

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 102**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2008 E 08768370 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2170953**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal anti beta amiloide**

30 Prioridad:

12.06.2007 US 943543 P

12.06.2007 US 943541 P

13.06.2007 US 943790 P

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

13.10.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 548 102 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

Anticuerpo monoclonal anti beta amiloide

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

10 La amiloidosis no es una enfermedad única, sino más bien un grupo diverso de procesos patológicos progresivos caracterizados por depósitos en el tejido extracelular de una proteína de tipo almidón, cérea, denominada amiloide, que se acumula en uno o más órganos o sistemas del cuerpo. A medida que los depósitos de amiloide se acumulan, empiezan a interferir en la función normal del órgano o sistema corporal. Hay al menos 15 tipos diferentes de amiloidosis. Las formas principales son la amiloidosis primaria sin antecedentes conocidos, la amiloidosis secundaria que sigue a alguna otra afección, y la amiloidosis hereditaria.

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

20 Las fibrillas de proteína amiloide, que representan aproximadamente el 90 % del material amiloide, comprenden uno de varios tipos diferentes de proteínas. Algunas de estas proteínas son capaces de plegarse en las denominadas fibrillas en lámina "beta-plegada", una configuración única de proteína que muestra sitios de unión para el rojo Congo que da como resultado las propiedades especiales de tinción de la proteína amiloide. Además, los depósitos de amiloide están estrechamente asociados con el componente amiloide P (pentagonal) (AP), una glucoproteína relacionada con el amiloide P del suero normal (SAP), y con glucosaminoglucanos sulfatados (GAG), carbohidratos complejos del tejido conjuntivo.

25 Muchas enfermedades del envejecimiento se basan en o están asociadas con las proteínas de tipo amiloide y se caracterizan, en parte, por la acumulación de depósitos extracelulares de material amiloide o de tipo amiloide que contribuyen a la patogénesis, así como al avance de la enfermedad. Estas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), incluyendo enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), y el complejo de Parkinson-demencia de Guam. Otras enfermedades que se basan en o están asociadas con las proteínas de tipo amiloide son la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de inicio en la edad adulta; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otras, incluyendo la degeneración macular.

35 Aunque la patogenia de estas enfermedades puede ser diversa, sus depósitos característicos contienen a menudo muchos componentes moleculares compartidos. En gran medida, esto puede ser atribuible a la activación local de las rutas proinflamatorias y por lo tanto puede estar asociado con el depósito simultáneo de componentes activados del complemento, reaccionantes en fase aguda, moduladores inmunitarios, y otros mediadores de la inflamación (McGeer *et al.*, 1994).

40 La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurológico que se cree que está causado principalmente por placas amiloides, una acumulación de depósito anómalo de proteínas en el cerebro. El tipo más frecuente de amiloide encontrado en el cerebro de los individuos afectados se compone principalmente de fibrillas A β . Las pruebas científicas demuestran que un aumento en la producción y acumulación de la proteína beta-amiloide en placas conduce a la muerte de las células nerviosas, lo que contribuye al desarrollo y progreso de la EA. La pérdida de células nerviosas en zonas estratégicas del cerebro, causa a su vez, una reducción en los neurotransmisores y el deterioro de la memoria. Las proteínas responsables principalmente de la acumulación de placa incluyen la proteína precursora amiloide (APP) y dos presenilinas (presenilina I y presenilina II). La escisión secuencial de la proteína precursora amiloide (APP), que es expresada constitutivamente y catabolizada en la mayoría de las células, por las enzimas β -secretasa y γ -secretasa, conduce a la liberación de un péptido A β de 39 a 43 aminoácidos. La degradación de las proteínas precursoras amiloides aumenta probablemente su propensión a agregarse en placas. El fragmento A β (1-42) en particular, tiene una alta propensión a acumularse agregados debido a dos residuos de aminoácidos muy hidrófobos en su C-terminal. Se cree por lo tanto que el fragmento A β (1-42) está principalmente implicado y es responsable del inicio de la formación de la placa neurítica en la EA y que tiene, por lo tanto, un alto potencial patológico. Por lo tanto, existe la necesidad de anticuerpos específicos que puedan dirigirse a la formación de la placa amiloide y difundirla.

55 Los síntomas de la EA se manifiestan lentamente y el primer síntoma puede ser solamente una leve mala memoria. En esta etapa, las personas pueden olvidar acontecimientos recientes, actividades, los nombres de personas o cosas familiares y pueden no ser capaces de resolver problemas matemáticos sencillos. A medida que la

enfermedad avanza, los síntomas se perciben más fácilmente y se vuelven lo suficientemente graves como para hacer que las personas con EA o sus familiares busquen ayuda médica. Los síntomas de la EA en la fase media incluyen el olvido de cómo realizar tareas sencillas, tales como el aseo, y el desarrollo de problemas con el habla, la comprensión, la lectura o la escritura. Los pacientes con EA en fase tardía se pueden volver ansiosos o agresivos, pueden marcharse de casa y finalmente, necesitan atención total.

En la actualidad, la única manera definitiva para diagnosticar la EA es identificar placas y ovillos en el tejido cerebral en una autopsia después de la muerte del individuo. Por lo tanto, los médicos sólo pueden hacer un diagnóstico de una EA "posible" o "probable" mientras la persona esté todavía viva. Utilizando los métodos actuales, los médicos pueden diagnosticar la EA correctamente hasta el 90 por ciento de las veces utilizando varias herramientas para diagnosticar la EA "probable". Los médicos hacen preguntas sobre la salud general de la persona, los problemas médicos anteriores, y el historial de cualquiera de las dificultades que tiene la persona para realizar las actividades diarias. Las pruebas conductuales de memoria, resolución de problemas, atención, el acto de contar y el lenguaje proporcionan información sobre la degeneración cognitiva y pruebas médicas tales como análisis de sangre, orina o líquido cefalorraquídeo, y gammagrafías cerebrales, pueden proporcionar alguna información adicional.

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

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

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

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

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

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

Los cuerpos de Lewy se forman a partir de proteínas neurofilamentosas fosforiladas y no fosforiladas; contienen la proteína sináptica alfa-sinucleína, así como ubiquitina, que está implicada en la eliminación de las proteínas dañadas

o anormales. Además de los cuerpos de Lewy, también pueden estar presentes las neuritas de Lewy, que son cuerpos de inclusión en los procesos celulares de las células nerviosas. Las placas amiloides se pueden formar en los cerebros de pacientes aquejados de demencia por cuerpos de Lewy, sin embargo tienden a ser menores en número que las vistas en los pacientes con enfermedad de Alzheimer. Los ovillos neurofibrilares, el otro distintivo micropatológico de la EA, no son una característica principal de la demencia por cuerpos de Lewy, pero con frecuencia se encuentran presentes en adición a las placas amiloides.

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) se caracteriza por la degeneración de las neuronas motoras superiores e inferiores. En algunos pacientes con ELA, pueden estar presentes demencia o afasia (ELA-D). La demencia es más comúnmente una demencia frontotemporal (FTD), y muchos de estos casos tienen inclusiones ubiquitina-positivas, tau-negativas en las neuronas de la circunvolución dentada y las capas superficiales de los lóbulos frontales y temporales.

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

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

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

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

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

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

El diagnóstico de la degeneración macular implica típicamente un examen con dilatación del ojo, una prueba de agudeza visual y una inspección del fondo de ojo utilizando un procedimiento llamado fundoscopia para ayudar a diagnosticar la DMAE, y, si se sospecha que hay DMAE húmeda se puede realizar también una angiografía con fluoresceína. Si la DMAE seca alcanza las fases avanzadas, no existe ningún tratamiento actual para evitar la pérdida de visión. Sin embargo, una fórmula específica de altas dosis de antioxidantes y cinc puede retrasar o evitar que la DMAE intermedia progrese hasta la fase avanzada. La terapia con Macugen® (inyección de pegaptanib de sodio), la fotocoagulación con láser y la terapia fotodinámica pueden controlar el crecimiento anormal de los vasos sanguíneos y la hemorragia en la mácula, lo que resulta útil para algunas personas que tienen DMAE húmeda; sin embargo, la visión que se haya perdido no será restaurada por estas técnicas. Si ya se ha perdido la visión, existen ayudas de baja visión que pueden ayudar a mejorar la calidad de vida.

Uno de los primeros signos de degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es la acumulación de drusas entre la lámina basal del epitelio pigmentario de la retina (RPE) y la membrana de Bruch (BM). Estudios recientes realizados por Anderson *et al.*, han confirmado que las drusas contienen beta amiloide. (Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256).

5 La investigación en curso continúa con estudios que exploran los factores ambientales, genéticos y dietéticos que pueden contribuir a la DMAE. Se están explorando también nuevas estrategias de tratamiento, incluyendo trasplantes de células retinales, fármacos que eviten o ralenticen el progreso de la enfermedad, radioterapia, terapias génicas, un chip informático implantado en la retina que pueda ayudar a estimular la visión y agentes que eviten el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos debajo de la mácula.

10 Un factor importante a tener en cuenta cuando se desarrollan nuevos fármacos es la facilidad de uso para los pacientes objetivo. La administración oral de fármacos, específicamente comprimidos, cápsulas y cápsulas blandas, representan el 70 % de todas las formas farmacéuticas consumidas debido a la comodidad del paciente. Los desarrolladores de fármacos están de acuerdo en que los pacientes prefieren la administración oral en lugar de someterse a inyecciones u otras formas más invasivas de administración médica. También son preferibles las formulaciones que dan como resultado intervalos bajos de administración (esto es, una vez al día o liberación sostenida). La facilidad de administración de antibióticos en formas farmacéuticas orales se traduce en un aumento del cumplimiento del paciente durante el tratamiento.

15 Lo que se necesita son métodos y composiciones eficaces para la generación de anticuerpos altamente específicos y altamente eficaces, lo cual es un requisito previo si los anticuerpos se van a proporcionar en una forma farmacéutica oral. Preferiblemente, tales anticuerpos reconocerán epítopos específicos sobre diversos antígenos tales como la proteína amiloide.

20 Lo que se necesita también, por lo tanto, son composiciones y métodos eficaces para tratar, en sujetos que lo necesiten, las complicaciones asociadas con enfermedades y trastornos que están causadas por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide, incluyendo la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, incluyendo, pero sin limitarse a, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), incluyendo enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); complejo de Parkinson-demencia de Guam; además de otras enfermedades que se basan en o están asociadas con las proteínas de tipo amiloide, tales como la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de inicio en la edad adulta; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluyendo la degeneración macular. En particular lo que se necesita son anticuerpos especializados y altamente eficaces capaces de contrarrestar las manifestaciones fisiológicas de la enfermedad, tales como la formación de placas asociadas con la agregación de fibras del péptido amiloide o de tipo amiloide.

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

30 La inoculación intraperitoneal de A β ₁₋₁₆ tetrapalmitoilado reconstituido en liposomas a ratones transgénicos NORBA provocó títulos significativos de anticuerpos anti-amiloide, que también se ha demostrado que son capaces de solubilizar las fibras y placas amiloides *in vitro* e *in vivo*. (Nicolau *et al.*, 2002).

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

40 Frenkel *et al.*, 2007 (Journal of Neuroimmunology, vol. 106, no. 1-2, pages 23-31) describen la generación de un anti amiloide beta (Abeta) scFv (508F) que presenta propiedades de desagregación. El anticuerpo monoclonal inicial fue generado contra los aminoácidos 1-16 conjugados a KLH. Este anticuerpo evita la neurotoxicidad, mediada por Abeta, hacia las células cultivadas y rompe las estructuras de fibrillas amiloides preformadas.

45 Moretto *et al.*, 2007 (Journal of Biological Chemistry, vol. 282, no. 15, pages 11436-11445) describen un anticuerpo anti Abeta generado contra Abeta (1-15) introducido en cuatro copias dentro del sitio activo de tioredoxina bacteriana que se une a las fibrillas y oligómeros de Abeta 42 pero no a los monómeros y reduce la patología de Abeta en los ratones transgénicos. El anticuerpo reduce la carga de placa después de inyección en los hemisferios cerebrales.

Kim *et al.*, 2004 (Neurobiology of Aging, vol. 25, 1 page 145) describen el desarrollo de anticuerpos específicos de conformación para neutralización de los oligómeros Abeta.

5 Lambert *et al.*, 2007 (Journal of Neurochemistry, vol. 100, no. 1, pages 23-35) describen la generación de anticuerpos monoclonales específicos para los oligómeros y fibrillas de Abeta pero que no se unen al monómero Abeta fisiológicamente prevalente.

Fukuchi *et al.*, 2006 (Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 344, no. 1, pages 79-86) describen el aislamiento de un scFv (scFv59) que reacciona específicamente con los Abeta oligoméricos y las placas amiloides. El anticuerpo scFv inhibe la agregación de Abeta y la citotoxicidad mediada por Abeta *in vitro*. El scFv 59 reacciona con el Abeta tetramérico pero básicamente con el Abeta monomérico.

10 Los documentos WO2005081872 y WO2006121656 describen métodos para provocar una respuesta inmunitaria con anticuerpos de alta especificidad conformacionalmente sensibles que comprenden un constructo antigénico supramolecular que comprende péptidos antigénicos de beta amiloide modificados por PEGilación o por ácido palmítico. Los anticuerpos monoclonales producidos desagregaron las fibras amiloides hasta un 80 %.

15 El documento WO2007064972 describe la generación de anticuerpos monoclonales (8F5 & 8C5) frente a globulómeros Abeta1-42 que se unen preferentemente a los globulómeros (oligómeros) en comparación con las preparaciones monoméricas de Abeta1-40 y 1-42. Estos anticuerpos se unen débilmente a Abeta fibrilar. Se ha informado que el anticuerpo 8F5 mejora las capacidades cognitivas en los ratones APP transgénicos.

20 La presente invención proporciona nuevos métodos y composiciones que comprenden anticuerpos altamente específicos y altamente eficaces que tienen la capacidad de reconocer específicamente y unirse a proteínas β -amiloides específicas. Los anticuerpos dados a conocer por las enseñanzas de la presente invención son particularmente útiles, en sujetos que lo necesiten, para el tratamiento de enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placa amiloide, incluyendo la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, incluyendo, pero sin limitarse a, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), incluyendo enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); el complejo de Parkinson-demencia de Guam; además de otras enfermedades que se basan en o están asociadas con proteínas de tipo amiloide, tales como la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeldt Jacob, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de inicio en la edad adulta, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y otros, incluyendo la degeneración macular, por nombrar solamente algunos.

35 Por otra parte, la presente invención proporciona nuevos métodos y composiciones para conservar o aumentar la capacidad de memoria cognitiva en un mamífero que presenta una enfermedad o afección asociada a amiloides que comprende administrar a un sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que necesite dicho tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal según la invención.

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

45 En particular, se proporciona un anticuerpo incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o más particularmente, un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que ha sido generado frente a un constructo antigénico supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del péptido β -amiloide, particularmente de un fragmento seleccionado del péptido β -amiloide, modificado con un resto hidrófilo tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), o como alternativa, con un resto hidrófobo, tal como, por ejemplo, un ácido palmítico, en donde dicho resto hidrófilo o hidrófobo se une covalentemente a cada uno de los terminales del péptido antigénico por medio de al menos uno, particularmente uno o dos aminoácidos tales como, por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisteína o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado capaz de servir como un dispositivo de conexión para acoplar el resto hidrófilo o hidrófobo al fragmento de péptido.

50 Cuando se utiliza un resto hidrófilo tal como PEG, el fragmento seleccionado del péptido β -amiloide puede ser un fragmento que corresponde a la secuencia de aminoácidos $A\beta_{22-35}$ y $A\beta_{29-40}$, respectivamente, y los terminales libres de PEG se pueden unir covalentemente a fosfatidiletanolamina o cualquier otro compuesto adecuado para funcionar como el elemento de anclaje, por ejemplo para insertar el constructo antigénico en la bicapa de un liposoma.

55 Cuando se utiliza un resto hidrófobo tal como ácido palmítico, el fragmento seleccionado del péptido β -amiloide puede ser un fragmento que corresponde a la secuencia de aminoácidos $A\beta_{1-15}$ y este resto hidrófobo puede servir directamente como el elemento de anclaje, por ejemplo, para insertar el constructo antigénico en la bicapa de un liposoma.

La presente invención se refiere a un anticuerpo o una parte funcional del mismo capaz de unirse específicamente a un beta amiloide, en donde el anticuerpo o la parte funcional del mismo comprende:

- 5 a. (i) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 7, o una parte funcional de la misma que comprende tres CDR (regiones determinantes de la complementariedad) de la cadena ligera que tiene las secuencias de polipéptidos de SEQ ID NOs: 9-11; y
- 10 (ii) un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 8, o una parte funcional de la misma que comprende tres CDRs de la cadena pesada que tiene las secuencias de polipéptidos de SEQ ID NOs: 12-14; o
- b. las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 7 y 8, en donde el anticuerpo ha sido alterado introduciendo al menos una, al menos dos, o al menos 3 sustituciones conservativas en las secuencias de SEQ ID NOs: 7 y 8; o
- 15 c. (i) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a la secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 19, o una parte funcional de la misma que comprende tres CDRs de la cadena ligera que tiene las secuencias de polipéptidos de SEQ ID NOs: 21-23; y
- 20 (ii) un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20, o una parte funcional de la misma que comprende tres CDRs de la cadena pesada que tiene las secuencias de polipéptidos de SEQ ID NOs: 24-26; o
- 25 d. las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 17 y 18, en donde el anticuerpo ha sido alterado introduciendo al menos una, al menos dos, o al menos 3 sustituciones conservativas en las secuencias de SEQ ID NOs: 17 y 18; o
- e. las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 19 y 20, en donde el anticuerpo ha sido alterado introduciendo al menos una, al menos dos, o al menos tres sustituciones conservativas en las secuencias de SEQ ID NOs: 19 y 20,
- 30

en donde dicho anticuerpo tras la co-incubación con un péptido Abeta1-42 monomérico y/o oligomérico, inhibe la agregación de los monómeros Abeta en fibrillas amiloides poliméricas de alto peso molecular y, en adición tras la co-incubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados, formados por la agregación de péptidos Abeta1-42 monoméricos y/o oligoméricos, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados, en una relación de concentración molar de 1:100 después de incubación durante 24 horas a 37 °C.

35

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo o una parte funcional del mismo capaz de unirse específicamente a un beta amiloide, en donde:

- 40 a. las regiones CDR (regiones determinantes de complementariedad) del anticuerpo o parte funcional del mismo son:
- i. la CDR1 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9;
- ii. la CDR2 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10;
- 45 iii. la CDR3 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;
- iv. la CDR1 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;
- 50 v. la CDR2 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; y
- vi. la CDR3 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; o

b. las regiones CDR del anticuerpo o parte funcional del mismo son:

i. la CDR1 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;

5 ii. la CDR2 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22;

iii. la CDR3 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23;

iv. la CDR1 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24;

10 v. la CDR2 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y

vi. la CDR3 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26;

15 en donde dicho anticuerpo tras la co-incubación con un péptido Abeta1-42 monomérico y/o oligomérico, inhibe la agregación de los monómeros Abeta en fibrillas amiloides poliméricas de alto peso molecular y, en adición tras la co-incubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados, formados por la agregación de péptidos Abeta1-42 monoméricos y/o oligoméricos, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados, en una relación de concentración molar de 1:100 después de incubación durante 24 horas a 37 °C.

20 En una realización específica, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o la parte funcional del mismo.

En una realización específica, se proporciona un anticuerpo o una parte funcional del mismo según una cualquiera de las realizaciones precedentes, cuyo anticuerpo es un anticuerpo monoclonal y es capaz de unirse específicamente a un beta amiloide, en donde el anticuerpo monoclonal o la parte funcional del mismo comprende:

25 (i) un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8; o

(ii) un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 18; o

30 (iii) un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 19 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 20.

35 En otra realización específica, la invención se refiere al anticuerpo o una parte funcional del mismo de cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo y comprende:

a. las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 7 y 8, en donde el anticuerpo ha sido alterado introduciendo al menos una, al menos dos, o al menos tres sustituciones conservativas en las secuencias de SEQ ID NOs: 7 y 8; en donde el aminoácido de la posición 52 se selecciona de cualquier aminoácido, o del grupo que consiste en cisteína, tirosina, y serina; o

40 b. las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 17 y 18, en donde el anticuerpo ha sido alterado introduciendo al menos una, al menos dos, o al menos tres sustituciones conservativas en las secuencias de SEQ ID NOs: 17 y 18; en donde el aminoácido de la posición 52 se selecciona de cualquier aminoácido, o del grupo que consiste en cisteína, tirosina, y serina; o

45 c. las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 19 y 20, en donde el anticuerpo ha sido alterado introduciendo al menos una, al menos dos, o al menos tres sustituciones conservativas en las secuencias de SEQ ID NOs: 19 y 20; en donde el aminoácido de la posición 52 se selecciona de cualquier aminoácido, o del grupo que consiste en cisteína, tirosina, y serina.

50 En otra realización específica, la invención se refiere al anticuerpo o una parte funcional del mismo de cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo y comprende:

- a. las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 7 y 8, en donde el anticuerpo ha sido alterado introduciendo al menos una, al menos dos, o al menos tres sustituciones conservativas en las secuencias de SEQ ID NOs: 7 y 8; en donde el aminoácido de la posición 52 es cisteína; o
- 5 b. las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 17 y 18, en donde el anticuerpo ha sido alterado introduciendo al menos una, al menos dos, o al menos tres sustituciones conservativas en las secuencias de SEQ ID NOs: 17 y 18; en donde el aminoácido de la posición 52 es cisteína; o
- c. las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 19 y 20, en donde el anticuerpo ha sido alterado introduciendo al menos una, al menos dos, o al menos tres sustituciones conservativas en las secuencias de SEQ ID NOs: 19 y 20; en donde el aminoácido de la posición 52 es cisteína.
- 10 En otra realización específica, el anticuerpo o una parte funcional del mismo según una cualquiera de las realizaciones precedentes, es un anticuerpo quimérico o la parte funcional del mismo.
- En otra realización específica más, el anticuerpo o una parte funcional del mismo según una cualquiera de las realizaciones precedentes, es un anticuerpo humanizado o la parte funcional del mismo.
- 15 En otra realización específica, la invención se refiere a un anticuerpo o una parte funcional del mismo según una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el anticuerpo o la parte funcional del mismo ha sido producido por la línea celular de hibridoma EJ1A9, depositada con el número de depósito DSM ACC2844, o la línea celular de hibridoma FG1F9E4, depositada con el número de depósito DSM ACC2845, o la línea celular de hibridoma FK2A6A6, depositada con el número de depósito DSM ACC2846.
- 20 En una realización, la invención se refiere a un polinucleótido, particularmente un polinucleótido aislado, que codifica el anticuerpo o la parte funcional del mismo según una cualquiera de las realizaciones precedentes, particularmente un polinucleótido que codifica el dominio variable de la cadena ligera y el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo o fragmento funcional del mismo según una cualquiera de las realizaciones precedentes.
- En una realización específica, el polinucleótido comprende al menos una de las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NOs: 15-16, y SEQ ID NOs: 27-30.
- 25 En una realización, la invención se refiere a una composición terapéutica, particularmente una composición terapéutica que comprende además un vehículo, un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables, cuya composición comprende el anticuerpo o la parte funcional del mismo según una cualquiera de las realizaciones precedentes en una cantidad terapéuticamente eficaz.
- 30 En una realización específica, la composición terapéutica según la realización precedente, comprende además una sustancia biológicamente activa seleccionada de uno o más compuestos utilizados en el tratamiento de enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide, incluyendo la amiloidosis, compuestos contra el estrés oxidativo, compuestos anti-apoptóticos, quelantes de metales, inhibidores de la reparación del ADN, tales como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de la secretasa, inhibidores de la β -secretasa y γ -secretasa, proteínas tau, neurotransmisores, rompedores de láminas β , moléculas antiinflamatorias, o
- 35 inhibidores de la colinesterasa (ChEIs), tales como tacrina, rivastigmina, donepezilo, galantamina y/o suplementos nutritivos.
- En una realización, la invención se refiere al anticuerpo o la parte funcional del mismo según una cualquiera de las realizaciones precedentes, para uso en:
- 40 a. el tratamiento de enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis; o
- b. el tratamiento o alivio de los efectos de enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), y enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo de Parkinson-demencia de Guam y otras enfermedades que se basan en o están asociadas con proteínas de tipo amiloide tales como la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral
- 45 amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de inicio en la edad adulta; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y degeneración macular en un sujeto; o
- 50 c. el tratamiento de un sujeto mediante la reducción de la carga de placa en el cerebro del sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con un aumento de la carga de placa en el cerebro; o

d. el tratamiento de un sujeto mediante la reducción de la cantidad de placas en el cerebro del sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con un aumento de la carga de placa en el cerebro; o

5 e. el tratamiento de un sujeto mediante la reducción de la cantidad total de A β soluble en el cerebro del sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con el aumento de las concentraciones de A β soluble en el cerebro; o

f. el tratamiento de un sujeto mediante la conservación o el incremento de la capacidad de memoria cognitiva en el sujeto que presenta una enfermedad o afección asociada con el amiloide.

