.833 y 5.283.185. También pueden adsorberse vectores y ADN que codifica un inmunógeno en o asociarse con vehículos en partículas, por ejemplo de los que incluyen polímeros de polimetilmetacrilato y polilactidas y poli(lactida-co-glicolidas), véase, por ejemplo, McGee *et al.*, *J. Micro Encap.* (1996).

50

Pueden suministrarse vectores de terapia génica o ADN desnudo *in vivo* mediante administración a un paciente individual, típicamente por administración sistémica (por ejemplo, infusión intravenosa, intraperitoneal, nasal, gástrica, intradérmica, intramuscular, subdérmica o intracraneal) o aplicación tópica (véase por ejemplo documento US 5.399.346). Dichos vectores pueden incluir además agentes facilitadores tales como bupivacaína (documento 5.593.970). También puede administrarse ADN usando una pistola génica (véase Xiao y Brandsma, mencionado anteriormente). El ADN que codifica un inmunógeno se precipita en la superficie de perlas metálicas microscópicas. Los microproyectiles se aceleran con una onda de choque o gas de helio en expansión y penetran en tejidos a una profundidad de varias capas celulares. Por ejemplo, el sistema de Suministro Génico Accel™ fabricado por Agacetus, Inc. Middleton WI es adecuado. Como alternativa, puede pasar ADN desnudo a través de la piel al torrente sanguíneo simplemente aplicando puntualmente el ADN en la piel con irritación química o mecánica (véase documento WO 95/05853).

55

60

65

En una variación adicional, pueden suministrarse vectores que codifican inmunógenos a células *ex vivo*, tales como células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia tisular) o células madre hematopoyéticas donantes universales, seguido de reimplantación de las células en un paciente, habitualmente después de selección con respecto a células que han incorporado el vector.

IX. Adyuvantes

Se administran en ocasiones agentes inmunogénicos, tales como péptidos, en combinación con un adyuvante. El adyuvante aumenta el título de anticuerpos inducidos y/o la afinidad de unión de anticuerpos inducidos en relación con la situación si el péptido se usara solo. Puede usarse una diversidad de adyuvantes en combinación con un fragmento inmunogénico de AA, para inducir una respuesta inmunitaria. Los adyuvantes preferidos aumentan la respuesta intrínseca a un inmunógeno sin provocar cambios conformacionales en el inmunógeno que afecten a la forma cualitativa de la respuesta. Los adyuvantes preferidos incluyen hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, monofosforil lípido A (MPL™) 3 Des-O-acilado (véase documento GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, ahora parte de Corixa), RC-529 (Corixa, Hamilton, Montana). STIMULON™ QS-21 es un glucósido de triterpeno o saponina aislado de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina hallado en Sudamérica (véase Kensil *et al.*, en *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); Patente de Estados Unidos N° 5.057.540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA). Otros adyuvantes son emulsiones de aceite en agua (tales como escualeno o aceite de cacahuete), opcionalmente en combinación con estimulantes inmunitarios, tales como monofosforil lípido A (véase Stoute *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)), polímeros de pluronic, y micobacterias muertas. Otro adyuvante es CpG (documento WO 98/40100). Pueden administrarse adyuvantes como un componente de una composición terapéutica con un agente activo o pueden administrarse por separado, antes, simultáneamente con, o después de la administración del agente terapéutico.

Una clase preferida de adyuvantes es sales de aluminio (alumbre), tal como hidróxido de alumbre, fosfato de alumbre, sulfato de alumbre. Dichos adyuvantes pueden usarse con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como MPL o 3-DMP, QS-21, aminoácidos poliméricos o monoméricos tales como ácido poliglútamico o polilisina. Otra clase de adyuvantes es formulaciones de emulsión de aceite en agua. Dichos adyuvantes pueden usarse con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (por ejemplo, N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi propilamida (DTP-DPP) THERAMIDE™), u otros componentes de pared celular bacteriana. Las emulsiones de aceite en agua incluyen (a) MF59 (documento WO 90/14837), que contiene Escualeno 5 %, Tween 80 0,5 % y Span 85 0,5 % (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidificador tales como microfluidificador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, que contiene Escualeno 10 %, Tween 80 0,4 %, polímero bloqueado con pluronic L121 5 % y thr-MDP, bien microfluidificado en una emulsión submicrométrica o bien agitado vorticialmente para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula, y (c) sistema de adyuvante RIBI™ (RAS), (Ribi ImmunoChem, Hamilton, MT) que contienen escualeno 2 %, Tween 80 0,2 % y uno o más componentes de pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM) y esqueleto de pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (DETOX™).

Otra clase de adyuvantes preferidos es los adyuvantes de saponina, tales como STIMULON™ (QS-21, Aquila, Framingham, MA) o partículas generadas de los mismos tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes) e ISCOMATRIX. Otros adyuvantes incluyen RC-529, GM-CSF y Adyuvante Completo de Freund (CFA) y Adyuvante Incompleto de Freund (IFA). Otros adyuvantes incluyen citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo, péptidos α y β de IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL13 e IL-15), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), quimiocinas, tales como MIP1 α y β y RANTES. Otra clase de adyuvantes es análogos glucolípidos incluyendo N-glucosilamidas, N-glucosilureas y N-glucosilcarbamatos, cada uno de los cuales se sustituye en el resto de azúcar por un aminoácido, como inmunomoduladores o adyuvantes (véase Patente de Estados Unidos N° 4.855.283). También pueden usarse como adyuvantes proteínas de choque térmico, por ejemplo, HSP70 y HSP90.

Un adyuvante puede administrarse con un inmunógeno como una única composición, o puede administrarse antes, simultáneamente con, o después de la administración del inmunógeno. El inmunógeno y adyuvante pueden envasarse y proporcionarse en el mismo vial o pueden envasarse en viales separados y mezclarse antes de su uso. El inmunógeno y adyuvante típicamente se envasan con una etiqueta que indica la aplicación terapéutica pretendida. Si el inmunógeno y el adyuvante se envasan por separado, el envase típicamente incluye instrucciones para su mezcla antes de su uso. La elección de un adyuvante y/o vehículo depende de la estabilidad de la formulación inmunogénica que contiene el adyuvante, la vía de administración, el programa de dosificación, la eficacia del adyuvante para la especie que se vacuna, y, en seres humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable es uno que se ha aprobado o puede aprobarse para administración humana por los cuerpos reguladores pertinentes. Por ejemplo, el adyuvante completo de Freund no es adecuado para administración humana. Se prefieren alumbre, MPL y QS-21. Opcionalmente, pueden usarse simultáneamente dos o más adyuvantes

diferentes. Las combinaciones preferidas incluyen alumbre con MPL, alumbre con QS-21, MPL con QS-21, MPL o RC-529 con GM-CSF, y alumbre, QS-21 y MPL juntos. Además, puede usarse Adyuvante Incompleto de Freund (Chang *et al.*, *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 173-186 (1998)), opcionalmente en combinación con cualquiera de alumbre, QS-21 y MPL y todas las combinaciones de los mismos.

5

X. Administración pasiva de anticuerpos

Los agentes terapéuticos incluyen anticuerpos que se unen específicamente con un epítipo que comprende X_1EDX_2 en una proteína amiloide agregada, en el que X_1 es H, T, F, S, P, A o cualquier otro resto de aminoácido inmediatamente antes de ED en dicha proteína amiloide agregada, y en el que X_2 es T, S, E, R, I, V, F, A o cualquier otro resto de aminoácido inmediatamente después de ED en dicha proteína amiloide agregada, incluyendo epítipos dentro de péptidos amiloides tales como AA. Los anticuerpos usados para administración pasiva pueden ser anticuerpos que se unen con epítipos C terminales o N terminales de AA. Otras proteínas amiloides además de proteína amiloide A del Suero incluyen proteína amiloide A del suero, proteína de cadena ligera de inmunoglobulina tal como, por ejemplo, $\lambda 6$ Wil o $\nu\kappa$, polipéptido precursor de amiloide de islotes humanos (IAPP), péptido beta amiloide, transtiretina (TTR) y ApoA1, así como otros enumerados en la Tabla 1 anterior.

10

15

AA se forma por escisión proteolítica de SAA. Los anticuerpos biespecíficos se unen específicamente con neoepítipos de AA que se forman tras la escisión proteolítica de SAA. Los anticuerpos específicos se unen especialmente con un neoepítipo C terminal de AA, especialmente, dichos anticuerpos se unen específicamente con la isoforma alfa de HAA1 dentro de los restos 70-76 (GHGAEDS, SEC ID N°:4), la isoforma beta de HAA1 dentro de los restos 70-76 (GHDAEDS, SEC ID N°: 5), la isoforma gamma de HAA1 dentro de los restos 70-76 (GHDAEDS, SEC ID N°: 5), isoformas alfa y beta de HAA2 dentro de los restos 70-76 (GHGAEDS, SEC ID N°: 10), HAA3 dentro de los restos 70-76 (GDHAEDS, SEC ID N°: 7), HAA4 dentro de los restos 78-84 (STVIEDS, SEC ID N°: 8), AA1 de ratón (MAA1) dentro de los restos 69-75 (GRGHEDT, SEC ID N°: 9), MAA2 dentro de los restos 69-75 (GRGHEDT, SEC ID N°: 9), MAA3 dentro de los restos 62-68 (GHGAEDS, SEC ID N°: 10) y MAA4 dentro de los restos 76-82 (NHGLETL, SEC ID N°: 11). Algunos anticuerpos se unen solamente con un epítipo dentro de uno de estos péptidos. Otros anticuerpos se unen con epítipos dentro de más de uno de estos péptidos. Por ejemplo, algunos anticuerpos se unen específicamente con un péptido GHGAEDS, (SEC ID N°: 4) y un péptido GHDAEDS, (SEC ID N°: 5). Algunos anticuerpos se unen con un péptido GHGAEDS, (SEC ID N°: 4) sin unirse específicamente con un péptido GHDAEDS, (SEC ID N°: 5). Es preferible la unión con al menos uno de los péptidos AA humanos. La unión con al menos uno de los péptidos AA humanos y un péptido de ratón correspondiente es útil porque el mismo anticuerpo puede ensayarse en un modelo animal y posteriormente usarse en seres humanos. Algunos anticuerpos preferidos se unen específicamente con epítipos dentro de los restos 71-76, 72-76, 73-76, 74-76, 70-75, 70-74, 70-73, 70-72, 71-75, 72-75, 73-75, 71-74, 71-73, 72-74 de la isoforma alfa de HAA1 o los restos 70-75, 71-75, 72-75, 73-75, 69-74, 69-73, 69-72, 69-71, 70-74, 71-74, 72-74, 70-73, 70-72 de MAA1. Dichos anticuerpos se unen típicamente de forma específica con depósitos amiloides pero pueden unirse o no con AA soluble. Cuando se dice que un anticuerpo se une específicamente con un epítipo dentro de restos específicos, tales como los restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1, por ejemplo, se entiende que el anticuerpo se une específicamente con un polipéptido que contiene los restos específicos (es decir, restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 en este ejemplo). Dicho anticuerpo no entra en contacto necesariamente con cada resto dentro de los restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1. Tampoco cada sustitución o delección de un único aminoácido dentro de los restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 afecta necesariamente de forma significativa a la afinidad de unión. Dichos anticuerpos de neoepítipos se unen con AA pero no con SAA. La especificidad epitópica de un anticuerpo puede determinarse, por ejemplo, como se describe en el documento WO 00/72880.

20

25

30

35

40

45

Los anticuerpos usados para administración pasiva pueden ser anticuerpos para epítipos N terminales de AA. Los anticuerpos preferidos se unen específicamente con un neoepítipo N terminal de AA, especialmente, dichos anticuerpos se unen específicamente con los restos 1-15 de HAA1 (RSFFSFLGEAFD GAR, (SEC ID N°: 80), los restos 1-15 de HAA2 (RSFFSFLGEAFD GAR, SEC ID N°: 80), los restos 1-15 de HAA3 (QGWLTLKAAGQGAK, SEC ID N°: 81), los restos 1-15 de HAA4 (ESWRSFFKEA, SEC ID N°: 82), los restos 1-15 de MAA1 (GFFSFVHEAFQGAGD, SEC ID N°: 83), los restos 1-15 de MAA2 (GFFSFVHEAFQGAGD, SEC ID N°: 83), los restos 1-9 de MAA3 (EAGQGSRD, SEC ID N°: 84), y los restos 1-14 de MAA4 (WYSFFREAVQGTWD, SEC ID N°: 85). Algunos anticuerpos se unen solamente con un epítipo dentro de uno de estos péptidos. Otros anticuerpos se unen con epítipos dentro de más de uno de estos péptidos. Por ejemplo, algunos anticuerpos se unen específicamente con un péptido RSFFSFLGEAFD GAR, (SEC ID N°: 80) y un péptido QGWLTLKAAGQGAK, (SEC ID N°: 81). Algunos anticuerpos se unen con un péptido RSFFSFLGEAFD GAR, (SEC ID N°: 80) sin unirse específicamente con un péptido QGWLTLKAAGQGAK, (SEC ID N°: 81). Es preferible la unión con al menos uno de los péptidos AA humanos. La unión con al menos uno de los péptidos AA humanos y un péptido de ratón correspondiente es útil porque el mismo anticuerpo puede ensayarse en un modelo de ratón y usarse posteriormente en seres humanos.

50

55

60

Algunos anticuerpos se unen específicamente con un epítipo que consiste en dicho X_1EDX_2 . Preferentemente dichos anticuerpos se unen específicamente con dicho epítipo en una proteína amiloide agregada. Algunos de dichos anticuerpos se unen preferentemente de forma específica con una proteína amiloide agregada en relación con la forma monomérica de dicha proteína amiloide. En algunos anticuerpos, X_1 es H, T, F, S, P o A y X_2 es T, S, E,

65

D, R, I, V, F o A. En algunos de dichos anticuerpos, cuando X₁ es H, X₂ es T o A; cuando X₁ es A, X₂ es S, T, E o V; cuando X₁ es T, X₂ es E; cuando X₁ es F, X₂ es D; cuando X₁ es S, X₂ es E, F o A; y cuando X₁ es P, X₂ es E, I o F. En algunos anticuerpos, X₁ es H, T, F, S, P o A y X₂ es T, S, E, D, R, I, V, F o A, a condición de que si X₁ es A, X₂ no es V. En algunos anticuerpos, cuando X₁ es A, X₂ es S, T o E.

Algunos anticuerpos se unen específicamente con un epítipo que comprende la secuencia de aminoácidos GHEDT, (SEC ID N° 3), HEDT, (SEC ID N°: 12), AEDS, (SEC ID N°: 13), AEDT, (SEC ID N°: 14), HEDA, (SEC ID N°: 15), TEDE, (SEC ID N°: 16), FEDD, (SEC ID N°: 17), SEDE, (SEC ID N°: 18), AEDE, (SEC ID N°: 19), PEDE, (SEC ID N°: 20), PEDI, (SEC ID N°: 21), PEDF, (SEC ID N°: 22), AEDV, (SEC ID N°: 23), SEDF, (SEC ID N°: 24) o SEDA, (SEC ID N°: 25).

Algunos anticuerpos se unen específicamente con un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en GHEDT, (SEC ID N°: 3), HEDT, (SEC ID N°: 12), AEDS, (SEC ID N°: 13), AEDT, (SEC ID N°: 14), HEDA, (SEC ID N°: 15), TEDE, (SEC ID N°: 16), FEDD, (SEC ID N°: 17), SEDE, (SEC ID N°: 18), AEDE, (SEC ID N°: 19), PEDE, (SEC ID N°: 20), PEDI, (SEC ID N°: 21), PEDF, (SEC ID N°: 22), SEDF, (SEC ID N°: 24) y SEDA, (SEC ID N°: 25). Algunos anticuerpos se unen específicamente con un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en GHEDT, (SEC ID N°: 3), HEDT, (SEC ID N°: 12), AEDS, (SEC ID N°: 13), AEDT, (SEC ID N°: 14), HEDA, (SEC ID N°: 15) y TEDE, (SEC ID N°: 16).

Algunos anticuerpos se inducen para un péptido que comprende GHEDT, (SEC ID N°: 3), tal como, por ejemplo, 2A4, 7D8 y 8G9, o son versiones humanizadas o quiméricas de los mismos.

Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Los sueros policlonales típicamente contienen poblaciones mixtas de anticuerpos que se unen específicamente con varios epítopos a lo largo de la longitud de AA. Sin embargo, los sueros policlonales pueden ser específicos para un segmento particular de AA, tales como los restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1. Los anticuerpos preferidos son quiméricos o humanizados (véase Queen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033 (1989) y documentos WO 90/07861, US 5.693.762, US 5.693.761, US 5.585.089, US 5.530.101 y Winter, US 5.225.539), o humanos (Lonberg *et al.*, documentos WO 93/12227 (1993); US 5.877.397, US 5.874.299, US 5.814.318, US 5.789.650, US 5.770.429, US 5.661.016, US 5.633.425, US 5.625.126, US 5.569.825, US 5.545.806, Nature 148, 1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucheralapati, WO 91/10741 (1991)). Un enfoque alternativo para inmunizar un anticuerpo, también conocido como revestimiento, se describe en el documento US 6.797.492. Están disponibles varios anticuerpos de ratón de diferentes especificidades de unión como materiales de partida para preparar anticuerpos humanizados.

Son anticuerpos humanizados representativos el anticuerpo 7D8 de versión humanizada (Número de Referencia de ATCC PTA-9468), anticuerpo 7D29 de versión humanizada, anticuerpo 7D19 de versión humanizada, anticuerpo 7D47 de versión humanizada, anticuerpo 7D39 de versión humanizada, anticuerpo 7D66 de versión humanizada, anticuerpo 8G9 de versión humanizada, anticuerpo 8G3 de versión humanizada, anticuerpo 8G4 de versión humanizada, anticuerpo 8G51 de versión humanizada, anticuerpo 8G22 de versión humanizada, anticuerpo 8G30 de versión humanizada, anticuerpo 8G46 de versión humanizada, anticuerpo 2A4 de versión humanizada (Número de Referencia de ATCC PTA-9662), anticuerpo 2A20 de versión humanizada, anticuerpo 2A44 de versión humanizada, anticuerpo 2A77 de versión humanizada, anticuerpo 2A13 de versión humanizada, y anticuerpo 2A14 de versión humanizada. Se depositaron hibridomas que producían el anticuerpo 7D8 (JH80 7D8.29.19.47) y el anticuerpo 2A4 (JH80 2A4.20.44077) el 4 de septiembre de 2008 y el 17 de diciembre de 2008, respectivamente, en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), localizada en la actualidad en 10801 University Boulevard, Manassas, VA20110-2209, según las cláusulas del Tratado de Budapest para el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para el Fin de Procedimiento de Patente ("Tratado de Budapest"). La ATCC ha asignado al hibridoma que produce 7D8 el N° de Referencia de ATCC PTA-9468, y al hibridoma que produce 2A4 el N° de Referencia de ATCC PTA-9662.

Se prefiere IgG1 de isotipo humano para anticuerpos para la región C terminal de AA debido a que tiene la mayor afinidad de isotipos humanos por el receptor FcRI en células fagocíticas. Algunos anticuerpos se unen específicamente con AA con una afinidad de unión mayor de o igual a aproximadamente 10⁷, 10⁸, 10⁹ o 10¹⁰ M⁻¹.

La inmunización activa con fragmentos de AA puede combinarse con administración pasiva de anticuerpos. Los ejemplos de combinaciones específicas incluyen fragmentos AA que comprenden los restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente con un epítipo dentro de los restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente con un epítipo dentro de los restos 71-76 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente con un epítipo dentro de los restos 72-76 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente con un epítipo dentro de los restos 73-76 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente con un epítipo dentro de los restos 74-76 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente con un epítipo dentro de los restos 70-75 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que

comprenden los restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente con un epítipo dentro de los restos 70-74 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente con un epítipo dentro de los restos 70-73 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente con un epítipo dentro de los restos 70-72 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente con un epítipo dentro de los restos 71-75 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente con un epítipo dentro de los restos 72-75 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente con un epítipo dentro de los restos 73-75 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente con un epítipo dentro de los restos 73-75 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente con un epítipo dentro de los restos 71-74 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente con un epítipo dentro de los restos 71-73 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente con un epítipo dentro de los restos 72-74 de la isoforma alfa de HAA1. Adicionalmente, pueden combinarse fragmentos AA que comprenden los restos 71-76, 72-76, 73-76, 74-76, 70-75, 70-74, 70-73, 70-72, 71-75, 72-75, 73-75, 71-74, 71-73, 72-74 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente con un epítipo dentro de los restos 71-76, 72-76, 73-76, 74-76, 70-75, 70-74, 70-73, 70-72, 71-75, 72-75, 73-75, 71-74, 71-73, 72-74 de la isoforma alfa de HAA1. Pueden combinarse fragmentos AA que comprenden los restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1, los restos 70-76 de la isoforma beta de HAA1, los restos 70-76 de la isoforma gamma de HAA1, los restos 70-76 de las isoformas alfa y beta de HAA2, los restos 69-75 de MAA1, los restos 69-75 de MAA2 o los restos 62-68 de MAA3 con anticuerpos que se unen específicamente con un epítipo dentro de los restos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1, los restos 70-76 de la isoforma beta de HAA1, los restos 70-76 de la isoforma gamma de HAA1, los restos 70-76 de las isoformas alfa y beta de HAA2, los restos 69-75 de MAA1, los restos 69-75 de MAA2 o los restos 62-68 de MAA3.

Algunos de los anticuerpos descritos anteriormente no se unen específicamente con la forma monomérica o precursora de la proteína amiloide. Algunos de dichos anticuerpos se unen específicamente con un neopítipo generado tras la escisión de una proteína precursora que da como resultado una proteína amiloide. Por ejemplo, algunos anticuerpos se unen específicamente con los restos C terminales de –HEDT de fibrillas AA de ratón (SEC ID N°: 12), pero no se unen específicamente con un péptido que se extiende a la parte no amiloide de SAA (GHEDTMADQE, SEC ID N°: 61). Algunos anticuerpos se unen específicamente con un epítipo conformacional. Algunos de dichos epítipos conformacionales son lineales. Algunos de dichos epítipos conformacionales se exponen cuando una proteína amiloide entra en una estructura agregada (por ejemplo, fibrilar) o se desnaturaliza parcialmente. Los ejemplos de dichos anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales murinos 2A4 (Número de Referencia de ATCC PTA-9662), 8G9 y 7D8 (Número de Referencia de ATCC PTA-9468), formas humanas, humanizadas y quiméricas de los mismos, otros anticuerpos que se unen específicamente con el mismo epítipo que 2A4, 8G9 o 7D8, y fragmentos de unión a antígeno de cualquiera de dichos anticuerpos. Algunos anticuerpos se unen específicamente con una proteína amiloide que comprende la secuencia de aminoácidos ED. Algunos anticuerpos se unen específicamente con una proteína amiloide seleccionada del grupo que consiste en proteína de cadena ligera de inmunoglobulina, polipéptido precursor amiloide de islotes humanos (IAPP), péptido beta amiloide, trastiretina (TTR) y ApoA1.

Se sabe que la unidad estructural de anticuerpo básica comprende un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena “ligera” (aproximadamente 25 kDa) y una cadena “pesada” (aproximadamente 50-70 kDa). La parte amino terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento de antígenos. La parte carboxilo terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora.

1. Anticuerpos

La divulgación incluye anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, así como anticuerpos pegilados y fragmentos de anticuerpo, así como anticuerpos con función efectora alterada (por ejemplo, reducida o eliminada), por ejemplo, anticuerpos que comprenden mutaciones o restos sustituidos en la región Fc. Los ejemplos de partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')₂ tri-Fab', Fab', Fv, scFv, di-Fab' que pueden generarse tratando el anticuerpo con una enzima tal como pepsina o producirse por técnicas de ingeniería recombinante reconocidas en este campo. Los fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno adicionales incluyen fragmentos de anticuerpos terapéuticos, incluyendo fragmentos de anticuerpos pegilados tales como Fab' PEGilado y di-Fab' PEGilado. Se describen ejemplos de mutantes de función efectora en la Patente de Estados Unidos N° 5.624.821. Algunos anticuerpos tienen afinidad de unión reducida por el receptor Fc gamma RI. Los anticuerpos mutantes de función efectora incluyen anticuerpos que comprenden mutaciones en la región bisagra. Algunos anticuerpos IgG mutantes comprenden una mutación en la región constante de cadena pesada en una o más de las posiciones 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322. En algunos anticuerpos uno o más

de los restos 234, 236 y 237 se sustituye con alanina. En algunos anticuerpos, el resto 235 se sustituye con glutamina. En algunos anticuerpos, el resto 297 se sustituye con alanina. En algunos anticuerpos, los restos 318, 320 y 322 se sustituyen con alanina. En algunos anticuerpos, el resto 318 se sustituye con valina. En algunos anticuerpos, el resto 322 se sustituye con glutamina. Los anticuerpos con función efectora potencial incluyen anticuerpos mutantes individuales S239D e I332E y dobles y triples S239D/I332E y S239D/I332E/A330L (numeración de Kabat).

2. Anticuerpos policlonales

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

3. Anticuerpos monoclonales

Cualquiera de los muchos protocolos bien conocidos usados para fusionar linfocitos y líneas celulares inmortalizadas puede aplicarse para el fin de generar un anticuerpo monoclonal (véase, por ejemplo, Galfre *et al.* (1977) *Nature* 266: 55052; Gefer *et al.* *Somatic Cell Genet.*, mencionado anteriormente; Lerner, *Yale J. Biol. Med.*, mencionado anteriormente; Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, mencionado anteriormente). Además, el trabajador habitualmente experto en la materia apreciará que existen muchas variaciones de dichos métodos que también serían útiles. Típicamente, la línea celular inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma) deriva de la misma especie de mamífero que los linfocitos. Por ejemplo, pueden prepararse hibridomas murinos fusionando linfocitos de un ratón inmunizado con una preparación inmunogénica de la presente invención con una línea celular de ratón inmortalizada. Son líneas celulares inmortales preferidas las líneas celulares de mieloma de ratón que son sensibles a medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"). Puede usarse cualquiera de varias líneas celulares de mieloma como un compañero de fusión de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14. Estas líneas de mieloma están disponibles de ATCC. Típicamente, las células de mieloma de ratón sensibles a HAT se fusionan con esplenocitos de ratón usando polietilenglicol ("PEG"). Las células de hibridoma resultantes de la fusión se seleccionan después usando medio HAT, que destruye células de mieloma no fusionadas y fusionadas de forma no productiva (los esplenocitos no fusionados mueren después de varios días debido a que no se transforman). Se detectan células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal explorando los sobrenadantes de cultivo de hibridoma con respecto a anticuerpos que se unen con un antígeno diana, por ejemplo, A β , usando un ensayo de ELISA convencional.

4. Anticuerpos recombinantes

Como alternativa a la preparación de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales, puede identificarse un anticuerpo monoclonal y aislarse explorando una biblioteca de inmunoglobulina combinatoria recombinante (por ejemplo, una biblioteca de presentación en fagos de anticuerpos) con un antígeno diana para aislar de este modo miembros de la biblioteca de inmunoglobulinas que se unen con el antígeno diana. Están disponibles en el mercado kits para generar y explorar bibliotecas de presentación en fagos (por ejemplo, el *Sistema de Anticuerpos de Fase Recombinante* de Pharmacia, N° de Catálogo 27-9400-01; y el *Kit de Presentación en Fagos SurfZAP™* de Stratagene, N° de Catálogo N° 240612). Adicionalmente, pueden encontrarse ejemplos de métodos y reactivos particularmente susceptibles para uso en la generación y exploración de bibliotecas de presentación de anticuerpos, por ejemplo, en Ladner *et al.* Patente de Estados Unidos N° 5.223.409; Kang *et al.* Publicación Internacional de PCT N° WO 92/18619; Dower *et al.* Publicación Internacional de PCT N° WO 91/17271; Winter *et al.* Publicación Internacional de PCT WO 92/20791; Markland *et al.* Publicación Internacional de PCT N° WO 92/15679; Breitling *et al.* Publicación Internacional de PCT WO 93/01288; McCafferty *et al.* Publicación Internacional de PCT N° WO 92/01047; Garrard *et al.* Publicación Internacional de PCT N° WO 92/09690; Ladner *et al.* Publicación Internacional de PCT N° WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9: 1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3: 81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246: 1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12: 725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 226: 889-896; Clarkson *et al.* (1991) *Nature* 352: 624-628; Gram *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9: 1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc. Acid Res.* 19: 4133-4137; Barbas *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7978-7982; y McCafferty *et al.* *Nature* (1990) 348: 552-554.