La invención se refiere además a una línea celular caracterizada porque produce el anticuerpo o la parte funcional del mismo de una cualquiera de las realizaciones precedentes, particularmente una línea celular que es:

10 a. hibridoma EJ1A9, depositada el 25 de mayo de 2007 y que recibió el número de depósito DSM ACC2844, o

b. hibridoma FG1F9E4, depositada el 25 de mayo de 2007 y que recibió el número de depósito DSM ACC2845, o

15 c. hibridoma FK2A6A6, depositada el 25 de mayo de 2007 y que recibió el número de depósito DSM ACC2846.

En otra realización, la invención se refiere a un método de diagnóstico de una enfermedad o afección asociada con el amiloide o de diagnóstico de una predisposición a la misma, en un sujeto, que comprende detectar la unión inmunespecífica de un anticuerpo o un fragmento activo del mismo a un epítipo de la proteína amiloide en una muestra del sujeto, que incluye las etapas de:

20 a. poner en contacto una muestra del sujeto que se sospecha que contiene la proteína amiloide, con el anticuerpo o la parte funcional del mismo según una cualquiera de las realizaciones precedentes;

b. dejar que el anticuerpo o la parte funcional del mismo se una a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;

c. detectar la formación del complejo inmunológico; y

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

En una realización, la invención se refiere a un método para determinar la extensión de la carga de placa amiloidogénica en un tejido de un sujeto, que comprende:

30 a. analizar una muestra del sujeto en cuanto a la presencia de proteína amiloide con el anticuerpo o la parte funcional del mismo según una cualquiera de las realizaciones precedentes;

b. determinar la cantidad de anticuerpo unida al antígeno; y

c. calcular la carga de placa en el tejido del sujeto.

En una realización, la invención se refiere a un método para el seguimiento de la enfermedad residual mínima en un sujeto después de tratamiento con el anticuerpo o la parte funcional del mismo de una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde dicho método comprende:

35 a. poner en contacto una muestra del sujeto que se sospecha que contiene la proteína amiloide, con el anticuerpo o la parte funcional del mismo según una cualquiera de las realizaciones precedentes;

b. dejar que el anticuerpo o la parte funcional del mismo se una a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;

40 c. detectar la formación del complejo inmunológico;

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

45 e. comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor normal de control, en donde un aumento de la cantidad de dicho agregado en comparación con un valor normal de control indica que dicho sujeto padece una enfermedad residual mínima.

En una realización, la invención se refiere a un método para predecir el grado de respuesta de un sujeto al tratamiento con el anticuerpo o la parte funcional del mismo de una cualquiera de las realizaciones precedentes, que comprende:

- a. poner en contacto una muestra del sujeto que se sospecha que contiene la proteína amiloide, con el anticuerpo o la parte funcional del mismo según una cualquiera de las realizaciones precedentes;
- b. dejar que el anticuerpo o la parte funcional del mismo se una a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;
- 5 c. detectar la formación del complejo inmunológico;
- d. correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína amiloide en la muestra del sujeto; y
- e. comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico antes y después del inicio del tratamiento,

10 en donde una reducción de la cantidad de dicho agregado indica que dicho sujeto tiene altas posibilidades de responder al tratamiento.

15 En otras realizaciones adicionales, la invención proporciona un kit de ensayo que comprende el anticuerpo o la parte funcional del mismo de una cualquiera de las realizaciones precedentes, particularmente un kit de ensayo que comprende además instrucciones para utilizar el anticuerpo o la parte funcional del mismo con el fin de que se una a la proteína amiloide y forme un complejo inmunológico, y para detectar la formación del complejo inmunológico de tal manera que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de la proteína amiloide.

También se incluye en la presente memoria un método para producir el anticuerpo o la parte funcional del mismo de una cualquiera de las realizaciones precedentes, que comprende cultivar la línea celular como se ha descrito aquí previamente.

20 La presente invención comprende además un método para producir el anticuerpo o fragmento funcional del mismo según una cualquiera de las realizaciones precedentes, que comprende cultivar la línea celular como se ha descrito aquí previamente, o expresar el polinucleótido como se ha descrito aquí previamente en una célula para producir el anticuerpo o fragmento funcional del mismo.

25 Se describe en la presente memoria un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo reconoce y se une a un epítipo conformacional y se une al amiloide polimérico soluble y a las fibrillas o fibras de amiloide, respectivamente, particularmente a los péptidos de A β amiloide polimérico soluble y a las fibrillas o fibras de A β amiloide, respectivamente.

30 Se describe además un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo reconoce y se une a un epítipo conformacional preferentemente expuesto sobre péptidos amiloides poliméricos solubles y péptidos amiloides oligoméricos, respectivamente, particularmente sobre péptidos A β amiloides poliméricos solubles y péptidos A β amiloides oligoméricos que comprenden una pluralidad de péptidos A β 1-42 monoméricos, respectivamente.

35 También se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo reconoce y se une a un epítipo conformacional preferentemente expuesto sobre péptidos amiloides poliméricos solubles y péptidos amiloides oligoméricos, respectivamente, pero también sobre fibrillas o fibras amiloides, particularmente sobre péptidos A β amiloides poliméricos solubles y péptidos A β amiloides oligoméricos que comprenden una pluralidad de péptidos A β 1-42 monoméricos, y sobre las fibrillas o fibras de amiloide que incorporan una pluralidad de dichos péptidos oligoméricos, respectivamente.

40 La herencia del alelo ϵ 4 de la proteína apolipoproteínaE (apoE4) es un fuerte factor genético de riesgo para la enfermedad de Alzheimer. Esta proteína es capaz de unirse al amiloide y se sabe que está implicada tanto en el aclaramiento de A β través de la barrera hematoencefálica, como en la promoción de los depósitos de A β . A la inversa, la unión de amiloide se asocia a la región de unión de ApoE a la lipoproteína hidrófoba y esta asociación disminuye drásticamente la capacidad de unión de ApoE a los lípidos en general.

45 Por consiguiente, un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria, es capaz de inhibir o disminuir de otro modo la interacción del amiloide con ApoE4 en el cerebro de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano, particularmente en el cerebro de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con el aumento de la concentración de A β en el cerebro. El anticuerpo descrito aquí, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, se une por lo tanto preferentemente a péptidos amiloides poliméricos solubles y a péptidos amiloides oligoméricos, respectivamente, particularmente a los péptidos A β poliméricos solubles y a los péptidos A β oligoméricos que comprenden una pluralidad de péptidos A β 1-42 monoméricos, respectivamente. Un anticuerpo como se describe en la presente

5 memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, se une a los péptidos A β monoméricos que tienen al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, incluso más particularmente al menos 40 residuos de aminoácidos, pero no muestra esencialmente ninguna unión a los péptidos A β monoméricos que tienen menos de 30 residuos, en particular a los péptidos que tienen menos de 20 residuos, más particularmente a los péptidos que tienen menos de 10 residuos, pero especialmente a los péptidos que tienen 8 residuos o menos.

10 Un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, se une a los péptidos A β monoméricos que tienen al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, incluso más particularmente al menos 40 residuos de aminoácidos, particularmente al péptido A β 1-40 monomérico y al péptido amiloide polimérico soluble y/o al péptido amiloide oligomérico que comprenden una pluralidad de péptidos A β 1-42 monoméricos, pero no muestra esencialmente ninguna unión al péptido A β 17-40 monomérico.

15 Un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, se une al péptido A β 1-40 monomérico, particularmente al péptido A β 1-40 monomérico y al péptido amiloide polimérico soluble y/o al péptido amiloide oligomérico que comprenden una pluralidad de péptidos A β 1-42 monoméricos, pero no muestra esencialmente ninguna unión al péptido A β 17-40 monomérico.

20 En otro aspecto, se describe aquí un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une al péptido A β 1-40 monomérico, particularmente al péptido A β 1-40 monomérico y al péptido amiloide polimérico soluble y/o al péptido amiloide oligomérico que comprenden una pluralidad de péptidos A β 1-42 monoméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil al péptido A β 1-28 monomérico.

25 En otro aspecto, se describe aquí un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une al péptido A β 1-40 monomérico, en particular al péptido A β 1-40 monomérico y al péptido amiloide polimérico soluble y/o al péptido amiloide oligomérico que comprenden una pluralidad de péptidos A β 1-42 monoméricos, pero muestra una unión intermedia al péptido A β 1-42 monomérico.

30 En otro aspecto, se describe aquí un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une al péptido A β 1-40 monomérico, en particular al péptido A β 1-40 monomérico y al péptido amiloide polimérico soluble y/o al péptido amiloide oligomérico que comprenden una pluralidad de péptidos A β 1-42 monoméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil al péptido A β 1-28 monomérico y una unión intermedia al péptido A β 1-42 monomérico.

35 En otro aspecto, se describe aquí un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une al péptido A β 1-40 monomérico, particularmente al péptido A β 1-40 monomérico y al péptido amiloide polimérico soluble y/o al péptido amiloide oligomérico que comprenden una pluralidad de péptidos A β 1-42 monoméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil al péptido A β 1-28 monomérico y esencialmente ninguna unión al péptido A β 17-40 monomérico.

40 En otro aspecto, se describe aquí un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une al péptido A β 1-40 monomérico, en particular al péptido A β 1-40 monomérico y al péptido amiloide polimérico soluble y/o al péptido amiloide oligomérico que comprenden una pluralidad de péptidos A β 1-42 monoméricos, pero muestra una unión intermedia al péptido A β 1-42 monomérico y esencialmente ninguna unión al péptido A β 17-40 monomérico.

45 En otro aspecto, se describe aquí un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une al péptido A β 1-40 monomérico, en particular al péptido A β 1-40 monomérico y al péptido amiloide polimérico soluble y/o al péptido amiloide oligomérico que comprenden una pluralidad de péptidos A β 1-42 monoméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil al péptido A β 1-28 monomérico y una unión intermedia al péptido A β 1-42 monomérico y esencialmente ninguna unión al péptido A β 17-40 monomérico.

50 En un aspecto, el anticuerpo que se describe aquí, tras la co-incubación con un péptido A β monomérico en una forma monomérica y/o oligomérica que tiene al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, incluso más particularmente al menos 40 residuos de aminoácidos en una forma monomérica y/o oligomérica, pero especialmente con un péptido A β 1-42 monomérico y/o un péptido oligomérico que comprende una pluralidad de dichos péptidos A β 1-42 monoméricos, particularmente en una relación de concentración molar de anticuerpo a A β 1-42 de hasta 1:1000, pero especialmente en una relación de concentración molar entre 1:10 y 1:100, inhibe la agregación de los A β monómeros y/u oligómeros en fibrillas poliméricas de alto peso molecular.

55

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

5 En un aspecto específico, la co-incubación con péptidos amiloides monoméricos y/o oligoméricos se lleva a cabo durante 48 horas a una temperatura de 37 °C.

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

10 En un aspecto, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une preferentemente a un péptido A β ₁₋₄₀ monomérico, particularmente a un péptido A β 1-40 monomérico y a un péptido amiloide soluble polimérico y/o oligomérico que comprende una pluralidad de péptidos A β ₁₋₄₂ monoméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil a un péptido A β 1-28 monomérico y una unión intermedia a un péptido 1-42 monomérico y esencialmente no muestra ninguna unión a un péptido A β 17-40 monomérico y, tras la co-incubación con un péptido A β ₁₋₄₂ monomérico y/o oligomérico inhibe la agregación de los monómeros A β en fibrillas poliméricas de alto peso molecular.

20 En un aspecto, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une preferentemente a un péptido A β ₁₋₄₀ monomérico y también a péptidos A β ₁₋₄₂, oligoméricos y/o poliméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil a un péptido A β 1-28 monomérico y/o una unión intermedia a un péptido 1-42 monomérico y/o esencialmente ninguna unión a un péptido A β 17-40 monomérico y, tras la co-incubación con un péptido A β ₁₋₄₂ monomérico y/o oligomérico inhibe la agregación de los monómeros y/o de los oligómeros A β en fibrillas poliméricas de alto peso molecular.

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

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

35 Como se describe en esta memoria, la unión de los anticuerpos a péptidos amiloidogénicos monoméricos y/o oligoméricos pero, en particular, a la forma amiloide (1-42) conduce a la inhibición de la agregación de los péptidos amiloidogénicos monoméricos y/o oligoméricos en fibrillas o filamentos de alto peso molecular. Por medio de la inhibición de la agregación de los péptidos amiloidogénicos monoméricos y/o oligoméricos, los anticuerpos son capaces de prevenir o ralentizar la formación de placas amiloides, particularmente la forma amiloide (1-42), que se sabe que se vuelve insoluble por un cambio de conformación secundaria y que es la parte principal de las placas amiloides en los cerebros de animales o seres humanos enfermos.

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

45 En un aspecto, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, como se describe en la presente memoria, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo, tras la co-incubación, en particular en una relación de concentración molar entre 1:10 y 1:1000, más

- particularmente en una relación de 1:100, con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados, formados por la agregación de péptidos A β monoméricos y/o oligoméricos que tienen al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, incluso más particularmente al menos 40 residuos de aminoácidos en una forma monomérica y/o oligomérica que comprende una pluralidad de dichos péptidos monoméricos, pero especialmente péptidos A β ₁₋₄₂ monoméricos y/o oligoméricos, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, particularmente al menos un 40 %, más particularmente al menos un 50 %, incluso más particularmente al menos un 60 %, pero especialmente al menos un 70 % o más.
- En un aspecto específico, la inhibición de la agregación y el potencial de desagregación del anticuerpo, respectivamente, se determinan por ultracentrifugación con gradiente de densidad seguida por un análisis de sedimentación SDS-PAGE en un gradiente preformado.
- En otro aspecto específico, la inhibición de la agregación y el potencial de desagregación del anticuerpo, respectivamente, se determinan por el ensayo de fluorescencia de tioflavina T (Th-T).
- En otro aspecto específico, el anticuerpo es co-incubado con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados, durante 12 horas a 36 horas, particularmente durante 18 horas a 30 horas, más particularmente durante 24 horas a una temperatura entre 28 °C y 40 °C, particularmente entre 32 °C y 38 °C, más particularmente a 37 °C.
- En particular, la co-incubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados, se lleva a cabo durante 24 horas a una temperatura de 37 °C.
- En un aspecto, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une preferentemente a un péptido A β ₁₋₄₀ monomérico particularmente a un péptido A β 1-40 monomérico y a un péptido amiloide soluble polimérico y/o oligomérico que comprende una pluralidad de péptidos A β ₁₋₄₂ monoméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil al péptido A β 1-28 monomérico y una unión intermedia al péptido 1-42 monomérico y esencialmente ninguna unión al péptido A β 17-40 monomérico y, tras la co-incubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados, formados por la agregación de péptidos A β ₁₋₄₁ monoméricos y/o oligoméricos es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados, particularmente en al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 20 %, particularmente al menos 30 %, más particularmente al menos un 40 %, incluso más particularmente al menos un 50 %, pero especialmente al menos un 60 %, e incluso más particularmente un 70 % o más.
- En particular, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une preferentemente a un péptido A β ₁₋₄₀ monomérico y también a péptidos A β ₁₋₄₂ oligoméricos y/o poliméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil a un péptido A β 1-28 monomérico y/o una unión intermedia a un péptido 1-42 monomérico y/o esencialmente ninguna unión a un péptido A β 17-40 monomérico y, tras la co-incubación con fibrillas o filamentos de amiloides de alto peso molecular preformados, formados por la agregación de péptidos A β ₁₋₄₂ monoméricos y/o oligoméricos es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados, particularmente en al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 20 %, particularmente al menos un 30 %, más particularmente al menos un 40 %, incluso más particularmente al menos un 50 %, pero especialmente al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o más.
- En un aspecto, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une preferentemente a un péptido A β ₁₋₄₀ monomérico y también a péptidos A β ₁₋₄₂ oligoméricos y/o poliméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil a un péptido A β 1-28 monomérico y/o una unión intermedia a un péptido 1-42 monomérico y/o esencialmente ninguna unión a un péptido A β 17-40 monomérico y tras la co-incubación con fibrillas o filamentos de amiloide de alto peso molecular preformados, formados por la agregación de un péptido A β ₁₋₄₂ monomérico y/o oligomérico durante 24 horas a una temperatura de 37 °C produce una desagregación de las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, particularmente al menos un 55 %, particularmente al menos un 60 %, más particularmente al menos un 70 % y más, con una relación de concentración molar de anticuerpo a A β ₁₋₄₂ de 1:100 y en al menos un 40 %, al menos un 50 %, particularmente al menos un 60 %, particularmente al menos un 65 %, más particularmente al menos un 75 %, incluso más particularmente al menos un 80 %, pero especialmente al menos un 85 %-90 % con una relación de concentración molar de anticuerpo a A β ₁₋₄₂ de 1:10 como se determina por un ensayo de fluorescencia de tioflavina T (Th-T), particularmente un ensayo de fluorescencia de tioflavina T (Th-T) como se describe en los Ejemplos 1.4 y 2.4 más adelante.
- Tanto por medio de la inhibición de la agregación de proteína amiloide como por medio de la desagregación de fibrillas o filamentos amiloidogénicos poliméricos, los anticuerpos son capaces de evitar o ralentizar la formación de placas amiloides lo que lleva a un alivio de los síntomas asociados con la enfermedad y a un retraso o inversión de su progreso.

Por consiguiente, en un aspecto adicional se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria, cuyo anticuerpo es capaz de disminuir la cantidad total de A β en el cerebro de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con un aumento de la concentración de A β en el cerebro.

En otro aspecto se proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe aquí, cuyo anticuerpo es capaz de romper las placas reduciendo de este modo la carga de placa en el cerebro de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con un aumento en la carga de placa en el cerebro. Un anticuerpo como se describe en esta memoria, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, disminuye la carga de placa en el cerebro en al menos un 10 %, al menos un 20 %, particularmente al menos un 25 %, más particularmente al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, particularmente al menos un 60 %, particularmente al menos un 65 %, más particularmente al menos un 75 %, incluso más particularmente al menos un 80 %, pero especialmente al menos 85 % - 90 %.

En otro aspecto más, se describe en esta memoria un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo es capaz de solubilizar las placas lo que está asociado con una reducción de la cantidad de placas en el cerebro de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con un aumento en la carga de placa en el cerebro. El anticuerpo, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo reduce la cantidad de placas en el cerebro en al menos un 10 %, particularmente al menos un 15 %, más particularmente al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, particularmente al menos un 60 %, particularmente al menos 65 %, más particularmente al menos un 75 %, incluso más particularmente al menos un 80 %, pero especialmente al menos 85 % -90 %.

Se debe entender que el anticuerpo descrito puede presentar una, dos o más de las propiedades específicas descritas en esta memoria en diferentes combinaciones.

Por ejemplo, en un aspecto, se describen anticuerpos, pero especialmente anticuerpos monoclonales, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyos anticuerpos son bi-específicos o bi-eficaces porque presentan tanto una propiedad de inhibición de la agregación, como una propiedad de desagregación como se define en esta memoria, particularmente acompañadas de un alto grado de sensibilidad conformacional.

En un aspecto, un anticuerpo como se describe en la presente memoria es bi-específico o bi-eficaz y, tras la co-incubación con un péptido A β monomérico y/o oligomérico que tiene al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, incluso más particularmente al menos 40 residuos de aminoácidos en una forma monomérica y/o oligomérica que comprende una pluralidad de dichos péptidos monoméricos, pero especialmente con un péptido A β ₁₋₄₂ monomérico y/o oligomérico, inhibe la agregación de los monómeros A β en fibrillas poliméricas de alto peso molecular y, además, tras la co-incubación con fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados, formados por la agregación de péptidos A β monoméricos y/o oligoméricos que tienen al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, aún más particularmente al menos 40 residuos de aminoácidos en una forma monomérica y/o oligomérica que comprende una pluralidad de dichos péptidos monoméricos, pero especialmente péptidos A β ₁₋₄₂ monoméricos y/o oligoméricos, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados.

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

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

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

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

10 En un aspecto, se describe aquí un anticuerpo bi-específico o bi-eficaz, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo muestra una alta especificidad para los péptidos A β ₁₋₄₀ monoméricos particularmente para un péptido A β 1-40 monomérico y para un péptido amiloide soluble polimérico y/o oligomérico que comprende una pluralidad de péptidos A β ₁₋₄₂ monoméricos, pero no muestra esencialmente ninguna o solamente una reactividad cruzada de leve a moderada con un monómero de péptido amiloide seleccionado del grupo que consiste en los péptidos monoméricos A β ₁₋₂₈, A β ₁₇₋₄₀, A β ₁₋₃₈, A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₄₁, y/o A β ₁₋₄₂

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

25 En un aspecto, se describe aquí un anticuerpo bi-específico o bi-eficaz, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une preferentemente a un péptido A β ₁₋₄₀ monomérico y también a péptidos A β ₁₋₄₂ oligoméricos y/o poliméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil a un péptido A β 1-28 monomérico y/o una unión intermedia a un péptido 1-42 monomérico y/o esencialmente ninguna unión a un péptido A β 17-40 monomérico y, tras la co-incubación con un péptido A β ₁₋₄₂ monomérico y/o oligomérico durante 24 horas a una temperatura de 37 °C inhibe la agregación de los monómeros y/o oligómeros A β en fibrillas poliméricas de alto peso molecular en al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, particularmente al menos un 55 %, particularmente al menos un 65 %, más particularmente al menos un 70 %, con una relación de concentración molar de anticuerpo a A β ₁₋₄₂ de 1:100 y en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, particularmente al menos un 60 %, particularmente al menos un 65 %, más particularmente al menos un 75 %, incluso más particularmente al menos un 80 %, pero especialmente al menos 85 %-90 % con una relación de concentración molar de anticuerpo a A β ₁₋₄₂ de 1:10 y tras la co-incubación con fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados, formados por la agregación de péptido A β ₁₋₄₂ monomérico y/o oligomérico durante 24 horas a una temperatura de 37 °C produce una desagregación de las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en al menos un 10 % con una relación de concentración molar de anticuerpo a A β ₁₋₄₂ de 1:100 y en al menos un 20 % con una relación de concentración molar de anticuerpo a A β ₁₋₄₂ de 1:10 como se determina por un ensayo de fluorescencia de tioflavina T (Th-T), en particular un ensayo de fluorescencia de tioflavina T (Th-T) como se describe en los Ejemplos 1.4 y 2.4 más adelante.

40 En otro aspecto específico, se describe en la presente memoria un anticuerpo particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo tiene una alta sensibilidad de unión al péptido amiloide A β ₁₋₄₀ y es capaz de detectar péptidos amiloides A β ₁₋₄₂ solubles oligómeros y/o polímeros en una concentración de hasta 0,01 μ g, pero particularmente en un intervalo de concentración entre 0,5 μ g y 0,01 μ g, más particularmente entre 0,1 μ g y 0,01 μ g, pero especialmente en una concentración de 0,01 μ g.

50 En un aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo ha sido generado frente a un constructo antigénico supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del péptido β -amiloide, A β ₁₋₁₅, modificada con restos de ácido palmítico hidrófobos, en donde dicho resto hidrófobo está unido covalentemente a cada terminal por medio de un aminoácido tal como, por ejemplo, lisina o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado capaz de servir como una molécula de enlace.

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

60 En un aspecto, se describe una región variable de la cadena ligera que presenta una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a las secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 7, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDRs de la cadena ligera que tiene las

secuencias de polipéptidos SEQ ID NOs: 9-11, pero especialmente todas las CDRs insertadas en sus regiones estructurales naturales.

5 En un aspecto, se describe una región variable de la cadena pesada que presenta una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a las secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 8, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDRs de la cadena pesada que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NOs: 12-14, pero especialmente todas las CDRs insertadas en sus regiones estructurales naturales.

10 Además, la solicitud describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria en donde dicho anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera que presenta una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a las secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 7, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDRs de la cadena ligera que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NOs: 9-11, pero especialmente todas las CDRs insertadas en sus regiones estructurales naturales .

15 Además, se describe en la presente memoria un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que presenta una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a las secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 8, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDRs de la cadena pesada que tienen las secuencias de polipéptidos SEQ ID NOs: 12-14, pero especialmente todas las CDRs insertadas en sus regiones estructurales naturales .

25 En un aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera y un dominio variable de la cadena pesada que presentan una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a las secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, o una parte funcional de la misma que comprende parte o la totalidad de las CDRs de la cadena pesada y de la cadena ligera que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NOs: 9-14.

30 En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo comprende una secuencia polipeptídica representada en SEQ ID NO: 7 y/o SEQ ID NO: 8. La invención se refiere además al anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NOs: 7-8.

35 También comprende la presente invención un anticuerpo cuya secuencia ha sido alterada por la introducción de al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 o más sustituciones conservativas en las secuencias SEQ ID NOs: 7-8, de tal manera que el anticuerpo mantiene esencialmente su funcionalidad completa.

40 En un aspecto, se describe un fragmento de péptido que comprende la CDR1 de la cadena ligera como se proporciona en SEQ ID NO: 9 y/o la CDR2 de la cadena ligera como se proporciona en SEQ ID NO: 10 y/o la CDR3 de la cadena ligera como se proporciona en SEQ ID NO: 11.

En un aspecto, se describe un fragmento de péptido que comprende la CDR1 de la cadena pesada como se proporciona en SEQ ID NO: 12 y/o la CDR2 de la cadena pesada como se proporciona en SEQ ID NO: 13 y/o la CDR3 de la cadena pesada como se proporciona en SEQ ID NO: 14.

45 En un aspecto, se describen

la CDR1 de la cadena ligera como se proporciona en SEQ ID NO: 9,

la CDR2 de la cadena ligera como se proporciona en SEQ ID NO: 10, y

la CDR3 de la cadena ligera como se proporciona en SEQ ID NO: 11..

En un aspecto, se describen

50 la CDR1 de la cadena pesada como se proporciona en SEQ ID NO: 12,

la CDR2 de la cadena pesada como se proporciona en SEQ ID NO: 13, y

la CDR3 de la cadena pesada como se proporciona en SEQ ID NO: 14..

5 En un aspecto, se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de la cadena ligera que presenta una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a las secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 7, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDRs de la cadena ligera que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NOs: 9-11, pero especialmente todas las CDRs insertadas en sus regiones estructurales naturales.

10 En un aspecto, se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de la cadena pesada que presenta una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a las secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 8, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDRs de la cadena pesada que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NOs: 12-14, pero especialmente todas las CDRs insertadas en sus regiones estructurales naturales.

15 En un aspecto, se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera que presenta una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a las secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 7, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDRs de la cadena ligera que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NOs: 9-11, pero especialmente todas las CDRs insertadas en sus regiones estructurales naturales.

20 En un aspecto, se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que presenta una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a las secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 8, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDRs de la cadena pesada que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NOs: 12-14, pero especialmente todas las CDRs insertadas en sus regiones estructurales naturales.

25 En una realización, la invención se refiere a un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo según la presente invención y como se describe en la presente memoria en donde dicho anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera y un dominio variable de la cadena pesada que presenta una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a las secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 7 y en SEQ ID NO: 8, o una parte funcional de la misma que comprende las CDRs de la cadena ligera y de la cadena pesada que tienen las secuencias de polipéptidos SEQ ID NOs: 9-14.

30 En otra realización de la invención, se proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo según la invención como se describe aquí, pero particularmente una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo monoclonal que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NOs: 7-8. En particular, estas secuencias de polinucleótidos son las SEQ ID NOs: 15-16.

35 Además, se describe un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia de 8 nucleótidos que codifica el anticuerpo monoclonal que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NOs: 7-8. En particular se proporciona un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con las secuencias de nucleótidos SEQ ID NOs: 15-16.

40 En particular, la posición 52 de las SEQ ID NOs: 7-8, puede ser cualquier aminoácido. En una realización adicional, la posición 52 puede ser un residuo de tirosina, serina, o cisteína. Más particularmente la posición 52 es un residuo de cisteína.

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

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

55 En un aspecto, se describe un epítipo A β que se une a un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo ha sido generado contra un constructo antigénico supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos

del péptido β -amiloide, $A\beta_{1-15}$, modificada con restos hidrófobos de ácido palmítico, en donde dicho resto hidrófobo está unido covalentemente a cada terminal por medio de un aminoácido tal como, por ejemplo, lisina o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado capaz de servir como una molécula de enlace. La invención se refiere además al epitopo $A\beta$ que se une al anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3.

5 En un aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une a péptidos $A\beta$ monoméricos que tienen al menos 10, particularmente al menos 20, más particularmente al menos 30, aún más particularmente al menos 40 residuos de aminoácidos, y/o a péptidos amiloides poliméricos solubles que comprenden una pluralidad de dichos péptidos amiloides monoméricos y/o a fibras o fibrillas de amiloide que
10 incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos pero especialmente a un péptido $A\beta_{1-42}$ monomérico y a péptidos $A\beta$ poliméricos solubles que comprenden una pluralidad de péptidos $A\beta_{1-42}$ monoméricos y fibrillas o fibras $A\beta$ que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos, y no muestra esencialmente ninguna unión a los péptidos $A\beta$ monoméricos que tienen 8 residuos de aminoácidos o menos.

15 En un aspecto específico, se describe en la presente memoria un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une a péptidos $A\beta$ monoméricos que tienen al menos 30, incluso más particularmente al menos 40 residuos de aminoácidos, y/o a péptidos amiloides poliméricos solubles que comprenden una pluralidad de dichos péptidos amiloides monoméricos y/o a fibras o fibrillas de amiloide que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos pero especialmente a un péptido $A\beta_{1-42}$ monomérico y a péptidos $A\beta$ poliméricos solubles que
20 comprenden una pluralidad de péptidos $A\beta_{1-42}$ monoméricos y a fibrillas o fibras $A\beta$ que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos, pero no muestra esencialmente ninguna unión a un péptido $A\beta$ 17-40 monomérico.

25 En otro aspecto específico, se describe aquí un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une al péptido $A\beta$ 1-42 monomérico y a péptidos $A\beta$ poliméricos solubles que comprenden una pluralidad de péptidos $A\beta_{1-42}$ monoméricos y a fibrillas o fibras $A\beta$ que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil al péptido $A\beta$ 1-28 monomérico.

30 En otro aspecto, se describe aquí un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une al péptido $A\beta$ 1-42 monomérico y a péptidos $A\beta$ poliméricos solubles que comprenden una pluralidad de péptidos $A\beta_{1-42}$ monoméricos y a fibrillas o fibras $A\beta$ que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil al péptido $A\beta$ 1-28 monomérico y esencialmente ninguna unión al péptido $A\beta$ 17-40 monomérico.

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

40 En un aspecto, el anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal como se describe en la presente memoria, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, inhibe la agregación de los monómeros y/o oligómeros $A\beta$ en fibrillas poliméricas de alto peso molecular en al menos un 20 %, al menos un 30 %, particularmente al menos un 40 %, particularmente al menos un 50 %, más particularmente al menos un 60 %, incluso más particularmente al menos un 70 %, pero especialmente al menos 80 % -90 %, o más, en comparación
45 con los respectivos monómeros de péptidos amiloides incubados en solución tampón (control).

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

5 En particular, se describe un anticuerpo, particularmente el anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une a un péptido A β ₁₋₄₂ monomérico y a péptidos A β poliméricos solubles que comprenden una pluralidad de péptidos A β ₁₋₄₂ monoméricos y a fibrillas o
 10 fibras A β que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil a un péptido A β 1-28 monomérico y/o esencialmente ninguna unión a un péptido A β 17-40 monomérico, y tras la co-incubación con fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados, formados por la agregación de péptidos A β ₁₋₄₂ monoméricos y/o oligoméricos es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados, en particular en al menos un 10 %, al menos un 20 %, particularmente al menos un 30 %, más particularmente al menos un 40 %, incluso más particularmente al menos un 50 %, pero especialmente al menos un 60 % o más.

15 En un aspecto, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une a un péptido A β ₁₋₄₂ monomérico y a péptidos A β poliméricos solubles que comprenden una pluralidad de péptidos A β ₁₋₄₂ monoméricos y a fibrillas o
 20 fibras A β que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil a un péptido A β 1-28 monomérico y/o esencialmente ninguna unión a un péptido A β 17-40 monomérico y, tras la co-incubación con fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados, formados por la agregación de péptido A β ₁₋₄₂ monomérico y/o oligomérico durante 24 horas a una temperatura de 37 °C produce una desagregación de las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, particularmente al menos un 40 %, particularmente al menos un 50 %, más particularmente al menos un 60 %, incluso más particularmente al menos un 70 %, con una relación de concentración molar de anticuerpo a A β ₁₋₄₂ de 1:100 y en al menos un 40 %, particularmente al menos un 50 %, más particularmente al menos un 60 %, incluso más particularmente al menos un 70 % con una relación de concentración molar de anticuerpo a A β ₁₋₄₂ de 1:10 como se determina por un ensayo de fluorescencia de tioflavina T (Th-T), particularmente un ensayo de fluorescencia de tioflavina T (Th-T) como se describe en los Ejemplos 1.4 y 2.4 más adelante.

25 Por medio de la inhibición de la agregación de la proteína amiloide y/o por medio de la desagregación de las fibrillas o filamentos amiloidogénicos poliméricos, los anticuerpos según la presente invención son capaces de evitar o ralentizar la formación de placas amiloides lo que lleva a un alivio de los síntomas asociados con la enfermedad y a un retraso o inversión de su progreso.

30 Por consiguiente, es una realización adicional de la invención proporcionar un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria, cuyo anticuerpo es capaz de disminuir la cantidad total de A β en el cerebro de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con el aumento de la concentración de A β en el cerebro.

35 El anticuerpo de la invención, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe aquí, es capaz de romper las placas disminuyendo de este modo la carga de placa en el cerebro de un sujeto, en particular un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con un aumento de la carga de placa en el cerebro. Un anticuerpo según la invención, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, disminuye la carga de placa en el cerebro en al menos un 20 %, particularmente al menos un 25 %, más particularmente al menos un 30 %, incluso más particularmente más del 30 % .

40 El anticuerpo de la invención, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describe en la presente memoria es capaz además de solubilizar las placas lo que está asociado con una reducción de la cantidad de placas en el cerebro de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con un aumento de la carga de placa en el cerebro. Un anticuerpo según la invención, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, reduce la cantidad de placas en el cerebro en al menos un 10 %, particularmente al menos un 15 %, más particularmente al menos un 20 %.

Se debe entender que un anticuerpo según la invención puede presentar una, dos o más de las propiedades específicas descritas en esta memoria en diferentes combinaciones.

50 Por ejemplo, en una realización, la presente invención proporciona anticuerpos, pero especialmente anticuerpos monoclonales, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyos anticuerpos son bi-específicos o bi-eficaces porque presentan tanto una propiedad de inhibición de la agregación, como una propiedad de desagregación como se define aquí, en particular acompañada de un alto grado de sensibilidad conformacional.

55 En un aspecto, el anticuerpo según la invención y como se describe en la presente memoria es bi-específico o bi-eficaz y, tras la co-incubación con un péptido A β monomérico y/o oligomérico que tiene al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, incluso más particularmente al menos 40 residuos de aminoácidos, pero especialmente con un péptido A β ₁₋₄₂ monomérico y/o oligomérico, inhibe la agregación de los monómeros A β en fibrillas poliméricas de alto peso molecular y, además, tras la co-incubación con fibrillas o filamentos amiloides

poliméricos de alto peso molecular preformados, formados por la agregación de péptidos A β monoméricos y/o oligoméricos que tienen al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, incluso más particularmente al menos 40 residuos de aminoácidos, pero especialmente péptidos A β ₁₋₄₂ monoméricos y/o oligoméricos, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados.

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

- 10 La co-incubación de un anticuerpo según la invención con péptidos amiloides monoméricos y/o oligoméricos se lleva a cabo durante 24 horas a 60 horas, particularmente durante 30 horas a 50 horas, más particularmente durante 48 horas a una temperatura entre 28 °C y 40 °C, particularmente entre 32 °C y 38 °C, más particularmente a 37 °C, mientras que la co-incubación con fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados se lleva a cabo durante 12 horas a 36 horas, particularmente durante 18 horas a 30 horas, más particularmente durante 24 horas a una temperatura entre 28 °C y 40 °C, particularmente entre 32 °C y 38 °C, más particularmente a 37 °C.

- 15 El anticuerpo bi-específico o bi-eficaz según la invención y como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, particularmente al menos un 40 %, particularmente al menos un 50 %, más particularmente al menos un 60 %, aún más particularmente al menos un 70 %.

- 20 El anticuerpo bi-específico o bi-eficaz según la invención y como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, es capaz además de inhibir la agregación de péptidos A β monoméricos y/o oligoméricos que tienen al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, aún más particularmente al menos 40 residuos de aminoácidos, pero especialmente de péptidos A β ₁₋₄₂ monoméricos y/o oligoméricos, en al menos un 30 %, particularmente al menos 40 %, particularmente al menos un 50 %, más particularmente al menos un 60 %, incluso más particularmente al menos un 70 %, pero especialmente al menos 80-90 %, o más, en comparación con los respectivos monómeros de péptidos amiloides incubados en solución tampón (control).

- 25 El anticuerpo bi-específico o bi-eficaz como se describe aquí, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, presenta una alta especificidad para los péptidos A β ₁₋₄₂ monoméricos pero no muestra esencialmente ninguna o solamente una reactividad cruzada leve con un monómero de péptido amiloide seleccionado del grupo que consiste en los péptidos A β ₁₋₂₈ y A β ₁₇₋₄₀ monoméricos.

- 30 El anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, es hasta 1000 veces, particularmente de 50 a 1000 veces, más particularmente de 80 a 100 veces, pero especialmente 100 veces más sensible a un péptido amiloide A β ₁₋₄₂ en comparación con A β ₁₋₂₈ y/o A β ₁₇₋₄₀, y es capaz de inhibir, *in vitro* e *in vivo*, la agregación de péptidos amiloidogénicos monoméricos y/o oligoméricos y/o de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados.

- 35 El anticuerpo bi-específico o bi-eficaz como se describe aquí, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une a un péptido A β ₁₋₄₂ monomérico y a péptidos A β poliméricos solubles que comprenden una pluralidad de péptidos A β ₁₋₄₂ monoméricos y a fibrillas o fibras A β que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil a un péptido A β 1-28 monomérico y/o esencialmente ninguna unión a un péptido A β 17-40 monomérico, y tras la co-incubación con péptido A β ₁₋₄₂ monomérico y/o oligomérico durante 24 horas a una temperatura de 37 °C inhibe la agregación de los monómeros A β en fibrillas poliméricas de alto peso molecular en al menos un 30 % con una relación de concentración molar de anticuerpo a A β ₁₋₄₂ de 1:100 y en al menos un 65 % con una relación de concentración molar de anticuerpo a A β ₁₋₄₂ de 1:10 y, tras la co-incubación con fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados, formados por la agregación de péptido A β ₁₋₄₂ monomérico y/o oligomérico durante 24 horas a una temperatura de 37 °C produce una desagregación de las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en al menos un 20 %, con una relación de concentración molar de anticuerpo a A β ₁₋₄₂ de 1:100 y en al menos un 50 % con una relación de concentración molar de anticuerpo a A β ₁₋₄₂ de 1:10 como se determina por un ensayo de fluorescencia de tioflavina T (Th-T), particularmente un ensayo de fluorescencia de tioflavina T (Th-T) como se describe en los Ejemplos 1.4 y 2.4. más adelante

- 40 El anticuerpo como se describe aquí, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tiene una alta sensibilidad de unión al péptido amiloide A β ₁₋₄₂ y es capaz de detectar fibras A β ₁₋₄₂ en una concentración de hasta 0,01 μ g, pero particularmente en un intervalo de concentración entre 0,5 μ g y 0,01 μ g, más particularmente entre 0,1 μ g y 0,01 μ g, pero especialmente en una concentración de 0,01 μ g.

5 El anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo ha sido generado frente a un constructo antigénico supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del péptido β -amiloide $A\beta_{22-35}$ y $A\beta_{29-40}$ respectivamente, modificado con un resto hidrófilo tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), en donde dicho resto hidrófilo está unido covalentemente a cada terminal por medio de un aminoácido tal como, por ejemplo, lisina o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado capaz de servir como una molécula de enlace.

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

15 En un aspecto, se describe una región variable de la cadena ligera que presenta una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a las secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 19, respectivamente, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDRs de la cadena ligera, pero especialmente todas las CDRs insertadas en sus regiones estructurales naturales.

20 En un aspecto, se describe una región variable de la cadena pesada que presenta una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a las secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20, respectivamente, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDRs de la cadena pesada, pero especialmente todas las CDRs insertadas en sus regiones estructurales naturales.

25 Además, se describe aquí un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera que presenta una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a las secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 19, respectivamente, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDRs de la cadena ligera, pero especialmente todas las CDRs insertadas en sus regiones estructurales naturales.

30 Además, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que presenta una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a las secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20, respectivamente, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDRs de la cadena pesada, pero especialmente todas las CDRs insertadas en sus regiones estructurales naturales.

35 En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo según la presente invención y como se describe en la presente memoria, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera y un dominio variable de la cadena pesada que presentan una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a las secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20, o una parte funcional de la misma que comprende todas o parte de las CDRs de la cadena pesada y de la cadena ligera.

40 La invención se refiere además a un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo comprende la secuencia de polipéptido como se proporciona en SEQ ID NOs: 17 y SEQ ID NOs: 19 y/o en SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20. La invención se refiere además al anticuerpo monoclonal ACI-11-Ab-9 que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NO: 17-18 y al anticuerpo monoclonal ACI-12-Ab-11 que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NOs: 19-20.

45 También comprende la presente invención un anticuerpo cuya secuencia ha sido alterada por la introducción de al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 o más sustituciones conservativas en las secuencias de SEQ ID NOs: 17-18 y SEQ ID NOs: 19-20, respectivamente, de tal modo que el anticuerpo mantiene esencialmente su funcionalidad completa.

50 En un aspecto, se describe un fragmento de péptido que comprende la CDR1 de la cadena ligera como se proporciona en SEQ ID NO: 21 y/o la CDR2 de la cadena ligera como se proporciona en SEQ ID NO: 22 y/o la CDR3 de la cadena ligera como se proporciona en SEQ ID NO: 23.

55 En un aspecto, se describe un fragmento de péptido que comprende la CDR1 de la cadena pesada como se proporciona en SEQ ID NO: 24 y/o la CDR2 de la cadena pesada como se proporciona en SEQ ID NO: 25 y/o la CDR3 de la cadena pesada como se proporciona en SEQ ID NO: 26.

En un aspecto, se describen

la CDR1 de la cadena ligera como se proporciona en SEQ ID NO: 21.

la CDR2 de la cadena ligera como se proporciona en SEQ ID NO: 22, y

la CDR3 de la cadena ligera como se proporciona en SEQ ID NO: 23.

5 En un aspecto, se describen

la CDR1 de la cadena pesada como se proporciona en SEQ ID NO: 24,.

la CDR2 de la cadena pesada como se proporciona en SEQ ID NO: 25, y

la CDR3 de la cadena pesada como se proporciona en SEQ ID NO: 26.

10 En un aspecto, se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de la cadena ligera que presenta una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a las secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 19, respectivamente, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDRs de la cadena ligera representadas en las SEQ ID NOs: 21-23, pero especialmente todas las CDRs insertadas en sus regiones estructurales naturales.

15 En un aspecto, se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de la cadena pesada que presenta una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a las secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20, respectivamente, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDRs de la cadena pesada representadas en las SEQ ID NOs: 24-26, pero especialmente todas las CDRs insertadas en sus regiones estructurales naturales.

20 En un aspecto, se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera que presenta una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a las secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 19, respectivamente, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDRs de la cadena ligera representadas en las SEQ ID NOs: 21-23, pero especialmente las CDRs insertadas en sus regiones estructurales naturales.

25 En un aspecto, se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que presenta una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a las secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20, respectivamente, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, particularmente al menos dos, más particularmente al menos 3 de las CDRs de la cadena pesada representadas en las SEQ ID NOs: 24-26, pero especialmente las CDRs insertadas en sus regiones estructurales naturales.

30 En una realización, la invención se refiere a un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo según la presente invención y como se describe en esta memoria, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera y un dominio variable de la cadena pesada que presentan una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a las secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 19 y en SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20, respectivamente, o una parte funcional de la misma que comprende las CDRs de la cadena ligera y de la cadena pesada como se representan en las SEQ ID NOs: 21-26.

35 En otra realización de la invención, se proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo según la invención como se describe aquí, pero particularmente una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo monoclonal que tiene las secuencias de polipéptidos de SEQ ID NOs: 17-18 o un anticuerpo monoclonal que tiene las secuencias de polipéptidos de SEQ ID NOs: 19-20. En particular, los polinucleótidos que codifican las SEQ ID NOs: 17-18 y SEQ ID NOs: 19-20 son las SEQ ID NOs: 27-28 y SEQ ID NO: 29-30, respectivamente.

40 En otra realización, se proporciona un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo monoclonal que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NO: 17-18 o un anticuerpo monoclonal que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NOs: 19-20. En particular se proporciona un

polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con las secuencias de nucleótidos SEQ ID NOs: 27-28 o SEQ ID NO: 29-30. En una realización específica, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma FG1F9E4, depositada el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2845.

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

En una realización específica, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma FK2A6A6, depositada el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2846.

En una realización específica, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, producido por la línea celular de hibridoma FK2A6A6, depositada el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2846.

En particular, se describe un epítipo A β que se une a un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo ha sido generado contra un constructo antigénico supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del péptido β -amiloide, A β ₂₂₋₃₅ y A β ₂₉₋₄₀, respectivamente, modificado con un resto hidrófilo tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), en donde dicho resto hidrófilo está unido covalentemente a cada terminal por medio de un aminoácido tal como, por ejemplo, lisina o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado capaz de servir como una molécula de enlace. Se describe además un epítipo A β que se une al anticuerpo monoclonal ACI-11-Ab-9 y un epítipo A β que se une al anticuerpo monoclonal ACI-12-Ab-11. En un aspecto, el anticuerpo según la invención y como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, es capaz de disminuir la cantidad total de A β soluble en el cerebro de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con el aumento de las concentraciones de A β soluble en el cerebro.

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

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

Es otro objeto de la presente invención proporcionar métodos y composiciones que comprenden un anticuerpo según la invención y como se describe en esta memoria para la prevención y/o tratamiento terapéutico y/o alivio de los efectos de las enfermedades y trastornos en un sujeto que lo necesite, los cuales están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo, pero sin limitarse a, la amiloidosis (un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placa amiloide incluyendo la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad tales como enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); el complejo de Parkinson-demencia de Guam, además de otras enfermedades y condiciones que se basan en o están asociadas con proteínas de tipo amiloide, tales como la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de inicio en la edad adulta; y amiloidosis cardíaca senil); tumores endocrinos, y degeneración macular, por ejemplo, mediante la inmunización pasiva de un sujeto, incluyendo un mamífero o un ser humano, con un anticuerpo según la invención y como se ha descrito antes en esta memoria.

En un aspecto específico de la invención, el anticuerpo monoclonal de estos métodos es ACI-24-Ab-3 que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NOs: 7-8 o una parte funcional de las mismas como se describe aquí.

En otro aspecto específico de la invención, el anticuerpo monoclonal de estos métodos es ACI-11-Ab-9 que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NO: 17-18 o ACI-12-Ab-11 que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NO: 9-10, respectivamente, o una parte funcional de las mismas como se describe aquí.

La invención se refiere además a una composición terapéutica que comprende un anticuerpo como se describe aquí, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, en una cantidad terapéuticamente eficaz.

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

5 En una realización, la invención proporciona una composición como se describe, para su uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo, pero sin limitarse a, amiloidosis, tumores, y degeneración macular.

En un aspecto específico de dichas realizaciones, el anticuerpo monoclonal utilizado es ACI-24-Ab-3 que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NO: 7-8 o una parte funcional de las mismas como se describe aquí.

10 En otro aspecto específico de dichas realizaciones, el anticuerpo monoclonal utilizado se selecciona del anticuerpo monoclonal ACI-11-Ab-9 que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NOS: 17-18 y del anticuerpo monoclonal ACI-12-Ab-11 que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NO: 19-20 o una parte funcional de las mismas como se describen en la presente memoria.

15 Un anticuerpo según la invención, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, se puede administrar en combinación con otras sustancias biológicamente activas u otros procedimientos de tratamiento para el tratamiento de enfermedades. Las otras sustancias biológicamente activas pueden ser parte de la misma composición que ya comprende un anticuerpo según la invención, en la forma de una mezcla, en donde el anticuerpo y la otra sustancia biológicamente activa se mezclan entre sí o con el mismo disolvente y/o vehículo farmacéuticamente aceptables o el anticuerpo y la otra sustancia biológicamente activa se pueden proporcionar por separado, como parte de composiciones separadas, que se pueden ofrecer por separado, o juntas en la forma de un kit de partes.