5. Anticuerpos quiméricos y humanizados

Adicionalmente, se describen anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden partes tanto humanas como no humanas, que pueden realizarse usando técnicas de ADN recombinante convencionales.

La expresión “inmunoglobulina humanizada” o “anticuerpo humanizado” se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo que incluye al menos una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo humanizada (es decir, al menos una cadena ligera o pesada humanizada). La expresión “cadena de inmunoglobulina humanizada” o “cadena de anticuerpo humanizado” (es decir, una “cadena ligera de inmunoglobulina humanizada” o “cadena pesada de inmunoglobulina humanizada”) se refiere a una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo (es decir, una cadena ligera o pesada, respectivamente) que tiene una región variable que incluye una región marco conservada variable sustancialmente de una inmunoglobulina o un anticuerpo humano y regiones determinantes de complementariedad (CDR) (por ejemplo, al menos una CDR, preferentemente dos CDR, más preferentemente tres CDR) sustancialmente de una inmunoglobulina o un anticuerpo no humano, e incluye además regiones constantes (por ejemplo, al menos una región constante o parte de la misma, en el caso de una cadena ligera, y tres regiones constantes en el caso de una cadena pesada). La expresión “región variable humanizada” (por ejemplo, “región variable de cadena ligera humanizada” o “región variable de cadena pesada humanizada”) se refiere a una región variable que incluye una región marco conservada variable sustancialmente de una inmunoglobulina o un anticuerpo humano y regiones determinantes de complementariedad (CDR) sustancialmente de una inmunoglobulina o un anticuerpo no humano.

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

En consecuencia, todas las regiones o restos de una inmunoglobulina o un anticuerpo humanizado, o de una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo humanizada, excepto las CDR, son sustancialmente idénticas a las regiones o los restos correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulina humana nativa. La expresión “región correspondiente” o “resto correspondiente” se refiere a una región o un resto en una segunda secuencia de aminoácidos o nucleótidos que ocupa la misma posición (es decir, equivalente) que una región o resto en una primera secuencia de aminoácidos o nucleótidos, cuando las primera y segunda secuencias se alinean de forma óptima para fines de comparación.

La expresión “identidad significativa” significa que dos secuencias polipeptídicas, cuando se alinean de forma óptima, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten al menos 50-60 % de identidad de secuencia, preferentemente el menos 60-70 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos 70-80 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos 80-90 % de identidad de secuencia, aún más preferentemente al menos 90-95 % de identidad de secuencia, e incluso más preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia o más (por ejemplo, 99 % de identidad de secuencia o más). La expresión “identidad sustancial” significa que dos secuencias polipeptídicas, cuando se alinean de forma óptima, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten al menos 80-90 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos 90-95 % de identidad de secuencia, y más preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia o más (por ejemplo, 99 % de identidad de secuencia o más). Para comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros de programa de algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula después el porcentaje de identidad de secuencias para la secuencia o las secuencias de ensayo en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros de programa designados.

Puede realizarse alineamiento óptimo de secuencias para comparación, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección visual (véase en general Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*). Un ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de

identidad de secuencia y la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). Está disponible públicamente software para realizar análisis de BLAST a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (públicamente accesible a través del servidor de Internet del NCBI de los Institutos Nacionales de Salud). Típicamente, pueden usarse parámetros de programa por defecto para realizar la comparación de secuencias, aunque también pueden usarse parámetros adaptados. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915 (1989)).

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

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

La expresión "inmunoglobulina quimérica" o anticuerpo se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo cuyas regiones variables derivan de una primera especie y cuyas regiones constantes derivan de una segunda especie. Pueden construirse inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, por ejemplo por ingeniería genética, a partir de segmentos génicos de inmunoglobulina que pertenecen a una especie diferente. No se pretende que las expresiones "inmunoglobulina inmunizada" o "anticuerpo humanizado" abarquen inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, como se define posteriormente. Aunque las inmunoglobulinas o los anticuerpos humanizados son quiméricos en su construcción (es decir, comprenden regiones de más de una especie de proteína), incluyen características adicionales (es decir, regiones variables que comprenden restos de CDR donantes y restos de marco conservado aceptores) no halladas en inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, como se define en el presente documento.

Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse por técnicas de ADN recombinante conocidas en este campo, por ejemplo usando métodos descritos en Robinson *et al.* Solicitud Internacional N° PCT/US86/02269; Akira, *et al.* Solicitud de Patente Europea 184.187; Taniguchi, M., Solicitud de Patente Europea 171.496; Morrison *et al.* Solicitud de Patente Europea 173.494; Neuberger *et al.* Publicación Internacional de PCT N° WO 86/01533; Cabilly *et al.* Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Cabilly *et al.* Solicitud de Patente Europea 125.023; Better *et al.* (1988) Science 240: 1041-1043; Liu *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443; Liu *et al.* (1987) J. Immunol. 139: 3521-3526; Sun *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218; Nishimura *et al.* (1987) Canc. Res. 47: 999-1005; Wood *et al.* (1985) Nature 314: 446-449; y Shaw *et al.* (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553-1559; Morrison, S. L. (1985) Science 229: 1202-1207; Oi *et al.* (1986) BioTechniques 4: 214; Winter Patente de Estados Unidos 5.225.539; Jones *et al.* (1986) Nature 321: 552-525; Verhoeyan *et al.* (1988) Science 239: 1534; y Beidler *et al.* (1988) J. Immunol. 141: 4053-4060. Los agentes terapéuticos también incluyen miméticos de anticuerpo tales como miméticos de región determinante de complementariedad (CDR).

6. Anticuerpos humanos de animales transgénicos y presentación en fagos

Como alternativa, es posible ahora producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras su inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de región de unión de cadena pesada de anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de producción de anticuerpos endógena. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal da como resultado la

producción de anticuerpos humanos tras su exposición a antígeno. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 6.150.584; 6.114.598; y 5.770.429.

5 También pueden derivar anticuerpos completamente humanos de bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)). También pueden obtenerse anticuerpos policlonales quiméricos a partir de bibliotecas de presentación en fagos (Buechler *et al.* Patente de Estados Unidos N° 6.420.113).

10 7. Anticuerpos biespecíficos, polipéptidos de fusión de anticuerpos y anticuerpos monocatenarios

Los anticuerpos biespecíficos (BsAb) son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Dichos anticuerpos pueden derivar de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos F(ab)²). Se conocen en la técnica métodos para realizar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein *et al.*, Nature, 305: 537-539 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diferentes moléculas de anticuerpo (véase, documento WO 93/08829 y en Traunecker *et al.*, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991)).

20 Los anticuerpos biespecíficos también incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse con avidina, el otro con biotina u otra carga útil. Pueden prepararse anticuerpos heteroconjugados usando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Los agentes de entrecruzamiento adecuados se conocen bien en la técnica, y se desvelan en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980, junto con varias técnicas de entrecruzamiento.

25 En otro aspecto más, el anticuerpo puede fusionarse, química o genéticamente, con una carga útil tal como un resto reactivo, detectable o funcional, por ejemplo, una inmunotoxina para producir un polipéptido de fusión de anticuerpo. Dichas cargas útiles incluyen, por ejemplo, inmunotoxinas, productos quimioterapéuticos y radioisótopos, todos los cuales se conocen bien en la técnica.

30 Los anticuerpos monocatenarios también son adecuados para estabilización de acuerdo con la invención. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de cadena ligera (VL) con un enlazador, que permite que todas las regiones variables interaccionen entre sí y recrear el bolsillo de unión a antígeno del anticuerpo parental del que derivan las regiones VL y VH. Véase Gruber *et al.*, J. Immunol., 152: 5368 (1994).

35 Se entiende que cualquiera de las moléculas polipeptídicas anteriores, solas o en combinación, son adecuadas para la preparación como formulaciones estabilizadas de acuerdo con la invención.

40 XI. Sujetos susceptibles de tratamiento

Los sujetos o pacientes susceptibles de tratamiento incluyen individuos en riesgo de enfermedad pero que no muestran síntomas, así como pacientes que presentan síntomas en la actualidad. Por lo tanto, los presentes tratamientos pueden administrarse de forma profiláctica a la población general sin necesidad de ninguna evaluación del riesgo del paciente objeto. Los presentes tratamientos son especialmente útiles para individuos que no tienen un riesgo genético conocido de trastornos autoinmunitarios. Dichos individuos incluyen los que tienen parientes que han experimentado esta enfermedad y aquellos cuyo riesgo se determina por análisis de marcadores genéticos o bioquímicos.

50 Los pacientes que padecen amiloidosis AA pueden ser asintomáticos durante un periodo de tiempo prolongado. Por lo tanto, el diagnóstico clínico de amiloidosis AA con frecuencia se retarda o no se realiza hasta que los depósitos amiloides son extensivos. Para los pacientes que son sintomáticos, se estima que solamente se han diagnosticado el 53 % de los casos. Véase L. E. K. Consulting, Independent Market Research (2003).

55 La divulgación proporciona tratamiento o consecución de profilaxis de una enfermedad caracterizada por la deposición de una proteína amiloide tal como, por ejemplo, las enfermedades descritas anteriormente, incluyendo las enumeradas en la Tabla 1. Algunos aspectos son útiles para tratar o efectuar profilaxis de una enfermedad caracterizada por la deposición de una proteína amiloide que comprende la secuencia de aminoácidos ED. En algunos casos si la proteína amiloide comprende la secuencia de aminoácidos AEDV, entonces el anticuerpo no se administra para tratar o efectuar profilaxis de enfermedad de Alzheimer o deterioro cognitivo leve. La proteína amiloide puede ser cualquiera de las proteínas amiloides descritas anteriormente, incluyendo las enumeradas en la Tabla 1, tales como, por ejemplo, proteína amiloide A del suero, proteína de cadena ligera de inmunoglobulina, tal como, por ejemplo V λ 6 Wil o V κ , polipéptido precursor amiloide de islotes humanos (IAPP), péptido beta amiloide, transtiretina (TTR) o ApoA1.

65

La presente divulgación es especialmente útil para individuos que no tienen un riesgo conocido de, se sospecha que tienen o se les ha diagnosticado amiloidosis AA o amiloidosis AL. Dichos individuos incluyen pero sin limitación los que tienen enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades inflamatorias heredadas e infecciones microbianas crónicas, tales como artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondilitis anquilosante, psoriasis, artropatía psoriásica, síndrome de Reiter, enfermedad de Still del Adulto, síndrome de Behcet, enfermedad de Crohn, Fiebre Mediterránea Familiar, lepra, tuberculosis, bronquiectasia, úlceras por decúbito, pielonefritis crónica, osteomielitis, enfermedad de Whipple, mieloma, macroglobulinemia, discrasia inmunocitaria, gammapatía monoclonal, discrasia oculta. Las afecciones inflamatorias e infecciosas crónicas son prerequisites para el desarrollo de amiloidosis AA y la amiloidosis AL manifestada por amiloidosis nodular local puede asociarse con enfermedades inflamatorias crónicas. Los individuos que tienen riesgo conocido de amiloidosis AA también incluyen pero sin limitación los que tienen neoplasias malignas como linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas del intestino, pulmón y tracto urogenital, carcinoma de células basales y leucemia por tricoleucitos. Adicionalmente, los individuos que tienen riesgo conocido de amiloidosis AA también incluyen pero sin limitación los que tienen trastornos linfoproliferativos tales como Enfermedad de Castleman.

En pacientes tanto asintomáticos como sintomáticos, el tratamiento puede comenzar en cualquier momento antes o después del diagnóstico de las enfermedades amiloides AA o AL subyacentes. El tratamiento implica típicamente múltiples dosificaciones durante un periodo de tiempo. El tratamiento puede controlarse ensayando las respuestas de anticuerpo, linfocitos T activados (un efecto secundario) o linfocitos B al agente terapéutico (por ejemplo, péptido AA), o empleando Escintigrafía SAP radiomarcada a lo largo del tiempo. Si la respuesta cae, se indica una dosificación de refuerzo.

XII. Regímenes de tratamiento

En general, los regímenes de tratamiento implican administrar un agente eficaz para inducir una respuesta inmunogénica a una proteína amiloide, y preferentemente a una forma agregada de dicha proteína amiloide, tal como, por ejemplo, AA o AL. Preferentemente se administra a un paciente un fragmento inmunogénico de AA o AL o un fragmento X₁EDX₂. En aplicaciones profilácticas, se administran composiciones farmacéuticas o medicamentos a un paciente susceptible de, o de otro modo en riesgo de, amiloidosis, tal como amiloidosis AA o amiloidosis AL, en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad, o retardar la aparición de la enfermedad, incluyendo síntomas fisiológicos, bioquímicos, histológicos y/o conductuales de una enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, un agente se administra a un paciente que se sospecha que o que ya padece dicha enfermedad en un régimen que comprende una cantidad y frecuencia de administración del agente suficiente para curar, o al menos parcialmente detener, o inhibir el deterioro de los síntomas de la enfermedad (fisiológicos, bioquímicos, histológicos y/o conductuales), incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad. En algunos casos, la administración de agente reduce o elimina la sintomatología temprana en pacientes que no han desarrollado aún patología de amiloidosis AA o AL característica. Una cantidad adecuada para conseguir tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis terapéutica y/o profilácticamente eficaz. Una combinación de cantidad y frecuencia de dosificación adecuada para conseguir el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como un régimen terapéutica o profilácticamente eficaz. En regímenes tanto profilácticos como terapéuticos, los agentes se administran habitualmente en varias dosificaciones hasta que se ha conseguido una respuesta inmunitaria suficiente. Una dosificación y frecuencia de administraciones adecuada para conseguir tratamiento terapéutico o profiláctico se define como un régimen terapéutica o profilácticamente eficaz. Típicamente, la respuesta inmunitaria del paciente se controla y se proporcionan dosificaciones repetidas si la respuesta inmunitaria comienza a disminuir. La respuesta inmunitaria puede controlarse detectando anticuerpos, por ejemplo, para AA o AL en la sangre del paciente o detectando niveles de, por ejemplo, AA o AL.

Las dosis eficaces de los agentes y composiciones de la presente divulgación para el tratamiento de las afecciones anteriormente descritas varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medio de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otras medicaciones administradas, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Habitualmente, el paciente es un ser humano pero también pueden tratarse mamíferos no humanos incluyendo mamíferos transgénicos. Es necesario valorar las dosificaciones del tratamiento para optimizar la seguridad y eficacia. La cantidad de inmunógeno depende de si también se administra adyuvante, requiriéndose mayores dosificaciones en ausencia de adyuvante. La cantidad de un inmunógeno para administración en ocasiones varía de 1 a 500 µg por paciente y más habitualmente de 5 a 500 µg por inyección para administración humana. Ocasionalmente, se usa una dosis mayor de 1-2 mg por inyección. Típicamente se usan al menos 10, 20, 50 o 100 µg para cada inyección humana. La masa de inmunógeno también depende de la relación de masas del epítipo inmunogénico dentro del inmunógeno con respecto a la masa de inmunógeno en su conjunto. Típicamente, se usan 10⁻³ a 10⁻⁵ micromoles de epítipo inmunogénico por microgramo de inmunógeno. El ritmo de las inyecciones puede variar significativamente de una vez al día, a una vez al año, a una vez cada década. En cualquier día dado en que se proporcione una dosificación de inmunógeno, la dosificación es mayor de 1 µg/paciente y habitualmente mayor de 10 µg/paciente si también se administra adyuvante, y mayor de 10 µg/paciente y habitualmente mayor de 100 µg/paciente en ausencia de adyuvante. Un régimen típico consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo a intervalos temporales, tales como intervalos de 6 semanas.

Otro régimen consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo 1, 2 y 12 meses después. Otro régimen implica una inyección cada dos meses durante toda la vida. Como alternativa, las inyecciones de refuerzo pueden ser de forma irregular como se indica por el control de la respuesta inmunitaria.

- 5 Las dosis para ácidos nucleicos que codifican inmunógenos varían de aproximadamente 10 ng a 1 g, de 100 ng a 100 mg, de 1 µg a 10 mg o de 30 a 300 µg de ADN por paciente. Las dosis para vectores virales infecciosos varían de 10 a 100, o más, viriones por dosis.

10 Para inmunización pasiva con un anticuerpo (en terapias de combinación), la dosificación varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, de 0,5 a menos de 5 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, de 0,5 a 3 mg/kg del peso corporal del hospedador. Por ejemplo las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1 a 10 mg/kg o en otras palabras, 70 mg o 700 mg o dentro del intervalo de 70-700 mg, respectivamente, para un paciente de 70 kg. Como ejemplo adicional, las dosificaciones pueden ser menores de 5 mg/kg de peso corporal o 1,5 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 0,5 a 1,5 mg/kg, preferentemente al menos 1,5 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. En algunos casos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado queda dentro de los intervalos indicados. El anticuerpo se administra habitualmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones individuales pueden ser semanalmente, mensualmente o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles en sangre de anticuerpo para AA en el paciente. En algunos casos, la dosificación se ajusta para conseguir una concentración de anticuerpo en plasma de 1-1000 µg/ml y en algunos métodos 25-300 µg/ml. Como alternativa, puede administrarse anticuerpo como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la mayor semivida, seguido de los anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosificación y frecuencia de la administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un periodo de tiempo largo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, se requiere en ocasiones una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o termina, y preferentemente hasta que el paciente muestra mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A continuación, puede administrarse al paciente un régimen profiláctico.

35 Pueden administrarse agentes para inducir una respuesta inmunitaria por medios parenterales, tópicos, intravenosos, orales, subcutáneos, intraarteriales, intracraneales, intraperitoneales, intranasales o intramusculares para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. La vía más típica de administración de un agente inmunogénico es subcutánea aunque pueden ser igualmente eficaces otras vías. La siguiente vía más común es la inyección intramuscular. Este tipo de inyección se realiza más típicamente en los músculos del brazo o la pierna. En algunos casos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular en el que se han acumulado depósitos, por ejemplo, inyección intracraneal. Se prefiere inyección intramuscular o infusión intravenosa para administración del anticuerpo (en terapias de combinación). En algunos casos, se inyectan anticuerpos terapéuticos particulares directamente en el cráneo. En algunos casos, se administran anticuerpos como una composición o dispositivo de liberación sostenida, tal como un dispositivo MEDIPAD™.

45 Los agentes de la divulgación se administran con frecuencia como composiciones farmacéuticas que comprenden un agente terapéutico activo, es decir, y una diversidad de componentes farmacéuticamente aceptables adicionales. Véase Remington's Pharmaceutical Science (15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980). La forma preferida depende del modo de administración pretendido y la aplicación terapéutica. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, no tóxicos, que se definen como vehículos usados habitualmente para formular composiciones farmacéuticas para administración animal o humana. El diluyente se selecciona para no afectar a la actividad biológica de la combinación. Son ejemplos de dichos diluyentes agua destilada, solución salina tamponada con fosfato fisiológica, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición farmacéutica o formulación también puede incluir otros vehículos, adyuvantes o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

60 Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir macromoléculas grandes, que se metabolizan lentamente tales como proteínas, polisacáridos tales como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (tales como SEPHAROSE™ funcionalizada con látex, agarosa, celulosa y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados lipídicos (tales como gotas de aceite o liposomas). Adicionalmente, estos vehículos pueden actuar como agentes inmunoestimulantes (es decir, adyuvantes).

65 Para administración parenteral, los agentes de la invención pueden administrarse como dosificaciones inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua, aceites, solución salina, glicerol o etanol. Adicionalmente, pueden estar presentes en composiciones sustancias adyuvantes, tales como agentes humectantes

o emulsionantes, tensioactivos, sustancias tamponantes de pH y similares. Otros componentes de composiciones farmacéuticas son los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite mineral. En general, son vehículos líquidos preferidos glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol, particularmente para soluciones inyectables. Los anticuerpos pueden administrarse en forma de una inyección de liberación prolongada o preparación de implante que puede formularse de tal manera que permita una liberación sostenida del principio activo. Una composición ejemplar comprende anticuerpo monoclonal a 5 mg/ml, formulado en tampón acuoso que consiste en L-histidina 50 mM, NaCl 150 mM, ajustado a pH 6,0 con HCl. Las composiciones para administración parenteral son típicamente sustancialmente estériles, isotónicas y se fabrican en condiciones de GMP de la FDA o un cuerpo similar.

Típicamente, se preparan composiciones como inyectables, bien como soluciones o suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de su inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas o micropartículas tales como polilactida, poliglicolida o copolímero para efecto adyuvante potenciado, como se ha analizado anteriormente (véase Langer, *Science* 249, 1527 (1990) y Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 97-119 (1997)). Los agentes de la presente invención puede administrarse en forma de una inyección de liberación prolongada o preparación de implante que puede formularse de tal manera que permita una liberación sostenida o intermitente del principio activo.

Las formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales, intranasales y pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas.

Para supositorios, los aglutinantes y vehículos incluyen, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; dichos supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo de 0,5 % a 10 %, preferentemente 1 %-2 %. Las formulaciones orales incluyen excipientes, tales como usos farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa y carbonato de magnesio. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen 10 %-95 % de principio activo, preferentemente 25 %-70 %.

La aplicación tópica puede dar como resultado suministro transdérmico o intradérmico. La administración tópica puede facilitarse por la coadministración del agente con toxina del cólera o derivados destoxificados o subunidades de los mismos u otras toxinas bacterianas similares (véase Glenn *et al.*, *Nature* 391, 851 (1998)). Puede conseguirse coadministración usando los componentes como una mezcla o como moléculas unidas obtenidas por entrecruzamiento químico o expresión como una proteína de fusión.

Como alternativa, puede conseguirse suministro transdérmico usando un parche cutáneo o usando transferosomas (Paul *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 25, 3521-24 (1995); Cevc *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta* 1368, 201-15 (1998)).

XIII. Regímenes de tratamiento de terapia farmacológica combinatoria

Puede realizarse terapia de combinación sola o junto con otra terapia para tratar o efectuar profilaxis de amiloidosis AA. También puede realizarse terapia de combinación junto con otra terapia que trata o efectúa profilaxis de una enfermedad amiloide subyacente tal como enfermedades inflamatorias, infecciones microbianas crónicas, neoplasias malignas, enfermedades inflamatorias heredadas y trastornos linfoproliferativos. Existe una gran variedad de tratamientos disponibles en uso comercial, en evaluación clínica y en desarrollo preclínico, que podrían seleccionarse para su uso con la invención ahora desvelada para efectuar profilaxis y tratamiento de amiloidosis AA por terapia farmacológica de combinación. Dichos tratamientos pueden ser uno o más compuestos seleccionados de, pero sin limitación, varias categorías importantes, concretamente, (i) fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE; por ejemplo, detoprofeno, diclofenac, diflunisal, etodolac, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, meclofenamato, ácido mefenámico, meloxicam, nabumeona, naproxeno sódico, oxaprozina, piroxicam, sulindac, tolmetina, celecoxib, rofecoxib, aspirina, salicilato de colina, salsalto, y salicilato sódico y magnésico); (ii) esteroides (por ejemplo, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona); (iii) ARME, es decir, fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (por ejemplo, ciclosporina, azatioprina, metotrexato, leflunomida, ciclofosfamida, hidroxiclороquina, sulfasalazina, D-penicilamina, minociclina y oro); o (iv) proteínas recombinantes (por ejemplo, ENBREL® (etanercept, un receptor de TNF soluble) y REMICADE® (infliximab) un anticuerpo quimérico monoclonal anti TNF).

La duración de la terapia de combinación depende del tipo de enfermedad subyacente que se trate, la edad y la condición del paciente, el estadio y el tipo de la enfermedad del paciente, y cómo responde el paciente al tratamiento. El doctor puede observar los efectos de la terapia estrechamente y realizar cualquier ajuste que sea necesario. Adicionalmente, una persona que tenga un mayor riesgo de desarrollar amiloidosis AA (por ejemplo, una persona que esté genéticamente predispuesta o haya tenido previamente un trastorno inflamatorio u otras enfermedades subyacentes) o amiloidosis AL puede recibir tratamiento profiláctico para inhibir o retardar el desarrollo de agregados de AA AL tales como fibrillas.

La dosificación, frecuencia y modo de administración de cada componente de la combinación pueden controlarse de forma independiente. Por ejemplo, un compuesto puede administrarse por vía oral tres veces al día, mientras que el

segundo compuesto puede administrarse por vía intramuscular una vez al día. Puede proporcionarse terapia de combinación en ciclos de activación e inactivación que incluyen periodos de descanso. Los compuestos también pueden formularse juntos de modo que una administración suministre ambos compuestos. La combinación también puede proporcionarse como componentes de un envase farmacéutico. Los fármacos pueden formularse juntos o por separado y en cantidades de dosificación individuales. Cada compuesto se mezcla con una sustancia vehículo adecuada, y está presente en general en una cantidad de 1-95 % en peso del peso total de la composición.

La composición puede proporcionarse en una forma de dosificación que es adecuada para administración oral, parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular, subcutánea), rectal, transdérmica, nasal, vaginal, inhalante u ocular. Por lo tanto, la composición puede estar en forma de, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, granulados, suspensiones, emulsiones, soluciones, geles incluyendo hidrogeles, pastas, pomadas, cremas, parches, pociones, dispositivos de suministro, supositorios, enemas, inyectables, implantes, pulverizaciones o aerosoles. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (19ª ed.) ed. A. R. Gennaro, 1995, Mack Publishing Company, Easton, Pa. y Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick y J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, N.Y.

XIV. Control o diagnóstico de amiloidosis AA o AL

Los medios para controlar o diagnosticar amiloidosis AA o AL incluyen medir las concentraciones en plasma de SAA y proteína reactiva a C, realizar biopsia tisular (renal, rectal, gástrica, gingival, grasa, glándulas salivares, labiales) e histología con tinción de rojo congo y/o inmunotinción con anticuerpos específicos dirigidos contra agregados AA o AL tales como fibrillas. La divulgación posibilita la detección de una respuesta de anticuerpo contra péptido AA en un paciente que padece o es susceptible a Amiloidosis AA. Esto es particularmente útil para controlar un curso de tratamiento que se administra a un paciente. La divulgación puede usarse para controlar tanto el tratamiento terapéutico en pacientes sintomáticos como el tratamiento proliáctico en pacientes asintomáticos. Esto puede implicar en ocasiones determinar un valor de línea basal de una respuesta de anticuerpo en un paciente antes de administrar una dosificación de un agente inmunogénico, y comparar este con un valor para la respuesta inmunitaria después del tratamiento. Un aumento significativo (es decir, mayor que el margen típico de error experimental en mediciones referidas de la misma muestra, expresado como una desviación típica de la media de dichas mediciones) en el valor de la respuesta de anticuerpo señala un resultado de tratamiento positivo (es decir, que la administración del agente ha conseguido o aumentado una respuesta inmunitaria). Si el valor para la respuesta de anticuerpo no cambia significativamente, o se reduce, se indica un resultado de tratamiento negativo. En general, se espera que los pacientes que se someten a un curso de tratamiento inicial con un agente inmunogénico muestren un aumento en la respuesta de anticuerpo con dosificaciones sucesivas, que con el tiempo alcanza una meseta. La administración de agente continúa generalmente mientras aumenta la respuesta de anticuerpo. La consecución de la meseta es un indicador de que la administración de tratamiento puede detenerse o reducirse en su dosificación o frecuencia.

En otros casos, se determina un valor de control (es decir, una media y desviación típica) de una respuesta de anticuerpo para una población de control. Típicamente los individuos en la población de control no han recibido tratamiento previo. Los valores medidos de la respuesta de anticuerpo en un paciente después de administrar un agente terapéutico se comparan después con el valor de control. Un aumento significativo en relación con el valor de control (por ejemplo, mayor de una desviación típica de la media) señala un resultado de tratamiento positivo. Una falta de aumento significativo o una reducción señala un resultado de tratamiento negativo. La administración de agente continúa en general mientras la respuesta de anticuerpo aumenta en relación con el valor de control. Como antes, la consecución de una meseta en relación con valores de control es un indicador de que la administración de tratamiento puede detenerse o reducirse en su dosificación o frecuencia.