20 El anticuerpo, en particular el anticuerpo monoclonal según la invención, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, se puede administrar a un sujeto que lo necesite, al mismo tiempo que la otra u otras sustancias biológicamente activas, de forma intermitente o secuencial. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal según la invención, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo se puede administrar simultáneamente con una primera sustancia adicional biológicamente activa, o administrada secuencialmente después o antes del anticuerpo. Si se elige un régimen de aplicación en el que se administra más de una sustancia adicional biológicamente activa junto con al menos un anticuerpo según la invención, los compuestos o sustancias se pueden administrar parcialmente de manera simultánea, parcialmente de manera secuencial en varias combinaciones.

30 En una realización, la invención se refiere a una composición que comprende un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, en una cantidad terapéuticamente eficaz y una sustancia o compuesto adicional biológicamente activo, particularmente un compuesto utilizado en el tratamiento de enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide, incluyendo, pero sin limitarse a, la amiloidosis, tumores endocrinos, y degeneración macular y/o un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

40 En una realización, se proporciona una composición según la invención y como se describe en la presente memoria que comprende un anticuerpo como se describe aquí, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, y que comprende además al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos contra el estrés oxidativo, compuestos anti-apoptóticos, quelantes de metales, inhibidores de la reparación del ADN, tales como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de la secretasa, inhibidores de la β -secretasa y γ -secretasa, proteínas tau, neurotransmisores, rompedores de láminas β , moléculas antiinflamatorias, o inhibidores de la colinesterasa (ChEIs), tales como tacrina, rivastigmina, donepezilo, y/o galantamina y otros fármacos y suplementos nutritivos, y opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

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

50 En otra realización específica, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que comprende además al menos un compuesto adicional seleccionado del grupo que consiste en tacrina, rivastigmina, donepezilo, galantamina, niacina y memantina.

55 En otra realización más de la invención se proporcionan composiciones que comprenden un anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que comprende además al menos un "antipsicótico atípico", tal como, por ejemplo clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol o olanzapina para el tratamiento de los

síntomas psicóticos positivos y negativos, incluyendo alucinaciones, delirios, trastornos del pensamiento (que se manifiestan por incoherencia notable, pérdida de asociación, tangencialidad), y el comportamiento extraño o desorganizado, además de anhedonia, afecto aplanado, apatía, y aislamiento social, y, opcionalmente, que comprende además un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

- 5 Otros compuestos que se pueden utilizar adecuadamente en composiciones en combinación con un anticuerpo según la presente invención, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, están descritos, por ejemplo, en el documento WO 2004/058258 (véanse especialmente las páginas 16 y 17) que incluye las dianas terapéuticas del fármaco (páginas 36-39), ácidos alcanosulfónicos y ácidos alcanosulfúricos (páginas 39-51), inhibidores de la colinesterasa (páginas 51-56), antagonistas del receptor NMDA (páginas 56-58), estrógenos (páginas 58-59), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (páginas 60-61), antioxidantes (páginas 61-62), agonistas de los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR) (páginas 63-67), agentes reductores del colesterol (páginas 68-75); inhibidores de amiloides (páginas 75-77), inhibidores de la formación de amiloides (páginas 77-78), quelantes de metales (páginas 78-79), antipsicóticos y antidepressivos (páginas 80-82), suplementos nutricionales (páginas 83-89) y compuestos que aumentan la disponibilidad de sustancias biológicamente activas en el cerebro (véanse las páginas 89-93) y profármacos (páginas 93 y 94), cuyo documento se incorpora aquí como referencia.

En particular, la composición según la invención comprende el anticuerpo monoclonal y/o la sustancia biológicamente activa, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, en una cantidad terapéuticamente eficaz.

- 20 El anticuerpo como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, se puede producir por un método que comprende generar en un organismo hospedante adecuado un anticuerpo contra un constructo antigénico supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del péptido β -amiloide o un fragmento del mismo, particularmente del péptido β -amiloide $A\beta_{1-15}$, modificado con restos hidrófobos, particularmente un resto de ácido palmítico, o, como alternativa, particularmente de péptido β -amiloide $A\beta_{22-23}$ y $A\beta_{29-40}$, respectivamente, modificado con restos hidrófilos, particularmente restos de polietilenglicol (PEG), en donde dicho resto hidrófobo o hidrófilo está unido covalentemente a cada terminal por medio de al menos uno, particularmente uno o dos aminoácidos tales como, por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisteína o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado capaz de servir como una molécula de enlace; y aislar el anticuerpo.
- 30 Cuando se utiliza un resto hidrófilo tal como PEG, el fragmento seleccionado del péptido β -amiloide puede ser un fragmento que corresponde a la secuencia de aminoácidos $A\beta_{22-35}$, y $A\beta_{29-40}$, respectivamente, y los extremos libres de PEG se pueden unir covalentemente a fosfatidiletanolamina o cualquier otro compuesto adecuado para funcionar como el elemento de anclaje, por ejemplo para insertar el constructo antigénico en la bicapa de un liposoma.

- 35 El anticuerpo según la invención y como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo y/o de una composición farmacéutica según la invención y como se describe en la presente memoria, o de una mezcla según la invención y como se describe en la presente memoria, se pueden utilizar para la preparación de un medicamento para tratar o aliviar, en un sujeto que lo necesite, los efectos de las enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide, incluyendo, pero sin limitarse a, amiloidosis, tumores endocrinos, y degeneración macular.

- 45 En una realización, la invención se refiere a un método para la preparación de una composición farmacéutica o de una mezcla según la invención y como se describe aquí, utilizando un anticuerpo según la invención y como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, para su uso en el tratamiento o alivio, en un sujeto que lo necesite, de los efectos de las enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide, incluyendo, pero sin limitarse a, amiloidosis, tumores endocrinos, y degeneración macular.

- 50 En una realización, la invención proporciona un método para la preparación de un medicamento utilizando un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, una composición farmacéutica o una mezcla según la invención y como se describe en la presente memoria, para la prevención, tratamiento o alivio, en un sujeto que lo necesite, de los efectos de enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide, incluyendo, pero sin limitarse a, amiloidosis, tumores endocrinos, y degeneración macular.

- 55 En una realización específica, la invención se refiere a un método para la preparación de una composición farmacéutica utilizando particularmente un anticuerpo según la invención y como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que comprende formular dicho anticuerpo en una forma farmacéuticamente aceptable, particularmente de tal modo que el anticuerpo esté comprendido en la composición en una cantidad terapéuticamente eficaz.

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

10 En un aspecto específico de la invención, el anticuerpo monoclonal utilizado en estos métodos es ACI-24-Ab-3 que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NO: 7-8 o una parte funcional del mismo como se describe aquí. En particular, el anticuerpo monoclonal es producido por el hibridoma E JL A9, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2844.

15 En un aspecto específico adicional de la invención, el anticuerpo monoclonal utilizado en estos métodos es el anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo de anticuerpos que comprende ACI-11-Ab-9 que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NOs: 17-18 y ACI-12-AB-11 que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NO: 19-20 o una parte funcional de los mismos como se describe aquí. En particular, el anticuerpo monoclonal es producido por el hibridoma FG1F9E4, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2845, o por el hibridoma FK2A6A6, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2846.

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

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

30 En un aspecto específico de la invención, el anticuerpo monoclonal utilizado en tales métodos es ACI-24-Ab-3 que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NOs: 7-8 o una parte funcional del mismo como se describe aquí. En particular, el anticuerpo monoclonal es producido por el hibridoma EJ1A9, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2844.

35 En un aspecto específico adicional de la invención, el anticuerpo monoclonal utilizado en estos métodos es el anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo de anticuerpos que comprende ACI-11-Ab-9 que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NOs: 17-18 y ACI-12-Ab-11 que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NO: 19-20 o una parte funcional de los mismos como se describe aquí. En particular, el anticuerpo monoclonal es producido por el hibridoma FG1F9E4, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2845, o el hibridoma FK2A6A6, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2846.

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

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

50 En un aspecto específico de la invención, el anticuerpo monoclonal de estos métodos es ACI-24-Ab-3 que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NOs: 7-8 o una parte funcional del mismo como se describe aquí. En particular, el anticuerpo monoclonal es producido por el hibridoma EJ1A9, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2844.

55 En un aspecto específico adicional de la invención, el anticuerpo monoclonal utilizado en estos métodos es el anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo de anticuerpos que comprende ACI-11-Ab-9 que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NOs: 17-18 y ACI-12-Ab-11 que tiene las secuencias de polipéptidos SEQ ID NO: 19-20 o una parte funcional de los mismos como se describe aquí. En particular, el anticuerpo monoclonal es producido por el hibridoma FG1F9E4, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2845, o el hibridoma FK2A6A6, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2846.

En otro aspecto más de la invención, se proporciona un método para prevenir, tratar o aliviar, en un sujeto que lo necesite, los efectos de las enfermedades y trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo

5 amiloide, incluyendo, pero sin limitarse a, amiloidosis, tumores endocrinos, y degeneración macular en un animal, mamífero, o un ser humano afectado por dicho trastorno mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla según la invención y como se describe aquí, a un sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que necesite tal tratamiento.

10 En otro aspecto más de la invención, se proporciona un método para conservar o aumentar la capacidad de memoria cognitiva en un mamífero que presenta una enfermedad o afección asociada con el amiloide que comprende administrar a un animal, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que necesita dicho tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla según la invención o como se ha descrito antes en la presente memoria.

En una realización, la invención se refiere a una línea celular de hibridoma, caracterizada porque produce un anticuerpo monoclonal según la invención o como se ha descrito antes en la presente memoria.

15 En particular, la invención se refiere a una línea celular de hibridoma, caracterizada porque produce un anticuerpo monoclonal cuyo anticuerpo tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por el hibridoma EJ1A9, depositado el 25 de mayo de 2007 y que recibió el número de depósito DSM ACC2844.

En una realización específica de la invención, se proporciona la línea celular de hibridoma EJ1A9, depositada el 25 de mayo de 2007 y que recibió el número de depósito DSM ACC2844.

20 En particular, la invención se refiere a una línea celular de hibridoma, caracterizada porque produce un anticuerpo monoclonal cuyo anticuerpo tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por el hibridoma FG1F9E4, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2845, o el hibridoma FK2A6A6, depositado el 25 de mayo de 2007 como DSM ACC2846.

25 En una realización específica de la invención, se proporciona la línea celular de hibridoma FG1F9E4, depositada el 25 de mayo de 2007, como DSM ACC2845.

En otra realización específica de la invención, se proporciona la línea celular de hibridoma FK2A6A6, depositada el 25 de mayo de 2007, como DSM ACC2846.

30 En una realización, la invención se refiere a un método de diagnóstico de una enfermedad o afección asociada con el amiloide en un sujeto, que comprende la detección de la unión inmuno-específica de un anticuerpo como se describe en esta memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, a un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ*, que incluye las etapas de

35 (a) poner en contacto la muestra o una parte o zona específica del cuerpo del sujeto que se sospecha que contiene la proteína amiloide, con un anticuerpo según la invención, cuyo anticuerpo se une a un epítipo conformacional de la proteína amiloide;

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

(c) detectar la formación del complejo inmunológico, particularmente de tal manera que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de la proteína amiloide; y

40 (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra o parte o zona específica del cuerpo del sujeto.

En una realización específica la composición de la etapa (a) comprende una combinación de anticuerpos para el tratamiento de dicho sujeto.

En una realización, se proporciona un método para determinar la extensión de la carga de placa amiloidogénica en un tejido de un sujeto que lo necesite, que comprende

45 (a) obtener una muestra representativa del tejido del sujeto objeto de la investigación;

(b) analizar dicha muestra para la presencia de la placa amiloide con un anticuerpo según la invención y como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo;

50 (c) determinar la cantidad de anticuerpo unido a la muestra, particularmente de tal manera que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de placa amiloide; y

(d) calcular la carga de placa en el tejido del sujeto.

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

- 5
- (a) poner en contacto la muestra o una parte o zona específica del cuerpo del sujeto que se sospecha que contiene la proteína amiloide, con el anticuerpo, en donde el anticuerpo se une a un epítipo conformacional de la proteína amiloide;
 - 10 (b) dejar que el anticuerpo se una a cualquier proteína amiloide en la muestra para formar un complejo inmunológico;
 - (c) detectar la formación del complejo inmunológico;
 - (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra o parte o zona específica del cuerpo del sujeto; y
 - (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor normal de control,
- 15 en donde un aumento en la cantidad de dicho complejo en comparación con un valor normal de control indica que dicho paciente padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o afección asociada con el amiloide.

En una realización, se proporciona un método para el seguimiento de la enfermedad residual mínima en un sujeto después de tratamiento con un anticuerpo o una composición según la invención, en donde dicho método comprende:

- 20
- (a) poner en contacto la muestra o una parte o zona específica del cuerpo del sujeto que se sospecha que contiene la proteína amiloide, con un anticuerpo según la invención y como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une a un epítipo conformacional de la proteína amiloide;
 - 25 (b) dejar que el anticuerpo se una a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;
 - (c) detectar la formación del complejo inmunológico;
 - (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína amiloide en la muestra o parte o zona específica del cuerpo del sujeto; y
 - (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor normal de control,
- 30 en donde un aumento en la cantidad de dicho complejo en comparación con un valor normal de control indica que dicho sujeto todavía padece una enfermedad residual mínima.

En una realización específica la composición de la etapa (a) comprende una combinación de anticuerpos para el tratamiento de dicho sujeto.

- 35 En una realización, se proporciona un método para predecir el grado de respuesta de un sujeto que está siendo tratado con un anticuerpo o una composición según la invención, que comprende
- (a) poner en contacto la muestra o una parte o zona específica del cuerpo que se sospecha que contiene la proteína amiloide con un anticuerpo según la invención y como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une a un epítipo conformacional de la proteína amiloide;
 - 40 (b) dejar que el anticuerpo se una al antígeno amiloide para formar un complejo inmunológico;
 - (c) detectar la formación del complejo inmunológico;
 - (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína amiloide en la muestra o parte o zona específica del cuerpo del sujeto; y
 - (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico antes y después del inicio del tratamiento,
- 45 en donde una disminución en la cantidad de dicho complejo inmunológico indica que dicho sujeto tiene altas posibilidades de responder al tratamiento.

En una realización específica la composición de la etapa (a) comprende una combinación de anticuerpos para el tratamiento de dicho sujeto.

En una realización, la invención se refiere a un kit de ensayo para la detección y diagnóstico de enfermedades y condiciones asociadas con el amiloide en un sujeto que lo necesite, que comprende un anticuerpo según la invención y como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, e instrucciones para utilizar el anticuerpo con el fin de que se una a la proteína amiloide y forme un complejo inmunológico, y para detectar la formación del complejo inmunológico de tal manera que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de la proteína amiloide.

Estos y otros objetivos, características y ventajas de la presente invención se harán evidentes después de una revisión de la siguiente descripción detallada de las realizaciones descritas y de las reivindicaciones adjuntas.

10 Breve descripción de las figuras y secuencias

La Figura 1 muestra los resultados de un estudio de mapeo epitópico del anticuerpo monoclonal murino ACI-24-Ab-3 realizado mediante ELISA utilizando una biblioteca de péptidos de los péptidos superpuestos que cubren la secuencia completa de aminoácidos de A β 1-42. La unión a la A β 1-42 completa se utilizó como control positivo. Todos los demás péptidos fueron de 8 a 10 aminoácidos (aa) de largo. El número de péptido corresponde al aminoácido de la secuencia A β 1-42 en el que empieza el péptido. Los resultados se expresan como D.O. (densidad óptica).

La Figura 2 muestra los resultados de un estudio de mapeo epitópico del anticuerpo monoclonal murino ACI-24-Ab-3 realizado mediante ELISA utilizando péptidos más largos que cubren A β k1-28, 17-40, 1-40, 1-42A (Anaspec) o 1-42B (Bachem). Los resultados se expresan como D.O., después de restar el ruido de fondo. Los resultados muestran la media \pm 1 error estándar de 2 experimentos independientes.

La Figura 3 representa la inhibición mediada por el ACI-24-Ab-3 de la agregación de A β 1-42 con una relación molar de anticuerpo a A β 1-42 de 1:100 y 1:10. Los resultados muestran la media \pm 1 error estándar de 2 experimentos independientes.

La Figura 4 representa la desagregación mediada por ACI-24-Ab-3 de pre-agregados de A β 1-42 con una relación molar de anticuerpo a A β 1-42 de 1:100 y 1:10. Los resultados muestran la media \pm 1 error estándar de 2 experimentos independientes.

La Figura 5 representa la unión del anticuerpo ACI-24-Ab-3 a preparaciones del péptido A β 1-42 proto-fibrilares (PF) de alto peso molecular (HMW) enriquecidas con oligómeros y a preparaciones del péptido A β 1-42 monoméricas de bajo peso molecular (LMW).

La Figura 6 representa la unión del anticuerpo de control 6E10 a preparaciones del péptido A β 1-42 proto-fibrilares (PF) de alto peso molecular (HMW) enriquecidas con oligómeros y a preparaciones del péptido A β 1-42 monoméricas de bajo peso molecular (LMW).

La Figura 7 representa la unión del anticuerpo ACI-24-Ab-3 (A) y del anticuerpo control 6E10 (B) a monómeros y oligómeros del péptido A β 1-42. Los resultados se expresan como la media (+ SEM) de los valores de densidad óptica (D.O.) de tres experimentos independientes.

La Figura 8 muestra los resultados de un estudio de mapeo epitópico del anticuerpo monoclonal murino ACI-11-Ab-9 realizado mediante ELISA utilizando una biblioteca de péptidos de los péptidos superpuestos que cubren la secuencia de aminoácidos completa de A β 1-42. La unión a la A β 1-42 completa se utilizó como control positivo. Todos los demás péptidos fueron de 8 a 10 aminoácidos de largo. El número de péptido corresponde al aminoácido de la secuencia A β 1-42 en el que empieza el péptido. Los resultados se expresan como D.O..

La Figura 9 muestra los resultados de un estudio de mapeo epitópico del anticuerpo monoclonal murino ACI-11-Ab-9 realizado mediante ELISA utilizando péptidos más largos que cubren A β 1-28, 17-40, 1-40, 1-42A (Anaspec) o 1-42B (Bachem). Los resultados se expresan como D.O., después de restar el ruido de fondo. Los resultados se expresan como la media \pm 1 error estándar de 2 experimentos independientes.

La Figura 10 muestra los resultados de un estudio de mapeo epitópico del anticuerpo monoclonal murino ACI-12-Ab-11 realizado mediante ELISA utilizando una biblioteca de péptidos de péptidos superpuestos que cubren la secuencia de aminoácidos completa de A β 1-42. La unión a la A β 1-42 completa se utilizó como control positivo. Todos los otros péptidos fueron 8 a 10 aa de largo. El número de péptido corresponde al aminoácido de la secuencia A β 1-42 en el que empieza el péptido. Los resultados se expresan como D.O..

La Figura 11 muestra los resultados de un estudio de mapeo epitópico del anticuerpo monoclonal murino ACI-11-Ab-9 realizado mediante ELISA utilizando el péptido más largo que cubre A β 1-28, 17-40, 1-40, 1-42A (Anaspec) o 1-42B (Bachem). Los resultados se expresan como D.O., después de restar el ruido de fondo. Los resultados muestran la media \pm error estándar de 2 experimentos independientes.

- La Figura 12 representa la inhibición mediada por el ACI-11-Ab-9 de la agregación de A β 1-42 con una relación molar de anticuerpo a A β 1-42 de 1:100 y 1:10. Los resultados muestran la media \pm 1 error estándar de 2 experimentos independientes.
- 5 La Figura 13 representa la desagregación mediada por ACI-11-Ab-9 de pre-agregados de A β 1-42 con una relación molar de anticuerpo a A β 1-42 de 1:100 y 1:10. Los resultados muestran la media \pm 1 error estándar de 2 experimentos independientes.
- La Figura 14 representa la inhibición mediada por el ACI-12-Ab-11 de la agregación de A β 1-42 con una relación molar de anticuerpo a A β 1-42 de 1:100 y 1:10. Los resultados muestran la media \pm 1 error estándar de 2 experimentos independientes.
- 10 La Figura 15 representa la desagregación mediada por ACI-12-Ab-11 de pre-agregados de A β 1-42 con una relación molar de anticuerpo a A β 1-42 de 1:100 y 1:10. Los resultados muestran la media \pm 1 error estándar de 2 experimentos independientes
- La Figura 16 representa la unión del anticuerpo ACI-12-Ab-11 (A) y del anticuerpo control 6E10 (B) a monómeros y oligómeros del péptido A β 1-42. Los resultados se presentan como la media (+ SEM) de los valores de densidad óptica (D.O.) de tres experimentos independientes.
- 15 La Figura 17 representa esquemáticamente las etapas en el ensayo ELISA que se puede utilizar para analizar la unión de rhApoE4 a A β ₄₂-biotina.
- La Figura 18 representa los resultados obtenidos del desarrollo de un ensayo ELISA para la unión de rhApoE4 a A β ₄₂-biotina. Para optimizar las concentraciones de rhApoE4 y A β ₄₂-biotina, se analizan diluciones de rhApoE4 con una concentración constante de A β ₄₂-biotina.
- 20 La Figura 19 representa el efecto del exceso de A β ₄₂-biotina sobre la unión de A β ₄₂-biotina complejada con rhApoE4 en el ensayo ELISA descrito.
- La Figura 20 representa una determinación en una muestra de la concentración óptima de A β ₄₂-biotina en el ensayo ELISA descrito.
- 25 La Tabla 1.1 expone los anticuerpos y constructos antigénicos utilizados para producir ciertos anticuerpos descritos en la presente memoria.
- Tabla 1.2 Unión de péptidos A β a ACI-24-Ab-3. Los resultados se expresan como D.O. después de restar el ruido de fondo.
- 30 Tabla 1.3 Unión de ACI-24-Ab-3 a 33 péptidos superpuestos de A β 1-42 analizada mediante ELISA. La unión al A β 1-42 completo se utilizó como control positivo. Todos los otros péptidos fueron de 8 a 10 aa de largo. El número de péptido corresponde al aminoácido de la secuencia A β 1-42 en el que comienza el péptido. Los resultados se expresan como D.O.
- 35 Tabla 1.4 Unión del anticuerpo ACI-24-Ab-3 (EJ1A9 de ratón) a preparaciones del péptido A β 1-42 proto-fibrilares (PF) de alto peso molecular (HMW) enriquecidas con oligómeros y a preparaciones del péptido A β 1-42 monoméricas de bajo peso molecular (LMW).
- Tabla 1.5 Unión del anticuerpo control 6E10 a preparaciones del péptido A β 1-42 proto-fibrilares (PF) de alto peso molecular (HMW) enriquecidas con oligómeros y a preparaciones del péptido A β 1-42 monoméricas de bajo peso molecular (LMW).
- 40 Tabla 1.6 Unión del anticuerpo ACI-24-Ab-3 (EJ1A9 de ratón) a monómeros y oligómeros del péptido A β 1-42. Los resultados se expresan como valores de D.O..
- Tabla 1.7 Unión del anticuerpo de control 6E10 a monómeros y oligómeros del péptido A β 1-42. Los resultados se expresan como valores de D.O..
- La Tabla 2.1 expone los anticuerpos y constructos antigénicos utilizados para producir ciertos anticuerpos descritos en la presente memoria.
- 45 Tabla 2.2 Unión de péptidos A β a ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11. Los resultados se expresan como D.O. después de restar el ruido de fondo.
- 50 Tabla 2.3 Unión de ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 a 33 péptidos superpuestos de A β 1-42 analizada mediante ELISA. La unión al A β 1-42 completo se utilizó como control positivo. Todos los otros péptidos fueron de 8 a 10 aa de largo. El número de péptido corresponde al aminoácido del A β 1-42 en el que comienza el péptido. Los resultados se expresan como valores de D.O.

Tabla 2.4 Unión del anticuerpo ACI-12-Ab-11 (FK2A6A6 clon) a monómeros y oligómeros del péptido A β 1-42. Los resultados se expresan como valores de D.O..

Tabla 2.5 Unión del anticuerpo de control 6E10 a los monómeros y oligómeros del péptido A β 1-42. Los resultados se expresan como valores de D.O..