En otros casos, un valor de control de la respuesta de anticuerpo (por ejemplo, una media y desviación típica) se determina a partir de una población de control de individuos que se han sometido a tratamiento con un agente terapéutico y cuyas respuestas de anticuerpo han alcanzado una meseta en respuesta al tratamiento. Los valores medidos de respuestas de anticuerpo en un paciente se comparan con el valor de control. Si el nivel medido en un paciente no es significativamente diferente (por ejemplo, más de una desviación típica) del valor de control, el tratamiento puede detenerse. Si el nivel en un paciente está significativamente por debajo del valor de control, es necesaria la administración continuada del agente. Si el nivel en el paciente persiste por debajo del valor de control, entonces puede indicarse un cambio en el régimen de tratamiento, por ejemplo, uso de un adyuvante diferente, fragmento o cambio a administración pasiva.

En otros casos, un paciente que no está recibiendo en la actualidad tratamiento pero que se ha sometido a un ciclo de tratamiento previo se controla con respecto a respuesta de anticuerpos para determinar si se requiere una reanudación del tratamiento. El valor medido de la respuesta de anticuerpo en el paciente puede compararse con un valor de respuesta de anticuerpo previamente alcanzada en el paciente después de un ciclo de tratamiento previo. Una reducción significativa en relación con la medición previa (es decir, mayor que un margen de error típico en mediciones repetidas de la misma muestra) es un indicio de que puede reanudarse el tratamiento. Como alternativa, el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control (media más desviación típica)

determinado en una población de pacientes después de someterse a un ciclo de tratamiento. Como alternativa, el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control en poblaciones de pacientes tratados de forma profiláctica que permanecen sin síntomas de enfermedad, o poblaciones de pacientes tratados de forma terapéutica que muestran alivio de características de enfermedad. En todos estos casos, una reducción significativa en relación con el nivel de control (es decir, más de una desviación típica) es un indicador de que el tratamiento debería reanudarse en un paciente.

Algunos aspectos emplean escintigrafía de componente amiloide P del suero marcado con yodo 123 o marcado con yodo 125 (^{123}I -SAP o ^{125}I -SAP). ^{123}I -SAP o ^{125}I -SAP se inyecta por vía intravenosa a pacientes y se visualiza con una cámara gamma. La Escintigrafía de SAP radiomarcada es una técnica útil para controlar la progresión de amiloidosis en pacientes y evaluar los tratamientos. Es específica para amiloide y puede usarse para controlar de forma cuantitativa la localización y cantidad de depósitos amiloides en pacientes. ^{123}I -SAP y ^{125}I -SAP no se acumulan en sujetos sanos o en pacientes no amiloides. Puede usarse escintigrafía de SAP radiomarcada para controlar la renovación dinámica de amiloide, y puede evaluar la eficacia de los tratamientos dirigidos a la regresión de depósitos amiloides. Además, la escintigrafía de SAP radiomarcada no es invasiva y proporciona una exploración del cuerpo completo. Aspectos de la divulgación implican determinar un valor de línea basal de una respuesta de anticuerpo en un paciente antes de administrar una dosificación de un agente, y comparar esto con un valor para la respuesta inmunitaria después del tratamiento en un paciente. Un aumento significativo (es decir, mayor que el margen típico de error experimental en mediciones repetidas de la misma muestra, expresado como una desviación típica de la media de dichas mediciones) en el valor de la respuesta de anticuerpo señala un resultado de tratamiento positivo (es decir, que la administración del agente ha conseguido o aumentado una respuesta inmunitaria). Si el valor para la respuesta de anticuerpo no cambia significativamente, o se reduce, se indica un resultado de tratamiento negativo. En general, se espera que los pacientes que se sometan a un ciclo de tratamiento inicial con un agente inmunogénico muestren un aumento de la respuesta de anticuerpo con dosificaciones sucesivas, que con el tiempo alcanza una meseta. La administración del agente continúa generalmente mientras está aumentando la respuesta de anticuerpo. La consecución de la meseta es un indicador de que la administración de tratamiento debe detenerse o reducirse en su dosificación o frecuencia.

La muestra tisular para análisis es típicamente sangre, plasma, suero, moco o líquido cefalorraquídeo del paciente. La muestra se analiza para indicación de una respuesta inmunitaria a cualquier forma de péptido AA o AL. La respuesta inmunitaria puede determinarse a partir de la presencia de anticuerpos que se unen específicamente con péptido AA o AL. Los anticuerpos pueden detectarse en un ensayo de unión con un ligando que se une específicamente con los anticuerpos. Típicamente el ligando se inmoviliza. La unión puede detectarse usando un anticuerpo anti idiotípico marcado.

En regímenes de combinación que emplean administración tanto activa como pasiva, pueden usarse enfoques análogos para controlar los niveles de anticuerpo resultantes de la administración pasiva.

También pueden emplearse sistemas para diagnosticar amiloidosis, por ejemplo, administrando a un sujeto un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une con un marcador detectable, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se une específicamente con un epítipo que incluye $X_1\text{EDX}_2$ en una proteína amiloide agregada, en el que X_1 y X_2 son cualquier aminoácido, y detectando la presencia o ausencia del anticuerpo unido o fragmento del mismo. La detección del anticuerpo unido o fragmento apoya un diagnóstico de amiloidosis. Los anticuerpos y fragmentos útiles en el diagnóstico de amiloidosis incluyen los anticuerpos desvelados.

Los anticuerpos o fragmentos de diagnóstico pueden administrarse, por ejemplo, por inyección intravenosa en el cuerpo de un paciente, o directamente al cerebro mediante inyección intracraneal. La dosificación de anticuerpo se determina fácilmente por un experto en la materia. Típicamente, el anticuerpo está marcado, aunque en algunos métodos el anticuerpo no está marcado y se usa un agente de marcaje secundario para unirse con el anticuerpo. La elección de marcador depende del medio de detección. Por ejemplo, un marcador fluorescente es adecuado para la detección óptica. El uso de marcadores paramagnéticos es adecuado para detección topográfica sin intervención quirúrgica. Pueden usarse radiomarcadores incluyendo ^{211}At , ^{212}Bi , ^{67}Cu , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{32}P , ^{212}Pb , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ o ^{90}Y . Dichos marcadores pueden detectarse usando PET o SPECT u otra técnica adecuada.

También puede realizarse diagnóstico comparando el número, tamaño y/o intensidad de loci marcados con valores de línea basal correspondientes. Los valores de línea basal pueden representar los niveles medios en una población de individuos sin enfermedad. Los valores de línea basal también pueden representar niveles previos determinados en el mismo paciente. Por ejemplo, pueden determinarse valores de línea basal en un paciente, y medirse valores a continuación en comparación con los valores de línea basal. Un aumento en los valores en relación con las señales de línea basal apoya un diagnóstico de amiloidosis AA.

Los métodos de diagnóstico pueden usarse para diagnosticar enfermedades de amiloidosis incluyendo amiloidosis AA, amiloidosis AL, enfermedad de Alzheimer, Deterioro Cognitivo Leve, polineuropatía amiloide, fiebre Mediterránea, síndrome de Muckle-Wells, amiloidosis sistémica reactiva asociada con enfermedades inflamatorias sistémicas, mieloma o amiloidosis asociada con macroglobulinemia, amiloidosis asociada con discrasia inmunocitaria, gammapatía monoclonal, discrasia oculta o amiloidosis nodular local asociada con enfermedades

inflamatorias crónicas.

XV. Modelos animales de amiloidosis AA

5 Puede inducirse amiloidosis AA experimentalmente en ratones en los que se aumentan notablemente concentraciones de SAA por inyección de nitrato de plata, caseína o lipopolisacárido. Estos agentes estimulan la producción de citocinas. Véase Skinner *et al.* Lab Invest. 36: 420-427 (1997) y Kisilevsky *et al.* Bailliere's Clin. Immunol. Immunopathol. 8(3) 613-626 (1994). En un periodo de 2 o 3 semanas después del estímulo inflamatorio, los animales desarrollan depósitos de AA sistémicos, como se encuentra en pacientes con amiloidosis AA. Esta fase de retardo se acorta drásticamente cuando se proporciona a los ratones, de forma conjunta, una inyección intravenosa de proteína extraída de bazo e hígado de ratón cargado de amiloide AA. Véase Axelrad *et al.* Lab Invest. 47(2): 139-46 (1982). La actividad acelerante amiloidogénica de dichas preparaciones se denominó "factor potenciador amiloide" (AEF). Lundmark *et al.* indica que el principio activo de AEF es inequívocamente la fibra AA en sí misma. Además, han demostrado que este material es extremadamente potente, estando activo en dosis menores de 1 ng, y que conservó su actividad biológica durante un periodo de tiempo considerable. Notablemente, el AEF también era eficaz cuando se administró por vía oral. Concluyeron que AA y quizás otras formas de amiloidosis son enfermedades transmisibles, similares a los trastornos asociados a priones. Véase Lundmark *et al.* Proc. Nat. Acad. Sci. 99: 6979-6984 (2002).

20 También puede inducirse amiloide AA en cepas transgénicas de ratones que portan el gen de interleucina 6 humano bajo el control del promotor de metalotioneína I dando como resultado concentraciones notablemente aumentadas de SAA y desarrollando amiloide en el bazo, hígado y riñones a los 3 meses de edad. En el momento de la muerte a aproximadamente 8-9 meses, los órganos de estos ratones transgénicos tienen depósitos amiloides extensivos. Véase Solomon *et al.*, Am. J. Pathol. 154(4): 1267-1272 (1999).

25 El Modelo de Ratón Transgénico de Enfermedad Amiloide Inducida Rápidamente Transgénica (TRIAD) es una mejora con respecto al modelo de ratón transgénico anteriormente descrito. Los ratones TRIAD portan el gen de interleucina 6 humana bajo el control del promotor de histocompatibilidad H-2L^D. La administración de AEF a ratones TRIAD de 8 semanas de edad da como resultado depósitos amiloides AA esplénicos y hepáticos prominentes en un periodo de 3 a 4 semanas. Posteriormente, este proceso progresa a otros órganos, lo que conduce a la muerte 4-6 semanas después. El desarrollo de la amiloidosis sistémica se acelera en comparación con el modelo de ratón transgénico anteriormente descrito. Véase University of Tennessee Research Corporation, documento WO 01/77167, Pharmacopeia, documento WO 95/35503 y Scripps, documento WO 95/30642 Wall *et al.* Amyloid 12(3): 149-156 (2005).

35 El titi común (*Callithrix jacchus*) es una primate del Nuevo Mundo pequeño nativo de Brasil que se ha usado extensivamente en investigación biomédica. Ludlage *et al.* indica que se descubrió que el titi común tenía depósitos amiloides en uno o más órganos, incluyendo el hígado, glándulas adrenales, riñones e intestino. Los autores postulan que factores hereditarios podrían ser responsables del desarrollo de amiloidosis AA en este primate. A este respecto, el titi común podría actuar como un único modelo experimental para el estudio de la patogénesis y la terapia de AA y otros trastornos amiloides sistémicos. Véase Ludlage *et al.* Vet Pathol 42: 117-124 (2005).

45 La especie Shar Pei de perro, una raza que tiene una secuencia de AA con el motivo -AEDS y que es particularmente susceptible a amiloidosis AA, proporciona un modelo de origen natural de AA sistémico en el que evaluar nuevas aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas de anticuerpos específicos de amiloide AA y otros compuestos.

Ejemplos

50 Ejemplo I. Fragmentos AA.

Se sintetizaron péptidos correspondientes a los aminoácidos 71-75 - GHEDT, como se describe en Yamamoto y Migita Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 2915-2919 por AnaSpec, San Jose, CA, Estados Unidos. Se indujeron anticuerpos policlonales (Pab) AA y se aisló la fracción de inmunoglobulina, como se ha descrito previamente en Bard, F. *et al.*, (2000) Nat. Med. 6, 916-919.

Ejemplo II. Inmunógeno para preparación de anticuerpos murinos.

60 El epítipo usado fue GHEDT, (SEC ID N°: 3) con un enlazador CG en su extremo N terminal. El péptido EPRB-39 que contiene el epítipo se acopla con anticuerpo anti ratón de oveja. EPRB-39 es obtenido de Anasec, San Jose, CA. Los anticuerpos producidos parecen ser específicos de neoepítopos por que no se unen específicamente con un péptido que abarca la región GHEDTIADQE, (SEC ID N°: 89).

Ejemplo III. Procedimientos de inmunización.

Se inyectó por vía intraperitoneal a ratones A/J de seis semanas de edad 50 µg de IgG anti ratón de oveja/EPRB-39 con Adyuvante Completo de Freund (CFA) seguido de adyuvante Incompleto de Freund (IFA) una vez cada dos semanas para un total de tres inyecciones. Tres días antes de la fusión, se inyectó en la vena de la cola 50 µg de IgG SAM EPRB-39 en 90 µl de PBS. El título se estimó a 1/10000 de ELISA con alto fondo.

JH80 es el número de fusión para EPRB-39. La siguiente es una lista de los clones y clones de dilución limitante que están activos:

7D8.29.19.47*	39, 66	IgG2b k
8G9.3.4.51.22*	30, 46	IgG2b k
2A4.20.44.77*	13, 14	IgG2b k

7D47, 8G9 y 2A77 indican subclones preferidos. Los anticuerpos producidos parecen ser específicos de neopéptido porque no reaccionan con un péptido que abarca el sitio de escisión C terminal de SAA.

Ejemplo IV. Unión de anticuerpo con AA agregado y soluble.

Se realizaron títulos de suero (determinados por dilución en serie) y unión de anticuerpo monoclonal con AA agregado por ELISA como se ha descrito previamente en Schenk D. *et al.*, (1999) Nature 400, 173-177. AA soluble se refiere a las fibrillas de AA sonicadas en dimetil sulfóxido. Se incubaron diluciones en serie de anticuerpo con 50.000 cpm de ¹²⁵I-AA durante una noche a temperatura ambiente. Se incubaron 50 µl de una suspensión que contenía proteína A sepharose 75 mg/ml (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia)/200 µg de IgG de conejo anti ratón (H+L) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, Estados Unidos) con los anticuerpos diluidos durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron dos veces y se contaron en un contador gamma Wallac (PerkinElmer Life Science, Grove, IL, Estados Unidos). Todas las etapas se realizaron en tampón de radioinmunoensayo que consiste en Tris 10 mM, NaCl 0,5 M, gelatina 1 mg/ml y Nonidet P-40 0,5 %, pH 8,0.

Ejemplo V. Análisis de la estructura de Vλ6 Wil.

Las secuencias de los genes de línea germinal de cadena ligera de inmunoglobulina Vκ y Vλ humanos expresados son como se ilustra en las Figuras 21 y 22. Con la excepción de los subgrupos κ1a, λ1a, λ3a y λ3c existe un emparejamiento de restos Glu-Asp en las posiciones 81 y 82 en todas las secuencias génicas de línea germinal Vκ y Vλ (Figuras 21 y 22). Además, un segundo emparejamiento Glu-Asp codificado por línea germinal en las posiciones 50 y 51 es único del gen de línea germinal Vλ6. Por lo tanto, Vλ6 Wil contiene los pares Glu-Asp tanto 50-51 como 81-82. Las cadenas laterales de los restos 50 y 51 son ambas accesibles en la superficie de Vλ6 Wil, como se muestra por cristalografía de rayos x (Figura 24). Por el contrario, solamente la cadena lateral de Glu81 está expuesta en superficie y la cadena lateral de Asp82 está parcialmente internada y parece interaccionar (bien por interacciones electrostáticas o bien por enlaces H) con las cadenas laterales de Lys79 y Arg61 (Figura 25).

Basándose en estos análisis de la estructura cristalina de rayos x y la disponibilidad relativa de las cadenas laterales Glu-Asp los Solicitantes concluyen que el Glu81 internado se hace accesible a medida que el dominio entra en una estructura agregada (por ejemplo, fibrilar) (o se desnaturaliza parcialmente), exponiendo de este modo lo que es de otro modo un epítipo críptico, oculto.

Ejemplo VI. Análisis de la unión de anticuerpo monoclonal anti AA con Vλ6.

A. Resonancia de plasmón superficial

Se usó resonancia de plasmón superficial para establecer la cinética de unión de varios anticuerpos monoclonales con fibrillas Vλ6 Wil y monómero. A una concentración de 6,6 nM los 3 anticuerpos se unieron con las fibrillas Vλ6 Wil sintéticas inmovilizadas con una KD de ~ 1 nM, un valor comparable con el hallado para su reactividad con fibrillas AA murinas (Figura 26). El desvío (expresado en UR) durante la fase de unión fue similar para los mAb 7D8 y 2A4 pero fue 50 % menor para 8G9. Esto sugiere que la densidad de este anticuerpo en las fibrillas fue menor que los otros 2 reactivos, ya que las afinidades calculadas fueron similares para los 3 anticuerpos. Un mAb IgG1 actuó como un control y no mostró ninguna unión con fibrillas Vλ6 Wil.

La titulación del mAb 7D8 sobre el intervalo de 6,6 nM a 33,3 nM produjo la reducción esperada en el desvío máximo asociado con *kon* (Figura 27). En general, la cinética de unión fue similar a cada concentración, aunque en estos experimentos piloto el valor KD para 7D8 a 26,6 nM sí difirió del obtenido a las otras concentraciones.

Para evaluar la especificidad de la reacción y asegurar que la unión de los mAb con las fibrillas se produjo mediante la interacción de F(ab)-antígeno clásica (a diferencia de la unión mediada por Fc o adsorción no específica), se adquirieron datos de unión en presencia del péptido inmunógeno (p39) a 20 y 1 µg/ml (Figura 8). El péptido p41 que

no se une con el mAb 7D8 a bajas concentraciones, actuó como un control. En presencia de péptido p41 20 µg/ml, la cinética de unión para mAb 7D8 con fibrillas Vλ6 Wil fue idéntica a 7D8 solo. Por el contrario, el péptido inmunógeno p39 a 1 µg/ml provocó una reducción mayor de doble en el alcance de la unión como se valoró por el desvío de la señal medida (Figura 28). La inhibición de la unión de fibrilla por 7D8 se inhibió casi completamente cuando se usó péptido p39 20 µg/ml. Estos datos indicaron que el mAb 7D8 se unía con fibrillas mediante la región F(ab) de la molécula en la medida en que esta interacción podría inhibirse completamente por el péptido inmunógeno.

La reactividad del mAb 7D8 con monómero Vλ6 inmovilizado en una microplaca se examinó usando el BIAcore. El anticuerpo no reaccionó con la proteína monomérica. Estos datos indican que el sitio de unión reconocido por el mAb 7D8 está presente en fibrillas, pero no en la proteína precursora soluble, lo que implica que el antígeno es de naturaleza conformacional o críptica.

B. Inmunohistoquímica

Se realizó inmunohistoquímica de la siguiente manera: secciones de 6 µm de grosor, cortados a partir de bloques incluidos en parafina, fijados en formalina, se sometieron a y recuperación de antígenos por incubación con CitraPlus (BioGenex, San Ramon, CA) durante 30 minutos a 90 °C. Los tejidos se inmunotiñeron con una solución 3 µg/ml de los mAb 2A4, 7D8 u 8G9. El mAb IgG2a TY11 actuó como un control. Se usó un anticuerpo de caballo anti Ig de ratón conjugado con HRPO (ImmPRESS Universal Reagent, Vector Labs, Burlingame, CA) como el reactivo secundario. Se revelaron portaobjetos usando 3,3'-diaminobencideno (Vector Labs) y se examinaron usando un microscopio Leica DM500. La interacción de los anticuerpos monoclonales con depósitos tisulares amiloides ALκ y ALλ también se estudió usando inmunohistoquímica. Como se ilustra en la Figura 29, se inmunotiñeron depósitos amiloides en la glándula tiroidea de un paciente que estaban compuestos de fragmentos λ2 por 7D8, 2A4 y 8G9. Las áreas de reactividad se correlacionaron con los depósitos amiloides, indicados por la birrefringencia verde-oro vista en la sección tisular teñida con rojo Congo. La reactividad más impactante se consiguió con los mAb 7D8 y 2A4 mientras que 8G9, aunque era positivo, era considerablemente más débil. Estos datos cualitativos se corresponden bien con los análisis de BIAcore en los que 8G9 se unió menos con las fibrillas Vλ6 Wil que los otros dos reactivos (Figura 26). El mAb TY11 de isotipo coincidente que actuó como un control no mostró inmunorreactividad amiloide.

La secuencia de aminoácidos de esta proteína λ2 (SEC ID N°: 86) (mostrada posteriormente) contiene los restos Glu y Asp codificados en línea germinal en la posición 81 y 82, respectivamente.

```

1      11      21      31      35
GSVVIQPPS VSGAPROTVA ISCSGSSSNI GNNAVN WYQQLPEKAP
45      55      65      73      83
KVLIIYYDDL PAGVSDREFG SKSGTSAS LAIRGLQSED EGDYYCAAND
93
DLSLSAL

```

El examen de un depósito tisular amiloide ALκ reveló que 2A4, y en menor grado el 7D8 y 8G9, tenía reactividad positiva. De nuevo hubo concordancia entre la inmunotinción y las regiones amiloides congofílicas, birrefringentes. El mAb TY11 no era reactivo.

C. Captura de imágenes radiológicas de amiloidoma AL usando 7D8 marcado con ¹²⁵I

El modelo experimental *in vivo* de amiloidoma AL se usó para estudiar si el mAb 7D8 radiomarcado capturaría imágenes de amiloide AL humano. La eficacia del radiomarcaje de 7D8, como se determinó por SDS-PAGE, reveló que las cadenas tanto IgH como IgL incorporaban el marcador 1-125, y no se observaron pruebas de bandas asociadas con fragmentación o agregación. La captura de imágenes por SPECT/CT 125 de un ratón que portaba un amiloidoma AL inducido reveló que el anticuerpo marcado con I se localizaba en la masa amiloide localizada en la parte dorsal, inducida, como se demuestra por la acumulación de los anticuerpos radiomarcados en los tejidos amiloides, en relación con los no amiloides (por ejemplo, hígado, corazón, bazo y riñones). El mAb IgG irrelevante radiomarcado no se acumuló en la masa; sin embargo se observó radioyoduro libre que se acumulaba en el tiroides, lo que es indicativo del catabolismo y deshalogenación del anticuerpo IgG. La distribución del mAb ¹²⁵I-7D8 en los ratones portadores de amiloidoma se cuantificó midiendo la actividad asociada con la masa amiloide en comparación con la del hígado, bazo, riñón, estómago, corazón y pulmón. Estos datos confirmaron el estudio de captura de imágenes de SPETC/CT. A las 72 h después de la inyección (momento en el cual se adquirieron imágenes y se recogieron los tejidos), el amiloidoma contenía ~8 % de ID que es ~ 4 veces mayor que el visto en el hígado, el sitio de catabolismo de mAb, y el corazón en el que se esperaba que la actividad de recogida de sangre residual fuera alta. La actividad mostrada en el pulmón se debió al modo de eutanasia (datos no mostrados).

Para confirmar los datos de biodistribución, el amiloidoma así como el hígado, bazo, corazón y riñones se recogieron y se prepararon secciones tisulares para análisis autorradiográfico. Se realizó radiomarcaje de la siguiente manera: el anticuerpo 7D8 se marcó con 2 mCi de ¹²⁵I sin reductor (Perkin Elmer) usando cantidades limitantes de Cloramina T y se suspendió en PBS que contenía albúmina de suero bovino 5 mg/ml (BSA/PBS). Se retiraron agregados proteicos e isótopos no unidos mediante cromatografía líquida de exclusión por tamaño a través de una columna Ultrogel AcA34 (Amersham Pharmacia). Se agruparon fracciones que contenían monómero de IgG para experimentos de captura de imágenes. El rendimiento radioquímico fue de ~ el 50 %, que proporcionaba una actividad específica de ~ 25 µCi/µg. Se sometió mAb marcado con ¹²⁵I a SDS/PAGE (geles 10 %) en presencia o ausencia de un agente reductor y se analizó con un phosphor-imager Cyclone. De acuerdo con la captura de imágenes por SPECT y las mediciones de biodistribución, las autorradiografías confirmaron acumulación significativa de ¹²⁵I-7D8 en el amiloidoma, en relación con el hígado. No hubo pruebas de la captación de anticuerpos radiomarcados ¹²⁵I-7D8 en cualquier otro órgano (distinto de la actividad hepática esperada asociada con el catabolismo del anticuerpo). Aunque mAb 7D8 estaba distribuido de forma relativamente uniforme por todo el volumen de la masa amiloide, se observó una densidad moderadamente mayor en las áreas periféricas en el límite de abdomen-amiloido. No hubo ninguna captación del IgG de control radiomarcado en ningún órgano.

D. Sumario y conclusiones

La resonancia de plasmón superficial, inmunohistoquímica y captura de imágenes radiológicas *in vivo* establecen que los anticuerpos reactivos a AA 2A4, 7D8 y 8G9 se unen con amiloide AL y fibrillas (Kd ~ 1 nM) derivaban de cadenas ligeras de inmunoglobulina. Esta interacción sucede probablemente en los aminoácidos Glu y Asp altamente conservados en la posición 81 y 82, respectivamente, que forman un epitopo lineal críptico que se expone solamente cuando la cadena ligera amiloidogénica se incorpora en fibrillas.

Ejemplo VII. El análisis de ELISA demuestra la unión de anticuerpo con péptidos X₁EDX₂.

Se realizó análisis de BIAcore para evaluar la unión de los anticuerpos 2A4, 7D8 y 8G4 en péptidos de diversas secuencias. Como se muestra posteriormente en la Tabla 4, se descubrió que los anticuerpos reaccionaban con péptidos que tenían la secuencia X₁EDX₂. Resulta interesante que los anticuerpos no reaccionaban con péptidos que tenían restos C terminales adicionales. Esto sugiere que los anticuerpos se unen específicamente con una escisión generada por neoepitopo de SAA para generar un extremo C terminal libre. Sin embargo, como se demuestra en el Ejemplo V, el extremo libre no es esencial para la unión de estos anticuerpos con Vλ6 Wil, sino que más bien el dominio X₁EDX₂ adopta una conformación favorable a la unión con los anticuerpos a medida que entra en una estructura agregada (por ejemplo, fibrilar) (o se desnaturaliza parcialmente), exponiendo un epitopo críptico, oculto.

Tabla 4

Anticuerpo	Péptido	pos/neg
2A4 (39)	CGGHEDT, (SEC ID N° 87)	POS
40	CGGAEDS, (SEC ID N°: 88)	pos
41	GHEDTIADQE, (SEC ID N°: 89)	NEG
64	CGGAEDT, (SEC ID N°: 90)	POS
65	CGGHADT, (SEC ID N°: 91)	DÉBIL
66	CGGHEAT, (SEC ID N°: 92)	NEG
67	CGGHEDA, (SEC ID N°: 93)	POS
68	CGGHEDTM, (SEC ID N°: 94)	NEG
69	CGGHEDTMA, (SEC ID N°: 95)	NEG
70	CGGHEDTMAD, (SEC ID N°: 96)	NEG
71	CGGHED, (SEC ID N°: 97)	¿FALSO POS?
7d8 (39)	CGGHEDT, (SEC ID N°: 87)	POS
40	CGGAEDS, (SEC ID N°: 88)	POS
41	GHEDTIADQE, (SEC ID N°: 89)	NEG
64	CGGAEDT, (SEC ID N°: 90)	POS
65	CGGHADT, (SEC ID N°: 91)	NEG
66	CGGHEAT, (SEC ID N°: 92)	NEG
67	CGGHEDA, (SEC ID N°: 93)	POS
68	CGGHEDTM, (SEC ID N°: 94)	NEG
69	CGGHEDTMA, (SEC ID N°: 95)	NEG
70	CGGHEDTMAD, (SEC ID N°: 96)	NEG
71	CGGHED, (SEC ID N°: 97)	NEG
8g4 (39)	CGGHEDT, (SEC ID N°: 87)	POS
40	CGGAEDS, (SEC ID N°: 88)	POS
41	GHEDTIADQE, (SEC ID N°: 89)	NEG
64	CGGAEDT, (SEC ID N°: 90)	POS

Anticuerpo	Péptido	pos/neg
65	CGGHADT, (SEC ID N°: 91)	NEG
66	CGGHEAT, (SEC ID N°: 92)	NEG
67	CGGHEDA, (SEC ID N°: 93)	DÉBIL
68	CGGHEDTM, (SEC ID N°: 94)	¿FALSO +?
69	CGGHEDTMA, (SEC ID N°: 95)	¿FALSO +?
70	CGGHEDTMAD, (SEC ID N°: 96)	NEG
71	CGGHED, (SEC ID N°: 97)	NEG

Ejemplo VIII. Análisis inmunohistoquímico de AA de ratón.