- 5 SEQ ID NO: 1: Péptido antigénico A β ₂₂₋₃₅,
 SEQ ID NO: 2: Péptido antigénico A β ₂₉₋₄₀,
 SEQ ID NO: 3: Fragmento A β ₁₋₂₈ de péptido A β
 SEQ ID NO: 4: Fragmento A β ₁₇₋₄₀ de péptido A β
 SEQ ID NO: 5 Fragmento A β ₁₋₄₀ de péptido A β
- 10 SEQ ID NO 6: Fragmento A β ₁₋₄₂ de péptido A β
 SEQ ID NO: 7 Secuencia de aminoácidos de la secuencia del dominio variable de la cadena ligera de ACI-24-Ab-3.
 SEQ ID NO: 8 Secuencia de aminoácidos de la secuencia del dominio variable de la cadena pesada de ACI-24-Ab-3.
 SEQ ID NO: 9 Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera
 SEQ ID NO: 10 Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena ligera
- 15 SEQ ID NO: 11 Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena ligera
 SEQ ID NO: 12 Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada
 SEQ ID NO: 13 Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena pesada
 SEQ ID NO:14 Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena pesada
- 20 SEQ ID NO: 15 Secuencia de polinucleótidos que codifica la secuencia del dominio variable de la cadena ligera de ACI-24-Ab-3.
 SEQ ID NO: 16 Secuencia de polinucleótidos que codifica la secuencia del dominio variable de la cadena pesada de ACI-24-Ab-3.
 SEQ ID NO: 17 Secuencia de aminoácidos de la secuencia del dominio variable de la cadena ligera de ACI-11-Ab-9.
 SEQ ID NO: 18 Secuencia de aminoácidos de la secuencia del dominio variable de la cadena pesada de ACI-11-Ab-9
- 25 SEQ ID NO: 19 Secuencia de aminoácidos de la secuencia del dominio variable de la cadena ligera de ACI-12-Ab-11.
 SEQ ID NO: 20 Secuencia de aminoácidos de la secuencia del dominio variable de la cadena pesada de ACI-12-Ab-11.
 SEQ ID NO: 21 Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera
 SEQ ID NO: 22 Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena ligera
 SEQ ID NO: 23 Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena ligera
- 30 SEQ ID NO: 24 Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada
 SEQ ID NO: 25 Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena pesada
 SEQ ID NO: 26 Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena pesada
 SEQ ID NO: 27 Secuencia de polinucleótidos que codifica la secuencia del dominio variable de la cadena ligera de ACI-11-Ab-9.
- 35 SEQ ID NO: 28 Secuencia de polinucleótidos que codifica la secuencia del dominio variable de la cadena pesada de ACI-11-Ab-9.
 SEQ ID NO: 29 Secuencia de polinucleótidos que codifica la secuencia del dominio variable de la cadena ligera de ACI-12-Ab-11.
- 40 SEQ ID NO: 30 Secuencia de polinucleótidos que codifica la secuencia del dominio variable de la cadena ligera de ACI-12-Ab-11.

Definiciones

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

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

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

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

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

20 "Fibrilla A β " o "Filamento A β " o "fibrillas de amiloide" o "proto-fibrillas" son formas poliméricas de proteína monomérica que forma fibras individuales o agrupadas con un diámetro de fibra constante que son insolubles en medio acuoso y contienen grandes cantidades de una estructura β cruzada en su núcleo; en gran parte con cadenas beta perpendiculares al eje de las fibrillas.

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

25 "Proto-fibrillas" o "preparación proto-fibrilar" tal como se utiliza aquí se refiere a fracciones de peso molecular más alto de péptidos A β amiloides poliméricos, que están enriquecidos con oligómeros solubles de A β amiloides.

30 "Amiloide polimérico soluble" y "péptidos A β amiloides oligoméricos" y "oligómero de A β " se utilizan de modo intercambiable en la presente memoria y se refieren a múltiples monómeros agregados de péptidos amiloides, o de péptidos de tipo amiloide, o de péptidos amiloides modificados o truncados o de otros derivados de péptidos amiloides que forman estructuras oligoméricas o poliméricas que son solubles tanto *in vitro* en medio acuoso como *in vivo* en el cuerpo de mamíferos o seres humanos, más particularmente en el cerebro, pero se refieren particularmente a múltiples monómeros agregados de péptidos amiloides o de péptidos amiloides modificados o truncados o de derivados de los mismos, que son solubles en el cuerpo de mamíferos o seres humanos, más particularmente en el cerebro.

35 "Péptidos A β amiloides poliméricos solubles" y "péptidos A β amiloides oligoméricos" y "oligómero de A β " se utilizan de modo intercambiable en la presente memoria y se refieren a múltiples monómeros agregados de péptidos A β amiloides, o de péptidos A β amiloides modificados o truncados o de otros derivados de péptidos A β amiloides que forman estructuras oligoméricas o poliméricas que son solubles tanto *in vitro* en medio acuoso como *in vivo* en el cuerpo de un mamífero o de un ser humano, más particularmente en el cerebro, pero se refieren particularmente a múltiples monómeros agregados de β -amiloide (A β) o de péptidos de β -amiloide (A β) modificados o truncados o de derivados de los mismos, que son solubles en el cuerpo de mamíferos o de seres humanos, más particularmente en el cerebro.

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

55 Con respecto a un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une al péptido A β 1-42 monomérico y a péptidos A β poliméricos solubles que comprenden una pluralidad de péptidos A β ₁₋₄₂ monoméricos y a fibrillas o fibras A β que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil al péptido A β 1-28 monomérico y esencialmente ninguna unión al péptido A β 17-40 monomérico, por una "unión sustancialmente más débil" se entiende una unión, que es al menos aproximadamente 60 %, en particular al menos aproximadamente 65

%, más particularmente al menos aproximadamente 70 %, incluso más particularmente al menos aproximadamente 80 %, pero especialmente al menos aproximadamente 90 % y hasta el 100 % menor que la unión al péptido A β 1-42 monomérico.

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

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

20 Con respecto a un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se une al péptido A β 1-42 monomérico y a los péptidos A β poliméricos solubles que comprenden una pluralidad de péptidos A β 1-42 monoméricos y a fibrillas o fibras A β que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil al péptido A β 1-28 monomérico y esencialmente ninguna unión al péptido A β 17-40 monomérico, por "esencialmente ninguna unión" se entiende una unión, que es al menos aproximadamente 85 %, particularmente al menos aproximadamente 90 %, más particularmente al menos aproximadamente 95 %, incluso más particularmente al menos aproximadamente 98 %, pero especialmente al menos aproximadamente 99 % y hasta el 100 % menor que la unión al péptido A β 1-42 monomérico.

30 La unión del anticuerpo según la invención como se describe en la presente memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, a péptidos A β monoméricos se determina mediante un ensayo de tipo ELISA, en particular mediante un ensayo ELISA utilizando péptidos A β monoméricos biotinilados, pero especialmente mediante un ensayo ELISA como se describe en los Ejemplos 1.16 y 2.16 más adelante.

35 Por "aislado" se entiende una molécula biológica libre de al menos alguno de los componentes con los que aparece naturalmente.

40 La expresión "enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide" incluye, pero no se limita a, las enfermedades y trastornos causados por la presencia o actividad de las proteínas de tipo amiloide en estado monomérico, de fibrillas, o polimérico, o cualquier combinación de los tres. Dichas enfermedades y trastornos incluyen, pero no se limitan a, amiloidosis, tumores endocrinos, y degeneración macular.

45 El término "amiloidosis" se refiere a un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide incluyendo, pero sin limitarse a, la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad tales como enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), incluyendo enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); complejo de Parkinson-demencia de Guam; además de otras enfermedades que se basan en o están asociadas con las proteínas de tipo amiloide, tales como la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de inicio en la edad adulta; y amiloidosis cardíaca senil, y varias enfermedades oculares, incluyendo la degeneración macular, neuropatía óptica relacionada con drusen y cataratas debidas a los depósitos de beta-amiloide.

55 Los términos "anticuerpo" o "anticuerpos" como se utilizan en la presente memoria son términos reconocidos en la técnica y se entiende que se refieren a moléculas o fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos, particularmente a moléculas de inmunoglobulina y a porciones inmunológicamente activas de las moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión que se une inmunoespecíficamente a un antígeno. La inmunoglobulina según la invención puede ser de cualquier tipo (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA e IgY) o clase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclases de molécula de inmunoglobulina.

Se pretende que "anticuerpos" dentro del alcance de la presente invención incluya anticuerpos monoclonales, policlonales, quiméricos, de cadena sencilla, biespecíficos o bi-eficaces, simianizados, humanos y humanizados, además de los fragmentos activos de los mismos. Los ejemplos de los fragmentos activos de las moléculas que se unen a antígenos conocidos incluyen fragmentos Fab, F(ab')₂, scFv y Fv, incluyendo los productos de una biblioteca de expresión de inmunoglobulina Fab y los fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anticuerpos y fragmentos mencionados anteriormente.

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

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

Un "anticuerpo humanizado" se puede obtener también mediante un nuevo enfoque de ingeniería genética que permite la producción de anticuerpos policlonales de tipo humano madurados por afinidad en animales grandes, tales como, por ejemplo, conejos (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 7.129.084).

El término "anticuerpo monoclonal" también es bien reconocido en la técnica y se refiere a un anticuerpo que se produce en masa en el laboratorio a partir de un único clon y que reconoce solamente un antígeno. Los anticuerpos monoclonales se elaboran típicamente fusionando una célula B productora de anticuerpos, normalmente de vida corta, con una célula de crecimiento rápido, tal como una célula cancerosa (denominada a veces célula "inmortal"). La célula híbrida resultante o hibridoma, se multiplica rápidamente, creando un clon que produce grandes cantidades del anticuerpo. Para los fines de la presente invención, también se debe entender que "anticuerpo monoclonal" comprende los anticuerpos que son producidos por un clon madre que todavía no ha alcanzado una monoclonalidad completa.

El término "CDR" se refiere a la región hipervariable de un anticuerpo. El término "región hipervariable", "HVR", o "HV", cuando se utiliza aquí se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en la secuencia y/o que forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en la VH (región variable de la cadena pesada) (H1, H2, H3), y tres en la VL (región variable de la cadena ligera) (L1, L2, L3). Un número de delineaciones de la región hipervariable están en uso y se abarcan en la presente memoria. Las regiones determinantes de complementariedad de Kabat se basan en la variabilidad de la secuencia y son comúnmente las más utilizadas (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)).

Las letras "HC" y "LC" que preceden al término "CDR" se refieren, respectivamente, a una CDR de una cadena pesada y de una cadena ligera. Chothia se refiere en cambio a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia and Lesk J. Mol Biol. 196: 901-917 (1987)). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre las CDRs de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son utilizadas por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los residuos de cada una de estas regiones hipervariables se indican a continuación.

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

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

- 5 El término "numeración de residuo de dominio variable según Kabat" o "numeración de posición de aminoácido según Kabat", y variaciones del mismo, se refiere al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de la cadena pesada o dominios variables de la cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).
- 10 Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que corresponden a un acortamiento de o a una inserción en una FR (región marco) o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir una inserción de un solo aminoácido (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b, y 82c, etc. según Kabat) después del residuo 82 de la FR de la cadena pesada. La numeración de Kabat de los residuos se puede determinar para un anticuerpo dado mediante la alineación en regiones de homología, de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada "estándar" de Kabat.

- Se entiende dentro del alcance de la presente invención que "anticuerpo funcionalmente equivalente" hace referencia a un anticuerpo que comparte sustancialmente con un anticuerpo al menos una propiedad funcional importante, por ejemplo, las propiedades funcionales descritas en la presente memoria, incluyendo, pero sin limitarse a: especificidad de unión a la proteína β -amiloide, particularmente a la proteína $A\beta_{1-42}$, y más particularmente a la región epitópica 4-16 de la proteína $A\beta_{1-42}$, inmunoreactividad *in vitro*, inhibición de la agregación de los monómeros de $A\beta_{1-42}$ en fibrillas poliméricas de alto peso molecular y/o desagregación de fibrillas poliméricas de $A\beta_{1-42}$ preformadas, y/o una propiedad de rotura de la lámina β , y aliviar los efectos de las enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con las proteínas amiloides o de tipo amiloide
- 20 incluyendo, pero sin limitarse a, amiloidosis, tumores endocrinos, y degeneración macular, cuando se administra profilácticamente o terapéuticamente. Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase tales como IgG, IgM, o IgA, etc. o de cualquier subclase tales como IgG1, IgG2a, etc. y otras subclases descritas en la presente memoria o conocidas en la técnica, pero particularmente de la clase IgG4. Además, los anticuerpos pueden ser producidos por cualquier método, tal como presentación en fagos, o producidos en cualquier organismo o línea celular, incluyendo
- 25 bacterias, insectos, mamíferos u otro tipo de célula o línea celular que produce anticuerpos con las características deseadas, tales como anticuerpos humanizados. Los anticuerpos también se pueden formar mediante la combinación de una porción Fab y una región Fc de especies diferentes.

- Los términos "biespecífico" o "bifuncional" y "bi-eficaz" se utilizan como sinónimos dentro del alcance de esta solicitud para caracterizar un anticuerpo que presenta tanto una propiedad de inhibición de la formación de fibras de amiloide o de tipo amiloide, como una propiedad de desagregación de fibras de amiloide o de tipo amiloide.

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

- 40 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "soluble" significa que se disuelve parcial o completamente en una solución acuosa.

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

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

- "Amiloide polimérico soluble" se refiere a múltiples monómeros agregados de péptidos amiloides, o de péptidos de tipo amiloide, o de péptidos amiloides modificados o truncados o de otros derivados de péptidos amiloides que forman estructuras oligoméricas o poliméricas que son solubles en el cuerpo de un mamífero o de un ser humano, más particularmente en el cerebro, pero particularmente a múltiples monómeros agregados de β -amiloide ($A\beta$) o de péptidos de β -amiloide ($A\beta$) modificados o truncados o de sus derivados, que son solubles en el cuerpo de un mamífero o de un ser humano, más particularmente en el cerebro.

- El término "hibridoma" es reconocido en la técnica y los expertos en la técnica entienden que hace referencia a una célula producida por la fusión de una célula productora de anticuerpos y una célula inmortal, por ejemplo, una célula de mieloma múltiple. Esta célula híbrida es capaz de producir un suministro continuo de anticuerpos. Véase la definición anterior de "anticuerpo monoclonal" y los ejemplos que siguen para una descripción más detallada de un método de fusión conocido en la técnica.

El término "portador", como se usa en la presente memoria significa una estructura a la que se puede incorporar o con la que se puede asociar un péptido antigénico o constructo supramolecular, presentando o exponiendo de este modo los péptidos antigénicos o parte del péptido al sistema inmunológico de un ser humano o de un animal. Cualquier partícula que se pueda utilizar de forma adecuada en la terapia de animales o de seres humanos, tal como, por ejemplo, una vesícula, una partícula o un material particulado se pueden utilizar como un portador en el contexto de la presente invención. El término comprende además métodos de administración en los que las composiciones de constructo antigénico supramolecular que comprenden el péptido antigénico pueden ser transportadas a los sitios deseados mediante mecanismos de administración. Un ejemplo de tal sistema de administración utiliza metales coloidales tales como oro coloidal. El término "portador" comprende, además, mecanismos de administración conocidos por los expertos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, hemocianina de lapa bocallave (KLH), seroalbúmina bovina (BSA) y otros adyuvantes.

En un constructo antigénico supramolecular según la presente invención, el liposoma puede tener una doble función ya que puede ser utilizado como un portador que comprende el constructo supramolecular como se describe en la presente memoria y, al mismo tiempo, puede funcionar como un adyuvante para aumentar o estimular la respuesta inmunitaria en el animal o ser humano diana a ser tratado con la vacuna terapéutica según la invención. Se debe entender también que las composiciones de constructo antigénico supramolecular de la presente invención pueden comprender además adyuvantes adicionales, tales como, por ejemplo, lípido A, alumbre, fosfato de calcio, interleucina 1, y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas, pero particularmente un lípido A detoxificado, tal como lípido A monofosforilado o difosforilado, o alumbre, conservantes, diluyentes, emulsionantes, estabilizantes adicionales, y otros componentes que son conocidos y utilizados para las vacunas en la técnica. Por otra parte, se puede utilizar en la composición de la presente invención cualquier sistema adyuvante conocido en la técnica. Tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvante incompleto de Freund, adyuvante completo de Freund, manano acetilado con uniones β -(1,4) polidisperso ("Acemanano"), TI-TERMAX® (adyuvantes de copolímero de polioxitileno-polioxiopropileno de CytRx Corporation), adyuvantes lipídicos modificados de Chiron Corporation, adyuvantes derivados de saponina de Cambridge Biotech, *Bordetella pertussis* muerta, el lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram-negativas, aniones poliméricos grandes tales como sulfato de dextrano, y geles inorgánicos tales como alumbre, hidróxido de aluminio, o fosfato de aluminio.

Las proteínas portadoras que se pueden utilizar en las composiciones de constructo antigénico supramolecular de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, la proteína de unión a maltosa "MBP"; seroalbúmina bovina "BSA"; hemocianina de lapa bocallave "KLH"; ovoalbúmina; flagelina; tiroglobulina; seroalbúmina de cualquier especie; gammaglobulina de cualquier especie; células singénicas; células singénicas portadoras de antígenos Ia; y polímeros de D- y/o L-aminoácidos.

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

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

Como se usa en la presente memoria un "cambio conservativo" se refiere a alteraciones que son sustancialmente conformacionalmente o antigénicamente neutrales, que producen cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o que producen cambios mínimos en los determinantes antigénicos de los polipéptidos mutantes, respectivamente, en comparación con la proteína nativa. Cuando se refiere a los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención, un cambio conservativo significa una sustitución de aminoácido que no vuelve al anticuerpo incapaz de unirse al receptor del sujeto. Los expertos en la técnica podrán predecir qué sustituciones de aminoácidos se pueden hacer a la vez que se mantenga una alta probabilidad de que sean conformacionalmente y

antigénicamente neutrales. Se proporciona esa orientación, por ejemplo, en Berzofsky, (1985) Science 229: 932-940 y Bowie *et al.* (1990) Science 247: 1306-1310. Los factores a tener en cuenta que afectan a la probabilidad de mantener la neutralidad conformacional y antigénica incluyen, pero no se limitan a: (a) la sustitución de aminoácidos hidrófobos es menos probable que afecte a la antigenicidad ya que los residuos hidrófobos es más probable que estén localizados en el interior de una proteína; (b) la sustitución de aminoácidos fisicoquímicamente similares, es menos probable que afecte a la conformación debido a que el aminoácido sustituido imita estructuralmente al aminoácido nativo; y (c) la alteración de secuencias conservadas evolutivamente es probable que afecte negativamente a la conformación ya que dicha conservación sugiere que las secuencias de aminoácidos pueden tener importancia funcional. Los expertos en la técnica podrán evaluar las alteraciones en la conformación de la proteína utilizando ensayos bien conocidos, tales como, pero no limitados a los métodos de fijación de microcomplemento (véase, por ejemplo, Wasserman *et al* (1961) J. Immunol 87: 290-295; Levine *et al* (1967) Meth Enzymol 11: 928-936) y por medio de estudios de unión utilizando anticuerpos monoclonales dependientes de la conformación (véase, por ejemplo Lewis *et al* (1983) Biochem 22: 948-954) .

El término "hibridar" como se utiliza aquí se refiere a condiciones de hibridación convencionales, preferiblemente a condiciones de hibridación en las que se utiliza 5xSSPE, SDS al 1 %, 1x solución de Denhardt como una solución y/o las temperaturas de hibridación están entre 35 °C y 70 °C, preferiblemente 65 °C. Después de la hibridación, el lavado se lleva a cabo preferiblemente primero con 2 x SSC, SDS al 1 % y seguidamente con 0,2 x SSC a temperaturas entre 35 °C y 70 °C, preferiblemente a 65 °C (con respecto a la definición de SSPE, SSC y solución de Denhardt véase Sambrook *et al* Molecular Biology: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989). Son particularmente preferidas las condiciones de hibridación rigurosas como por ejemplo las descritas en Sambrook *et al.*, *supra*. Las condiciones de hibridación rigurosas particularmente preferidas están presentes, por ejemplo si se producen la hibridación y el lavado a 65 °C como se ha indicado anteriormente. Las condiciones de hibridación no rigurosas, por ejemplo, con hibridación y lavado realizados a 45 °C, son menos preferidas y a 35 °C todavía menos.

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

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

Los anticuerpos se pueden administrar a los individuos para inmunizarlos pasivamente contra una variedad de enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide tales como la enfermedad de Alzheimer.

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

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

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

La modificación por ácido palmítico (palmitoilación), aunque proporciona un ancla para el péptido en la bicapa de liposomas, debido a la reducida longitud relativa del resto de ácido graso C_{16.0} conduce a la colocación del péptido prácticamente en la superficie del liposoma. Por lo tanto, las células que procesan el antígeno tendrán que absorber el liposoma completo con el péptido, lo que, en la mayoría de los casos, se traduce en una respuesta inmunitaria más lenta en términos relativos.

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

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

El péptido amiloide A β ₁₋₁₅ modificado se puede sintetizar siguiendo el método descrito por Nicolau et. al. 2002. El enfoque referido por Nicolau *et al*, implica modificar el péptido antigénico por medio de un injerto sobre resina de un resto lipófilo o hidrófobo, en los residuos de aminoácido terminales de un péptido pre-formado dando como resultado un producto de pureza considerablemente alta. En particular, un aminoácido protegido, particularmente un aminoácido protegido con Fmoc, se une a una resina utilizando la química de acoplamiento conocida. Se separa el grupo protector y se acopla un segundo residuo de aminoácido protegido. Se utilizan entonces la síntesis estándar automatizada de péptidos empleando la química de protección conocida, en particular la química de Fmoc/tBu, y los grupos protectores estándar de la cadena lateral, para sintetizar el péptido antigénico A β mediante el acoplamiento sobre los aminoácidos 22 a 25, 29 a 40 y 1 a 15, respectivamente, de la proteína amiloide A β ₁₋₄₂ para producir el fragmento de péptido. En una etapa final se acoplan dos aminoácidos protegidos adicionales al fragmento de péptido en crecimiento. Los grupos Mtt se pueden escindir entonces selectivamente y se pueden acoplar al ácido palmítico. Después del lavado de la resina, se elimina el grupo protector y la resina se escinde de forma simultánea, seguido por las desprotecciones de las cadenas laterales utilizando la metodología estándar. El producto final se puede obtener entonces con alta pureza y se puede confirmar su identidad por métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, espectrometría de masas por electropulverización.

El resto lipófilo o hidrófobo según la presente invención puede ser un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido en donde la cadena principal carbonada del ácido graso tiene al menos 10 átomos de carbono. Particularmente, el resto lipófilo o hidrófobo es un ácido graso con una cadena principal carbonada de al menos aproximadamente 14 átomos de carbono y hasta aproximadamente 24 átomos de carbono, formando también parte de la presente invención cada número individual de átomos de carbono que entra dentro de este intervalo. Más particularmente, el resto lipófilo o hidrófobo tiene una cadena principal carbonada de al menos 14 átomos de carbono. Los ejemplos de restos hidrófobos incluyen, pero no se limitan a, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico y colesterol o DSPE. En una realización específica de la presente invención, el resto lipófilo o hidrófobo es el ácido palmítico.

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

El PEG se une covalentemente a un residuo de aminoácido unido a ambos terminales del péptido, en particular, un residuo de aminoácido Glu, Cys o Lys o cualquier otro residuo de aminoácido que se pueden utilizar adecuadamente para unir covalentemente el PEG al péptido. En el otro extremo de la cadena se puede unir covalentemente un resto hidrófobo para que funcione como el elemento de anclaje en la bicapa del liposoma, tal como, por ejemplo, fosfatidil etanol amina (PEA). De este modo, el liposoma todavía funciona como un adyuvante y el péptido que está suficientemente lejos de la bicapa se puede procesar solo y de este modo aumenta su inmunogenicidad en comparación con el antígeno palmitoilado.

En ciertas realizaciones, los constructos antigénicos supramoleculares utilizados dentro del alcance de la presente invención comprenden una secuencia peptídica, unida covalentemente a la lisina pegilada, una en cada terminal. La longitud de la cadena de PEG (polietilenglicol) puede variar de n = 8 a n = 150.000 o más, particularmente de n = 10 a n = 80.000, más particularmente de n = 20 a n = 10.000. En una realización específica de la invención, la longitud de la cadena de PEG no es mayor que n = 45, en particular entre n = 5 y n = 40, más particularmente entre n = 10 y n = 30, y aún más particularmente n = 10.

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

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

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

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

Los acoplamientos en fase de solución se lograron satisfactoriamente con los péptidos derivados de una secuencia de proteína β -amiloide tal como, por ejemplo, un A β ₂₂₋₃₅ y A β ₂₉₋₄₀, respectivamente, o un A β ₁₋₁₅ a una molécula de PEG modificada por un ácido graso-fosfatidilcolina tal como, por ejemplo, DSPE. La separación de los productos mono- y di-acoplados antes de las desprotecciones finales de las cadenas laterales se puede lograr mediante el uso

de cromatografía de intercambio catiónico. La posterior desprotección de las cadenas laterales de los péptidos conduce al aislamiento de los conjugados deseados con una pureza aceptable. La purificación se puede lograr por métodos bien conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, HPLC, etc.