5 La reactividad de sobrenadantes de hibridomas que expresan anticuerpos 2A4, 8G9 y 7D8 para depósitos amiloides
 10 esplénicos y hepáticos AA murinos (los sitios principales de deposición amiloide) se documentó de forma
 inmunohistoquímica. Para estos estudios, se tiñeron secciones de tejido recogido de un ratón TRIAD con amiloide
 AA extensivo en el hígado y el bazo (como se demuestra por depósitos Congófilos birrefringentes verdes) con los
 sobrenadantes que contienen mAb. Los 3 se unieron con el amiloide hepático y esplénico. Por el contrario, no hubo
 reactividad con sobrenadantes de cultivo derivados de hibridomas irrelevantes. Se ensayó la capacidad del amiloide
 usando 2A4, 8G9 y 7D8 para inmunotefñir amiloide en hígado y bazo murino incluido en OCT, nuevo (no fijado).
 Hubo pruebas de que los mAb conservaban su capacidad para unirse con amiloide AA en el sinusoides hepático.
 Además, la reactividad de anticuerpo con tejido esplénico fue más fácil de interpretar, y el amiloide perifolicular se
 inmunotefñió intensamente. Para demostrar que los mAb se unían específicamente con amiloide AA, los
 sobrenadantes de mAb a una dilución 1:25 se preincubaron con 50 µg/ml de péptidos N° 39 (p N° 39) o N° 41 (p N°
 15 41) durante 1 h a temperatura ambiente. Con tejido fijado en formalina como un sustrato, el péptido p N° 39 (50
 µg/ml) inhibió significativamente la reactividad amiloide de los mAb tanto 2A4 como 7D8 (los resultados con 8G9
 están pendientes). Por el contrario, el péptido p N° 41 fue ineficaz. Se obtuvieron resultados comparables con tejidos
 nuevos.

20 Ejemplo IX. Análisis inmunohistoquímico de AA humano.

25 La comparación de la secuencia de aminoácidos de SAA de ratón y humano de la posición 73-76 revela 2 restos
 idénticos, una sustitución Ser a Thr conservada, y un intercambio Ala a His no conservado. Para ensayar si los mAb
 2A4, 8G9 y 7D8 reaccionarían de forma cruzada con depósitos amiloides AA humanos, los inventores ensayaron su
 reactividad con riñón que contenía AA humano, glándula adrenal, ovario e hígado. En todos los casos, los
 sobrenadantes de mAb inmunotefñieron los depósitos amiloides. En tejido ovárico, el péptido p N° 39 bloqueó
 eficazmente la unión de los mAb con el amiloide AA perivascular, mientras que el péptido p N° 41 no inhibió esta
 reacción.

30 Ejemplo X. Interacción de anti AA de sobrenadantes de cultivo con fibrillas AA derivadas de murino.

35 La interacción de los mAb 2A4, 8G9 y 7D8 con amiloide AA se ensayó inicialmente por ELISA y los datos,
 proporcionados en la Figura 31, se analizaron usando SigmaPlot (SPSS Inc.). Cada punto representa la media ± ET
 (n = 3). Se usó un sobrenadante de cultivo de un hibridoma irrelevante como un control (Sobrenadante de Cultivo de
 Control). Hubo una relación de señal-ruido extremadamente baja y los resultados mostraron que la primera recogida
 contenía más mAb en relación con la segunda, como se demuestra por la mayor señal de absorbancia en relación
 con el sobrenadante de control. (Además, la reactividad inmunohistoquímica del material de día 1 fue mayor que las
 muestras del día 2). Aunque los valores de ET eran grandes, parecía a partir de estos datos que la afinidad de unión
 de 2A4, 8G9 y 7D8 era aproximadamente equivalente con reactividad ausente después de dilución ~ 1:64. Los datos
 de unión también sugieren que la capacidad, es decir, la cantidad de mAb unido, varió con 7D8>8G9>2A4; sin
 embargo, estos datos no se corrigieron para la concentración de mAb y en estudios posteriores no se observó esta
 tendencia. Debido a la baja señal y alta variabilidad halladas con los sobrenadantes de cultivo y para determinar con
 más precisión la afinidad de unión relativa de los mAb para fibrillas amiloides AA murinas y humanas (así como para
 proporcionar material para estudios de biodistribución *in vivo*) fue necesario aislar los mAb por cromatografía de
 afinidad de proteína A. La pureza de los mAb aislados se estableció por SDS-PAGE usando geles de acrilamida al
 10 % en condiciones reductoras y no reductoras (Figura 32). Las muestras en los carriles 1-4 tratadas con
 mercaptoetanol, los carriles 5-9 sin. El gel se tiñó con azul de Coomassie: mAb 8G9, carriles 1 y 6; mAb 2A4, carriles
 2 y 7; mAb 7D8, carriles 3 y 8; sobrenadante de control SP2/0, carriles 4 y 9; blanco, carril 5. Los marcadores de Mr
 proteicos (Patrón) son, de arriba a abajo: 176, 119, 75, 49, 39, 25 y 19 kDa. La interacción de los mAb purificados
 con el péptido inmunizador p N° 39, péptido de control (p N° 41), extractos AA murinos y humanos se determinó por
 50 ELISA como se ha descrito anteriormente. Estos datos se analizaron ajustando una curva sigmoidea usando el
 software SigmaPlot y la concentración de mAb a 50 % de saturación (CE50), se determinó (Tabla 5).

Tabla 5
Valores CE_{50} para unión de mAb purificado

mAb	Sustrato			
	AA humano	AA de ratón (AEF)	Péptido 39	Péptido 41
8G9	31,7 nM	5,64 nM	4,0 nM	>> 100 nM
2A4	26,4 nM	4,09 nM	3,4 nM	>> 100 nM
7D8	13,3 nM	1,84 nM	2,3 nM	>> 100 nM

5 La interacción de los 3 mAb con el péptido p N° 39 mostró unión saturable con valores de CE_{50} en el intervalo nanomolar bajo (véase Tabla 5 anterior). Por el contrario, incluso a la mayor concentración de mAb usada (100 nM) hubo poca unión detectable con el péptido p N° 41 (Figura 33 - Cada punto representa la media \pm ET (n = 3 a cada concentración)). Estos datos confirmaron los resultados inmunohistoquímicos descritos anteriormente, es decir, que el péptido p N° 39 era capaz de bloquear completamente la unión de los mAb con tejidos cargados con amiloide AA. Las CE_{50} calculadas para la unión de cada mAb con péptido p N° 39 fueron esencialmente idénticas como sucedió cuando se usó un extracto amiloide AA murino como el sustrato (Figura 34 - Cada punto representa la media \pm ET (n = 3 a cada concentración)). Los valores de CE_{50} calculados para la unión de mAb con extracto AA de ratón fueron esencialmente idénticos a los obtenidos cuando se usó el péptido p N° 39 como el sustrato (Figura 34; Tabla 5). Por el contrario, cuando se secó extracto amiloide AA humano en los pocillos de la microplaca, los valores de CE_{50} estaban entre 5 y 7x menores que el observado para AA de ratón y péptido p N° 39 (Figura 35 - Cada punto representa la media \pm ET (n = 3 a cada concentración); Tabla 5). Debido a que el valor de CE_{50} para la unión de mAb 7D8 fue el menor de los 3 anticuerpos ensayados, los solicitantes seleccionaron este reactivo para colocalización *in vivo* y estudios de captura de imágenes. Las 2 sustituciones de aminoácidos en la secuencia de SAA humana con respecto a la proteína murina afectan a los valores de CE_{50} . Aunque sin desear quedar ligado a una teoría particular, los solicitantes atribuyen la CE_{50} mayor para el AA humano a un "ajuste" peor de las cadenas laterales de aminoácidos en el sitio de unión a antígeno, sin embargo, este efecto corresponde a solamente una reducción de 5 veces en la afinidad relativa cuando los extractos amiloides se adsorben en superficie, como en el ELISA. Además, estos datos apoyan la observación de que los 3 mAb se unían con depósitos amiloides AA de tejido tanto murino como humano.

25 Ejemplo XI. Unión competitiva de mAb con amiloide AA de ratón y humano.

Para determinar el efecto, si lo hubiera, de desnaturalización potencial cuando se adsorbieron en la superficie del pocillo de microtitulación, la reactividad de los 2A4, 8G9 y 7D4 se evaluó usando un ELISA de competición en el que se usó extracto amiloide AA humano o murino como un competidor soluble para la interacción de los mAb con extracto de AA unido a superficie.

35 En todos los casos, las fibrillas amiloides AA solubles (no adsorbidas) de origen tanto humano como de ratón fueron capaces de competir por los 3 mAb, lo que indica que el epítipo reconocido por los reactivos no depende de la desnaturalización parcial que resulta de la adsorción en superficie. En general, el extracto de AA murino (AEF) fue un mejor competidor que el AA humano (Tabla 6).

Tabla 6
Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) para unión de mAb con amiloide AA

mAb	AA [†] humano	AA (AEF) [‡] de ratón
8G9	>119,5	17,3
2A4	>211,7	14,7
7D8	>881,1	26,8

†Amiloide AA humano en solución que compite por AA de ratón adsorbido (AEF);

‡AA ratón (AEF) en solución que compite por el extracto amiloide AA humano absorbido en la placa.

40 Los valores de CI_{50} (concentración de AA (en peso) que redujo la unión de mAb en 50 %) para AEF murino en solución fueron de $\sim 20 \mu\text{g/ml}$, mientras que para AA humano los valores fueron de 6 a 44 veces mayores (por el contrario, las CE_{50} para AA humano fueron solamente 7 veces menores que las de AA de ratón). Esto puede reflejar el hecho de que, cuando están en solución, el epítipo en las fibrillas amiloides es menos accesible en preparaciones de AA humano en comparación con AA murino.

45 Como se esperaba, el mAb 7D8 que mostraba la mayor afinidad relativa por las fibrillas AA humanas y murinas cuando se adsorbieron en superficie requería la mayor concentración de amiloide AA para conseguir competición.

50 Ejemplo XII. mAb 7D8 radiomarcado.

La eficacia del radiomarcado de 7D8 se determinó por SDS-PAGE. Se analizaron mAb reducidos y nativos y las proteínas se visualizaron usando un phosphor imager. Las cadenas tanto IgH como IgL incorporaron el marcador 1-125, y no se observó ninguna prueba de bandas asociadas con fragmentación o agregación.

Ejemplo XIII. Captura de imágenes de amiloide AA usando 7D8 marcado con ^{125}I .

Para estudiar la localización *in vivo* de mAb 7D8 radiomarcado se usaron tres grupos de ratones: IL-6 transgénico; inducido por AgNO_3/AEF , y controles que carecen de amiloides (WT). La captura de imágenes por SPECT/CT reveló que el mAb ^{125}I -7D8 se localizó en depósitos amiloides AA murinos en el bazo y el hígado, como se demuestra por la acumulación del mAb radiomarcado en esos tejidos en relación con el ratón de control, que mostró solamente baja actividad de acumulación de sangre en el hígado y yoduro libre en la glándula tiroidea.

A diferencia de estos ratones, los ratones inyectados con AgNO_3 mostraron captación tiroidea de yoduro libre, algo de actividad hepática, pero el sitio principal de unión de ^{125}I -7D8 se vio en el sitio de inyección de AgNO_3 s.c. (el área dorsal derecha inferior). La actividad en esta área se imita claramente por la solución de plata de atenuación de rayos x como se ve por CT. Se ha mostrado que el mAb 7D8 se une con depósitos amiloides AA tanto en el hígado como en el bazo en presencia de sAA en circulación en el ratón TRIAD, como se demuestra en las imágenes de SPECT.

A. Biodistribución de ^{125}I -7D8 en ratones.

48 h después de la inyección de ^{125}I -7D8 hubo radiactividad en la acumulación de sangre, que representaba la captación relativamente alta en el pulmón (que se llena con sangre cuando se sacrifican los ratones). Debe observarse que la acumulación hepatoesplénica de mAb en el ratón de IL-6 es indicativa de la presencia de amiloide. Las imágenes de SPECT/CT confirmaron la distribución del mAb de estos órganos. 72 h después de la inyección los valores de acumulación de sangre han cambiado poco como se demuestra por la actividad sin cambios en el corazón y el pulmón en relación con los ratones sacrificados a las 48 h, debido al $T_{1/2\text{bio}}$ relativamente largo para este mAb (~60 h). Hubo acumulación significativa del mAb radiomarcado en el ratón IL-6, que se correlacionaba con las imágenes de SPECT que se adquirieron que mostraban impactante captación esplénica y, en menor grado, hepática. De los otros órganos, el más importante fue el hígado (que es el sitio del catabolismo de IgG y la fuente de sAA durante la respuesta de fase aguda). En los ratones WT sin ninguna exposición inflamatoria o amiloide, el hígado contenía < 6 % de ID/g, lo que es comparable con el riñón y el corazón cuando la acumulación de sangre contribuye casi exclusivamente a la señal.

B. Análisis autorradiográfico e histoquímico.

Para determinar si la acumulación hepática aumentada de ^{125}I -7D8 en los ratones IL-6 y AgNO_3 resultó de la captación de amiloides, la eliminación catabólica o la unión son sAA de nueva síntesis, así como otros tejidos se sometieron a análisis autorradiográficos.

Basándose en la captura de imágenes de SPECT y mediciones de biodistribución, se supuso que la mayor cantidad de amiloide en los ratones IL-6 transgénicos era en el hígado y el bazo. Esta suposición se confirmó en las secciones teñidas con rojo Congo en las que se observó amiloide significativo por toda la pulpa roja así como en las regiones perivasculares y sinusoides del hígado. Además, estaban presentes más depósitos birrefringentes discretos en los riñones y el corazón. La distribución del ^{125}I -7D8 dentro de estos tejidos se correlacionó bien con el material reactivo AA y rojo Congo. No hubo acumulación en los hepatocitos que estaban desprovistos de amiloide.

Basándose en los datos de biodistribución, el ratón tratado con AgNO_3 tuvo más captación de ^{125}I -7D8 en el hígado que el bazo, lo que era inesperado ya que este no es el patrón normal de acumulación de AA en dichos animales. La tinción con rojo Congo reveló cantidades pequeñas de amiloide en una única región perifolicular en el bazo (esquina superior derecha) y depósitos perivasculares hepáticos extensivos ambos de los cuales fueron evidentes en las autorradiografías. Adicionalmente, se vio que el sitio s.c. de la inyección de AgNO_3 en las imágenes de SPECT tenía una concentración significativa de ^{125}I -7D8 (los inventores han observado también esto cuando se usó SAP radioyodado como el agente de captura de imágenes). Este sitio no contiene amiloide (es decir, material birrefringente-rojo Congo); sin embargo, se inmunotizó por mAb anti AA. Sin desear quedar ligado a una teoría particular, es posible que el mAb 7D8 se localice en sitios de inflamación o "preamiloides" (así como depósitos amiloides maduros). A diferencia de la acumulación impactante de 7D8 en los órganos del ratón IL-6, se descubrió que los tejidos de los ratones de control tenían poco o ningún indicador en ningún órgano distinto de la acumulación de sangre. No se encontró amiloide en secciones teñidas con rojo Congo de ningún órgano de estos controles.

C. Farmacocinética de ^{125}I -7D8.

Después de la inyección del anticuerpo 7D8 radiomarcado, se determinó la tasa de desaparición de la molécula y las determinaciones de la semivida se resumen en la Tabla 7. Estos resultados indicaron que el $T_{1/2\text{bio}}$ de 7D8 fue ~ 60 h, coherente con el del mAb murino IgG2b (obsérvese que 7D8 es de la subclase IgG2b). La eliminación ligeramente más rápida del ^{125}I -7D8 en los ratones IL-6 (TRIAD) no se consideró significativa. Basándose en estos datos, la retención del mAb por amiloide tisular, como se demuestra en los datos de SPECT, durante 72 h no influye en la velocidad de excreción.

Tabla 7
Análisis de semivida para ¹²⁵I-7D8 en ratones

Ratón	A (E.T.)	K (E.T. x 10 ⁻⁴)	R ²	t _{1/2 bio}	t _{1/2 ef}
IL-6, 48 h	191,7 (2,96)	0,0117(7,0)	0,98	59,2 h	56,2
IL-6, 72 h	175,2 (3,99)	0,012 (8,9)	0,97	57,7 h	
AgNO ₃ , 48 h	181,0 (1,99)	0,0106 (4,9)	0,99	65,3 h	61,1
AgNO ₃ , 72 h	174,1 (2,97)	0,0112 (5,8)	0,98	62,2 h	
Ctrl, 48 h	185,1 (3,19)	0,0108 (7,6)	0,98	64,3 h	61,3
Ctrl, 72 h	185,1 (3,09)	0,0109 (5,6)	0,98	63,7 h	

- 5 1. Método para identificar Agentes que Previenen o Tratan la Amiloidosis Usando Ratones Transgénicos o TRIAD. Se describen procedimientos para preparación de agentes en Schenk *et al.* Nature 400: 173-177. Se emulsionan agentes 1:1 (v/v) con adyuvante completo de Freund para la primera inmunización de ratones transgénicos, seguido de un refuerzo en adyuvante completo de Freund a las 2 semanas y mensualmente a continuación. Las inyecciones de PBS siguieron el mismo programa y se inyectó a los ratones una mezcla 1:1 de PBS/adyuvante para control. La vida útil de los ratones transgénicos se compara para determinar si los agentes son eficaces en la prevención de la Amiloidosis AA aumentando la vida del animal.
- 10 2. Histopatología. Para microscopía óptica y polarizante, se cortaron secciones tisulares de 4 a 6 µm de grosor y se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE) y una solución de rojo Congo alcalina recién preparada, respectivamente. Para microscopía electrónica, se incluyeron secciones en Epon (Ted Pella, Redding, CA), se seccionaron, y se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión JEOL 100S. Véase Ludlage *et al.* Vet Pathol 42: 117-124 (2005).
- 15 3. Inmunohistoquímica. Se cortaron secciones tisulares incluidas en parafina (de 6 µm de grosor) en un microtomo, se montaron en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina, se secaron durante una noche a temperatura ambiente y se desparafinizaron. Se realizó inmunotinción usando la técnica de complejo de avidinabiotina (ABC-élite) como se ha descrito previamente. Los anticuerpos primarios fueron anti amiloide A humano de ratón (Accurate Chemical and Scientific Corporation, Westbury, NY) y antisueros policlonales anti SAA de ratón. Se usaron inmunoglobulina G (IgG) de caballo anti ratón purificada por afinidad conjugada con peroxidasa de rábano rusticano (Vector Laboratories, Burlingame, CA) o IgG de cabra anti conejo, ratón o rata conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (BioRad Laboratories, Richmond, CA) como los anticuerpos secundarios.
- 20 4. Cuantificación de SAA por ELISA. Se midieron las concentraciones de SAA por un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando el kit de ELISA SAA Multiespecie de acuerdo con las directrices proporcionadas por el fabricante (Biosource, Camarillo, CA). Se prepararon curvas patrón usando cantidades conocidas de proteína SAA humana y se midió la absorbancia a 405 nm con un lector de placas BioRad modelo 4450 (Fullerton, CA).
- 30 5. Estudios de Renovación de Escintigrafía de SAP Radiomarcada en ratones. SAP se yodó oxidativamente con ¹²⁵I(2-5 MBq/mg) usando N-bromosuccinimida. Los ratones de 6 a 12 semanas de edad recibieron 2-10 µg de ¹²⁵I-SAP en 200 µl por vía intravenosa. Se tomaron muestras sanguíneas de la cola medidas con precisión (0,01-0,04 g) en intervalos temporales específicos y se contó la radiactividad precipitable con ácido trifluoroacético en el mismo ciclo al final de cada experimento junto con alícuotas convencionales del indicador inyectado. Pepys *et al.* Proc Natl. Acad. Sci. USA 91: 5602-5606 (1994).
- 35 6. Estudios de Captura de Imágenes y Renovación de Escintigrafía de SAP Radiomarcada en el Hombre. SAP para su uso en el hombre se aisló del plasma de un donante acreditado normal individual y se yodó oxidativamente con ¹²⁵I (2-5 MBq/mg) o ¹²³I (110 MBq/50 µg de proteína) usando N-bromosuccinimida. Después de inyección de ¹²³I SAP, se adquirieron datos y se procesaron en una cámara gamma IGE Starcam (IGE Medical Systems, Slough, Reino Unido). Clearance of ¹²⁵I-labeled SAP was studied in healthy individuals and patients suffering from AA amyloidosis. Pepys *et al.* Proc Natl. Acad. Sci. USA 91: 5602-5606 (1994).
- 40 7. Extracción y purificación de amiloides. Los métodos usados para extraer amiloide del tejido fueron como se describe en Pras *et al.* Véase Pras *et al.* J. Clin. Invest. 47:924-933 (1968). Brevemente, se homogeneizó una parte del hígado o los tejidos de otros órganos obtenidos en la necrosia y se mantuvieron a -80 °C con solución salina fría en un baño de hielo usando un Mezclador Omni (Omni International, Waterbury, CT). El extracto se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C y el sedimento se volvió a extraer dos veces más con solución salina fría, una vez con solución salina tamponada con Tris de citrato sódico 0,1 M, pH 8,0 y después de nuevo con solución salina hasta que el A280 del sobrenadante fue < 0,10. El sedimento resultante se homogeneizó con agua destilada fría, y la mezcla se centrifugó a 35.000 rpm durante 3 horas a 4 °C. Después se liofilizó el sedimento obtenido del extracto de agua.
- 45 8. Resonancia de Plasmón Superficial. Se midió la cinética de unión en un instrumento BIAcore X. Se sonicaron fibrillas preparadas a partir del Vλ.6 Wil brevemente con un sonicador de sondas y después se acoplaron con una microplaca CM-5 usando química de amina, según el protocolo de BIAcore. Este proceso utiliza EDC y NHS para activar los grupos carboxilo en la microplaca para acoplamiento con grupos amino libres en las fibrillas. El acoplamiento se realizó en un tampón de NaOAc, pH 4,0 a una concentración de 100 µg/ml. El canal de control
- 55

se “acopló de forma simulada” y ambos canales se hicieron reaccionar con etanolamina para saturar sitios que no habían reaccionado. Se acoplaron aproximadamente 16.000 UR de fibrillas V λ 6 Wil.

Se procesaron sensogramas en tampón de HBS-EP de BIAcore a 20 μ l/min en modo Fc1 (fibrillas V λ 6 Wil) menos Fc-2 (control). Se inyectaron muestras que contenían mAb o mAb más inhibidores peptídicos (70 μ l) y los sensogramas se recogieron usando la función de lavado retardado durante 200 s. Los datos se analizaron en el software BIAevaluation, usando el modelo de Langmuir 1:1 con corrección de acción de masas.

9. MicroSPECT/CT. Se inyectó a dos cohortes de 3 ratones cada una s.c. 50 mg de extracto amiloide AL humano entre las escápulas. Después de 7 días, un grupo de ratones recibió una inyección en la vena de la cola iv de \sim 300 μ Ci de mAb 7D8 marcado con 125 I. Al segundo grupo se le administró una cantidad igual de mAb murino MOPC 31C como control. Después de 72 h, los ratones se sacrificaron por sobredosis de isoflurano y se adquirieron imágenes de SPECT/CT. Para proporcionar mejora del contraste vascular en las imágenes de CT, se proporcionó a los ratones una dosis iv de 200 μ l de Fenestra VCTM (Advanced Research Technologies, Montreal, Canadá) 5 min antes de la exploración.

Se recogieron datos de SPECT con una plataforma de captura de imágenes de modalidad doble microCAT II + SPECT (Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN), con capacidad de resolución espacial submilimétrica cuando se equipa con un colimador poroso de 0,5 mm de diámetro de poro. Cuando se capturan imágenes, los 2 detectores (compuestos de un tubo foto-multiplicador multi-ánodo Hamamatsu R2486-02 de 50 mm de diámetro acoplado a una matriz de cristal de 1 \times 1 \times 8 mm de Csl (TI) dispuesta sobre una rejilla de 1,2 mm²). Se situaron a \sim 45 mm del centro de rotación. Cada conjunto de datos de SPECT comprendía 45 proyecciones recogidas sobre 360 $^{\circ}$ durante el transcurso de \sim 50 min. Las imágenes se reconstruyeron usando una implementación del algoritmo de maximización de la expectativa-probabilidad máxima (EM-ML).

Después de la recogida de los datos de SPECT, se obtuvieron imágenes de CT de alta resolución. El explorador microCAT II tiene una geometría de haz cónico orbital circular, equipado con una fuente de rayos x de micro enfoque de 20-80 kVp, y captura un campo de visión de 90 mm \times 60 mm usando un detector de conjunto de CCD 2048 \times 3072, acoplado ópticamente a una pantalla de fósforo minR mediante un haz de fibra óptica. Cada conjunto de datos de CT, compuesto de 360 proyecciones a acimuts de 1 $^{\circ}$, se adquirió en 8 min. Las imágenes se reconstruyeron en tiempo real en voxels isotrópicos de 77 μ m usando una implementación del algoritmo de retroproyección de Feldkamp. Para facilitar el registro conjunto de las imágenes de SPECT y CT reconstruidas, se colocaron fuentes selladas Co-57 en el lecho de captura de imágenes. Los conjuntos de datos de microSPECT y CT se visualizaron y se registraron conjuntamente manualmente con un paquete de software de análisis de imágenes en 3-D (Amira, Versión 3:1: Mercury Computer Systems).

10. Biodistribución. Se recogieron de muestras de hígado, bazo, riñón, corazón, pulmón y tumores amiloides implantados (es decir, amiloidoma) de los ratones y se colocaron en frascos tarados, se pesaron y se midió la radiactividad. Los valores de índices primarios se expresaron como % de dosis inyectada/g de tejido (% de DI/g).

11. Autorradiografía. Se colocaron secciones de 6 μ m de grosor cortadas de bloques de tejido incluidos en parafina, fijados en formalina, obtenidos de ratones sacrificados 72 h después de la inyección de 125 I-7D8 en portaobjetos de microscopio Probond (Fisher Scientific), se sumergieron en una emulsión de NTB-2 (Eastman Kodak), se almacenaron en la oscuridad, y se desarrollaron después de una exposición de 24 h. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina y eosina (H&E), se cubrieron con cubreobjetos usando Permount (Fisher Scientific) y se examinaron por microscopía óptica. Además, se tiñeron portaobjetos consecutivos con rojo Congo alcalino y se visualizaron con iluminación contrapolarizada. Finalmente, se inmunotizó un tercer portaobjetos usando como reactivo primario el mAb reactivo a AA de los inventores. Se tomaron imágenes microscópicas con cámara digital y se evaluaron usando un paquete de software de análisis de imágenes (Image Pro Plus, Media, Cybernetics).

Ejemplo XIV. Preparación de anticuerpos 2A4 y 7D8 humanizados.

Se prepararon anticuerpos 2A4, 7D8 y 8G9 humanizados por injerto de CDR de 2A4, 7D8 y 8G9 murinos en marcos conservados aceptores humanos de acuerdo con técnicas conocidas en este campo. Se realizaron retromutaciones para reducir la antigenicidad conservando al mismo tiempo la afinidad de unión. Las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada del 2A4 murino se exponen como los restos 20-131 de SEC ID N $^{\circ}$: 152 y como los restos 20-138 de SEC ID N $^{\circ}$: 154, respectivamente. Las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada del 7D8 se exponen como los restos 20-131 de SEC ID N $^{\circ}$: 153 y como los restos 20-138 de SEC ID N $^{\circ}$: 154, respectivamente. Las regiones variables de cadena ligera y de 2A4 y 8G9 murinos son idénticas entre sí y difieren de la región variable de cadena ligera de 7D8 en un único resto en CDR1. Las regiones variables de cadena pesada de cada uno de 2A4, 7D8 y 8G9 son idénticas.

La kappa variable (Vk) de 2A4 y 7D8 pertenece al subgrupo 2 de ratón, que corresponde al subgrupo 2 humano y la pesada variable (Vh) al subgrupo 3c de ratón que corresponde al subgrupo 3 humano (Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición. Publicación del NIH N $^{\circ}$ 91-3242). CDR-L1 incluye 16 restos y pertenece a la clase canónica 4 en Vk. CDR-L2 incluye 7 restos y pertenece a la clase 1 en Vk. CDR-L3 incluye 9 restos y pertenece a la clase 1 en Vk. Véase Martin AC, Thornton JM. (1996) J Mol Biol. 263, 800-15. La leucina en la posición 27 en el 7D8 es más bien inusual, y la glutamina en 2A4 es más usual. Un modelo muestra que la cadena lateral está en la superficie del sitio de unión, y por lo tanto debería ser importante para la unión al antígeno. CDR-H1 incluye 5 restos y pertenece a la clase 1, y CDR-H2 incluye 19 restos y pertenece a la clase 4

(Marin y Thornton, 1996). CDR-H3 no tiene clases canónicas, pero el bucle de 8 restos probablemente tiene una base acodada de acuerdo con las reglas de Shirai *et al.* (1999). FEBS Lett. 455, 188-97. Esto se conserva en un modelo aunque la conformación del vértice de CDR-H3 puede ser diferente. Los restos en la interfaz entre los dominios Vk y Vh son los hallados habitualmente para 2A4 Vk, 7D8 Vk y 2A4 Vh.

5 Se realizó una búsqueda de la base de datos PDB (Deshpande *et al.* (2005) Nucleic Acids Res. 33: D233-7) para encontrar estructuras que guiarían la elección de retromutaciones. Una búsqueda de la base de datos de secuencias proteicas no redundantes del NCBI permitió la selección de marcos conservados humanos adecuados en los que
10 injertar las CDR murinas. Para Vk, se eligió una cadena ligera kappa humana con código de referencia de NCBI BAC01562 (gi:21669075) (SEC ID N°: 166). Esta tiene la misma longitud que CDR-L3 y pertenece a la línea germinal humana VKII19/A3 y el subgrupo kappa humano 2. También se descubrió un marco conservado similar que solamente difería la región J con el código de referencia NCBI BAC01733 (gi:21669417) (SEC ID N°: 167). Se usó BAC01562 como un marco conservado para Vk 2A4, y se usó BAC01733 como un marco conservado para Vk 7D8.
15 Para Vh, se usó la cadena pesada de Ig humana AAC51024 (gi:1791061) (SEC ID N°: 165). Véase Glas *et al.* (1997) Clin. Exp. Immunol. 107: 372-380. Esta pertenece a la línea germinal humana VH3-72 y el subgrupo pesado humano 3.

Se exponen regiones variables de cadena ligera de 2A4 humanizadas representativas como SEC ID N°: 155, 156 y 157. Se exponen regiones variables de cadena ligera de 7D8 humanizadas representativas como SEC ID N°: 158, 159, 160, 174, 175 y 176. Se exponen regiones variables de cadena pesada de 2A4/7D8 humanizadas representativas como SEC ID N°: 161, 162 y 163. Véase Figuras 36A-36E.

Los anticuerpos humanizados representativos incluyen anticuerpos que tienen una región variable de cadena ligera seleccionada de uno de los restos 20-131 de SEC ID N°: 152, los restos 20-131 de SEC ID N°: 153 y SEC ID N°: 155, 156, 157, 157, 159, 160, 174, 175 y 176; y una región variable de cadena pesada seleccionada de uno de los restos 20-138 de SEC ID N°: 154 y SEC ID N°: 161, 162 y 163.

Ejemplo XV. Efectos terapéuticos de MAb 2A4 en ratones como amiloidosis AA sistémica grave

30 Se evaluó la eficacia terapéutica de mAb 2A4 en ratones H2/huIL-6 con amiloidosis sistémica grave. Se ha demostrado que los ratones H2/huIL-6 transgénicos, que expresan de forma constitutiva un transgén de IL-6 humano, desarrollan amiloidosis AA sistémica rápida e irreversible. En un primer y segundo estudio, se usaron ratones tratados con mAb TY-11 de isotipo coincidente, que no tiene actividad indicada en ratones, como control. Antes de administrar el factor potenciador de amiloide para inducir AA, se tomaron muestras de ratones H2/huIL-6 y se tomaron muestras sanguíneas a través del seno retro-orbital, se prepararon en suero y se determinó la concentración de sAA usando un kit de ELISA disponible en el mercado. Los valores representativos fueron los siguientes: 2196,7 µg/ml, 823,91 µg/ml, 1415,00 µg/ml, 1673,01 µg/ml, 814,53 µg/ml, 1088,18 µg/ml, 736,34 µg/ml, 1546,35 µg/ml, 953,70 µg/ml, 886.46 µg/ml, media = 1213,4 ± 478 µg/ml.

40 Al comienzo del segundo estudio (semana 0), se inyectó iv a ratones H2/huIL-6 100 µg de factor potenciador amiloide (AFF). Después de la inducción de patología AA inyectando AEF, se administró a los ratones 5 inyecciones de 100 µg por vía subcutánea en extremidades alternas de mAb 2A4 (13 animales) o TY11 (11 animales). La terapia se inició aproximadamente 1 semana después de la inyección de AEF. La supervivencia de animales en cada grupo de tratamiento se representó y analizó. Los resultados se muestran en la Tabla 7. Solamente el 45 % de los ratones tratados con mAb TY11 sobrevivió hasta el final del estudio. Por el contrario, ninguno de los ratones tratados con 2A4 se perdió durante el transcurso del estudio. El análisis de los datos de supervivencia usando métodos convencionales mostró una diferencia significativa en las curvas de supervivencia (P<0,0025) en ambos grupos. Se calculó que la mediana de la supervivencia de los ratones tratados con TY11 era de 41 días, comparable con la observada en un estudio anterior (38,5 días).

50

Tabla 7

Porcentaje de animales supervivientes		
Días después de la inyección	Tratados con TY11	Tratados con 2A4
0	100,00	100,00
22	81,2	100,00
33	72,73	100,00
37	63,64	100,00
41	45,45	100,00
42	45,45	100,00

55 En la semana 6, después de AEF, se tomaron muestras sanguíneas de los ratones y se sacrificaron, y sus órganos se recogieron para análisis adicional. Para cuantificación de amiloide en el hígado y en el bazo, se visualizó birrefringencia de rojo Congo por microscopía con iluminación contra polar y se registró digitalmente. El área de material birrefringente se determinó seleccionando (usando un método de secuenciación espectral) y cuantificando los píxeles asociados a amiloides. El índice de carga amiloide (ABI), una medida del contenido de amiloide, se

expresó como el porcentaje de área ocupada por amiloide en cada órgano. La cuantificación de amiloide en los hígados y bazo de ratones tratados con 2A4 y TY11 no reveló ninguna diferencia significativa entre los dos tratamientos. Sin embargo, los ratones tratados con TY-11 que se sobrevivieron hasta el día 42 para comparación con ratones tratados con 2A4 fueron los que no desarrollaron un grado mórbido o distribución de amiloide AA hasta dar como resultado de este modo morbilidad. La carga amiloide hepatosplénica también se controla durante el transcurso del estudio de supervivencia para evaluar un aumento de la carga amiloide que se correlaciona con la morbilidad.

En un tercer estudio, se comparó mAb 2A4 con el mAb JH70 de isotipo coincidente que no tiene reactividad indicada en ratones. Además se controló la química de la sangre y otros parámetros en todo el periodo de tratamiento. Se usaron ratones macho y hembra H2/huLL-6 nacidos entre el 1/8/08 y el 7/9/08 en este estudio. Se tomaron muestras sanguíneas de 23 ratones hembra y 16 ratones macho a través del seno retro-orbital. Se usó sangre completa para caracterización química de nitrógeno de urea en sangre (BUN) y alanina aminotransferasa (ALT) para medir la función renal y hepática usando el VetScan VS2 (Abaxis, Union City, CA). La concentración en suero de otras 12 proteínas y analitos se midió simultáneamente. Se realizó un recuento sanguíneo completo (CBC) usando la plataforma VetScan HM5. Además, se administró a cada ratón una dosis baja (~50-60 μ Ci) de componente amiloide P de suero humano radioyodado (125 I-SAP) en albúmina de suero bovino 5 mg/ml para evaluar la carga amiloide de los ratones antes del inicio del proceso de enfermedad. El porcentaje de 125 I-SAP conservado a las 24 h después de la inyección (pi) se midió colocando cada ratón en un calibrador de dosis. Una retención de 125 I-SAP mayor que la observada en ratones no transgénicos (control) fue indicativa de enfermedad amiloide. Finalmente, se usó suero para medir la concentración de proteína amiloide A de suero (sAA) usando un ensayo de ELISA comercial. Se muestra posteriormente en las Tablas 8 y 9 un sumario de estos datos de pretratamiento, valores químicos sanguíneos seleccionados y los tratamientos proporcionados a cada ratón.

Tabla 8

Sumario de datos de pre-tratamiento y terapia de MAb para cada animal					
Nº de ratón	conc. sAA (μ g/ml)	Sexo	FdN	Retención de 125 I-SAP (%)	Terapia (Nº de grupo)
3488	360	H	1/8/08	9	2A4 (1)
3489	996	H	1/8/08	29	2A4 (1)
3490	472	H	1/8/08	10	2A4 (1)
3492	2068	M	1/8/08	13	2A4 (1)
3493	1740	M	1/8/08	11	JH70 (1)
3494	1272	M	1/8/08	10	JH70 (1)
3495	1436	M	1/8/08	13	JH70 (1)
3496	2080	M	1/8/08	9	2A4 (1)
3498	268	M	1/8/08	9	2A4 (1)
3500	700	H	11/8/08	11	JH70 (1)
3501	ND	H	11/8/08	9	JH70 (1)
3503	1040	H	11/8/08	11	JH70 (1)
3504	960	H	11/8/08	10	JH70 (1)
3513 ¹	4400	M	13/8/08	60	2A4 (1)
3514 ¹	4400	M	13/8/08	40	2A4 (1)
3515	2800	M	13/8/08	13	2A4 (1)
3521	1480	M	18/8/08	11	2A4 (1)
3524	1680	M	18/8/08	9	2A4 (1)
3549	720	H	6/9/08	9	2A4 (2)
3550	760	H	6/9/08	9	2A4 (2)
3552 ²	0	H	6/9/08	11	2A4 (2)
3553	1160	H	6/9/08	12	2A4 (2)
3558	1660	M	6/9/08	9	JH70 (2)
3559	3520	M	6/9/08	12	JH70 (2)
3562	1312	H	6/9/08	11	JH70 (2)
3563	1120	M	6/9/08	9	JH70 (2)
3564	2512	M	6/9/08	11	2A4 (2)
3565	1960	M	6/9/08	10	2A4 (2)
3567	1880	H	6/9/08	12	2A4 (2)
3570	792	H	7/9/08	13	2A4 (2)
3573	700	H	7/9/08	8	2A4 (2)
3577 ²	0	H	7/9/08	10	2A4 (2)
3578 ²	0	H	7/9/08	9	2A4 (2)
3579	1120	H	7/9/08	10	2A4 (2)
3580 ²	0	H	7/9/08	8	JH70 (2)
3581	700	H	7/9/08	9	JH70 (2)
3582	1680	H	7/9/08	9	JH70 (2)
3583	804	H	7/9/08	9	JH70 (2)

Sumario de datos de pre-tratamiento y terapia de MAb para cada animal						
Nº de ratón	conc. sAA (µg/ml)	Sexo	FdN	Retención de ¹²⁵ I-SAP (%)	Terapia (Nº de grupo)	
3584	1040	H	7/9/08	14	JH70 (2)	

1, animales IL-6 homocigotos con altos niveles de sAA y enfermedad amiloide en vida temprana.
2, ratones de tipo silvestre sin sAA en circulación y sin enfermedad amiloide. La retención de ¹²⁵I-SAP en estos animales se considera normal y no refleja ninguna carga amiloide.

Tabla 9
Valores normales para parámetros de química sanguínea en ratones H2/huLL

	BUN (mg/dl)		GLU (mg/dl)		ALT (U/l)		ALB (g/dl)		TP (g/dl)		GLOB (g/dl)	
	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M
Media	21,1	23,8	144,7	151,2	37,6	42,3	2,5	1,9	5,6	6,2	3,1	4,4
DT	4,0	2,7	14,0	17,6	16,3	24,3	0,3	0,4	0,2	0,6	0,4	0,6
n	18	13	18	13	18	13	18	13	18	13	18	13
Alta	28,0	30,0	184,0	179,0	79,0	105,0	3,0	2,6	6,0	7,4	3,7	5,8
Baja	15,0	20,0	126,0	119,0	21,0	23,0	2,0	1,2	5,1	5,5	2,6	3,4
Mediana	20,0	24,0	143,0	154,0	32,5	32,0	2,4	1,9	5,6	6,0	3,2	4,3

BUN, nitrógeno de urea en sangre; GLU, glucosa; ALT, alanina aminotransferasa; ALB, albúmina; TP, proteína en suero total; GLOB, inmunoglobulina; H, hembra; M, macho; DT, desviación típica; n es el número de ratones usado para determinar los valores.

5 Al comienzo del tercer estudio (semana 0), todos los ratones H2/huLL-6 recibieron 100 µg iv de factor potenciador amiloide (1 mg/ml). Una semana después, comenzó la terapia y se administró a cada ratón 100 µg de mAb 2A4 o JH70 sc como se perfila en la Tabla 8. Las inyecciones de mAb continuaron semanalmente durante 7 semanas.

10 A las 2 sem. después de AEF, se realizaron mediciones de CBC, química sanguínea y sAA en suero usando sangre recogida a través del seno retro-orbital. En este momento, también se administró a los ratones en el grupo 1 ~60 µCi de ¹²⁵I-SAP en BSA como antes, para evaluar la acumulación de amiloide como se demuestra por la retención de SAP radiomarcado. Varios de los animales mostraron un efecto adverso de distrés extremo, y por lo tanto, se detuvo la evaluación de la carga amiloide usando ¹²⁵I-SAP. Los resultados de los parámetros de química sanguínea seleccionados, adquiridos 2 sem. después de AEF se muestran en la Tabla 10.

15

Tabla 10

	BUN (mg/dl)		GLU (mg/dl)		ALT (U/l)		ALB (g/dl)		TP (g/dl)		GLOB (g/dl)	
	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M
Media	31,4	52,1	145,1	129,8	33,9	63,3	2,3	1,8	6,5	8,1	4,2	6,2
DT	24,3	39,1	16,6	25,6	6,9	30,6	0,3	0,5	1,0	1,7	1,1	1,5
n	15	13	15	13	15	13	15	13	15	13	15	12
Alta	100,0	159,0	177,0	178,0	46,0	134,0	2,7	3,0	8,6	11,7	7,0	9,6
Baja	16,0	20,0	104,0	82,0	22,0	32,0	1,7	1,0	5,2	6,0	3,1	4,5
Mediana	22,0	31,0	150,0	120,0	32,0	54,0	2,3	1,7	6,5	7,5	4,0	6,0

BUN, nitrógeno de urea en sangre; GLU, glucosa; ALT, alanina aminotransferasa; ALB, albúmina; TP, proteína en suero total; GLOB, inmunoglobulina; H, hembra; M, macho; DT, desviación típica; n es el número de ratones usado para determinar los valores.

20 A las 8 semanas después de AEF, se tomaron muestras sanguíneas de los ratones una última vez y se les administró inmediatamente después ~200 Ci de ¹²⁵I-SAP usando suero de ratón normal al 5 % como vehículo. En respuesta a este tratamiento, algunos animales mostraron algún comportamiento inusual que remitió en un periodo de 30 minutos. Veinticuatro horas después, se inyectó a los ratones agente de contraste de CT de rayos x (~200 µl iv en la vena de la cola) y después se sacrificaron por sobredosis de isoflurano. Se adquirieron imágenes tomográficas de emisión de un único fotón (SPECT) y rayos x (CT) de cada animal. Los órganos se recogieron y se calculó la cantidad de radiactividad en cada muestra y se expresó como % de dosis inyectada por gramo de tejido.

25 Adicionalmente, se fijó una parte de cada tejido durante una noche en formalina tamponada en preparación para seccionamiento y análisis microscópico.

30 Durante el estudio de terapia de 7 semanas, se encontraron muertos 2 ratones y 3 ratones se sacrificaron debido a que se consideraba poco probable que sobrevivirían durante la noche y tenían una puntuación de condición corporal baja (< 2; asociada con > 15 % de pérdida de peso). Los ratones que experimentaron una reacción adversa a la inyección de ¹²⁵I-SAP y 1 ratón que se sacrificó debido a complicaciones que surgieron de un sangrado retro-orbital no se evaluaron como parte del análisis de supervivencia. Se muestra la supervivencia de los ratones en cada grupo de tratamiento de mAb en la Tabla 11.

35

Tabla 11

Porcentaje de animales supervivientes		
Días después de la inyección	Tratados con TY11	Tratados con 2A4
0	100,00	100,00
41		100,00
42		100,00
53	85,71	100,00
55	71,43	100,00
56	64,29	100,00
57	64,29	100,00

Aproximadamente el 65 % de los ratones tratados con mAb JH70 que pudieron evaluarse sobrevivieron hasta el final del estudio. Por el contrario, ninguno de los ratones 2A4 que pudieron evaluarse murieron durante los 57 días. El análisis de los datos de supervivencia usando los métodos convencionales demostró una diferencia significativa en las curvas de supervivencia ($P=0,015$ usando ensayo de Mantel-Cox y $P=0,016$ usando ensayo de Grehan-Breslow-Wilcoxon).

Los datos de química sanguínea finales se analizaron de acuerdo con la terapia que recibió cada ratón. Debido a las diferencias en los valores paramétricos medios asociados con ratones H2/huLL,-6 macho y hembra (en el momento del sacrificio, los niveles de BUN en los ratones hembra eran mayores tanto para ratones tratados con 2A4 como para tratados con JH70), solamente los ratones hembra que sobrevivieron se incluyeron en la Tabla 12 posterior.

Tabla 12

	BUN (mg/dl)		GLU (mg/dl)		ALT (U/l)		ALB (g/dl)		TP (g/dl)		GLOB (g/dl)	
	2A4	JH70	2A4	JH70	2A4	JH70	2A4	JH70	2A4	JH70	2A4	JH70
Media	60,7	73,3	107,8	100,1	45,5	119,7	2,3	2,2	9,2	9,1	7,0	7,1
TD	27,2	25,7	27,0	13,3	6,2	123,1	0,5	0,6	1,5	1,5	2,0	2,1
n	6,0	7,0	6,0	7,0	6,0	7,0	6,0	7,0	6,0	7,0	6,0	7,0
Alta	95,0	120,0	160,0	123,0	52,0	381,0	2,9	3,0	11,7	11,9	10,1	10,6
Baja	17,0	36,0	83,0	83,0	35,0	33,0	1,5	1,2	7,2	7,5	4,3	5,3
Mediana	66,5	70,0	99,5	98,0	46,5	65,0	2,2	2,1	9,1	8,9	7,1	6,2

BUN, nitrógeno de urea en sangre; GLU, glucosa; ALT, alanina aminotransferasa; ALB, albúmina; TP, proteína en suero total; GLOB, inmunoglobulina; H, hembra; M, macho; DT, desviación típica; n es el número de ratones usado para determinar los valores.

Los ratones tratados con 2A4 mostraron niveles de nitrógeno de urea de sangre (BUN) y alanina aminotransferasa (ALT) en suero reducidos en comparación con ratones tratados con JH70. BUN y ALT son marcadores de la función renal y hepática, respectivamente, y sus niveles reducidos indican que la función orgánica puede haberse conservado mejor por el tratamiento con 2A4.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Elan Pharmaceuticals, Inc.
Schenk, Dale B.
Wall, Jonathan
Seubert, Peter A.
Saldanha, Jose

<120> Tratamiento y Profilaxis de Amiloidosis

<130> 021452-0376734

<150> 61/007.544

<151> 28-12-2007

<150> 61/095.932

<151> 10-09-2008

<160> 177

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 122

<212> PRT

ES 2 544 679 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

5

```

Met Lys Leu Leu Thr Gly Leu Val Phe Cys Ser Leu Val Leu Gly Val
 1          5          10          15

Ser Ser Arg Ser Phe Phe Ser Phe Leu Gly Glu Ala Phe Asp Gly Ala
 20          25          30

Arg Asp Met Trp Arg Ala Tyr Ser Asp Met Arg Glu Ala Asn Tyr Ile
 35          40          45

Gly Ser Asp Lys Tyr Phe His Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Ala Ala Lys
 50          55          60

Arg Gly Pro Gly Gly Ala Trp Ala Ala Glu Val Ile Ser Asp Ala Arg
 65          70          75          80

Glu Asn Ile Gln Arg Phe Phe Gly His Gly Ala Glu Asp Ser Leu Ala
 85          90          95

Asp Gln Ala Ala Asn Glu Trp Gly Arg Ser Gly Lys Asp Pro Asn His
 100         105         110

Phe Arg Pro Ala Gly Leu Pro Glu Lys Tyr
 115         120
    
```

<210> 2

<211> 76

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

15 <223> Péptido de proteína amiloide A humana

<400> 2

ES 2 544 679 T3

Arg Ser Phe Phe Ser Phe Leu Gly Glu Ala Phe Asp Gly Ala Arg Asp
 1 5 10 15

Met Tyr Arg Ala Tyr Ser Asp Met Arg Glu Ala Asn Tyr Ile Gly Ser
 20 25 30

Asp Lys Tyr Phe His Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Ala Ala Lys Arg Gly
 35 40 45

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

Ile Gln Arg Phe Phe Gly His Gly Ala Glu Asp Ser
 65 70 75

5 <210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Derivado de péptido de amiloidosis
 <400> 3

Gly His Glu Asp Thr
 1 5

15 <210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Derivado de proteína amiloide A
 <400> 4

Gly His Gly Ala Glu Asp Ser
 1 5

25 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Derivado de proteína amiloide A
 <400> 5

Gly His Asp Ala Glu Asp Ser
 1 5

40 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 544 679 T3

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Derivado de proteína amiloide A

<400> 11

Asn His Gly Leu Glu Thr Leu
1 5

10 <210> 12
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Derivado de péptido de amiloidosis

20 <400> 12

His Glu Asp Thr
1

25 <210> 13
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

<400> 13

Ala Glu Asp Ser
1

35 <210> 14
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

<400> 14

Ala Glu Asp Thr
1

45 <210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

55 <400> 15

His Glu Asp Ala
1

<210> 16
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Fragmento V lambda AL de proteina amiloide
 10
 <400> 16

Thr Glu Asp Glu
1

 <210> 17
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Fragmento V lambda AL de proteina amiloide
 20
 <400> 17

Phe Glu Asp Asp
1

 <210> 18
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Fragmento V lambda A1 de proteina amiloide
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Secuencia consenso derivada de proteinas amiloidogénicas humanas
 35
 <400> 18

Ser Glu Asp Glu
1

 <210> 19
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Fragmento V lambda A1 de proteina amiloide
 45
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Secuencia consenso derivada de proteinas amiloidogénicas humanas
 50
 <400> 19

Ala Glu Asp Glu
1

 <210> 20
 <211> 4

ES 2 544 679 T3

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Fragmento V lambda AL de proteína amiloide

<400> 20

Pro Glu Asp Glu
1

10 <210> 21
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Fragmento V kappa A1, de proteína amiloide

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

<400> 21

Pro Glu Asp Ile
1

25 <210> 22
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Fragmento V kappa A1, de proteína amiloide

35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

<400> 22

40 <210> 23
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

Pro Glu Asp Phe
1

45 <220>
<223> Fragmento V kappa A1, de proteína amiloide

50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

<400> 23

55 <210> 24
<211> 4

Ala Glu Asp Val
1

60 <210> 24
<211> 4

ES 2 544 679 T3

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Fragmento V kappa A1, de proteína amiloide

10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas
<400> 24

Ser Glu Asp Phe
1

15 <210> 25
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Fragmento V kappa AL de proteína amiloide
<400> 25

Ser Glu Asp Ala
1

25 <210> 26
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas
<400> 26

Pro Glu Asp Ser
1

40 <210> 27
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas
<400> 27

Pro Glu Asp Leu
1

50 <210> 28
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas
<400> 28

Thr Glu Asp Val
1

5 <210> 29
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

<400> 29

Ser Glu Asp Ile
1

15 <210> 30
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

<400> 30

Thr Glu Asp Thr
1

30 <210> 31
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

<400> 31

Leu Glu Asp Gly
1

40 <210> 32
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

<400> 32

Ala Glu Asp Met
1

50 <210> 33
<211> 4
<212> PRT
55 <213> Artificial

ES 2 544 679 T3

<220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

5 <400> 33

His Glu Asp Ser
1

<210> 34
<211> 4
10 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

15 <400> 34

Cys Glu Asp Asp
1

20 <210> 35
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

<400> 35

Gln Glu Asp Ser
1

30 <210> 36
<211> 4
<212> PRT
35 <213> Artificial

<220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

40 <400> 36

Arg Glu Asp Ser
1

45 <210> 37
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
50 <223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

<400> 37

Thr Glu Asp Gly
1

55 <210> 38
<211> 4

ES 2 544 679 T3

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

<400> 38

Gln Glu Asp Arg
1

10 <210> 39
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

20 <400> 39

Thr Glu Asp Leu
1

25 <210> 40
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

<400> 40

Pro Glu Asp Asn
1

35 <210> 41
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

<400> 41

Glu Glu Asp Pro
1

45 <210> 42
<211> 4
<212> PRT
50 <213> Artificial

<220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

55 <400> 42

Leu Glu Asp Leu
1

5 <210> 43
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas
<400> 43

Lys Glu Asp Ala
1

15 <210> 44
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas
<400> 44

Ser Glu Asp Cys
1

25 <210> 45
<211> 4
<212> PRT
30 <213> Artificial

<220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas
35 <400> 45

Glu Glu Asp Asp
1

40 <210> 46
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas
<400> 46

Ser Glu Asp Lys
1

50 <210> 47
<211> 4
<212> PRT
55 <213> Artificial

<220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

ES 2 544 679 T3

<400> 47

Asp Glu Asp Asp
1

5 <210> 48
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

<400> 48

Asp Glu Asp Gly
1

15 <210> 49
<211> 4
<212> PRT
20 <213> Artificial

<220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

25 <400> 49

Leu Glu Asp Glu
1

30 <210> 50
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

<400> 50

Gly Glu Asp Ala
1

40 <210> 51
<211> 4
<212> PRT
45 <213> Artificial

<220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

<400> 51

50 **Val Glu Asp Phe**
1

55 <210> 52
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 544 679 T3

<220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

5 <400> 52

Tyr Glu Asp Glu
1

<210> 53
<211> 4
10 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

15 <400> 53

Ile Glu Asp Leu
1

20 <210> 54
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

<400> 54

Trp Glu Asp Tyr
1

30 <210> 55
<211> 4
<212> PRT
35 <213> Artificial

<220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

40 <400> 55

Asp Glu Asp Trp
1

45 <210> 56
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
50 <223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

<400> 56

Ser Glu Asp Leu
1

55 <210> 57
<211> 4

5 <210> 62
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

10 <400> 62

Ala Glu Asp Ala
1

15 <210> 63
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

20 <400> 63

Gln Glu Asp Leu
1

25 <210> 64
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

<400> 64

Val Glu Asp Leu
1

35 <210> 65
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

45 <400> 65

Leu Glu Asp Ala
1

50 <210> 66
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia consenso derivada de proteínas amiloidogénicas humanas

55 <400> 66

ES 2 544 679 T3

Ser Glu Asp Gly
1

5 <210> 67
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Derivada de CS de Malaria

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Epitopo T3

15 <400> 67

Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val
1 5 10 15

20 <210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Derivado de los restos 19-28 de antígeno de superficie de Hepatitis B