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

10 Los antígenos liposomales según la invención se pueden preparar entonces como se describe en Nicolau *et al.*, 2002. El péptido antigénico amiloide $A\beta$ modificado, en particular el péptido antigénico $A\beta_{22-35}$ y $A\beta_{9-40}$ PEGilado modificado, o el péptido antigénico $A\beta_{1-15}$ palmitoilado, se pueden reconstituir en un constructo que consiste en liposomas, particularmente liposomas compuestos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC),
 10 dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPEA), dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) y colesterol, que contienen opcionalmente lípido A monofosforilado.

15 En una realización específica de la invención se utilizan liposomas con lípido A, como adyuvante para preparar la vacuna anti-amiloide. Se mezclan dimiristoilfosfatidil-colina, dimiristoilfosfatidil-glicerol y colesterol, específicamente en una relación molar de 0,9:1,0:0,7. A continuación se añade un inmunomodulador fuerte tal como, por ejemplo, lípido A monofosforilado, a una concentración adecuada, particularmente a una concentración entre 30 y 50 mg por mmol, más particularmente a 40 mg por mmol de fosfolípidos. Se añade a continuación el péptido $A\beta$ antigénico modificado en una relación molar de péptido a fosfolípidos entre 1:30 y 1:200, particularmente en una relación molar entre 1:1000, 1:50, y 1:120, más particularmente de 1:100. Se separan los disolventes, por ejemplo, mediante evaporación, y la película resultante se hidrata con solución tampón estéril, tal como, por ejemplo PBS.

20 Los liposomas se pueden preparar también por la técnica de inyección de flujo cruzado como se describe, por ejemplo, en Wagner *et al* (2002) Journal of Liposome Research Vol 12(3), pp 259-270. Durante la inyección de soluciones de lípidos en un sistema tampón acuoso, los lípidos tienden a formar "precipitados", seguido por auto-ordenamiento en vesículas. El tamaño de las vesículas obtenidas depende de factores tales como la concentración de lípidos, la velocidad de agitación, la velocidad de inyección, y la elección de los lípidos. El sistema de preparación
 25 puede consistir en un módulo de inyección de flujo cruzado, recipientes para la fase polar (por ejemplo, una solución tampón de PBS), un recipiente para la solución de etanol/lípido y un dispositivo de presión, pero en particular un dispositivo de presión de nitrógeno. Mientras se bombea la solución acuosa o polar a través del módulo de inyección de flujo cruzado, se inyecta la solución de etanol/lípido en la fase polar aplicando diferentes presiones.

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

35 El terminal libre de PEG se une covalentemente a una molécula de fosfatidiletanolamina (donde el ácido graso puede ser: mirístico, palmítico, esteárico, oleico, etc., o una combinación de los mismos) para funcionar como el elemento de anclaje. Esta estructura supramolecular puede ser anclada mediante reconstitución en liposomas que consisten en fosfolípidos y colesterol (fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, colesterol en diversas relaciones molares. Se pueden utilizar otros fosfolípidos. El lípido A se utiliza a una concentración de aproximadamente 40 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ de fosfolípidos.

40 En ciertas realizaciones, los constructos antigénicos supramoleculares palmitoilados o pegilados comprenden un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de β -amiloide. Los péptidos también pueden comprender o corresponder a un péptido beta amiloide completo y a fragmentos activos del mismo. Adicionalmente, los péptidos útiles para la presente invención, en particular comprenden $A\beta_{22-35}$ y $A\beta_{29-40}$, respectivamente, o $A\beta_{1-15}$ y fragmentos activos de los mismos.

45 Para producir y preparar anticuerpos y para determinar la inmunogenicidad del constructo $A\beta$ antigénico modificado se inmuniza con el péptido antigénico un animal apropiado seleccionado del grupo que consiste en ratones, ratas, conejos, cerdos, aves, etc., pero particularmente ratones, especialmente ratones C57BL/6. La inmunogenicidad del constructo antigénico se determina mediante el sondeo de muestras de suero a intervalos de tiempo adecuados después de la inmunización utilizando un inmunoensayo tal como, por ejemplo, un ensayo ELISA.

50 Los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden preparar utilizando métodos clásicos de clonación y de fusión celular bien conocidos en la técnica. El inmunógeno (antígeno) de interés, se administra típicamente (por ejemplo, por inyección intraperitoneal) a ratones naturales o endogámicos (por ejemplo, ratones BALB/c o especialmente ratones C57BL/6), ratas, conejos u otras especies animales o ratones transgénicos que pueden producir anticuerpos nativos o humanos. El inmunógeno se puede administrar solo, o mezclado con adyuvante, o se puede expresar a partir de un vector (vector replicón VEE, vaccinia), o como ADN, o como una proteína de fusión para inducir una respuesta inmunitaria. Las proteínas de fusión comprenden el péptido contra el que se desea una respuesta inmunitaria acoplado a proteínas portadoras, tales como, por ejemplo, beta-galactosidasa, glutatión S-transferasa, hemocianina de lapa bocallave (KLH) y seroalbúmina bovina. En estos casos,
 55 los péptidos sirven como haptenos con las proteínas portadoras. Una vez que el animal recibe dosis de refuerzo, por ejemplo, dos o más veces, se recogen las células del bazo de los animales inmunizados y se generan hibridomas fusionando las células del bazo sensibilizadas con una línea celular de mieloma, tal como células de mieloma murino

SP2/O (ATCC, Manassas, VA) utilizando los procedimientos bien conocidos de Kohler and Milstein (Nature 256: 495-497 (1975)) y Harlow and Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988)).

5 En una realización específica de la invención, el constructo antigénico según la invención, particularmente una composición de vacuna que comprende dicho constructo antigénico en una forma farmacéuticamente aceptable, se administra en dosis repetidas, en particular en 1 a 15 dosis, más particularmente en 2 a 10 dosis, aún más particularmente en 3 a 7 dosis, pero especialmente en 4 a 6 dosis, a intervalos de tiempo entre 1 y 10 semanas, particularmente a intervalos de tiempo entre 1 y 6 semanas, más particularmente a intervalos de tiempo entre 1 y 4 semanas, y aún más particularmente a intervalos de tiempo entre 2 y 3 semanas. Se hace seguimiento de la
10 respuesta inmunitaria tomando muestras de suero en un momento adecuado después de las dosis de refuerzo, particularmente 3 a 10 días después del refuerzo, más particularmente 4 a 8 días después del refuerzo y más particularmente 5 a 6 días después del refuerzo y determinando la inmunogenicidad del constructo antigénico utilizando metodología conocida, en particular uno de los inmunoensayos utilizados comúnmente tal como, por ejemplo, un ensayo ELISA.

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

Las células híbridas resultantes son clonadas a continuación, de la manera convencional, por ejemplo utilizando dilución limitante, y se cultivan los clones resultantes, que producen los anticuerpos monoclonales deseados.

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

Los hibridomas se seleccionan posteriormente para determinar su capacidad de producir anticuerpos monoclonales contra las enfermedades o trastornos asociados con amiloides específicos. Los hibridomas que producen los anticuerpos de interés se clonan, se expanden y se almacenan congelados para la producción futura. El hibridoma
30 preferido produce un anticuerpo monoclonal que tiene el isotipo IgG.

El anticuerpo policlonal se prepara inmunizando animales, tales como ratones o conejos, o cualquier otro animal apropiado con las composiciones de constructos antigénicos supramoleculares de la presente invención descritos en esta memoria. A continuación se recoge el suero sanguíneo de los animales, y se examinaron los anticuerpos de los sueros para ver la reactividad de unión frente a la proteína amiloide.

35 Los anticuerpos según la invención se pueden preparar en una formulación fisiológicamente aceptable y pueden comprender un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptables utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, el anticuerpo según la invención y como se describe en la presente memoria, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, en particular, el anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, se combina con un
40 vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptables para formar una composición terapéutica. Los vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc.

45 La formulación de la composición farmacéutica según la invención se puede llevar a cabo según la metodología estándar conocida por los expertos en la técnica.

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

55 Las composiciones se pueden administrar por vías de administración estándar. En general, la composición se puede administrar por vía tópica, oral, rectal, nasal, intradérmica, intraperitoneal, o parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, o intramuscular). Además, la composición se puede incorporar en matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, siendo implantados los polímeros en la proximidad de donde se desea la

liberación, por ejemplo, en el sitio de un tumor. El método incluye la administración de una dosis única, la administración de dosis repetidas a intervalos de tiempo predeterminados, y la administración sostenida durante un período de tiempo predeterminado.

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

15 Es bien conocido por los expertos en la técnica pertinente que la dosificación de la composición dependerá de varios factores tales como, por ejemplo, la enfermedad a ser tratada, la composición particular utilizada, y otros factores clínicos tales como el peso, tamaño, sexo y estado general de salud del paciente, la superficie corporal, el compuesto o la composición particular a administrar, otros fármacos que se administren de forma concurrente, y la vía de administración.

20 La composición se puede administrar en combinación con otras composiciones que comprenden una sustancia o compuesto biológicamente activo, particularmente al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos contra el estrés oxidativo, compuestos anti-apoptóticos, quelantes de metales, inhibidores de la reparación del ADN, tales como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de secretasa, inhibidores de β -secretasa y γ -secretasa, proteínas tau, neurotransmisores, rompedores de la lámina β , moléculas antiinflamatorias, "antipsicóticos atípicos", tales como, por ejemplo, clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina o inhibidores de la colinesterasa (ChEIs), tales como tacrina, rivastigmina, donepezilo, y/o galantamina y otros fármacos y suplementos nutritivos, tales como, por ejemplo, vitamina B12, cisteína, un precursor de acetilcolina, lecitina, colina, Ginkgo biloba, acetil-L-carnitina, idebenona, propentofilina, o un derivado de xantina, junto con un anticuerpo según la presente invención y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables y las instrucciones para el tratamiento de enfermedades.

30 La materia proteínica farmacéuticamente activa puede estar presente en cantidades entre 1 ng y 10 mg por dosis. Generalmente, el régimen de administración debe estar en el intervalo entre 0,1 μ g y 10 mg del anticuerpo según la invención, particularmente en un intervalo de 1,0 μ g a 1,0 mg, y más particularmente en un intervalo entre 1,0 μ g y 100 μ g, siendo también parte de la invención todas las cifras individuales que entran dentro de estos intervalos. Si la administración se produce por medio de perfusión continua, una dosificación más adecuada puede estar en el intervalo entre 0,01 μ g y 10 mg de unidades por kilogramo de peso corporal por hora siendo también parte de la invención todas las cifras individuales que entran dentro de estos intervalos.

40 La administración normalmente será parenteral, por ejemplo por vía intravenosa. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas, estériles. Los disolventes no acuosos incluyen, sin limitarse a ellos, propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los disolventes acuosos se pueden seleccionar del grupo que consiste en agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, solución de Ringer con lactato, o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y otros. También pueden estar presentes conservantes tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes, etc.

50 La composición farmacéutica puede comprender además vehículos proteínicos tales como, por ejemplo, albúmina de suero o inmunoglobulina, particularmente de origen humano. Otros agentes biológicamente activos pueden estar presentes en la composición farmacéutica de la invención dependiendo de su uso previsto.

55 Cuando el objetivo de unión se encuentra en el cerebro, ciertas realizaciones de la invención proporcionan el anticuerpo o fragmento activo del mismo para atravesar la barrera hematoencefálica. Ciertas enfermedades neurodegenerativas están asociadas con un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, de tal modo que el anticuerpo o fragmento activo del mismo se puede introducir fácilmente en el cerebro. Cuando la barrera hematoencefálica permanece intacta, existen varios métodos conocidos en la técnica para el transporte de moléculas a través de ella, que incluyen, pero no se limitan a, métodos físicos, métodos basados en lípidos, y métodos basados en receptores y canales.

Los métodos físicos de transporte del anticuerpo o fragmento activo del mismo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a, salvar la barrera hematoencefálica en su totalidad, o crear aberturas

en la barrera hematoencefálica. Los métodos para salvar la barrera incluyen, pero no se limitan a, la inyección directa en el cerebro (véase, por ejemplo, Papanastassiou *et al.*, *Gene Therapy* 9: 398-406 (2002)) y la implantación de un dispositivo de administración en el cerebro (véase, por ejemplo, Gill *et al.*, *Nature Med.* 9: 589-595 (2003); y Gliadel Waters™, Guildford Pharmaceutical). Los métodos para crear aberturas en la barrera incluyen, pero no se limitan a, ultrasonidos (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de Estados Unidos No. 2002/0038086), presión osmótica (por ejemplo, mediante la administración de manitol hipertónico (Neuwelt, EA, *Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation*, Vols 1 & 2, Plenum Press, N.Y. (1989))), permeabilización mediante, por ejemplo, bradiquinina o permeabilizador A-7 (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.112.596, 5.268.164, 5.506.206, y 5.686.416), y transfección de las neuronas que se sitúan en la barrera hematoencefálica con vectores que contienen genes que codifican el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de Estados Unidos No. 2003/0083299).

Los métodos, basados en lípidos, para transportar el anticuerpo o fragmento activo del mismo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a, encapsular el anticuerpo o fragmento activo del mismo en liposomas que se acoplan a los fragmentos activos del mismo que se unen a los receptores sobre el endotelio vascular de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20020025313), y recubrir el anticuerpo o fragmento activo del mismo con partículas de lipoproteínas de baja densidad (véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20040204354) o apolipoproteína E (véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20040131692).

Los métodos, basados en receptores y canales, para transportar el anticuerpo o fragmento activo del mismo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a, utilizar bloqueantes glucocorticoides para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, las publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos Números 2002/0065259, 2003/0162695 y 2005/0124533); activar los canales de potasio (véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2005/0089473), inhibir los transportadores de fármacos ABC (véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2003/0073713); recubrir los anticuerpos con una transferrina y modular la actividad de los uno o más receptores de transferrina (véase, por ejemplo, la publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2003/0129186), y cationizar los anticuerpos (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.004.697).

En una realización adicional, la presente invención proporciona métodos y kits para la detección y el diagnóstico de enfermedades o afecciones asociadas con el amiloide, para el diagnóstico de una predisposición a una enfermedad o afección asociada con el amiloide o para el seguimiento de la enfermedad residual mínima en un paciente o para predecir el grado de respuesta de un paciente a un tratamiento con un anticuerpo o una composición de vacuna según la invención y como se describe en la presente memoria. Estos métodos incluyen métodos inmunológicos conocidos, utilizados comúnmente para detectar o cuantificar sustancias en muestras biológicas o en una afección *in situ*.

El diagnóstico de una enfermedad o afección asociada con el amiloide o de una predisposición a una enfermedad o afección asociada con el amiloide en un paciente, se puede lograr mediante la detección de la unión inmuno-específica de un anticuerpo de la invención, particularmente un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo del mismo, a un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ*, lo que incluye poner en contacto la muestra o una parte o zona específica del cuerpo que se sospecha que contiene la proteína amiloide, con un anticuerpo que se une a un epítipo de la proteína amiloide, dejar que el anticuerpo se una a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico, detectar la formación del complejo inmunológico y correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra o parte o zona específica del cuerpo, comparar opcionalmente la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal, en donde un aumento en la cantidad de dicho complejo inmunológico en comparación con un valor de control normal indica que dicho paciente padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o afección asociada con el amiloide. La proteína amiloide puede estar en la forma monomérica, de fibrillas, y/o en la forma polimérica. El anticuerpo o porción activa del mismo puede ser específico para las formas monoméricas, para las fibrillas, y/o para las formas poliméricas de la proteína amiloide.

El seguimiento de la enfermedad residual mínima en un paciente después del tratamiento con un anticuerpo o una composición de vacuna según la invención, se puede conseguir mediante la detección de la unión inmuno-específica de un anticuerpo de la invención, particularmente un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo del mismo a un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ*, lo que incluye poner en contacto la muestra o una parte o zona específica del cuerpo que se sospecha que contiene la proteína amiloide, con un anticuerpo que se une a un epítipo de la proteína amiloide, dejar que el anticuerpo se una a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico, detectar la formación del complejo inmunológico y correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra o parte o zona específica del cuerpo, comparar opcionalmente la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal, en donde un aumento en la cantidad de dicho complejo inmunológico en comparación con un valor de control normal indica que dicho paciente puede sufrir todavía una enfermedad residual mínima. La proteína amiloide puede estar en la forma monomérica, de fibrillas, y/o en la forma polimérica. El anticuerpo o porción activa del mismo puede ser específico para las formas monoméricas, para las fibrillas, y/o para las formas poliméricas de la proteína amiloide.

La predicción del grado de respuesta de un paciente a un tratamiento con una composición de vacuna según la invención se puede conseguir mediante la detección de la unión inmunespecífica de un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo del mismo a un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ*, lo que incluye poner en contacto la muestra o una parte o zona específica del cuerpo que se sospecha que contiene la proteína amiloide, con un anticuerpo que se une a un epítipo de la proteína amiloide, dejar que el anticuerpo se una a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico, detectar la formación del complejo inmunológico y correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra o parte o zona específica del cuerpo, comparar opcionalmente la cantidad de dicho complejo inmunológico antes y después del inicio del tratamiento, en donde una disminución en la cantidad de dicho complejo inmunológico indica que dicho paciente tiene altas posibilidades de responder al tratamiento. La proteína amiloide puede estar en la forma monomérica, de fibrillas, y/o en la forma polimérica. El anticuerpo o porción activa del mismo puede ser específico para las formas monoméricas, para las fibrillas, y/o para las formas poliméricas de la proteína amiloide.

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

Para el diagnóstico *in situ*, el anticuerpo o cualquier parte activa y funcional del mismo se puede administrar al organismo a ser diagnosticado, por métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, inyección intravenosa, intranasal, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial, de tal manera que se pueda producir una unión específica entre un anticuerpo según la invención y una región epitópica sobre la proteína amiloide. El complejo anticuerpo/antígeno se puede detectar convenientemente a través de una marca unida al anticuerpo o a un fragmento funcional del mismo o cualquier otro método de detección conocido en la técnica.

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

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

Los expertos en la técnica conocerán estas y otras marcas adecuadas que se pueden emplear de acuerdo con la presente invención. La unión de estas marcas a anticuerpos o fragmentos de los mismos se puede conseguir utilizando métodos estándar comúnmente conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos típicos están descritos por Kennedy, J.H., *et al.*, 1976 (Clin. Chim. Acta 70:1-31), y Schurs, A. H. W. M. *et al.* 1977 (Clin. Chim. Acta 81:1-40). Los métodos de acoplamiento mencionados en el último son el método del glutaraldehído, el método del peryodato, el método de dimaleimida, y otros, todos los cuales se incorporan como referencia a la presente memoria.

Los inmunoensayos actuales utilizan un método de anticuerpo doble para detectar la presencia de un analito, en donde el anticuerpo está marcado indirectamente por la reactividad con un segundo anticuerpo que ha sido marcado con una marca detectable. El segundo anticuerpo es preferiblemente uno que se une a los anticuerpos del animal del que se deriva el anticuerpo monoclonal. En otras palabras, si el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo de

ratón, entonces el segundo anticuerpo marcado es un anti-anticuerpo de ratón. Para el anticuerpo que se va a utilizar en el ensayo descrito en la presente memoria, esta marca es preferiblemente una perla recubierta con anticuerpo, particularmente una perla magnética. Para el anticuerpo a emplear en el inmunoensayo descrito en la presente memoria, la marca es preferiblemente una molécula detectable tal como una sustancia radiactiva, fluorescente o electroquimioluminiscente.

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

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

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

Es otro objetivo más de la presente invención proporcionar nuevas inmunosondas y kits de ensayo para la detección y el diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas con el amiloide, que comprenden los anticuerpos según la presente invención. Para las inmunosondas, los anticuerpos están unidos directa o indirectamente a una molécula informadora adecuada, por ejemplo, una enzima o un radionúclido. El kit de ensayo incluye un recipiente que contiene uno o más anticuerpos según la presente invención e instrucciones para utilizar los anticuerpos con el fin de que se unan al antígeno amiloide y formen un complejo inmunológico, y para detectar la formación del complejo inmunológico de tal manera que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de la proteína amiloide.

40 Ejemplos

Ejemplo 1: Anticuerpo generado por medio de la inmunización con constructos antigénicos supramoleculares de A β ₁₋₁₅ palmitoilados

Ejemplo 1.1 Métodos para preparar los constructos antigénicos supramoleculares de A β ₁₋₁₅ palmitoilados

1.1.1 Síntesis del péptido antigénico tetra(palmitoil lisina)-A β ₁₋₁₅

Se sintetizó el péptido amiloide 1-15 palmitoilado siguiendo un método previamente descrito mejorado (Nicolau *et al.* 2002). Este nuevo enfoque implicó el injerto sobre resina de ácido palmítico a los residuos terminales de Lys del péptido preformado en lugar de la síntesis en fase sólida por etapas, incorporando el aminoácido modificado 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc)-Lys(Pal)-OH. Este nuevo enfoque mejora la eficacia del acoplamiento y proporciona un producto de pureza considerablemente más alta. Por lo tanto, el aminoácido protegido ortogonalmente Fmoc-Lys(Mtt)-OH se unió a una resina de Wang utilizando la química de acoplamiento de [hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio] (HBTU). Se eliminó el grupo Fmoc utilizando piperidina al 20 % en DMF y se acopló un segundo residuo de Fmoc-Lys(Mtt)-OH. A continuación se utilizó la síntesis de péptidos automatizada estándar utilizando la química de Fmoc/tBu y grupos protectores estándar de la cadena lateral para acoplar sobre los siguientes 15 aminoácidos para producir una secuencia peptídica. Finalmente, los dos últimos aminoácidos acoplados fueron Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Los grupos Mtt se escindieron a continuación selectivamente utilizando ácido trifluoroacético (TFA) al 1 % en diclorometano, para liberar un fragmento peptídico y después se acoplaron a ácido palmítico utilizando HBTU. Después de lavar la resina, el grupo Fmoc se eliminó con piperidina al 20 % en dimetilformamida (DMF) y, finalmente, se realizaron simultáneamente la escisión de la resina y las desprotecciones

de la cadena lateral utilizando TFA en condiciones estándar. La trituración en éter dietílico frío proporcionó el producto como un sólido blanco. La espectrometría de masas por electropulverización confirmó la identidad del producto (m/z esperado: 1097,9 ([M]3+); encontrado: 1096,8 ([M-3H]3+), sin que se detectara ningún otro péptido tri-, di- o mono-palmitoilado.

- 5 Ejemplo 1.2: Anticuerpos producidos mediante fabricación de constructos antigénicos supramoleculares o fmAbs generados frente al constructo antigénico supramolecular de A β ₁₋₁₅ palmitoilado

Se utilizó antígeno palmitoilado (ACI-24, A β ₁₋₁₅) para la inmunización en ratones C57BL/6 a intervalos de 2 semanas. Se inmunizaron 10-12 animales con cada antígeno (volumen de inyección: 200 μ l que contenían 8 nmoles de péptido). La última inyección se realizó 4 días antes del sacrificio de los animales. Después de 5 dosis de refuerzo, se seleccionaron los ratones con títulos terapéuticos (cuando una dilución 1:5.000 del suero fue positiva en un ensayo ELISA) para una fusión. Se recogieron las células del bazo de los animales inmunizados y se generaron hibridomas mediante la fusión de las células del bazo sensibilizadas con una línea celular de mieloma. La fusión de los linfocitos B de los bazos de los ratones se llevó a cabo con células de la línea celular de mieloma SP2-0. (ATCC, Manassas, VA) utilizando los procedimientos bien conocidos de Kohler and Milstein (Nature 256: 495-497 (1975)) y Harlow and Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988)).

Se indujo la fusión de las células mediante la adición de polietilenglicol. Las células híbridas resultantes se cultivaron entonces durante 10 \pm 14 días de la manera convencional para permitir el crecimiento clonal. La selección clonal inicial se realizó utilizando la dilución limitante. Se seleccionaron los clones de hibridoma productores de IgG y se sometieron a ensayo para determinar su unión específica al péptido A β ₁₋₄₂ por medio de ELISA y se cultivaron los clones resultantes que producen los anticuerpos monoclonales deseados.

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

A continuación se seleccionaron los hibridomas en cuanto a la capacidad de producir anticuerpos monoclonales contra enfermedades o trastornos asociados con amiloides específicos. Una vez que se identificó el clon madre, éste se subclonó cuatro veces para asegurar la monoclonalidad y permitir que se estabilizara el híbrido. Los hibridomas que producen anticuerpos de interés se clonaron, se expandieron y se conservaron congelados para una producción en el futuro.