<400> 68

Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile
1 5 10

30 <210> 69
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Derivado de los restos 153-171 de la proteína de choque térmico 65 de *mycobacterium*

40 <400> 69

Asp Gln Ser Ile Gly Asp Leu Ile Ala Glu Ala Met Asp Lys Val Gly
1 5 10 15

Asn Glu Gly

45 <210> 70
<211> 14
<212> PRT
<213> Bacilo *calmette-guerin*

<400> 70

Gln Val His Phe Gln Pro Leu Pro Pro Ala Val Val Lys Leu
1 5 10

50 <210> 71
<211> 15
<212> PRT

ES 2 544 679 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Derivado de los restos 830-844 de toxoide del Tétanos

5

<400> 71

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
1 5 10 15

10

<210> 72

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Derivado de los restos 947-967 de toxoide del Tétanos

<400> 72

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
1 5 10 15

20

Ala Ser His Leu Glu
20

<210> 73

<211> 16

<212> PRT

25

<213> VIH

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> gb120 T1 de VIH

30

<400> 73

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala
1 5 10 15

35

<210> 74

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> Epítipo Pan DR

<220>

<221> MISC_FEATURE

45

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 74

50

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 75

<211> 36

<212> PRT

ES 2 544 679 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión derivada de los restos 830-844 y 947-967 de toxoide del Tétanos

5

<400> 75

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Phe
1 5 10 15

Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala
20 25 30

Ser His Leu Glu
35

10

<210> 76

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Derivado de los restos 323-389 de ovoalbúmina

<400> 76

Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly
1 5 10 15

20

Arg

<210> 77

<211> 13

<212> PRT

25

<213> Artificial

<220>

<223> Derivado de hemaglutinina del virus de la gripe A

30

<400> 77

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1 5 10

35

<210> 78

<211> 65

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> Proteína de fusión derivada de los restos 307-319, de la hemaglutinina de gripe A, CD de Malaria: Epítopo T3, restos 830-844 y 947-967 del toxoide del Tétanos

<400> 78

ES 2 544 679 T3

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Glu Lys Lys
 1 5 10 15

Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val Gln Tyr Ile
 20 25 30

Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe
 35 40 45

Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu
 50 55 60

Glu
 65

5 <210> 79
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Proteína de fusión
 <400> 79

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys
 1 5 10 15

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 20 25 30

Ala Ser His Leu Glu
 35

15 <210> 80
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Derivado de proteína amiloide A humana
 <400> 80

Arg Ser Phe Phe Ser Phe Leu Gly Glu Ala Phe Asp Gly Ala Arg
 1 5 10 15

30 <210> 81
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Derivado de proteína amiloide A humana
 <400> 81

ES 2 544 679 T3

Gln Gly Trp Leu Thr Phe Leu Lys Ala Ala Gly Gln Gly Ala Lys
1 5 10 15

5 <210> 82
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Derivado de proteína amiloide A de ratón
 <400> 82

Glu Ser Trp Arg Ser Phe Phe Lys Glu Ala
1 5 10

15 <210> 83
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Derivado de proteína amiloide A de ratón
 <400> 83

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

30 <210> 84
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Derivado de proteína amiloide A de ratón
 <400> 84

Glu Ala Gly Gln Gly Ser Arg Asp
1 5

40 <210> 85
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Derivado de proteína amiloide A de ratón
 <400> 85

Trp Tyr Ser Phe Phe Arg Glu Ala Val Gln Gly Thr Trp Asp
1 5 10

50 <210> 86
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

55 <220>

ES 2 544 679 T3

<221> MISC_FEATURE

<223> Fragmentos Lambda 2 de depósitos amiloides humanos

<400> 86

5

Gly Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Arg Gln
1 5 10 15

Thr Val Ala Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu
35 40 45

Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ala Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Arg Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Leu

<210> 87

<211> 7

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Derivado de proteína amiloide A del suero

15

<400> 87

Cys Gly Gly His Glu Asp Thr
1 5

20

<210> 88

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Derivado de proteína amiloide A del suero

<400> 88

Cys Gly Gly Ala Glu Asp Ser
1 5

30

<210> 89

<211> 10

<212> PRT

35

<213> Artificial

ES 2 544 679 T3

<220>

<223> Derivado de proteína amiloide A del suero

<400> 89

5

Gly His Glu Asp Thr Ile Ala Asp Gln Glu
1 5 10

<210> 90

<211> 7

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Derivado de proteína amiloide A del suero

15

<400> 90

Cys Gly Gly Ala Glu Asp Thr
1 5

20

<210> 91

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Derivado de proteína amiloide A del suero

<400> 91

Cys Gly Gly His Ala Asp Thr

30

1

5

<210> 92

<211> 7

35

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Derivado de proteína amiloide A del suero

40

<400> 92

Cys Gly Gly His Glu Ala Thr
1 5

45

<210> 93

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

50

<220>

<223> Derivado de proteína amiloide A del suero

<400> 93

Cys Gly Gly His Glu Asp Ala
1 5

ES 2 544 679 T3

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

5 <210> 99
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> HSA2

<400> 99

ES 2 544 679 T3

Met Lys Leu Leu Thr Gly Leu Val Phe Cys Ser Leu Val Leu Ser Val
 1 5 10 15

Ser Ser Arg Ser Phe Phe Ser Phe Leu Gly Glu Ala Phe Asp Gly Ala
 20 25 30

Arg Asp Met Trp Arg Ala Tyr Ser Asp Met Arg Glu Ala Asn Tyr Ile
 35 40 45

Gly Ser Asp Lys Tyr Phe His Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Ala Ala Lys
 50 55 60

Arg Gly Pro Gly Gly Ala Trp Ala Ala Glu Val Ile Ser Asn Ala Arg
 65 70 75 80

Glu Asn Ile Gln Arg Leu Thr Gly His Gly Ala Glu Asp Ser Leu Ala
 85 90 95

Asp Gln Ala Ala Asn Lys Trp Gly Arg Ser Gly Arg Asp Pro Asn His
 100 105 110

Phe Arg Pro Ala Gly Leu Pro Glu Lys Tyr
 115 120

<210> 100
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> HSAA3

10

<400> 100

Met Lys Leu Ser Thr Gly Ile Ile Phe Cys Ser Leu Val Leu Gly Val
 1 5 10 15

ES 2 544 679 T3

Ser Ser Gln Gly Trp Leu Thr Phe Leu Lys Ala Ala Gly Gln Gly Ala
 20 25 30

Lys Asp Met Trp Arg Ala Tyr Ser Asp Met Lys Glu Ala Asn Tyr Lys
 35 40 45

Lys Ser Asp Lys Tyr Phe His Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Ala Val Gln
 50 55 60

Arg Gly Pro Gly Gly Val Trp Ala Thr Glu Val Ile Ser Asp Ala Arg
 65 70 75 80

Glu Asn Val Gln Arg Leu Thr Gly Asp His Ala Glu Asp Ser Leu Ala
 85 90 95

Gly Gln Ala Thr Asn Lys Trp Gly Gln Ser Gly Lys Asp Pro Asn His
 100 105 110

Phe Arg Pro Ala Gly Leu Pro Glu Lys Tyr
 115 120

5 <210> 101
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> HSAA4

<400> 101

Met Arg Leu Phe Thr Gly Ile Val Phe Cys Ser Leu Val Met Gly Val
 1 5 10 15

Thr Ser Glu Ser Trp Arg Ser Phe Phe Lys Glu Ala Leu Gln Gly Val
 20 25 30

Gly Asp Met Gly Arg Ala Tyr Trp Asp Ile Met Ile Ser Asn His Gln
 35 40 45

Asn Ser Asn Arg Tyr Leu Tyr Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Ala Ala Gln
 50 55 60

Arg Gly Pro Gly Gly Val Trp Ala Ala Lys Leu Ile Ser Arg Ser Arg
 65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Gly Leu Ile Asp Tyr Tyr Leu Phe Gly Asn Ser Ser

ES 2 544 679 T3

85

90

95

Thr Val Leu Glu Asp Ser Lys Ser Asn Glu Lys Ala Glu Glu Trp Gly
100 105 110

Arg Ser Gly Lys Asp Pro Asp Arg Phe Arg Pro Asp Gly Leu Pro Lys
115 120 125

Lys Tyr
130

5

<210> 102
<211> 76
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> HAA1
<400> 102

Arg Ser Phe Phe Ser Phe Leu Gly Glu Ala Phe Asp Gly Ala Arg Asp
1 5 10 15

Met Trp Arg Ala Tyr Ser Asp Met Arg Glu Ala Asn Tyr Ile Gly Ser
20 25 30

Asp Lys Tyr Phe His Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Ala Ala Lys Arg Gly
35 40 45

Pro Gly Gly Val Trp Ala Ala Glu Ala Ile Ser Asp Ala Arg Glu Asn
50 55 60

Ile Gln Arg Phe Phe Gly His Gly Ala Glu Asp Ser
65 70 75

15

<210> 103
<211> 76
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> HAA2

25

<400> 103

Arg Ser Phe Phe Ser Phe Leu Gly Glu Ala Phe Asp Gly Ala Arg Asp
1 5 10 15

ES 2 544 679 T3

Met Trp Arg Ala Tyr Ser Asp Met Arg Glu Ala Asn Tyr Ile Gly Ser
 20 25 30

Asp Lys Tyr Phe His Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Ala Ala Lys Arg Gly
 35 40 45

Pro Gly Gly Ala Trp Ala Ala Glu Val Ile Ser Asn Ala Arg Glu Asn
 50 55 60

Ile Gln Arg Leu Thr Gly His Gly Ala Glu Asp Ser
 65 70 75

5 <210> 104
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> HAA3
 <400> 104

Gln Gly Trp Leu Thr Phe Leu Lys Ala Ala Gly Gln Gly Ala Lys Asp
 1 5 10 15

Met Trp Arg Ala Tyr Ser Asp Met Lys Glu Ala Asn Tyr Lys Lys Ser
 20 25 30

Asp Lys Tyr Phe His Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Ala Val Gln Arg Gly
 35 40 45

Pro Gly Gly Val Trp Ala Thr Glu Val Ile Ser Asp Ala Arg Glu Asn
 50 55 60

Val Gln Arg Leu Thr Gly Asp His Ala Glu Asp Ser
 65 70 75

15 <210> 105
 <211> 84
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> HAA4
 25 <400> 105

Glu Ser Trp Arg Ser Phe Phe Lys Glu Ala Leu Gln Gly Val Gly Asp
 1 5 10 15

ES 2 544 679 T3

Met Gly Arg Ala Tyr Trp Asp Ile Met Ile Ser Asn His Gln Asn Ser
 20 25 30

Asn Arg Tyr Leu Tyr Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Ala Ala Gln Arg Gly
 35 40 45

Pro Gly Gly Val Trp Ala Ala Lys Leu Ile Ser Arg Ser Arg Val Tyr
 50 55 60

Leu Gln Gly Leu Ile Asp Tyr Tyr Leu Phe Gly Asn Ser Ser Thr Val
 65 70 75 80

Ile Glu Asp Ser

<210> 106
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> MSA1

10

<400> 106

Met Lys Leu Leu Thr Ser Leu Val Phe Cys Ser Leu Leu Leu Gly Val
 1 5 10 15

Cys His Gly Gly Phe Phe Ser Phe Val His Glu Ala Phe Gln Gly Ala
 20 25 30

Gly Asp Met Trp Arg Ala Tyr Thr Asp Met Lys Glu Ala Asn Trp Lys
 35 40 45

Asn Ser Asp Lys Tyr Phe His Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Ala Ala Gln
 50 55 60

Arg Gly Pro Gly Gly Val Trp Ala Ala Glu Lys Ile Ser Asp Gly Arg
 65 70 75 80

Glu Ala Phe Gln Glu Phe Phe Gly Arg Ile Ala Asp Gln Glu Ala Asn
 85 90 95

Arg His Gly Arg Ser Gly Lys Asp Pro Asn Tyr Tyr Arg Pro Pro Gly
 100 105 110

Leu Pro Asp Lys Tyr
 115

15

<210> 107

<211> 122
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> MSAA2

10 <400> 107

```

Met Lys Leu Leu Thr Ser Leu Val Phe Cys Ser Leu Leu Leu Gly Val
 1          5          10          15

Cys His Gly Gly Phe Phe Ser Phe Ile Gly Glu Ala Phe Gln Gly Ala
 20          25          30

Gly Asp Met Trp Arg Ala Tyr Thr Asp Met Lys Glu Ala Gly Trp Lys
 35          40          45

Asp Gly Asp Lys Tyr Phe His Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Ala Ala Gln
 50          55          60

Arg Gly Pro Gly Gly Val Trp Ala Ala Glu Lys Ile Ser Asp Ala Arg
 65          70          75          80

Glu Ser Phe Gln Glu Phe Phe Gly Arg Gly His Glu Asp Thr Met Ala
 85          90          95

Asp Gln Glu Ala Asn Arg His Gly Arg Ser Gly Lys Asp Pro Asn Tyr
 100         105         110

Tyr Arg Pro Pro Gly Leu Pro Ala Lys Tyr
 115         120
    
```

15 <210> 108
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> MSAA3

<400> 108

```

Met Lys Pro Ser Ile Ala Ile Ile Leu Cys Ile Leu Ile Leu Gly Val
 1          5          10          15

Asp Ser Gln Arg Trp Val Gln Phe Met Lys Glu Ala Gly Gln Gly Ser
    
```


ES 2 544 679 T3

His Gly Leu Glu Thr Leu Gln Ala Thr Gln Lys Ala Glu Glu Trp Gly
 100 105 110

Arg Ser Gly Lys Asn Pro Asn His Phe Arg Pro Glu Gly Leu Pro Glu
 115 120 125

Lys Phe
 130

5 <210> 110
 <211> 85
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> MAA1

<400> 110

Gly Phe Phe Ser Phe Val His Glu Ala Phe Gln Gly Ala Gly Asp Met
 1 5 10 15

Trp Arg Ala Tyr Thr Asp Met Lys Glu Ala Asn Trp Lys Asn Ser His
 20 25 30

Glu Asp Thr Ile Ala Asp Gln Glu Ala Asp Lys Tyr Phe His Ala Arg
 35 40 45

Gly Asn Tyr Asp Ala Ala Gln Arg Gly Pro Gly Gly Val Trp Ala Ala
 50 55 60

Glu Lys Ile Ser Asp Gly Arg Glu Ala Phe Gln Glu Phe Phe Gly Arg
 65 70 75 80

Gly His Glu Asp Thr
 85

15 <210> 111
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> Ratón

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> MAA2

25 <400> 111

Gly Phe Phe Ser Phe Ile Gly Glu Ala Phe Gln Gly Ala Gly Asp Met
 1 5 10 15

ES 2 544 679 T3

Trp Arg Ala Tyr Thr Asp Met Lys Glu Ala Gly Trp Lys Asp Gly Asp
 20 25 30

Lys Tyr Phe His Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Ala Ala Gln Arg Gly Pro
 35 40 45

Gly Gly Val Trp Ala Ala Glu Lys Ile Ser Asp Ala Arg Glu Ser Phe
 50 55 60

Gln Glu Phe Phe Gly Arg Gly His Glu Asp Thr
 65 70 75

5 <210> 112
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> MAA3

<400> 112

Glu Ala Gly Gln Gly Ser Arg Asp Met Trp Arg Ala Tyr Ser Asp Met
 1 5 10 15

Lys Lys Ala Asn Trp Lys Asn Ser Asp Lys Tyr Phe His Ala Arg Gly
 20 25 30

Asn Tyr Asp Ala Ala Arg Arg Gly Pro Gly Gly Ala Trp Ala Ala Lys
 35 40 45

Val Ile Ser Asp Ala Arg Glu Ala Val Gln Lys Phe Thr Gly His Gly
 50 55 60

Ala Glu Asp Ser
 65

15 <210> 113
 <211> 82
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> MAA4

25 <400> 113

Trp Tyr Ser Phe Phe Arg Glu Ala Val Gln Gly Thr Trp Asp Leu Trp
 1 5 10 15

ES 2 544 679 T3

Arg Ala Tyr Arg Asp Asn Leu Glu Ala Asn Tyr Gln Asn Ala Asp Gln
 20 25 30

Tyr Phe Tyr Ala Arg Gly Asn Tyr Glu Ala Gln Gln Arg Gly Ser Gly
 35 40 45

Gly Ile Trp Ala Ala Lys Ile Ile Ser Thr Ser Arg Lys Tyr Phe Gln
 50 55 60

Gly Leu Leu Asn Arg Tyr Tyr Phe Gly Ile Arg Asn His Gly Leu Glu
 65 70 75 80

Thr Leu

5 <210> 114
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> HSAA1 alfa

<400> 114

Met Lys Leu Leu Thr Gly Leu Val Phe Cys Ser Leu Val Leu Gly Val
 1 5 10 15

Ser Ser Arg Ser Phe Phe Ser Phe Leu Gly Glu Ala Phe Asp Gly Ala
 20 25 30

Arg Asp Met Trp Arg Ala Tyr Ser Asp Met Arg Glu Ala Asn Tyr Ile
 35 40 45

Gly Ser Asp Lys Tyr Phe His Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Ala Ala Lys
 50 55 60

Arg Gly Pro Gly Gly Val Trp Ala Ala Glu Ala Ile Ser Asp Ala Arg
 65 70 75 80

Glu Asn Ile Gln Arg Phe Phe Gly His Gly Ala Glu Asp Ser Leu Ala
 85 90 95

Asp Gln Ala Ala Asn Glu Trp Gly Arg Ser Gly Lys Asp Pro Asn His
 100 105 110

Phe Arg Pro Ala Gly Leu Pro Glu Lys Tyr

15 115

120

ES 2 544 679 T3

<210> 115
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> HSSA1 beta

10

<400> 115

```

Met Lys Leu Leu Thr Gly Leu Val Phe Cys Ser Leu Val Leu Gly Val
 1           5           10           15

Ser Ser Arg Ser Phe Phe Ser Phe Leu Gly Glu Ala Phe Asp Gly Ala
 20           25           30

Arg Asp Met Trp Arg Ala Tyr Ser Asp Met Arg Glu Ala Asn Tyr Ile
 35           40           45

Gly Ser Asp Lys Tyr Phe His Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Ala Ala Lys
 50           55           60

Arg Gly Pro Gly Gly Ala Trp Ala Ala Glu Val Ile Ser Asp Ala Arg
 65           70           75

Glu Asn Ile Gln Arg Phe Phe Gly His Asp Ala Glu Asp Ser Leu Ala
 85           90           95

Asp Gln Ala Ala Asn Glu Trp Gly Arg Ser Gly Lys Asp Pro Asn His
 100          105          110

Phe Arg Pro Ala Gly Leu Pro Glu Lys Tyr
 115          120
  
```

<210> 116
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> HSSA1 gamma

20

<400> 116

```

Met Lys Leu Leu Thr Gly Leu Val Phe Cys Ser Leu Val Leu Gly Val
 1           5           10           15
  
```

25

ES 2 544 679 T3

Ser Ser Arg Ser Phe Phe Ser Phe Leu Gly Glu Ala Phe Asp Gly Ala
 20 25 30

Arg Asp Met Trp Arg Ala Tyr Ser Asp Met Arg Glu Ala Asn Tyr Ile
 35 40 45

Gly Ser Asp Lys Tyr Phe His Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Ala Ala Lys
 50 55 60

Arg Gly Pro Gly Gly Val Trp Ala Ala Glu Ala Ile Ser Asp Ala Arg
 65 70 75 80

Glu Asn Ile Gln Arg Phe Phe Gly His Asp Ala Glu Asp Ser Leu Ala
 85 90 95

Asp Gln Ala Ala Asn Lys Trp Gly Arg Ser Gly Arg Asp Pro Asn His
 100 105 110

Phe Arg Pro Ala Gly Leu Pro Glu Lys Tyr
 115 120

<210> 117
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> HSAA2 alfa

10

<400> 117

Met Lys Leu Leu Thr Gly Leu Val Phe Cys Ser Leu Val Leu Ser Val
 1 5 10 15

Ser Ser Arg Ser Phe Phe Ser Phe Leu Gly Glu Ala Phe Asp Gly Ala
 20 25 30

Arg Asp Met Trp Arg Ala Tyr Ser Asp Met Arg Glu Ala Asn Tyr Ile
 35 40 45

Gly Ser Asp Lys Tyr Phe His Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Ala Ala Lys
 50 55 60

Arg Gly Pro Gly Gly Ala Trp Ala Ala Glu Val Ile Ser Asn Ala Arg
 65 70 75 80

Glu Asn Ile Gln Arg Leu Thr Gly His Gly Ala Glu Asp Ser Leu Ala
 85 90 95

ES 2 544 679 T3

Asp Gln Ala Ala Asn Lys Trp Gly Arg Ser Gly Arg Asp Pro Asn His
 100 105 110

Phe Arg Pro Ala Gly Leu Pro Glu Lys Tyr
 115 120

5 <210> 118
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> HSAA2 beta

<400> 118

Met Lys Leu Leu Thr Gly Leu Val Phe Cys Ser Leu Val Leu Ser Val
 1 5 10 15

Ser Ser Arg Ser Phe Phe Ser Phe Leu Gly Glu Ala Phe Asp Gly Ala
 20 25 30

Arg Asp Met Trp Arg Ala Tyr Ser Asp Met Arg Glu Ala Asn Tyr Ile
 35 40 45

Gly Ser Asp Lys Tyr Phe His Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Ala Ala Lys
 50 55 60

Arg Gly Pro Gly Gly Ala Trp Ala Ala Glu Val Ile Ser Asn Ala Arg
 65 70 75 80

Glu Asn Ile Gln Arg Leu Thr Gly Arg Gly Ala Glu Asp Ser Leu Ala
 85 90 95

Asp Gln Ala Ala Asn Lys Trp Gly Arg Ser Gly Arg Asp Pro Asn His
 100 105 110

Phe Arg Pro Ala Gly Leu Pro Glu Lys Tyr
 115 120

15 <210> 119
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> isoforma beta de HAA1

25 <400> 119

ES 2 544 679 T3

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

<210> 120
 <211> 102
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Proteina amiloide A del suero

<400> 120

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

85

90

95

Gly Leu Pro Ala Lys Tyr
100

5 <210> 121
<211> 84
<212> PRT
<213> *Canis lupus familiaris (Shar pei)*

10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Proteína amiloide A del suero

<400> 121

Trp Tyr Ser Phe Val Gly Glu Ala Ala Gln Gly Ala Trp Asp Met Leu
1 5 10 15

Arg Ala Tyr Ser Asp Met Arg Glu Ala Asn Tyr Lys Asn Ser Asp Lys
20 25 30

Tyr Phe His Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Ala Ala Gln Arg Gly Pro Gly
35 40 45

Gly Ala Trp Ala Ala Lys Val Ile Ser Asp Ala Arg Glu Asn Ser Gln
50 55 60

Arg Asp Ser Gly His Gly Ala Glu Asp Ser Lys Ala Asp Gln Ala Ala
65 70 75 80

Asn Glu Trp Gly

15 <210> 122
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Inserto de aminoácidos entre las posiciones 67 y 68 de la secuencia de Shar Pei

25 <400> 122

Ile Thr Asp Leu Leu Arg Phe Gly
1 5

30 <210> 123
<211> 95
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> kpla

<220>

ES 2 544 679 T3

<221> MISC_FEATURE

<223> Secuencias de línea germinal de cadena ligera V kappa

<400> 123

5

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser
85 90 95

<210> 124

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> kplb

15

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Secuencias de línea germinal de cadena ligera V kappa

20

<400> 124

Ser Gln Asp Asn Tyr Asn Asp Asn Thr Asp Phe Glu Ile Asp Asn Leu
1 5 10 15

Pro

25

<210> 125

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> kplc

35

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Secuencias de línea germinal de cadena ligera V kappa

ES 2 544 679 T3

<400> 125

Ser Tyr Asn Ala Gln Asp Glu Ser Tyr Thr Pro
1 5 10

5 <210> 126
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> kpld

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Secuencias de línea germinal de cadena ligera V kappa

<400> 126

Ser Gly Arg Asn Asp Gly Arg Ala Gln Glu Leu His Pro
1 5 10

20 <210> 127
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> kple

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Secuencias de línea germinal de cadena ligera V kappa

35 <400> 127

Ser Gly Asn Tyr Phe Ser Ala Gln Asp Glu Pro
1 5 10

40 <210> 128
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> kplf

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Secuencias de línea germinal de cadena ligera V kappa

<400> 128

Ala Leu Ser Gly Ala Asp Asp Glu Phe Asn Pro
1 5 10

55 <210> 129
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 544 679 T3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> kplg
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Secuencias de línea germinal de cadena ligera V kappa
 10
 <400> 129

 Ser Val Gly Ala Gln Asp Glu Ala Phe Pro
 1 5 10

 <210> 130
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> kp2a
 20

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Secuencias de línea germinal de cadena ligera V kappa
 25
 <400> 130

 Val Thr Leu Ser Pro Val Thr Pro Glu Pro Ala Ser Ser Ser Leu Leu
 1 5 10 15

 Asp Ser Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Asp Leu Gln Ser Gln Thr Leu Tyr
 20 25 30

 Arg Ala Asp Asp Lys Arg Val Glu Ala Glu Val Gly Val Met Arg Ile
 35 40 45

 Glu Phe Pro
 50
 30
 <210> 131
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> kp2b
 40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Secuencias de línea germinal de cadena ligera V kappa
 45
 <400> 131

ES 2 544 679 T3

Val Leu Ser Pro Val Thr Pro Glu Pro Ala Ser Ser Ser Leu Leu His
 1 5 10 15

Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Asp Leu Gln Ser Gln Leu Gly Asn Arg Ala
 20 25 30

Asp Asp Lys Arg Val Glu Ala Glu Val Gly Val Met Ala Leu Gln Thr
 35 40 45

Pro

5 <210> 132
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> kp2c

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Secuencias de línea germinal de cadena ligera V kappa
 <400> 132

Val Thr Leu Ser Val Thr Pro Gln Pro Ala Ser Ser Lys Ser Leu Leu
 1 5 10 15

His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Tyr Leu Gln Pro Gln Glu Val Asn Arg
 20 25 30

Phe Asp Asp Lys Arg Val Glu Ala Glu Val Gly Val Met Ser Ile Gln
 35 40 45

Leu Pro

50

20 <210> 133
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> kp3a

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Secuencias de línea germinal de cadena ligera V kappa
 <400> 133

ES 2 544 679 T3

Glu Val Ala Val Pro Glu Ala Leu Ser Val Asn Gln Arg Gly Thr Arg
1 5 10 15

Ala Thr Ile Ala Ser Glu Val Asn Trp Pro
20 25

5 <210> 134
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> kp3b

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Secuencias de línea germinal de cadena ligera V kappa
 <400> 134

Glu Val Leu Gly Leu Pro Glu Ala Leu Ser Val Ser Tyr Gln Arg Gly
1 5 10 15

Arg Ala Thr Ile Asp Asp Arg Glu Glu Val Gly Ser Pro
20 25

20 <210> 135
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> kp3c

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Secuencias de línea germinal de cadena ligera V kappa
 <400> 135

Glu Val Leu Ala Leu Pro Glu Ala Leu Ser Val Ser Tyr Gln Arg Asp
1 5 10 15

Asn Arg Ala Thr Ile Ala Asp Glu Glu Val Arg Ser Asn Trp Pro
20 25 30

40 <210> 136
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> kp4

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Secuencias de línea germinal de cadena ligera V lambda

ES 2 544 679 T3

<400> 136

Val Asp Ser Ala Val Leu Glu Ala Asn Lys Ser Val Leu Tyr Ser Ser
 1 5 10 15

Asn Asn Lys Asn Tyr Gln Pro Trp Thr Arg Asp Asp Ala Glu Val Val
 20 25 30

Tyr Thr Pro
 35

5

<210> 137
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> kp5

15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Cadena ligera V lambda

20

<400> 137

Glu Thr Thr Leu Ala Phe Met Thr Pro Lys Asn Ser Lys Asp Asp Asp
 1 5 10 15

Asp Met Asn Glu Ala Ile Phe Ile Gln Glu Thr Thr Val Pro Ile Pro
 20 25 30

Tyr Asp Asn Asn Ile Glu Ser Glu Ala Tyr Phe Leu His Asp Asn Phe
 35 40 45

Pro

25

<210> 138
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> lmla

35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Cadena ligera V lambda

<400> 138

ES 2 544 679 T3

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

Ala

5 <210> 139
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Imlb
 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Cadena ligera V lambda
 <400> 139