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

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

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

Para analizar la especificidad del anticuerpo mACI-24-Ab3, se hace una transferencia de diferentes concentraciones de fibrillas de amiloide 1-42, 1-40 y 17-40, 1-28 pre-formadas, a membranas de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham Biosciences). Después de bloquear con leche en polvo al 10 % y Tween 20 al 0,7 %, se incuban las membranas con anticuerpo primario a 20 μ g/ml durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavado, se incuban las membranas con anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (Amersham Biosciences) durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavan y se incuban con una solución quimioluminiscente seguido de la exposición de la membrana a una película de rayos X.

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

Ejemplo 1.4: Ensayo de fluorescencia con tioflavina T (Th-T)

Para medir tanto las propiedades de inhibición de la agregación, como las propiedades de desagregación del mAb, se utilizó el ensayo de fluorescencia con tioflavina T (Th-T) que se une específicamente a moléculas de A β ₁₋₄₂ fibrilar y, posteriormente, se correlaciona la intensidad de emisión de fluorescencia con la cantidad de filamentos de A β ₁₋₄₂ presentes en la solución.

Se reconstituyó polvo liofilizado de A β ₁₋₄₂ en hexafluoroisopropanol (HFIP) hasta concentración 1 mM. La solución peptídica se sometió a sonicación durante 15 min a temperatura ambiente, se agitó durante la noche, y se prepararon alícuotas en tubos de microcentrifuga no siliconados. A continuación, se evaporó el HFIP bajo una corriente de argón. La película peptídica resultante se secó al vacío durante 10 min y se conservó a -80 °C hasta su uso.

1.4.1 Ensayo de agregación de A β ₁₋₄₂

Para el ensayo de determinación de la inhibición de la agregación de A β ₁₋₄₂ mediada por anticuerpos, se diluyó previamente el anticuerpo en PBS y se preparó en un tubo de incubación no siliconado una solución de ensayo que contenía los siguientes componentes: anticuerpo pre-diluido 3,3 o 0,33 μ M, tioflavina T 10 μ M, A β ₁₋₄₂ 33 μ M, y DMSO al 8,2 %. Por lo tanto las relaciones molares finales de anticuerpo a A β ₁₋₄₂ fueron 1:10 y 1:100. Se prepararon también soluciones de control apropiadas. Las soluciones se incubaron a continuación durante 24 horas a 37 °C, y se leyó la espectrofluorescencia (unidades de fluorescencia relativa; RFU) en seis réplicas en placas negras de 384 pocillos (Perkin-Elmer) en un espectrofluorómetro FluoroCount de Perkin-Elmer. La inhibición de la agregación o desagregación se expresa como % medio de inhibición o desagregación, respectivamente, según la siguiente ecuación

% de inhibición =

$$\frac{(\text{RFU de control posit} - \text{RFU de control negat}) - (\text{RFU de muestra con A}\beta_{1-42} - \text{RFU de muestra sin A}\beta_{1-42}) \times 100 \%}{(\text{RFU de control posit} - \text{RFU de control negat}) n}$$

Se obtuvo una media de 26 % (2 experimentos independientes), mientras que en una relación molar de 1:10 la inhibición fue del 51 % (2 experimentos independientes).

1.4.2 Ensayo de desagregación de A β ₁₋₄₂

Para medir las propiedades de desagregación del mAb se utilizó el ensayo de fluorescencia con tioflavina T (ThT) que se une específicamente a moléculas de A β ₁₋₄₂ fibrilar y, posteriormente, se correlaciona la intensidad de la emisión de fluorescencia con la cantidad de filamentos A β ₁₋₄₂ presentes en la solución.

Para el ensayo de determinación de la desagregación de A β ₁₋₄₂ pre-agregados, mediada por anticuerpos, se elaboró un A β ₁₋₄₂ de bajo peso molecular, preparado como se ha descrito anteriormente, como una solución 110 μ M en DMSO al 27 % y 1x PBS. Se dejó después que esta solución se agregara a 37 °C durante 24 horas tras lo cual se añadieron: anticuerpo pre-diluido 3,3 o 0,33 μ M, y tioflavina T 10 μ M. Esto dio lugar a una relación molar de 1:10 y 1:100 de anticuerpo a A β ₁₋₄₂, conteniendo DMSO al 8,2 %. Esta solución se incubó entonces durante 24 horas adicionales a 37 °C. Se midió después la espectrofluorescencia y se calculó el % de desagregación como se ha descrito anteriormente.

El anticuerpo ACI-24-Ab-3 mostró una desagregación significativa de los A β ₁₋₄₂ pre-agregados en el ensayo de desagregación. Con una relación molar de anticuerpo a A β ₁₋₄₂ de 1:100 la desagregación tuvo un promedio del 12 % (2 experimentos independientes), mientras que con una relación molar 1:10 la desagregación fue del 20 % (2 experimentos independientes).

De los resultados anteriores es evidente que ACI-24-Ab-3 presenta bi-funcionalidad en la interacción con los filamentos A β ₁₋₄₂, ya que es capaz de inhibir la agregación de A β ₁₋₄₂ y la desagregación de las fibras A β ₁₋₄₂ preformadas.

Ejemplo 1.5: Interacciones mACI-01Ab7C2-A β ₁₋₄₂

Las interacciones entre el anticuerpo ACI-24-Ab-3 y el péptido amiloide A β ₁₋₄₂ se estudian utilizando la resonancia de plasmones superficiales (SPR). Se determina la unión del anticuerpo de ratón a los monómeros o a las fibras de A β ₁₋₄₂.

Todos los experimentos de SPR se llevan a cabo en un aparato Biacore X (Biacore AB). Los reactivos para la inmovilización (EDC, NHS y etanolamina), los chips sensores CM5 y SA, así como el tampón de muestra y de migración HBS-EP se adquirieron de Biacore AB. El acetato de sodio (10 mM, pH 5,0) se utiliza como tampón de acoplamiento para aumentar el rendimiento del acoplamiento. Se prepara A β ₁₋₄₂ fibrilar (Bachem) añadiendo tampón PBS a A β ₁₋₄₂ hasta una concentración final de 3 mg/ml y dejando los viales a 37 °C durante 7 días. Se acopla el A β ₁₋₄₂ fibrilar a un chip sensor CM5 que contiene una matriz de carboximetildextrano unida a la superficie. El A β ₁₋₄₂ monomérico biotinilado (Bachem) se acopla a un chip Sensor SA que consiste en una matriz de carboximetildextrano con estreptavidina unida covalentemente. Típicamente se ensayan cuatro o cinco concentraciones de mAb mediante diluciones seriadas utilizando tampón de migración. Las inyecciones se realizan partiendo de la concentración más baja y se hacen pasar sobre ambos fc 1 y 2 a un caudal de 30 μ L/min durante 3 min. La célula de flujo 2 no se derivatiza y las respuestas se restan de fc 1 para corregir el ruido del aparato y los cambios refractivos de volumen. Una vez finalizada la inyección, se lavan las superficies inmediatamente con tampón de migración durante 5 min. Para separar el anticuerpo unido restante de las fibrillas de A β ₁₋₄₂, se lleva a cabo la regeneración de la superficie inyectando pulsos de NaOH 10 mM. Se realiza un análisis cinético utilizando algoritmos para la integración numérica y el análisis global utilizando BIAevaluation 3.0. Las curvas obtenidas para las inyecciones de analito a diferentes concentraciones se superponen y las líneas de base se ajustan a cero. Para el ajuste de curvas, todos los datos se ajustan simultáneamente a un complejo homogéneo 1:1.

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

Ejemplo 1.6: Unión del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 a las fibras amiloides

Para analizar el lado de unión molecular del anticuerpo ACI-24-Ab-3 sobre las fibras preformadas se realiza microscopía electrónica de transmisión (TEM) con contraste negativo.

5 El anticuerpo, ACI-24-Ab-3, se acopla con oro coloidal de 8 nm según Slot JW, Geuze HJ (1985). Para la co-incubación de fibras de amiloide 1-42 ($A\beta_{1-42}$) se incuban fibras 6,65 μM durante 24 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo marcado con oro con una relación molar de 1:100. Seguidamente se incuban 5 μl de muestra en una gradilla de Cu de descarga luminiscente recién preparada (malla 200) cubierta con película de parlodio/C durante 45 segundos, se lava 3 veces con agua y 1 vez con acetato de uranilo al 2 % recién preparado diluido y filtrado. Se tiñen las muestras en acetato de uranilo al 2 % durante 15-20 segundos. Se aspira el exceso de tinte sobre las gradillas y después se secan al aire. Se preparan tres gradillas de cada muestra. Se analizan las gradillas por microscopía electrónica de transmisión Hitachi 7000.

Ejemplo 1.7: Fraccionamiento por ultracentrifugación en gradiente de densidad

15 Las propiedades del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 para inhibir la polimerización de las fibras de $A\beta_{1-42}$ y para desagregar las fibras de $A\beta_{1-42}$ se estudian mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad (Rzepecki *et al.*, 2004) que se basa en el principio de distribuir entre diferentes tamaños las fibras de péptidos resultantes después de la incubación con y sin anticuerpos, seguido por un análisis de sedimentación en SDS-PAGE en un gradiente preformado (OptiPrep™). El análisis simultáneo de poblaciones de fibras de $A\beta$ preformadas, las propiedades de desagregación y de inhibición de la agregación de los anticuerpos co-incubados, y la unión de los anticuerpos a las fibras son ventajas evidentes de estos métodos.

20 Para la inhibición de la agregación de $A\beta_{1-42}$, se incuban los monómeros $A\beta_{1-42}$ con mAb ACI-24-Ab-3 en dos relaciones molares diferentes (relación molar de monómero $A\beta_{1-42}$ treinta o cien veces mayor que mAb) con una concentración final de $A\beta$ de 50 μM . Después de 24 horas de incubación a 37 °C, las muestras se superponen sobre un gradiente discontinuo de Optiprep™ y los tubos se centrifugan a 259 000 g durante 3 horas a 4 °C. Se recogen 15 fracciones (140 μl cada una), la fracción 1 es la fracción menos densa de la parte superior del gradiente y la fracción 25 15 es la fracción más densa de la parte inferior del gradiente. También se recoge el sedimento. Las fracciones recogidas se analizan mediante SDS-PAGE con tinción de plata. La concentración de $A\beta_{1-42}$ para los ensayos de inhibición es cinco veces menor que para los ensayos de desagregación lo que disminuye la cinética de agregación del amiloide y asegura la medida dentro de una fase lineal.

30 Para la desagregación de las fibrillas de $A\beta_{1-42}$ preformadas mediante la co-incubación con el mAb ACI-24-Ab-3 (a dos relaciones molares diferentes 1:30 y 1:100, mAb + monómero $A\beta_{1-42}$ con una concentración final de $A\beta$ de 246 μM), se incuban las muestras durante 24 horas a 37 °C. Después de 24 horas se fraccionan las muestras por ultracentrifugación y se separan por SDS-PAGE como se ha descrito más arriba y anteriormente (Rzepecki *et al.*, 2004).

Ejemplo 1.8: Ensayo de fluorescencia para evaluar la inhibición de la agregación de filamentos de $A\beta_{1-42}$ y la desagregación de filamentos de $A\beta_{1-42}$ preformados mediante co-incubación con mAb ACI-24-Ab-3. Ensayo de fluorescencia BIS-ANS

35 Para evaluar las propiedades de inhibición del mAb se utiliza el ensayo de fluorescencia BIS-ANS (Levine, 2002) que detecta específicamente el monómero o la población no fibrilar de filamentos de $A\beta_{1-42}$. Antes de la medida de fluorescencia, se pre-incuban los monómeros de $A\beta_{1-42}$, o con tampón, sirviendo como control, o con mAb ACI-24-Ab-3 (relación molar 1:100, mAb vs. péptido $A\beta_{1-42}$) durante 14 horas a 37 °C. Las unidades fluorescentes relativas se registran automáticamente y los resultados se expresan como cambios con respecto al control, en porcentaje.

Ejemplo 1.9: Caracterización por NMR y fluorescencia de la interacción del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 con el péptido β -amiloides 1-42 marcado con ^{13}C

45 Para evaluar el mecanismo potencial por el cual el mAb solubiliza las fibras pre-formadas o inhibe la formación de fibras, se realiza un experimento cara a cara entre el ensayo de fluorescencia con Th-T y la NMR en estado sólido del péptido β -amiloides 1-42 marcado en Tyr10 y Val12 con $U\text{-}^{13}\text{C}$. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es seguir la transición de la lámina β por medio de espectroscopía de NMR en estado sólido en el péptido β -amiloides y en presencia del anticuerpo monoclonal y comparar directamente ésta con la capacidad de desagregación medida por el ensayo de fluorescencia con Th-T.

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

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

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

Las capacidades de desagregación de ACI-24-Ab-3 se analizan por la co-incubación con fibras de β amiloide marcadas con ^{13}C preformadas, utilizando el ensayo de fluorescencia con Th-T.

Para investigar las diferencias entre la incubación con PBS (control) y con mAb se deconvoluciona cada espectro utilizando PeakFit (<http://www.systat.com/products/PeakFit>). Las líneas son bien concordantes empleando un procedimiento mixto de ajuste Lorentziano/Gaussiano.

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

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

Con el fin de evaluar el mecanismo por el cual el anticuerpo es capaz de desagregar las fibras beta-amiloides ($\text{A}\beta_{1-42}$) preformadas, se realiza una comparación cara a cara del ensayo de fluorescencia con tioflavina-T (Th-T) que mide la desagregación y la resonancia magnética nuclear (NMR) en estado sólido del péptido $\text{A}\beta_{1-42}$ marcado en la Tirosina 10 y en la Valina 12 con U- ^{13}C que analiza la conformación secundaria.

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

Se realizó el mapeo epitópico del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 mediante ELISA utilizando una biblioteca de péptidos que comprende un total de 33 péptidos biotinilados que abarcan la secuencia completa de aminoácidos (aa) de $\text{A}\beta_{1-42}$ (producida por Mimotopes, Clayton Victoria, Australia y adquirida de ANAWA Trading SA, Wangen Suiza). Los péptidos en la biblioteca de péptidos se componían de péptidos aa de 8, 9 o 10-meros. Se utilizó un péptido $\text{A}\beta_{1-42}$ completo biotinilado (secuencia humana) como control positivo (Bachem, Bubendorf, Suiza). Además, los péptidos más largos que cubren $\text{A}\beta_{1-28}$, $\text{A}\beta_{17-40}$, $\text{A}\beta_{1-40}$ y $\text{A}\beta_{1-42}$ se utilizaron para definir la región más ancha a la que se pueden unir estos anticuerpos. Estos 4 péptidos también fueron biotinilados (fabricados por Anaspec y adquiridos de ANAWA Trading SA, Suiza). El mapeo epitópico se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mimotopes). En resumen, se bloquearon las placas recubiertas con estreptavidina (NUNC, Roskilde, Dinamarca) con BSA al 0,1 % en PBS durante la noche a 4 °C. Después de lavado con PBS-Tween 20 al 0,05 %, se recubrieron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente con los diferentes péptidos de la biblioteca, diluidos en BSA al 0,1 %, azida de sodio al 0,1 % en PBS hasta una concentración final 10 μM . Después de lavado, se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente con los diferentes anticuerpos, diluidos a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para ACI-24-Ab-3 en BSA al 2 %, azida sódica al 0,1 % en PBS. Las placas se lavaron de nuevo y se incubaron con anti-IgG de ratón, de cabra, conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson Immunresearch West Grove, PA, USA.) durante 1 h a temperatura ambiente. Después del lavado final, las placas se incubaron con sustrato de fosfatasa (pNPP, Sigma Aldrich-, St Louis, MO, USA.) y se leyeron después de 3 horas de incubación a 405 nm utilizando un lector de placas de ELISA.

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

Para determinar si ACI-24-Ab-3 puede reconocer otros péptidos $\text{A}\beta$ se evaluó la unión a $\text{A}\beta_{1-28}$, $\text{A}\beta_{17-40}$ y $\text{A}\beta_{1-40}$ y $\text{A}\beta_{1-42}$. El ACI-24-Ab-3 no mostró ninguna unión a $\text{A}\beta_{17-40}$ y ninguna unión o una unión baja a $\text{A}\beta_{1-28}$ y $\text{A}\beta_{1-42}$, pero mostró una unión importante a $\text{A}\beta_{1-40}$. Este resultado sugiere que el ACI-24-Ab-3 puede ser específico para $\text{A}\beta_{1-40}$.

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

Para evaluar la capacidad *in vivo* del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 para unirse y aclarar el amiloide soluble del cerebro, se utilizan ratones hAPP sencillos de 6 meses de edad, agrupados por sexo y edad, para un estudio de inmunización pasiva con dosis diferentes. La carga de amiloide soluble se analiza al final del estudio recogiendo el cerebro de los animales y realizando un ELISA específico para $\text{A}\beta_{1-40}$ y $\text{A}\beta_{1-42}$ (TGC, Alemania).

Ocho-trece animales por grupo reciben dos inyecciones a un intervalo de una semana de 100, 300 y 1000 µg de anticuerpo monoclonal en 200 µl de PBS mientras que la inyección de PBS solo sirve como control. Un día después de la segunda inyección, se sacrifican los animales para el análisis bioquímico de la fracción de amiloide soluble. Para cuantificar la cantidad de Aβ1-40 humano y Aβ1-42 humano en la fracción soluble de los productos homogeneizados del cerebro y/o del fluido cefalorraquídeo (CSF), se utilizan kits de ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) comercialmente disponibles (h Amyloid β 40 o β 42 ELISA high sensitive, TGC, Suiza). Se realiza el ensayo ELISA según el protocolo del fabricante. En resumen, se preparan patrones (una dilución de Aβ1-40 o Aβ1-42 sintéticos) y muestras en una placa de polipropileno de 96 pocillos sin capacidad de unión a las proteínas (Greiner, Alemania). Las diluciones patrones con concentraciones finales de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3 y 15,6 pg/ml y las muestras se preparan en el diluyente de muestra, proporcionado con el kit de ELISA, hasta un volumen final de 60 µl. Puesto que los niveles de amiloide se incrementan con la edad del ratón y puesto que la evaluación real requiere que las lecturas de las muestras estén dentro de la parte lineal de la curva estándar, las muestras para el análisis de Aβ 40 se diluyen 2:3, y las muestras para el análisis de Aβ 42 no se diluyen.

Las muestras, los patrones y los blancos (50 µl) se añaden a la placa de poliestiril recubierta con anti-Aβ (el anticuerpo de captura reconoce selectivamente el extremo C terminal del antígeno) en adición con un conjugado de anticuerpo anti-Aβ selectivo (anticuerpo de detección biotinilado) y se incuban durante la noche a 4 °C con el fin de permitir la formación del complejo anticuerpo-amiloide-anticuerpo. Al día siguiente, se añade un conjugado de estreptavidina-peroxidasa, seguido 30 minutos más tarde de la adición de una mezcla de TMB/peróxido, dando como resultado la conversión del sustrato en un producto coloreado y se mide la intensidad de color por medios de fotometría con un lector de ELISA con un filtro de 450 nm. La cuantificación del contenido de Aβ de las muestras se obtiene comparando la absorbancia con la curva patrón elaborada con Aβ1-40 o Aβ1-42 sintéticos. Los datos se expresan como cambios individuales con respecto al valor medio de control (en porcentaje con respecto al control).

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

Para evaluar la capacidad *in vivo* del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 para unirse y reducir las placas amiloides en el cerebro, se utilizan ratones hAPPxPS1 transgénicos dobles de 3,5 meses de edad, agrupados por sexo y edad, para un estudio de inmunización pasiva crónica de 4 meses de duración. Las placas amiloides se analizan al final del estudio por histoquímica del cerebro de los animales mediante la unión de tioflavina S.

Quince animales transgénicos reciben 16 inyecciones semanales de 500 µg de anticuerpo monoclonal en PBS. Se inyectan 15 animales con PBS solo, sirviendo como controles. Todas las inyecciones se administran por vía intraperitoneal. En el sacrificio, los ratones se anestesian y se someten a lavado abundante trans-cardíaco con suero fisiológico a 4 °C para eliminar la sangre de los vasos cerebrales. Seguidamente, se retira el cerebro del cráneo y se separan el rombencéfalo y el prosencéfalo con un corte en el plano coronal/frontal. El prosencéfalo se divide uniformemente en hemisferio izquierdo y derecho utilizando un corte sagital en la línea media. Un hemisferio se fija con posterioridad durante la noche en paraformaldehído al 4 % para histología. Se cortan secciones sagitales con el vibrátomo (40 µm) para incubaciones flotantes libres y se almacenan a 4 °C hasta la tinción en PBS con azida de sodio al 0,1 %. Se tiñen cinco secciones a diferentes niveles de placas densas con Tioflavina S. Las secciones de todos los animales utilizados se asignan al azar para la tinción y cuantificación a ciegas. Se toman las imágenes con un microscopio Leica DMR equipado con una cámara Sony DXC-9100P y se analizan con un ordenador utilizando el software Leica Q-Win. Los ajustes de intensidad de luz y de condensador para el microscopio se mantienen constantes durante todo el proceso de captación de imágenes. Todas las imágenes obtenidas se someten a las mismas subrutinas de ordenador para minimizar el sesgo del investigador. Se aplican los umbrales de segmentación uniformemente a lo largo de todo el análisis. Se selecciona la zona del subículo para la cuantificación automática de la carga de amiloide en la tinción de tioflavina S.

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

Para analizar la capacidad *in vivo* del anticuerpo ACI-24-Ab-3 para modificar o aumentar la funcionalidad cognitiva, se utilizan ratones hAPP sencillos de 9 meses de edad, agrupados por sexo y edad, para el estudio de la inmunización pasiva. Se mide la cognición no espacial al final del periodo de inmunización, con un nuevo test de reconocimiento de objetos (ORT).

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

Ejemplo 1.15 -Unión preferencial del anticuerpo monoclonal de ratón a la preparación de péptido A β 1-42 proto-fibrilar (PF) de alto peso molecular (HMW) enriquecida en oligómeros sobre la de monómeros de bajo peso molecular (LMW)

5 La unión de anticuerpos monoclonales de ratón anti-betaamiloides al péptido A β 1-42 de monómeros de bajo peso molecular (LMW) y a las preparaciones de péptido A β 1-42 proto-fibrilares (PF) de alto peso molecular enriquecidas en oligómeros, se pueden realizar utilizando ELISA.

10 Se utilizó cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) empleando 2 columnas de SEC Superdex 75 HR 10/30 (Intervalo 3-70 kDa) y Superose 6 HR 10/30 (Intervalo 5-5000 kDa), para preparar fracciones de péptido A β 1-42 que consisten en preparaciones de péptido A β 1-42 proto-fibrilares (PF) de alto peso molecular (HMW) enriquecidas en oligómeros y preparaciones de péptido A β 1-42 de monómeros de bajo peso molecular (LMW). Los eluatos resultantes se tiñeron entonces con acetato de uranilo y se examinaron por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (TEM) a 100 kV para verificar la morfología estructural de las fracciones de A β 1-42 eluidas.

15 Se realizó entonces un ensayo ELISA recubriendo las fracciones de A β 1-42 sobre la placa de ensayo de alta avididad a 2 μ M durante la noche. Después, se bloqueó la placa recubierta con BSA al 1,0 % y se añade el anticuerpo ACI-24-Ab-3 (EJ1A9 de ratón) en una dilución seriada empezando a 20 μ g/ml. También se utilizó una dilución en serie de un anticuerpo estándar (6E10, Chemicon). Para la detección de la unión se utilizó el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina y fosfato de 4-nitrofenilo. Se leyeron las placas a 405 nm. Todas las condiciones se ensayaron por duplicado con coeficiente de variación (CV) <0,2.

20 La unión del anticuerpo ACI-24-Ab-3 anti-A β de ratón (EJ1A9 de ratón) y el anticuerpo de control 6E10 se midió por ELISA. La tabla 1.4 y la figura 5 muestran los valores de la densidad óptica (D.O.) para el anticuerpo ACI-24-Ab-3 (EJ1A9 de ratón) tras la unión a las preparaciones proto-fibrilares (PF) enriquecidas en oligómeros y a las de monómeros LMW, del péptido humano A β 1-42. La tabla 1.5 y la Figura 6 muestran los valores de densidad óptica (D.O.) para el anticuerpo de control anti-A β 1-42 de 6E10 tras la unión a las preparaciones del péptido humano A β 1-42 proto-fibrilares (PF) enriquecidas de oligómeros y las de monómeros LMW.

25 Estos resultados indican que el anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 muestra una unión más fuerte a los péptidos A β 1-42 que tienen una morfología de oligómeros PF de orden superior a la del péptido monomérico LMW. Además, estos resultados sugieren que el ACI-24-Ab-3 se une a un epítipo que se presenta preferentemente sobre fracciones de A β 1-42 proto-fibrilares (PF) enriquecidas con oligómeros.