Ala Gly Thr Arg Ser Tyr Arg Gln Val Ser Ala Ser Arg Ser Glu Ala
 1 5 10 15

Ala Asp Gly

20 <210> 140
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Imlc
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Cadena ligera V lambda
 <400> 140

ES 2 544 679 T3

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

Glu Gln Ser Tyr Gly
20

5 <210> 141
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Im2a

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Cadena ligera V lambda

<400> 141

Ala Ala Gly Ser Ser Ile Thr Thr Asp Val Ser Tyr Leu His Lys Met
1 5 10 15

Gly Ser Val Ser Ala Ala Glu Gln Ser Tyr Gly
20 25

20 <210> 142
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Im2b

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Cadena ligera V lambda

<400> 142

Ala Arg Gly Ser Val Ile Thr Thr Asp Val Gly Tyr His Lys Met Asp
1 5 10 15

Val Ser Val Asn Thr Ser Thr Ser Ala Glu Cys Ser Tyr Ala Gly Tyr
20 25 30

Thr Phe

35
 40 <210> 143
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Im3a

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Cadena ligera V lambda

5

<400> 143

Ser Tyr Val Lys Thr Ala Arg Thr Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser
1 5 10 15

His Lys Gln Val Val Val Asp Asp Ser Asp Glu Asn Asn Thr Thr Ser
20 25 30

Arg Val Glu Ala Gln Val Ser Asp His
35 40

10 <210> 144
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Im3b

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Cadena ligera V lambda

<400> 144

Ser Tyr Glu Val Ser Thr Ala Arg Thr Asp Ala Leu Pro Lys Gln Ala
1 5 10 15

Tyr Lys Gln Val Val Lys Asp Ser Glu Glu Ser Thr Val Thr Ser Val
20 25 30

Ala Glu Gln Ser Ala Gly
35

25 <210> 145
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Im3c

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Cadena ligera V lambda

40 <400> 145

ES 2 544 679 T3

Ser Tyr Glu Val Ser Thr Ala Ser Thr Asp Lys Leu Gly Asp Lys Ala
1 5 10 15

Cys Lys Gln Ser Val Val Gln Asp Ser Glu Asn Asn Thr Thr Ser Thr
20 25 30

Ala Met Gln Ala Thr Ala His
35

5 <210> 146
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Im4

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Cadena ligera V lambda
 <400> 146

Ser Glu Asp Ala Val Leu Thr Arg Thr Gln Asp Leu Arg Ser Tyr Ala
1 5 10 15

Lys Gln Val Val Gly Lys Asn
20

20 <210> 147
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Im6

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Cadena ligera V lambda
 <400> 147

Asn Phe Met His Glu Ser Lys Thr Thr Arg Gly Ser Ala Ser Gln Arg
1 5 10 15

Ser Ser Thr Thr Val Asp Gln Val Ile Asp Ser Ser Asn Ser Thr Ser
20 25 30

Lys Glu Gln Ser Tyr Asn
35

40 <210> 148
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 544 679 T3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Im7

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Cadena ligera V lambda

10

<400> 148

Thr Val Glu Leu Thr Val Ser Gly Thr Leu Thr Ala Ser Thr Gly Ala
 1 5 10 15

Val Thr Ser Gly Tyr Pro Asn Phe Lys Gln Arg Ala Ser Thr Ser Asn
 20 25 30

Lys His Trp Thr Ala Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Ser Val Pro Glu
 35 40 45

Glu Leu Leu Tyr Tyr Gly Gly Ala Gln
 50 55

15

<210> 149
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Im8

25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Cadena ligera V lambda

<400> 149

Leu Ser Ala Ser Leu Ala Ser Lys Leu Thr Thr Leu Gly His Ser Ser
 1 5 10 15

Tyr Ala Ile Ala His Gln Glu Lys Gly Arg Tyr Met Lys Leu Ser Asp
 20 25 30

Gly Gly Asp Ser Ala Glu Arg Tyr Thr Ser Ser Ser Glu Gln Gly Thr
 35 40 45

Gly Ile
 50

30

<210> 150
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35

<220>
 <221> MISC_FEATURE

ES 2 544 679 T3

<223> V lambda Wil

<400> 150

Asn Phe Leu Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Asn Asn
20 25 30

Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45

5

Ile Phe Glu Asp Asp His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50

55

60

Gly Ser Val Asp Thr Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

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

Asn Asn

10

<210> 151
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

15

<220>
<223> Fragmento V kappa AL de proteina amiloide

20

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Secuencia consenso derivada de proteinas amiloidogénicas humanas

<400> 151

Pro Glu Asp Val
1

25

<210> 152
<211> 131
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

30

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Cadena ligera v kappa 2A4 y 8G9 murina

35

<220>
<221> SEÑAL
<222> (1)..(19)
<223> Secuencia líder

ES 2 544 679 T3

<223> Cadena ligera v kappa 7D8 murina

<220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(19)
 <223> Secuencia líder

5

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (20)..(131)

10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (43)..(58)
 <223> CDR 1

15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (74)..(80)
 <223> CDR 2

20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (113)..(121)
 <223> CDR 3

25

<400> 153

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 -15 -10 -5

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 -1 1 5 10

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Leu Ser Leu
 15 20 25

Val His Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 30 35 40 45

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

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr
 65 70 75

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
 80 85 90

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 95 100 105

Glu Ile Lys
 110

30 <210> 154

<211> 138
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

5 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Cadena pesada v 2A4, 8G9 y 7D8 murina

10 <220>
<221> SEÑAL
<222> (1)..(19)
<223> Secuencia líder

15 <220>
<221> mat_peptide
<222> (20)..(138)

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (45)..(54)
<223> CDR 1

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (69)..(87)
<223> CDR 2

30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (120)..(127)
<223> CDR 3

<400> 154

ES 2 544 679 T3

Met Val Leu Gly Leu Lys Trp Val Phe Phe Val Val Phe Tyr Gln Gly
 -15 -10 -5

Val His Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Gln
 -1 1 5 10

Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 15 20 25

Asn Thr Tyr Ala Met Tyr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 30 35 40 45

Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Ile Tyr
 50 55 60

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Phe Arg Asp Asp Ser
 65 70 75

Gln Ser Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr
 80 85 90

Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg Pro Tyr Ser Asp Ser Phe Ala Tyr Trp
 95 100 105

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 110 115

5 <210> 155
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cadena ligera v kappa 2A4 y 8G9 humanizada versión 1
 <400> 155

ES 2 544 679 T3

Asp Val 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 His Ser
 20 25 30
 Thr Gly Asn 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 Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 157
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Cadena ligera v kappa 2A4 y 8G9 humanizada versión 3

10

<400> 157

ES 2 544 679 T3

Asp Val 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 His Ser
 20 25 30

Thr Gly Asn 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 Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 158
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Cadena ligera v kappa 7D8 humanizada versión 1

10

<400> 158

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

ES 2 544 679 T3

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

Thr Gly Asn 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 Tyr Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

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

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

<210> 159
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Cadena ligera v kappa 7D8 humanizada versión 2

10

<400> 159

Asp Val 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 Leu Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Thr Gly Asn 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 Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

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

15

<210> 160

ES 2 544 679 T3

<211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Cadena ligera v kappa 7D8 humanizada versión 3

<400> 160

```

  Asp Val 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 Leu Ser Leu Val His Ser
          20          25          30

  Thr Gly Asn 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 Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110
  
```

10

<210> 161
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Cadena pesada 2A4, 8G9 y 7D8 humanizada versión 1

20

<400> 161

ES 2 544 679 T3

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

- <210> 162
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Cadena pesada 2A4, 8G9 y 7D8 humanizada versión 2
- <400> 162

ES 2 544 679 T3

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

<210> 163
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Cadena pesada 2A4, 7D8 y 8g9 humanizada versión 3

10

<400> 163

ES 2 544 679 T3

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

<210> 164
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 164

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

10

ES 2 544 679 T3

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

Tyr Cys Val Arg Pro Tyr Ser Asp Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

5 <210> 165
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Marco conservado de cadena pesada humana

<400> 165

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 Asp His
 20 25 30

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

Gly Arg Thr Arg Asn Lys Ala Asn Ser Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15 <210> 166
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Marco conservado de cadena ligera v kappa humana

ES 2 544 679 T3

<400> 166

```

Asp Val 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 Leu His Ser
          20          25          30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Met Gln Ala
          85          90          95

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

```

Arg

5 <210> 167
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Marco conservado de cadena ligera v kappa humana

15 <400> 167

```

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1          5          10          15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser
          20          25          30

Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
          35          40          45

Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu

```


ES 2 544 679 T3

<221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(19)
 <223> CDR2 VH 2A4

5 <400> 172

Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Asp

10 <210> 173
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(8)
 <223> CDR3 VH 2A4

20 <400> 173

Pro Tyr Ser Asp Ser Phe Ala Tyr
 1 5

25 <210> 174
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cadena ligera v kappa 7D8 humanizada versión 4

<400> 174

Asp Val 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 Leu Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Thr Gly Asn 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 Tyr Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

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

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

ES 2 544 679 T3

5 <210> 175
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena ligera v kappa 7D8 humanizada versión 5
 10 <400> 175

```

Asp Val 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 Leu Ser Leu Val His Ser
          20          25          30

Thr Gly Asn 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 Phe Cys Ser Gln Ser
          85          90          95

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

15 <210> 176
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena ligera v kappa 7D8 humanizada versión 6
 20 <400> 176

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, que es una versión humanizada o quimérica del anticuerpo 2A4, en el que el anticuerpo 2A4 puede obtenerse del Número de Referencia ATCC PTA-9662.
- 10 2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 que comprende una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad expuestas como SEC ID N°: 168, 169 y 170, y una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad expuestas como SEC ID N°: 171, 172 y 173.
- 15 3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 2 que comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 157.
- 20 4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 2 que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 163.
5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 2 que comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 157 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 163.

HSAA1	(SEC ID N° : 98)	1	MKLLTGLVFC	SLVLGVSSRS	FFSFLGEAFD	GARDMWRAYS	DMREANYIGS
HSAA2	(SEC ID N° : 99)	1	MKLLTGLVFC	SLVLSVSSRS	FFSFLGEAFD	GARDMWRAYS	DMREANYIGS
HSAA3	(SEC ID N° : 100)	1	MKLTGILVFC	SLVLGVSSQG	WLTFLKAAGQ	GAKDMWRAYS	DMKEANYKKS
HSAA4	(SEC ID N° : 101)	1	MRLFTGIVFC	SLVMGVTSSES	WRSFFKEALQ	GVGDMGRAYW	DIMISNHQNS
HSAA1	(SEC ID N° : 98)	51	DKYFHARGNY	DAAKRGPGGV	WAAEAISDAR	ENIQRFCHG	A-----E
HSAA2	(SEC ID N° : 99)	51	DKYFHARGNY	DAAKRGPGGG	WAAEVISNAR	ENIQRLTGHG	A-----E
HSAA3	(SEC ID N° : 100)	51	DKYFHARGNY	DAVQRGPGGV	WATEVISDAR	ENVQRLTGDh	A-----E
HSAA4	(SEC ID N° : 101)	51	NRILYARGNY	DAAQRGPGGV	WAAKLISRSR	vylqglidy	lfgnsstvie
HSAA1	(SEC ID N° : 98)	93	DSLADQAANE	WRSRGKDPNH	FRPAGLPEKY		
HSAA2	(SEC ID N° : 99)	93	DSLADQAANK	WRSGRDPNH	FRPAGLPEKY		
HSAA3	(SEC ID N° : 100)	93	DSLAGQATNK	WQSOGKDPNH	FRPAGLPEKY		
HSAA4	(SEC ID N° : 101)	101	DSKSNEKAE	WRSRGKDPDR	FRPDGLPKKY		

FIG. 1

HSAAL	(SEC ID N° : 98)	1	mklltglvfc slvlqvssrs	FFSFLGGEAFD	GARDMWRAYS	DMREANYIGS
HAA1	(SEC ID N° : 102)	1	-----RS	FFSFLGGEAFD	GARDMWRAYS	DMREANYIGS
HSAAL	(SEC ID N° : 98)	51	DKYFHARGNY DAAKRGPGV	WAAEAISDAR	ENIQRFPHG	AEDsladqaa
HAA1	(SEC ID N° : 102)	33	DKYFHARGNY DAAKRGPGV	WAAEAISDAR	ENIQRFPHG	AEDS-----
HSAAL	(SEC ID N° : 98)	101	newgrsgkdp nhfrpaglpe	ky		
HAA1	(SEC ID N° : 102)		-----			--

FIG. 2

HSAA2 (alfa)	(SEC ID N°: 99)	1	mkllltglvfc	slvlsvsers	FFSFLGEAFD	GARDMWRAYS	DMREANYICS
HAA2 (alfa)	(SEC ID N°: 103)	1	-----	-----RS	FFSFLGEAFD	GARDMWRAYS	DMREANYICS
HSAA2 (alfa)	(SEC ID N°: 99)	51	DKYFHARGNY	DAAKRGGGA	WAAEVISNAR	ENIQRLTGHG	AEDSIadcaa
HAA2 (alfa)	(SEC ID N°: 103)	33	DKYFHARGNY	DAAKRGGGA	WAAEVISNAR	ENIQRLTGHG	AEDS-----
HSAA2 (alfa)	(SEC ID N°: 99)	101	nkwgrsgrdp	nhfirpaglpe	ky		
HAA2 (alfa)	(SEC ID N°: 103)		-----	-----	-----	-----	-----

FIG. 3

H5AA3	(SEC ID N°: 100)	1	mklstgiifc slvlgvssQG	WLTFLKAAGQ	GAKDMWRAYS	DMKEANYKKS
HAA3	(SEC ID N°: 104)	1	-----QG	WLTFLKAAGQ	GAKDMWRAYS	DMKEANYKKS
H5AA3	(SEC ID N°: 100)	51	DKYFHARGNY	DAVQRGPGGV	WATEVISDAR	ENVQRLITGDH AEDSlaqtat
HAA3	(SEC ID N°: 104)	33	DKYFHARGNY	DAVQRGPGGV	WATEVISDAR	ENVQRLITGDH AEDS-----
H5AA3	(SEC ID N°: 100)	101	nkwwgsgkdp	nhfrpaglpe	ky	
HAA3	(SEC ID N°: 104)		-----	-----	---	

FIG. 4

HSAA4	(SEC ID N°: 101)	1	mr1ftgivfc	slvmgvtSES	WRSFFKEALQ	GVGDMGRAYW	DIMISNHQNS
HAA4	(SEC ID N°: 105)	1	-----	-----ES	WRSFFKEALQ	GVGDMGRAYW	DIMISNHQNS
HSAA4	(SEC ID N°: 101)	51	NRPLYARGNY	DAAQRGPGV	WAAKLISRSR	VYLQGLIDYY	LFGNSstvlE
HAA4	(SEC ID N°: 105)	33	NRPLYARGNY	DAAQRGPGV	WAAKLISRSR	VYLQGLIDYY	LFGNS-----
HSAA4	(SEC ID N°: 101)	101	dkksnekaee	wgrsgkpdR	frpdglpkky		
HAA4	(SEC ID N°: 105)		-----	-----	-----		

FIG. 5

HAA1	(SEC ID N° : 102)	1	RSFFSFLGEA	FDGARDMWRA	YSDMREANYI	GSDKYFFHARG	NYDAAKRGPG
HAA2	(SEC ID N° : 103)	1	RSFFSFLGEA	FDGARDMWRA	YSDMREANYI	GSDKYFFHARG	NYDAAKRGPG
HAA3	(SEC ID N° : 104)	1	QGWLTFLKAA	GQGAKDMWRA	YSDMKEANYK	KSDKYFFHARG	NYDAVQRGPG
HAA4	(SEC ID N° : 105)	1	ESWRSFFKEA	LQGVGDMGREA	YWDIMISNHQ	NSNRILYARG	NYDAAQRGPG
HAA1	(SEC ID N° : 102)	51	GVWAAEAISD	ARENIQRF--	---FHGA--	--	-EDS
HAA2	(SEC ID N° : 103)	51	GAWAAEVISN	ARENIQRL--	---TGHGA--	--	-EDS
HAA3	(SEC ID N° : 104)	51	GVWATEVISD	ARENVQRL--	---TGdha--	--	-EDS
HAA4	(SEC ID N° : 105)	51	GVWAAKLISR	SRVYLQGLId	yyLFGNSStv		LEDs

FIG. 6

HAA1	(SEC ID N° : 102)	70	GHGAEDS
HAA2	(SEC ID N° : 103)	70	GHGAEDS
HAA3	(SEC ID N° : 104)	70	GdhAEDS
HAA4	(SEC ID N° : 105)	78	stVIEDS

FIG. 7

SAA1 de ratón	(SEC ID N° : 106)	1	MKLLTSLVFC SLLLVGCEGG FFSFVHEAFQ GAGDMWRAYT DMKEANWKNS
SAA2 de ratón	(SEC ID N° : 107)	1	MKLLTSLVFC SLLLVGCHGG FFSFIGEAFQ GAGDMWRAYT DMKEAGWKDG
SAA3 de ratón	(SEC ID N° : 108)	1	MKPSIAIILC ILLLVGDSQR WVQFMKEAGQ GSRDMWRAYS DMKKANWKNS
SAA4 de ratón	(SEC ID N° : 109)	1	MRLATVIVLC SLFLVSGDG WYFFFREAVQ GTWDLWRAYR DNLEANYQNA
SAA1 de ratón	(SEC ID N° : 106)	51	DKYFHARGNY DAAQRGPGGV WAAEKISDGR EAFQE----- FFG---RGHE
SAA2 de ratón	(SEC ID N° : 107)	51	DKYFHARGNY DAAQRGPGGV WAAEKISDAR ESFQE----- FFG---RGHE
SAA3 de ratón	(SEC ID N° : 108)	51	DKYFHARGNY DAAARRGGGA WAAKVISDAR EAVQK----- FTG---HGAE
SAA4 de ratón	(SEC ID N° : 109)	51	DQYFYARGNY EAQRGSGGI WAAKIISTSR KYFGIlnry YFGIrnHGLE
SAA1 de ratón	(SEC ID N° : 106)	93	DTIADQEANR HGRSGKDPNY YRPPGLEPKY
SAA2 de ratón	(SEC ID N° : 107)	93	DTMADQEANR HGRSGKDPNY YRPPGLPAKY
SAA3 de ratón	(SEC ID N° : 108)	93	DSRADQFANE WGRSGKDPNH FRPAGLPKRY
SAA4 de ratón	(SEC ID N° : 109)	101	TLQATQKAE E WGRSGKDPNH FRPEGLPEKF

FIG. 8

MSAA1	(SEC ID N° : 106)	1	mklltstlvfc	slllgvcbgG	FFSFVHEAFQ	GAGDMWRAYT	DMKEANWKNS
MAA1	(SEC ID N° : 110)	1	-----	-----G	FFSFVHEAFQ	GAGDMWRAYT	DMKEANWKNS
MSAA1	(SEC ID N° : 106)	51	DKYFHARGNY	DAAQRGPGV	WAAEKISDGR	EAFQEFFFRG	HEDTiadqea
MAA1	(SEC ID N° : 110)	32	DKYFHARGNY	DAAQRGPGV	WAAEKISDGR	EAFQEFFFRG	HEDT-----
MSAA1	(SEC ID N° : 106)	101	nrbgrsgkdp	nyyppslpd	ky		
MAA1	(SEC ID N° : 110)		-----	-----	---		

FIG. 9

MSAA2	(SEC ID N° : 107)	1	mklltstlvfc	slllgvcbg	FFSFIGEAFQ	GAGDMWRAYT	DMKEAGWKDG
MAA2	(SEC ID N° : 111)	1	-----	-----G	FFSFIGEAFQ	GAGDMWRAYT	DMKEAGWKDG
MSAA2	(SEC ID N° : 107)	51	DKYFHARGNY	DAAQRGGV	WAAEKISDAR	ESFQEFFGRG	HEDTmadqea
MAA2	(SEC ID N° : 111)	32	DKYFHARGNY	DAAQRGGV	WAAEKISDAR	ESFQEFFGRG	HEDT-----
MSAA2	(SEC ID N° : 107)	101	nrhgrsgkdp	nyyrpplpa	ky		
MAA2	(SEC ID N° : 111)		-----	-----	-----		

FIG. 10

MSAA3 (SEC ID N° : 108)	1	mkpslaillc	illlgvdsqr	wvqfmkeagq	GSRDMWRAYS	DMKKANWKNS
MAA3 (SEC ID N° : 112)	1	-----	-----	-----EAGQ	GSRDMWRAYS	DMKKANWKNS
MSAA3 (SEC ID N° : 108)	51	DKYFHARGNY	DAARRGPGA	WAAKVISDAR	EAVQKFTGHG	AEDSradqfa
MAA3 (SEC ID N° : 112)	25	DKYFHARGNY	DAARRGPGA	WAAKVISDAR	EAVQKFTGHG	AEDS-----
MSAA3 (SEC ID N° : 108)	101	newgrsgkdp	nhfrpaglpk	ry	-----	--
MAA3 (SEC ID N° : 112)		-----	-----	-----	-----	--

FIG. 11

MSAA4	(SEC ID N° : 109)	1	mllatvivilc slflgvsdg	WYFFFEAVQ	GTWDLWRAYR	DNLEANYQNA
MAA4	(SEC ID N° : 113)	1	-----	WYFFFEAVQ	GTWDLWRAYR	DNLEANYQNA
MSAA4	(SEC ID N° : 109)	51	DQYFYARGNY EAQQRGSGGI	WAAKIISTSR	KYFQGLLNRY	YFGIRNHGLE
MAA4	(SEC ID N° : 113)	31	DQYFYARGNY EAQQRGSGGI	WAAKIISTSR	KYFQGLLNRY	YFGIRNHGLE
MSAA4	(SEC ID N° : 109)	101	TLqatqkaee wgrsgknpnh	frpeglpckf		
MAA4	(SEC ID N° : 113)	81	TL-----	frpeglpckf		

FIG. 12

MAA1	(SEC ID N° : 110)	1	GFFSFVHEAF	QGAGDMWRAY	TDMKEANWKN	SDKYFHARGN	YDAAQRGPGG
MAA2	(SEC ID N° : 111)	1	GFFSFIGEAF	QGAGDMWRAY	TDMKENGWID	GDKYFHARGN	YDAAQRGPGG
MAA3	(SEC ID N° : 112)	1	-----EAG	QGSDDMWRAY	SDMKANWKN	SDKYFHARGN	YDAARRGPGG
MAA4	(SEC ID N° : 113)	1	-WYSEFFREAV	QGTWDLWRAY	RDNLEANYQN	ADQYFYARGN	YEAQRGSGG
MAA1	(SEC ID N° : 110)	51	VWAAEKISDG	REAFQE----	-FFG---RGH	EDT	
MAA2	(SEC ID N° : 111)	51	VWAAEKISDA	RESFQE----	-FFG---RGH	EDT	
MAA3	(SEC ID N° : 112)	44	AWAAKVISDA	REAVQK----	-FTG---HGA	EDS	
MAA4	(SEC ID N° : 113)	50	IWAAKIISTG	RKYFQGIINX	YFYGITLHGL	ETL	

FIG. 13

MAA1	(SEC ID N° : 110)	69	GRGHEDT
MAA2	(SEC ID N° : 111)	69	GRGHEDT
MAA3	(SEC ID N° : 112)	62	GHGAEDS
MAA4	(SEC ID N° : 113)	76	nHGLETL

FIG. 14

HSAAL (SEC ID N° : 98)	1	MKLLITGLVFC	SLVLGVSSRS	FFSFLGEAFD	GARDMWRAYS	DMREANYIGS
MSAAL (SEC ID N° : 106)	1	MKLLITSLVFC	SLLLVCHGG	FFSFVHEAFQ	GAGDMWEAYT	DMKEANWKNS
HSAAL (SEC ID N° : 98)	51	DKYFHARGNY	DAAKRPGGV	WAAEAISDAR	eniQRFFGHC	AEDSLADQAA
MSAAL (SEC ID N° : 106)	51	DKYFHARGNY	DAAQRPGGV	WAAEKISDGR	eaIQEFFGRG	HEDTIAADQEA
HSAAL (SEC ID N° : 98)	101	NEWGRSGKDP	NHFFPAGLPE	KY		
MSAAL (SEC ID N° : 106)	101	NRHGRSGKDP	NYRPPGLPD	KY		

FIG. 15

HAA1 (SEC ID N° : 102)	1	rSFFSTLGEA FDGARDMRA YSDMREANYI SSDKYFHARG NYDAAKRGPG
MAA1 (SEC ID N° : 110)	1	S-FFSFVHEA FQGAGDMRA YIDMKEANWK nSDKYFHARG NYDAAQRGPG
HAA1 (SEC ID N° : 102)	51	GVWAAEAISD AREniQRFFG HGAEDS
MAA1 (SEC ID N° : 110)	50	GVWAAEKISD GREafQEFFG RGHEDT

FIG. 16

HAAL	(SEC ID N° : 102)	1	GHGAEDS
MAAL	(SEC ID N° : 110)	1	GRGHEDT

FIG. 17

HSAAlalfa	(SEC ID N° : 114)	1	mKLLLTGLVFC	SLVLGVSSRS	FFSFLGEAFD	GARDMWRAYS	DMREANYIGS
HSAAlbeta	(SEC ID N° : 115)	1	mKLLLTGLVFC	SLVLGVSSRS	FFSFLGEAFD	GARDMWRAYS	DMREANYIGS
HSAAlgamma	(SEC ID N° : 116)	1	mKLLLTGLVFC	SLVLGVSSRS	FFSFLGEAFD	GARDMWRAYS	DMREANYIGS
HSAAlalfa	(SEC ID N° : 114)	51	DKYFHARGNY	DAAKRPGGV	WAAEAISDAR	ENIQRFHGHD	AEDSLADQAA
HSAAlbeta	(SEC ID N° : 115)	51	DKYFHARGNY	DAAKRPGGA	WAAEVIDAR	ENIQRFHGHD	AEDSLADQAA
HSAAlgamma	(SEC ID N° : 116)	51	DKYFHARGNY	DAAKRPGGV	WAAEAISDAR	ENIQRFHGHD	AEDSLADQAA
HSAAlalfa	(SEC ID N° : 114)	101	NEWGRSGKDP	NHFRPAGLPE	KY		
HSAAlbeta	(SEC ID N° : 115)	101	NEWGRSGKDP	NHFRPAGLPE	KY		
HSAAlgamma	(SEC ID N° : 116)	101	NEWGRSGKDP	NHFRPAGLPE	KY		

FIG. 18

HSAA2 _{alfa}	(SEC ID N°: 114)	1	TKLLTGLVFC	SLVLSVSSRS	FFSFLGEAFD	GARDMWRAYS	DmREANYIGS
HSAA2 _{beta}	(SEC ID N°: 115)	1	TKLLTGLVFC	SLVLSVSSRS	FFSFLGEAFD	GARDMWRAYS	DmREANYIGS
HSAA2 _{alfa}	(SEC ID N°: 114)	51	DKYFHARGNY	DAAKRGFGA	WAAEVISNAR	ENIQRLTGHG	AEDSLADQAA
HSAA2 _{beta}	(SEC ID N°: 115)	51	DKYFHARGNY	DAAKRGFGA	WAAEVISNAR	ENIQRLTGRG	AEDSLADQAA
HSAA2 _{alfa}	(SEC ID N°: 114)	101	NKWGRSGRDP	NHFRPAGLPE	KY		
HSAA2 _{beta}	(SEC ID N°: 115)	101	NKWGRSGRDP	NHFRPAGLPE	KY		

FIG. 19

	0	1	2	1	abc	def	0	3	5	3	4	5	4	5
kp1a	(SEC ID N°:123)	DIQMTQSPST	LSASVGRVIT	ITCRASQSI*	Q..D..	NY.N	NY.N	SSWLA	WYQQKPKGKAP	WYQQKPKGKAP	KLLIYKASSL	KLLIYKASSL		
kp1b	(SEC ID N°:124)	S	S	Q..D..	NY.N	NY.N	NY.N	SSWLA	WYQQKPKGKAP	WYQQKPKGKAP	KLLIYKASSL	KLLIYKASSL		
kp1c	(SEC ID N°:125)	S	S	Q..D..	NY.N	NY.N	NY.N	SSWLA	WYQQKPKGKAP	WYQQKPKGKAP	KLLIYKASSL	KLLIYKASSL		
kp1d	(SEC ID N°:126)	S	S	Q..D..	NY.N	NY.N	NY.N	SSWLA	WYQQKPKGKAP	WYQQKPKGKAP	KLLIYKASSL	KLLIYKASSL		
kp1e	(SEC ID N°:127)	S	S	Q..D..	NY.N	NY.N	NY.N	SSWLA	WYQQKPKGKAP	WYQQKPKGKAP	KLLIYKASSL	KLLIYKASSL		
kp1f	(SEC ID N°:128)	A..L.....SG..G..G..G..G..A..A..A..A..A..		
kp1g	(SEC ID N°:129)SVG..G..G..G..A..A..A..A..A..		
kp2a	(SEC ID N°:130)	V...T.LS	PVTP.EPAS	S.S...LL	DSDGNTY.D	L...QS	L...QS	Q...TL.YR	Q...TL.YR	Q...TL.YR	Q...TL.YR	Q...TL.YR		
kp2b	(SEC ID N°:131)	V...L.S	PVTP.EPAS	S.S...LL	HS.NGYNY.D	L...QS	L...QS	Q...LG.NR	Q...LG.NR	Q...LG.NR	Q...LG.NR	Q...LG.NR		
kp2c	(SEC ID N°:132)	V...T.LS	VTP.QPAS	S.KS...LL	HS.DGKTY.Y	L...QP	L...QP	Q...EV.NR	Q...EV.NR	Q...EV.NR	Q...EV.NR	Q...EV.NR		
kp3a	(SEC ID N°:133)	E.V...A.	V.P.E.A.	LS...V.N..Q.Q.	R...G..TR	R...G..TR	R...G..TR	R...G..TR	R...G..TR		
kp3b	(SEC ID N°:134)	E.VL...G.	L.P.E.A.	LS...VSY..Q.Q.	R...G..R	R...G..R	R...G..R	R...G..R	R...G..R		
kp3c	(SEC ID N°:135)	E.VL...A.	L.P.E.A.	LS...VSY..Q.Q.	R...D..NR	R...D..NR	R...D..NR	R...D..NR	R...D..NR		
kp4	(SEC ID N°:136)	V...DS	AV.L.E.A.	N.KS...VL	YSSNNKNY..QP.QP.W..TRW..TRW..TRW..TRW..TR		
kp5	(SEC ID N°:137)	ETTL...AF	M..TP..K.N	S.K...D..DDDMNE.AE.A	IFI.QE.TT.	IFI.QE.TT.	IFI.QE.TT.	IFI.QE.TT.	IFI.QE.TT.		
kp1a	(SEC ID N°:123)	ESGVPSRFSG	SG*SGTEFT	LTISLQPD	FATYCCQYN	SYS****	SYS****							
kp1b	(SEC ID N°:124)	T.....D..	F.....E.	I.....D	NLP.....									
kp1c	(SEC ID N°:125)	Q.....D..E.SY	TP.....									
kp1d	(SEC ID N°:126)	Q.....D..E.L.H.	..P.....									
kp1e	(SEC ID N°:127)	Q.....D..E.F.	N.P.....									
kp1f	(SEC ID N°:128)	Q.....D..E.F.	N.P.....									
kp1g	(SEC ID N°:129)	Q.....D..E.A.	..FP.....									
kp2a	(SEC ID N°:130)	A...D...	K..RVEAE	VGV...M.RI	EFF.....									
kp2b	(SEC ID N°:131)	A...D...	K..RVEAE	VGV...M.AL	QTP.....									
kp2c	(SEC ID N°:132)	F...D...	K..RVEAE	VGV...M.SI	QLP.....									
kp3a	(SEC ID N°:133)	AT.I.A...SE.	V.....VNWP									
kp3b	(SEC ID N°:134)	AT.I.D...R.E.E.	..V.....G	..SP.....									
kp3c	(SEC ID N°:135)	AT.I.A...E.E.	..V.....RS	NWP.....									
kp4	(SEC ID N°:136)D...AE.	V.V.....Y	..TP.....									
kp5	(SEC ID N°:137)	VP.I.P...Y.D..	..NNIESE.	A.Y.F.L.HD	NFP.....								

FIG. 21

	0	1	2	3	4	5
	1	1	1	abc	def	5
lm1a (SEC ID N°:138)	QSVLTQPPS*	VSAAPGQKVT	ISCSGSSNI	G***NNVVS	WYQQLPGTAP	KLLIYENKRR
lm1b (SEC ID N°:139)	A.GT...R..S...YR..Q.
lm1c (SEC ID N°:140)	..V.....	.G...R..	..T.....	A...GYD.HG.SN.
lm2a (SEC ID N°:141)	..A...A...	.GS...SI.	..T.T.DV	S...Y.L..H.K..	..M...GS..
lm2b (SEC ID N°:142)	..A...R...	.GS...VI.	..T.T.DV	G...Y...YH.K..	..M.DVS..
lm3a (SEC ID N°:143)	SY.....	.V...KTAR	T.G.NNIG*	*...SKS.HK.Q..	V.VV.DDSD.
lm3b (SEC ID N°:144)	SYE.....	.VS...TAR	T...DALP*	*...KQ.AYK.Q..	V.V.KDSE.
lm3c (SEC ID N°:145)	SYE.....	.VS...TAS	T...DKLG*	*...DK.ACK.QS.	V.V.QDS..
lm4 (SEC ID N°:146)	S.E...D.A.	.V.L.T.R	T.Q.D.LR*	*...SY.A.K.Q..	V.V.GK.N.
lm6 (SEC ID N°:147)	NFM.....H..	.ES.KT..	..TR.GS.	A...S...QR.SS.	TTV...D.Q.
lm7 (SEC ID N°:148)	.T.V.E...	LTVS.GT..	LT.AS.TGAV	TS...GY.PN	F.K.Q..	PA...STSNK
lm8 (SEC ID N°:149)	.L....S...	A..SL.AS.K	LT.TL..G**	*...HSSYAIA	H..Q.EKG.	RY.MKL.SDG
	5	6	7	8	9	
	5	5 ab	3	3	3	
lm1a (SEC ID N°:138)	PSGIPDRFSG	SK**SGTSAT	LGITGLQIGD	EADYYCGTWD	SSLSA**	
lm1b (SEC ID N°:139)	..V.....S	.A.S..RSE.AA..	D...G..	
lm1c (SEC ID N°:140)	..V.....S	.A...AE.QSY.G..	
lm2a (SEC ID N°:141)	..VSN.....NT.S	T.S..AE.CSYA	G.STL..	
lm2b (SEC ID N°:142)	..V.....NT.S	T.S...AE.CSYA	G.YTF..	
lm3a (SEC ID N°:143)E....	.N...NT..	.T.SRVEA..QV..	..SDH..	
lm3b (SEC ID N°:144)E....	.S...TV..	T.S.V.AE.QSA.	G**..	
lm3c (SEC ID N°:145)E....	.N...NT..	.T.S.T.AM.QA..	..TAH..	
lm4 (SEC ID N°:146)V.....	.S...NT.S	T...A.AE.NSR.	..GNH..	
lm6 (SEC ID N°:147)V.....	.IDS.SN..S	T.S.K.E.QSY.	..N**..	
lm7 (SEC ID N°:148)	H.WT.A...	.L.L.GK.A	.TLS.V.PE.	.E...LLY	GGAQ*..	
lm8 (SEC ID N°:149)	GD.....	.S...AERY	.T.SS..SE.Q..G	TGI**..	

FIG. 22

```
1      10      21      31      35
N F L L T Q P H S   V S E S P G K T V T   I S C T R S S G S I   A * * * * N N Y V H   W Y Q O R P G S S P
45      55      65 A B      73      82      93
T T V I F E D D H R   P S G V P D R F S G   S V D T S S N S A S   L T I S G L K T E D   E A D Y Y C Q S Y D   H N N
```

V₆ WII (SEC ID N° : 150)

FIG. 23

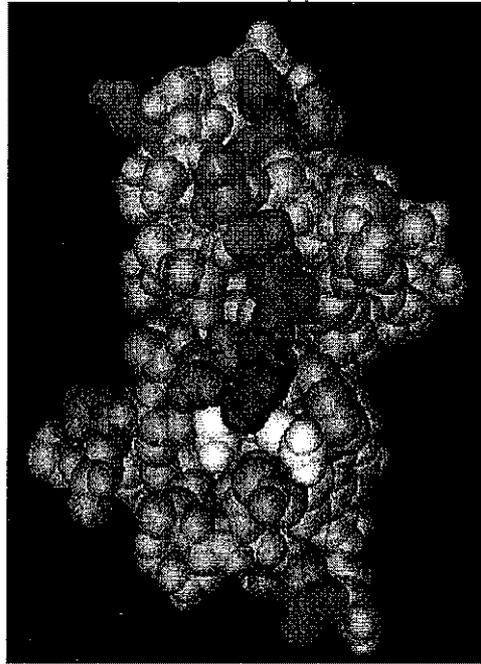
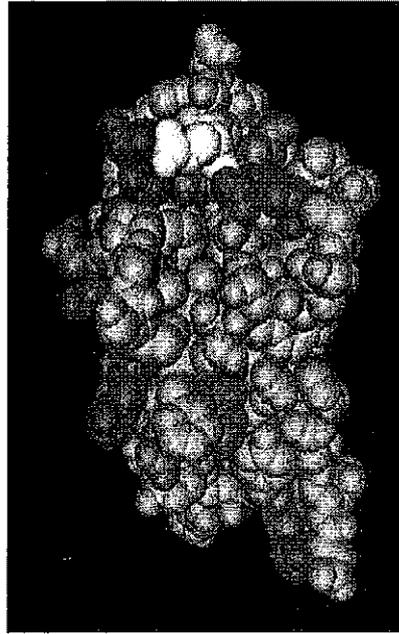
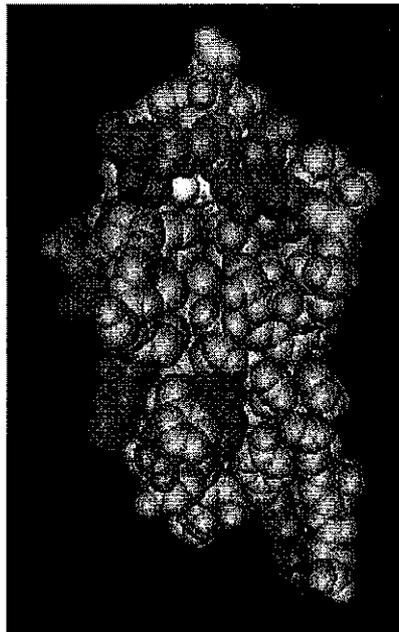


FIG. 24



V_λ 6 Wil Glu81



V_λ 6 Wil Asp82

FIG. 25

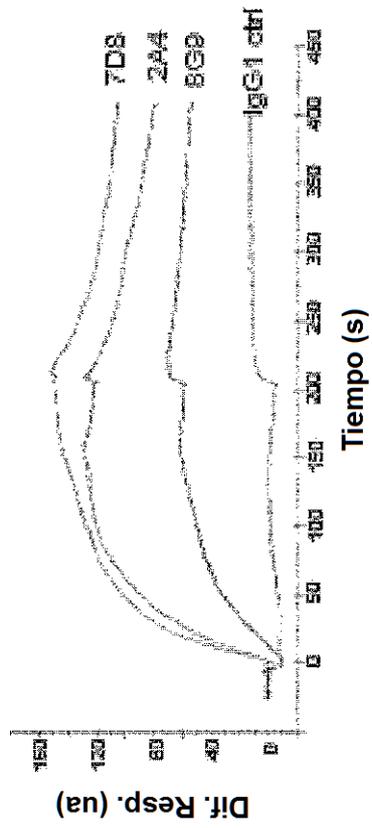


FIG. 26

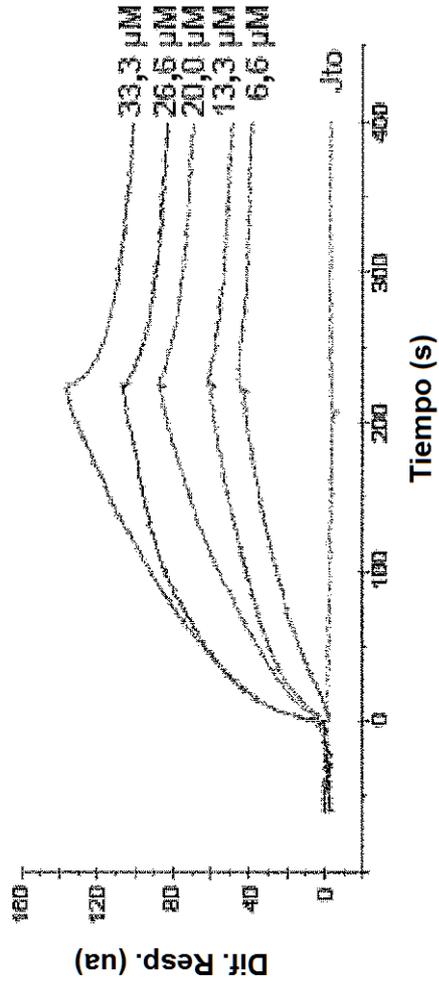


FIG. 27

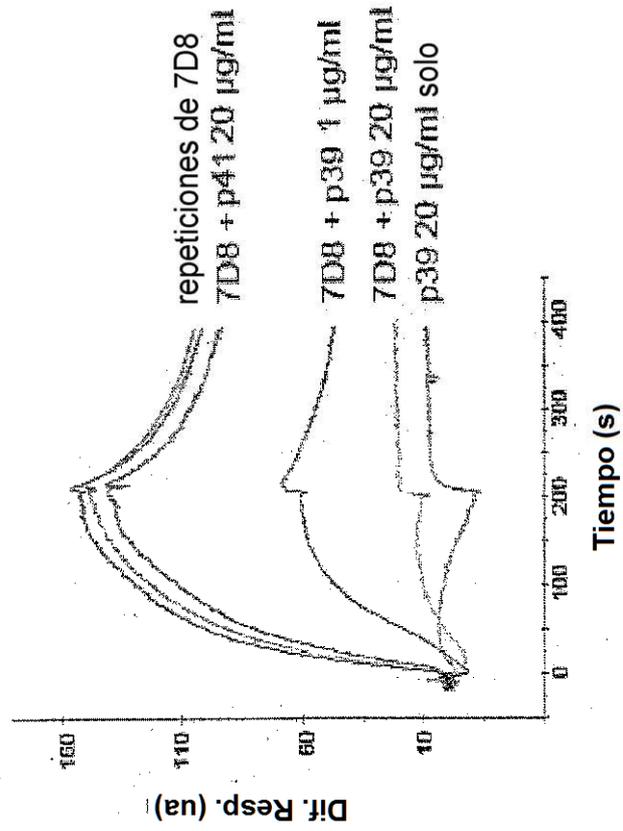


FIG. 28

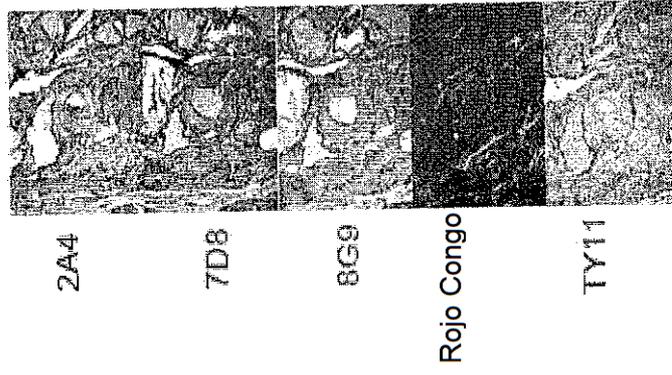


FIG. 29

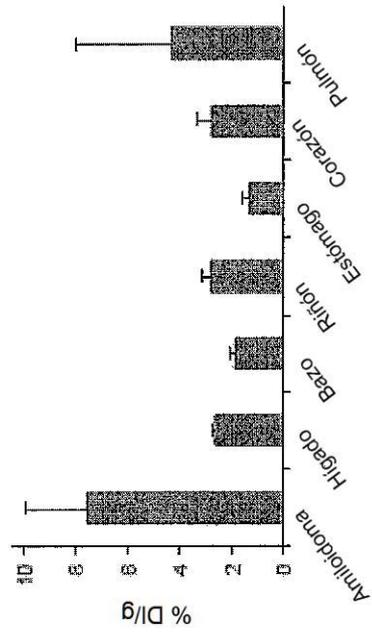


FIG. 30

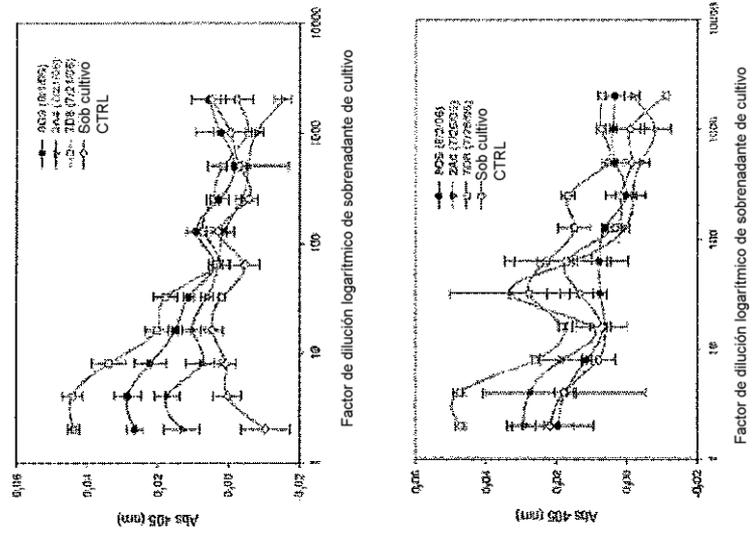


FIG. 31

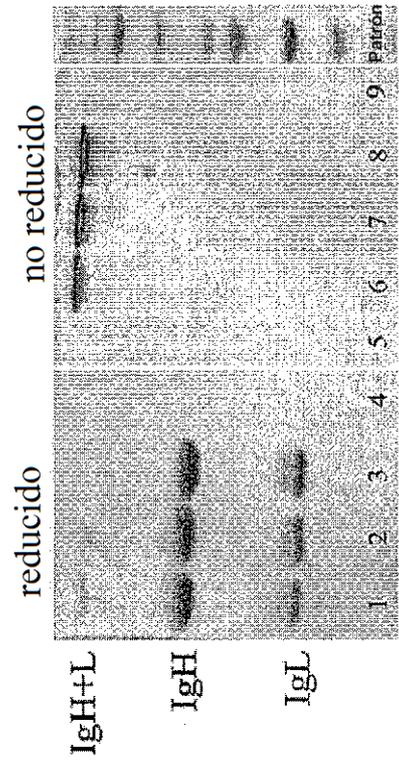


FIG. 32

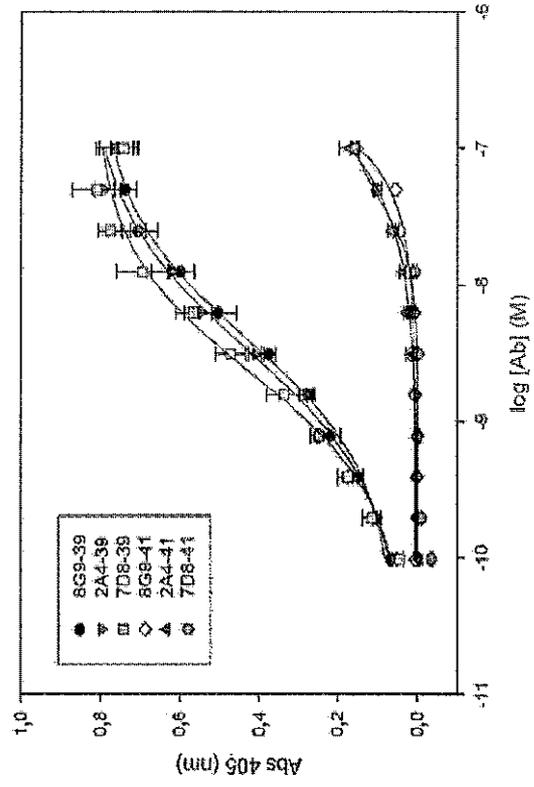


FIG. 33

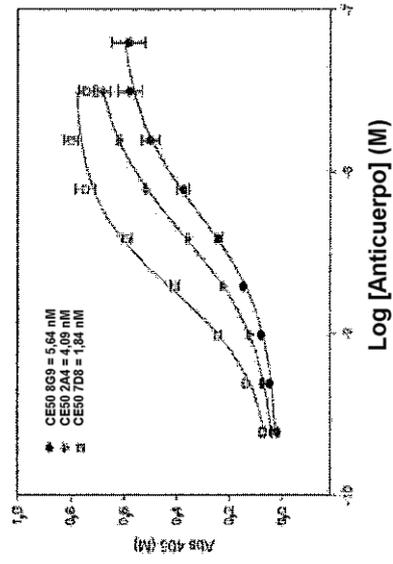


FIG. 34

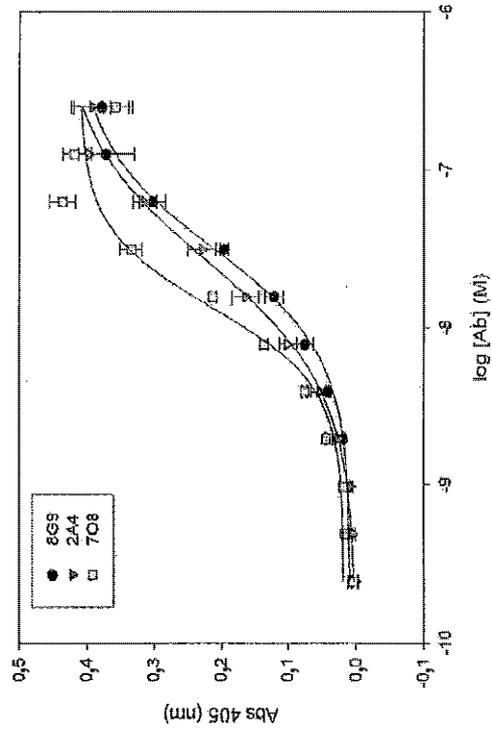


FIG. 35

VL murino (2A4 y 8G9)
MKIPVRLLVLMFWIPASSSDVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSOSLVHSTGNTILHWYLQKPGQSPKLLLIYKVSNRFSGVPDRFSGS
GSGTYFTLKISRVEAEDLGVYFCSOSTHVPFIFGGTKLEIK (SEC ID N° : 152)

VL murino (7D8)
MKIPVRLLVLMFWIPASSSDVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSLSLVHSTGNTILHWYLQKPGQSPKLLLIYKVSNRFSGVPDRFSGS
GSGTYFTLKISRVEAEDLGVYFCSOSTHVPFIFGGTKLEIK (SEC ID N° : 153)

VH murino (2A4, 7D8, 8G9)
MVLGLKWVFFVFYOGVHCEVQLVESGGRLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTIAMYWIRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYAIYADSVK
DRFTIFRDSQSMLYLQMNNLKTEDIAMYCVRPYSDSEFAYWGQILVTVSA (SEC ID N° : 154)

FIG. 36A

Hum2A4 VL Versión 1
 DVVMTQSPVLSLPTVPGEPAISICRSSQSLVHSTGNTYLHWYLVKPKGQSPQLLYKVSNRFSGVDRFSGSGGTyFTLKISRVEAEDVGV
 YfCSQSTHVPTFGGGTKVEIK (SEC ID N° : 155)

Hum2A4 VL Versión 2
 DVVMTQSPVLSLPTVPGEPAISICRSSQSLVHSTGNTYLHWYLVKPKGQSPQLLYKVSNRFSGVDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGV
 YfCSQSTHVPTFGGGTKVEIK (SEC ID N° : 156)

Hum2A4 VL Versión 3
 DVVMTQSPVLSLPTVPGEPAISICRSSQSLVHSTGNTYLHWYLVKPKGQSPQLLYKVSNRFSGVDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGV
 YYCSQSTHVPTFGGGTKVEIK (SEC ID N° : 157)

FIG. 36B

Hum7D8 VL Versión 1
 DVVMTQSPVTPGEPAISCRSSSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPQQLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGGTyFTLKISRVEAEDVGV
 YfCSQSTHVPTFGGKLEIK (SEC ID N° : 158)

Hum7D8 VL Versión 2
 DVVMTQSPVTPGEPAISCRSSSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPQQLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGV
 YfCSQSTHVPTFGGKLEIK (SEC ID N° : 159)

Hum7D8 VL Versión 3
 DVVMTQSPVTPGEPAISCRSSSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPQQLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGV
 YYCSQSTHVPTFGGKLEIK (SEC ID N° : 160)

Hum7D8 VL Versión 4
 DVVMTQSPVTPGEPAISCRSSSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPQQLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGGTyFTLKISRVEAEDVGV
 YfCSQSTHVPTFGGKLEIK (SEC ID N° : 174)

Hum7D8 VL Versión 5
 DVVMTQSPVTPGEPAISCRSSSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPQQLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGV
 YfCSQSTHVPTFGGKLEIK (SEC ID N° : 175)

Hum7D8 VL Versión 6
 DVVMTQSPVTPGEPAISCRSSSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPQQLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGV
 YYCSQSTHVPTFGGKLEIK (SEC ID N° : 176)

FIG. 36C

VL de marco conservado N° de Referencia de Gen Bank BAC01562
DVVMTQSPLSLPVTGEPASISCRSSQSLHNSNGYNYLDWYLQKPGQPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCMQALQIPLTFGGGTKVEIKR (SEC ID N° : 166)

VL de marco conservado N° de Referencia de Gen Bank BAC01733
MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADVMTQSPVTPGEPASISCRSSQSLHNSNGYNYLDWYLQKPGQPQLLIYLGSNRASGVDPDR
FSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQIPTYTFGGGKLEIKRTVAAFSVFIFFPSDEQLKSGTASVCLLNNFYBREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECARQSTPFVCEYQGQSSDLPQPPVN
AGGSGGGSG (SEC ID N° : 167)

FIG. 36D

Hum2A4/7D8/8G9 VH Versión 1
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN¹YAMYWIRQAPGKGLEWV^aRI¹RSKSN¹NYAIYYADSVKDRFTI¹ERDDSK¹NSLYLQ¹MNSL
 KT¹EDTAV¹YYCv¹RPYSD¹SFAYWGQ¹TLVTVSS (SEC ID N° : 161)

Hum2A4/7D8/8G9 VH Versión 2
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN²YAMYWIRQAPGKGLEWV^aRI²RSKSN²NYAIYYADSVKDRFTI²SRDDSK²NSLYLQ²MNSL
 KT²EDTAV²YYCv²RPYSD²SFAYWGQ²TLVTVSS (SEC ID N° : 162)

Hum2A4/7D8/8G9 VH Versión 3
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN³YAMYWIRQAPGKGLEWV^aRI³RSKSN³NYAIYYADSVKDRFTI³SRDDSK³NSLYLQ³MNSL
 KT³EDTAV³YYCv³RPYSD³SFAYWGQ³TLVTVSS (SEC ID N° : 163)

2A4_8G9_7D8_H_chain_pro (VH 2A4 murino)
 EVQLVESGGRLVQPKGSLKLSCAASGFTFN⁴YAMYWIRQAPGKGLEWV^aRI⁴RSKSN⁴NYAIYYADSVKDRFTI⁴FRDDSQ⁴SMLYLQ⁴MNN
 LK⁴TEDTAM⁴YYCv⁴RPYSD⁴SFAYWGQ⁴TLVTVSA (SEC ID N° : 164)

VH de marco conservado N° de Referencia de Gen Bank AAC51024
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMDWV⁵RI⁵QAPGKGLEWV^aGR⁵TRNKANSY⁵TT⁵EYAASV⁵KGRFTI⁵SRDDSK⁵NSLYLQ⁵MN
 SLK⁵TEDTAV⁵YYCARYV⁵VGATLDYWGQ⁵TLVTVSS (SEC ID N° : 165)

FIG. 36E