30 Ejemplo 1.16: Unión del anticuerpo monoclonal ACI-24-Ab-3 a los monómeros y oligómeros del péptido amiloide β 1-42

Se evaluó la unión del anticuerpo ACI-24-Ab-3 anti-amiloide β (clon: EJ1A9) a monómeros y oligómeros del péptido A β 1-42. Antes de ser utilizado en el estudio, el anticuerpo se conservó a -80 °C. El péptido A β 1-42 (W.M. Keck Facility, Yale University) se conservó como polvo liofilizado, hasta el día de su uso. Todos los demás materiales eran de Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) a menos que se indique otra cosa.

35 Para preparar monómeros y fracciones de peso molecular más alto con mejor enriquecimiento de oligómeros del péptido A β 1-42, se utilizó una metodología mejorada empleando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Se utilizaron dos columnas de SEC, Supelco TSK G4000PW-XL (intervalo 1500 kDa; Sigma) y Superosa 6 HR 10/30 (intervalo 5-5.000 kDa; GE Healthcare Bio-Sciences AB Uppsala, Suecia), para preparar fracciones del péptido A β 1-42 enriquecidas en monómeros LMW y fracciones de oligómeros de peso más alto. Los eluatos de SEC resultantes se tiñeron entonces con acetato de uranilo y se examinaron mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (TEM) a 100 kV para verificar la morfología estructural de las fracciones de A β 1-42 (no se muestran). Para investigar la unión del anticuerpo a las fracciones de A β 1-42, se realizó un ELISA. Las fracciones de A β 1-42 se recubrieron sobre placas de ensayo de alta avididad a 2,2 μ M en PBS durante 2 horas. Las placas recubiertas se lavaron entonces cinco veces con Tween-20 al 0,05 % en PBS y se bloquearon con BSA al 1,0 %. Se añadieron los anticuerpos anti-A β , incluyendo el anticuerpo de control (6E10) en una dilución seriada partiendo de las concentraciones indicadas. Se utilizó el anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Inglaterra), y fosfato de 4-nitrofenilo para la detección de la unión. Se leyeron las placas a 405 nm después de una incubación de 14 horas a temperatura ambiente. Se repitió el ensayo tres veces. La Figura 7 muestra la media (\pm SEM) de los valores de densidad óptica (D.O.) obtenidos de los tres ensayos ELISA separados. El anticuerpo ACI-24-AB-3 demostró una unión superior a la preparación de A β 1-42 enriquecida en oligómeros en comparación con la fracción no enriquecida en oligómeros, y que consiste principalmente en monómeros de A β 1-42 (Figura 7A). En comparación, el anticuerpo de control 6E10 se unió igualmente bien a ambas fracciones de A β 1-42. Las Tablas 1.6 y 1.7 muestran los valores de D.O. obtenidos en los ensayos ELISA 1, 2, y 3, para los anticuerpos ACI-24-Ab-3 y 6E10, respectivamente.

55 Estos resultados indican que el anticuerpo ACI-24-Ab-3 (clon: EJ1A9) presenta una afinidad de unión superior para las preparaciones de A β 1-42 enriquecidas en oligómeros que la que tiene para las preparaciones monoméricas de A β 1-42.

Ejemplo 2: Anticuerpo generado mediante la inmunización con un constructo antigénico supramolecular pegilado

Ejemplo 2.1: Métodos para preparar constructos antigénicos supramoleculares

2.1.1 Síntesis del antígeno péptido β -amiloide pegilado

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

10 Los constructos supramoleculares descritos en la presente memoria se sintetizaron excepcionalmente utilizando las protecciones convencionales de las cadenas laterales de los aminoácidos, Fmoc/tBu. Típicamente, la pegilación de los péptidos da como resultado mezclas de regioisómeros. En la presente memoria se demuestra un método conveniente para la unión específica del sitio de un conjugado de PEG-lípido tanto al C terminal como al N terminal de A β utilizando péptidos parcialmente protegidos.

15 Para aquellas secuencias de péptidos que contienen residuos internos de Lys o His (22-35), se añadió un Lys(ivDde) protegido ortogonalmente a cada terminal. Se añadió un Gly adicional al C-terminal para facilitar la síntesis. El grupo Fmoc se eliminó con piperidina al 20 % en DMF y se N-acetiló utilizando anhídrido acético. La escisión selectiva de los grupos ivDde se logró con hidrato de hidrazina al 3 % en DMF durante una hora. Se prefirió la resina de 2-clorotritilo sobre la resina de Wang más ampliamente utilizada ya que se ha demostrado que la primera es mucho más resistente a la hidrazinólisis. Además, la resina de 2-clorotritilo es extremadamente sensible a los ácidos y por lo tanto, a diferencia de la resina de Wang, permite el aislamiento de péptidos protegidos. En efecto, fue necesario llevar a cabo la reacción de acoplamiento en la fase de solución ya que el acoplamiento del péptido unido a la resina con el reactivo lipídico pegilado pre-activado DSPE-PEG-SPA no dio lugar a ningún producto de acoplamiento. Por lo tanto la escisión selectiva de la resina en condiciones suaves (ácido acético/trifluoroetanol/diclorometano, 1:1:8, 1 h, temperatura ambiente) dio los péptidos protegidos internamente.

Los acoplamientos en fase de solución se lograron satisfactoriamente con los péptidos derivados de la secuencia de A β ₂₂₋₃₅ y A β ₂₉₋₄₀, respectivamente, a DSPE-PEG-SPA en DMSO y exceso de base. Las reacciones se inactivaron después por la adición de un exceso de etanolamina durante 2 h y se liofilizó la solución.

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

30 La purificación por HPLC (columna semi-preparativa de fase inversa C₄) proporcionó entre 50-70 % de pureza de los conjugados de PEG-lípido en N- y C-terminales cuyas identidades se confirmaron por medio de MALDI (desorción-ionización láser asistida por matriz). Cada secuencia mostró una variación considerable en la facilidad de la reacción de acoplamiento y se ajustaron las condiciones en consecuencia (temperatura, número de equivalentes molares de DSPE-PEG-SPA, tiempo). Para la separación del exceso de DSPE-PEG-SPA del producto deseado se aplica la purificación por HPLC. La separación de los productos mono- y di-acoplados antes de las desprotecciones finales de las cadenas laterales se puede lograr mediante el uso de cromatografía de intercambio catiónico. Las posteriores desprotecciones de las cadenas laterales del péptido y la separación del exceso de DSPE-PEG-SPA inactivado conducen al aislamiento de los conjugados deseados con una pureza aceptable.

40 Este enfoque para la síntesis de antígenos β -amiloide con lípido-PEG en N- y C-terminales utilizando péptidos protegidos es aplicable a una amplia variedad de secuencias de péptidos.

Ejemplo 2.2: Anticuerpos provocados por constructos antigénicos supramoleculares

Fabricación de los mAb originados contra los constructos antigénicos supramoleculares A β ₂₂₋₃₅ y A β ₂₉₋₄₀ pegilados:

45 Se prepararon antígenos liposomales como se ha descrito (Nicolau *et al.*, 2002, PNAS, 99, 2332-37). Las secuencias de PEG-A β ₂₂₋₃₅ y PEG-A β ₂₉₋₄₀ se reconstituyeron en un constructo que consistía en liposomas elaborados de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPEA), dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) y colesterol (relaciones molares 0,9:0,1:0,1:0,7) que contenía lípido A monofosforilado (40 mg/mM de fosfolípidos). Estos antígenos se utilizaron para la inmunización en ratones C57BL/6 a intervalos de 2 semanas. Se inmunizaron 10-12 animales con cada antígeno. Después de 3 a 6 dosis de refuerzo, se seleccionaron los ratones con títulos terapéuticos: (cuando una dilución 1:5000 del suero fue positiva en el ensayo ELISA) para la fusión. Se recogen las células del bazo de los animales inmunizados y se generan hibridomas mediante fusión de las células de bazo sensibilizadas con una línea celular de mieloma. La fusión de los linfocitos B de los bazos de los ratones se llevó a cabo con células de la línea celular de mieloma SP2-0. (ATCC, Manassas, VA), utilizando los procedimientos bien conocidos de Kohler and Milstein (Nature 256: 495-497 (1975)) y Harlow and Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988))

Se indujo la fusión de las células mediante la adición de polietilenglicol. Las células híbridas resultantes se clonaron a continuación, de la manera convencional, por ejemplo utilizando la dilución limitante. Se seleccionaron los clones de hibridoma que producen IgG y se sometieron a ensayo para determinar su unión específica al péptido A β ₁₋₄₂ mediante ELISA y se cultivaron los clones resultantes, que producen los anticuerpos monoclonales deseados.

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

A continuación, se seleccionaron los hibridomas para determinar la capacidad para producir anticuerpos monoclonales contra enfermedades o trastornos específicos asociados a amiloides. Los hibridomas que producen anticuerpos de interés se clonaron, se expandieron y se conservaron congelados para la producción futura. Los hibridomas preferidos producen anticuerpos monoclonales que tienen el isotipo IgG.

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

Para analizar la especificidad de los anticuerpos ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11, se transfieren diferentes concentraciones de fibrillas de amiloide 1-42, 1-40 y 17-40, 1-28 pre-formadas, a membranas de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham Biosciences). Después de bloquear con leche en polvo al 10 % y Tween 20 al 0,7 %, se incuban las membranas con el anticuerpo primario a 20 μ g/ml durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavado, se incuban las membranas con anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (Amersham Biosciences) durante 1 h a temperatura ambiente, se lavan y se incuban con solución quimioluminiscente seguido por la exposición de la membrana a una película de rayos X.

Para medir la unión de los mAb AC-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 al β -amiloide se pre-forman fibras 1-42, 1-40 y 17-40, 1-28 durante siete días a 37 °C y se transfieren a la membrana. Se utilizan 20 μ g/ml de anticuerpo para medir la capacidad de unión y el anticuerpo unido se detecta mediante exposición a anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante durante 20 minutos.

Ejemplo 2.4: Ensayo de fluorescencia con tioflavina T (Th-T)

Para medir tanto las propiedades de inhibición de la agregación como las propiedades de desagregación de los mAb se utilizó el ensayo de fluorescencia con tioflavina T (Th-T) que se une específicamente a moléculas de A β ₁₋₄₂ fibrilar y, seguidamente, se correlaciona la intensidad de la emisión fluorescente con la cantidad de filamentos de A β ₁₋₄₂ presentes en la solución.

Se reconstituyó polvo liofilizado de A β ₁₋₄₂ en hexafluoroisopropanol (HFIP) hasta concentración 1 mM. La solución de péptido se sometió a ultrasonidos durante 15 min a temperatura ambiente, se agitó durante la noche, y se prepararon alícuotas en tubos de microcentrifuga no siliconados. Se evaporó entonces el HFIP bajo una corriente de argón. La película peptídica resultante se secó al vacío durante 10 min y se conservó a -80 °C hasta su uso.

2.4.1 Ensayo de agregación de A β ₁₋₄₂

Para el ensayo de la inhibición, mediada por anticuerpos, de la agregación de A β ₁₋₄₂, se diluyó previamente el anticuerpo en PBS y se preparó en un tubo de incubación no siliconado una solución de ensayo que contenía los siguientes componentes: anticuerpo pre-diluido 3,3 o 0,33 μ M, tioflavina T 10 μ M, A β ₁₋₄₂ 33 μ M, y DMSO al 8,2 %. Por lo tanto las relaciones molares finales de anticuerpo a A β ₁₋₄₂ fueron 1:10 y 1:100. Se prepararon también soluciones de control adecuadas. Las soluciones se incubaron entonces durante 24 horas a 37 °C, y se leyó la espectrofluorescencia (unidades de fluorescencia relativa; RFU) en seis réplicas en placas negras de 384 pocillos (Perkin-Elmer) en un espectrofluorómetro FluoroCount de Perkin-Elmer. La inhibición de la agregación o la desagregación se expresa como % medio de inhibición o desagregación, respectivamente, según la siguiente ecuación

% de inhibición =

$$\frac{(\text{RFU de control posit} - \text{RFU de control negat}) - (\text{RFU de muestra con A}\beta_{1-42} - \text{RFU de muestra sin A}\beta_{1-42})}{(\text{RFU de control posit} - \text{RFU de control negat})} \times 100 \%$$

45 El anticuerpo ACI-11-Ab-9 mostró una inhibición significativa de la agregación de A β ₁₋₄₂ en comparación con el control. Con una relación molar de anticuerpo a A β ₁₋₄₂ de 1:100 la inhibición tuvo un promedio del 34 % (3 experimentos independientes), mientras que con una relación molar 1:10 la inhibición fue del 69 % (2 experimentos independientes).

50 El anticuerpo ACI-12-Ab-11 mostró también una inhibición significativa de la agregación de A β ₁₋₄₂ en comparación con el control. Con una relación molar de anticuerpo a A β ₁₋₄₂ de 1:100 la inhibición tuvo un promedio del 30 % (2 experimentos independientes), mientras que con una relación molar 1:10 la inhibición fue del 66 % (2 experimentos independientes).

2.4.2 Ensayo de desagregación de A β 1-42

Para medir las propiedades de desagregación del mAb se utilizó el ensayo de fluorescencia con tioflavina T (ThT) que se une específicamente a las moléculas de A β 1-42 fibrilar y, posteriormente, se correlaciona la intensidad de la emisión de fluorescencia con la cantidad de filamentos A β 1-42 presentes en la solución.

5 Para el ensayo de determinación de la desagregación, mediada por anticuerpos, de A β 1-42 pre-agregados, se elaboró un A β 1-42 de bajo peso molecular, preparado como se ha descrito anteriormente, como una solución 110 μ M en DMSO al 27 % y 1x PBS. Se dejó después que esta solución se agregara a 37 °C durante 24 horas tras lo cual se añadieron: anticuerpo pre-diluido 3,3 o 0,33 μ M, y tioflavina T 10 μ M. Esto dio lugar a una relación molar de 1:10 y 1:100 de anticuerpo a A β 1-42, conteniendo DMSO al 8,2 %. Esta solución se incubó entonces durante 24 horas adicionales a 37 °C. Se midió después la espectrofluorescencia y se calculó el % de desagregación como se ha descrito anteriormente.

10 El anticuerpo ACI-11-Ab-9 mostró una desagregación significativa de los A β 1-42 pre-agregados en el ensayo de desagregación. Con una relación molar de anticuerpo a A β 1-42 de 1:100 la desagregación tuvo un promedio del 22 % (3 experimentos independientes), mientras que con una relación molar 1:10 la desagregación fue del 52 % (3 experimentos independientes).

15 El anticuerpo ACI-12-Ab-11 mostró también una desagregación significativa de los A β 1-42 pre-agregados en el ensayo de desagregación. Con una relación molar de anticuerpo a A β 1-42 de 1:100 la desagregación tuvo un promedio del 18 % (2 experimentos independientes), mientras que con una relación molar 1:10 la desagregación fue del 54 % (2 experimentos independientes).

20 De los resultados anteriores es evidente que los anticuerpos ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 presentan bi-funcionalidad en la interacción con los filamentos A β 1-42, ya que ambos anticuerpos son capaces de inhibir la agregación de A β 1-42 y la desagregación de las fibras A β 1-42 preformadas.

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

25 Las interacciones entre los anticuerpos ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 con el péptido amiloide A β ₁₋₄₂ se estudian utilizando la resonancia de plasmones superficiales (SPR). Se determina la unión del anticuerpo de ratón a cualquiera de los monómeros o fibras de A β ₁₋₄₂.

30 Todos los experimentos SPR se llevan a cabo en un aparato Biacore X (Biacore AB). Los reactivos para la inmovilización (EDC, NHS y etanolamina), los chips sensores CM5 y SA, así como el tampón de muestra y de migración HBS-EP se adquirieron de Biacore AB. El acetato de sodio (10 mM, pH 5,0) se utiliza como tampón de acoplamiento para aumentar el rendimiento del acoplamiento. Se prepara A β 1-42 fibrilar (Bachem) añadiendo tampón PBS a A β 1-42 hasta una concentración final de 3 mg/ml y dejando los viales a 37 °C durante 7 días. Se acopla A β 1-42 fibrilar a un chip sensor CM5 que contiene una matriz de carboximetildextrano unida a la superficie. El A β 1-42 monomérico biotilado (Bachem) se acopla a un chip Sensor SA que consiste en una matriz de carboximetildextrano con estreptavidina unida covalentemente. Típicamente se ensayan cuatro o cinco concentraciones de mAb mediante diluciones seriadas utilizando tampón de migración. Las inyecciones se realizan partiendo de la concentración más baja y se hacen pasar sobre ambos fc 1 y 2 a un caudal de 30 μ L/min durante 3 min. La célula de flujo 2 no se derivatiza y las respuestas se restan de fc 1 para corregir el ruido del aparato y los cambios refractivos de volumen. Una vez finalizada la inyección, las superficies se lavan inmediatamente con tampón de migración durante 5 min. Para separar el anticuerpo unido restante de las fibrillas de A β 1-42, se lleva a cabo la regeneración de la superficie inyectando pulsos de NaOH 10 mM. Se realiza un análisis cinético utilizando algoritmos para la integración numérica y el análisis global utilizando BIAevaluation 3.0. Las curvas obtenidas para las inyecciones de analito a diferentes concentraciones se superponen y las líneas de base se ajustan a cero. Para el ajuste de la curva, todos los datos se ajustan simultáneamente a un complejo homogéneo 1:1.

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

45 Ejemplo 2.6: Unión de los anticuerpos monoclonales ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 a las fibras amiloides

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

50 Los anticuerpos ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 se acoplan con oro coloidal de 8 nm según Slot JW, Geuze HJ (1985). Para la co-incubación de fibras de amiloide 1-42 (A β 1-42) se incuban fibras 6,65 μ M durante 24 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo marcado con oro con una relación molar de 1:100. Seguidamente se incuban 5 μ l de muestra en una gradilla de Cu de descarga luminiscente recién preparada (malla 200) cubierta con película de parlodio/C durante 45 segundos, se lava 3 veces con agua y 1 vez con acetato de uranilo al 2 % recién preparado diluido y filtrado. Se tiñen las muestras en acetato de uranilo al 2 % durante 15-20 segundos. Se aspira el exceso de tinte sobre las gradillas y después se secan al aire. Se preparan tres gradillas de cada muestra. Se analizan las gradillas por microscopía electrónica de transmisión Hitachi 7000.

55

Ejemplo 2.7: Fraccionamiento por ultracentrifugación en gradiente de densidad

Las propiedades de los anticuerpos monoclonales ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 para inhibir la polimerización de las fibras de A β ₁₋₄₂ y para desagregar las fibras de A β ₁₋₄₂, se estudian mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad (Rzepecki *et al.*, 2004) que se basa en el principio de distribuir entre diferentes tamaños las fibras de péptidos resultantes después de la incubación con y sin anticuerpos, seguido por un análisis de sedimentación en SDS-PAGE en un gradiente preformado (OptiPrep™). El análisis simultáneo de poblaciones de fibras de A β preformadas, las propiedades de desagregación y de inhibición de la agregación de los anticuerpos co-incubados, y la unión de los anticuerpos a las fibras son ventajas evidentes de estos métodos.

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

Para la desagregación de las fibrillas de A β ₁₋₄₂ preformadas mediante la co-incubación con mAb ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 (a dos relaciones molares diferentes 1:30 y 1:100, mAb + monómero A β ₁₋₄₂ con una concentración final de A β de 246 μ M), las muestras se incuban durante 24 horas a 37 °C. Después de 24 horas se fraccionan las muestras por ultracentrifugación y se separan por SDS-PAGE como se ha descrito más arriba y anteriormente (Rzepecki *et al.*, 2004).

Ejemplo 2.8: Ensayo de fluorescencia para evaluar la inhibición de la agregación de filamentos de A β ₁₋₄₂ y la desagregación de filamentos de A β ₁₋₄₂ preformados mediante co-incubación con mAb ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11, respectivamente.

Ensayo de fluorescencia BIS-ANS

Para evaluar las propiedades de inhibición del mAb se utiliza el ensayo de fluorescencia BIS-ANS (Levine, 2002) que detecta específicamente el monómero o la población no fibrilar de filamentos de A β ₁₋₄₂. Antes de la medida de fluorescencia, se pre-incuban los monómeros de A β ₁₋₄₂, o con tampón, sirviendo como control, o con mAb ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 (relación molar 1:100, mAb vs. péptido A β ₁₋₄₂) durante 14 horas a 37 °C. Las unidades fluorescentes relativas se registran automáticamente y los resultados se expresan como cambios con respecto al control en porcentaje.

Ejemplo 2.9: Caracterización por NMR y fluorescencia de la interacción de los anticuerpos monoclonales ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 con el péptido β -amiloide 1-42 marcado con ¹³C

Para evaluar el mecanismo potencial por el cual el mAb solubiliza las fibras pre-formadas o inhibe la formación de fibras, se realiza un experimento cara a cara entre el ensayo de fluorescencia con Th-T y la NMR en estado sólido del péptido β -amiloide 1-42 marcado en Tyr10 y Val12 con U-¹³C. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es seguir la transición de la lámina β por medio de espectroscopía de NMR en estado sólido en el péptido β -amiloide y en presencia del anticuerpo monoclonal y comparar directamente ésta con la capacidad de desagregación medida por el ensayo de fluorescencia con Th-T.

La espectroscopía de NMR en estado sólido no detecta solamente una transición en la estructura secundaria, sino que permite también localizar los dominios del péptido A β ₁₋₄₂ que dominan la transición estructural. Se ha demostrado la aplicabilidad de la NMR en estado sólido al problema, ya que ha contribuido a la determinación de la estructura de las fibras de A β ₁₋₄₂ (Petkova *et al.*, 2004, Petkova *et al.*, 2002). En particular la correlación del desplazamiento químico de ¹³Ca y ¹³C β con la estructura secundaria (Cornilescu *et al.*, 1999, Luca *et al.*, 2001, Iwadate *et al.*, 1999) es una herramienta valiosa para analizar los cambios en la estructura secundaria dentro de un péptido.

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

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

una alícuota de la misma solución para el ensayo de fluorescencia con Th-T y la solución restante se liofiliza para las medidas de la NMR.

Las capacidades de desagregación de ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 se analizan por la co-incubación con fibras de β amiloide marcadas con ^{13}C preformadas, utilizando el ensayo de fluorescencia con Th-T.

- 5 Para investigar las diferencias entre la incubación con PBS (control) y con mAb se deconvoluciona cada espectro utilizando PeakFit (<http://www.systat.com/products/PeakFit>). Las líneas son bien concordantes empleando un procedimiento mixto de ajuste Lorentziano/Gaussiano.

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

- 10 12.1 Modificación de la conformación de fibras de A β 1-42 e inicio de la desagregación después de la unión de los anticuerpos ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11

Con el fin de evaluar el mecanismo por el cual los anticuerpos son capaces de desagregar las fibras beta-amiloides (A β 1-42) preformadas, se realiza una comparación cara a cara del ensayo de fluorescencia con tioflavina-T (Th-T) midiendo la desagregación y la resonancia magnética nuclear (NMR) en estado sólido del péptido A β 1-42 marcado en la Tirosina 10 y en la Valina 12 con U- ^{13}C analizando la conformación secundaria.

- 15 Ejemplo 2.11: Mapeo epitópico de los anticuerpos monoclonales ACL-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11

Se realizó el mapeo epitópico de los anticuerpos monoclonales ACL-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 mediante ELISA utilizando una biblioteca de péptidos que comprende un total de 33 péptidos biotinilados que abarcan la secuencia completa de aminoácidos (aa) de A β 1-42 (producida por Mimotopes, Clayton Victoria, Australia y adquirida de ANAWA Trading SA, Wangen Suiza). Los péptidos en la biblioteca de péptidos se componían de péptidos aa de 8, 9 o 10-meros. Se utilizó un péptido A β 1-42 completo biotinilado (secuencia humana) como control positivo (Bachem, Bubendorf, Suiza). Además, los péptidos más largos que cubren A β 1-28, A β 17-40, A β 1-40 y A β 1-42 se utilizaron para definir la región más ancha a la que se pueden unir estos anticuerpos. Estos 4 péptidos también fueron biotinilados (fabricados por Anaspec y adquiridos de ANAWA Trading SA, Suiza). El mapeo epitópico se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mimotopes). En resumen, se bloquearon las placas recubiertas con estreptavidina (NUNC, Roskilde, Dinamarca) con BSA al 0,1 % en PBS durante la noche a 4 °C. Después de lavado con PBS-Tween 20 al 0,05 %, se recubrieron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente con los diferentes péptidos de la biblioteca, diluidos en BSA al 0,1 %, azida de sodio al 0,1 % en PBS hasta una concentración final 10 μM . Después de lavado, se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente con los diferentes anticuerpos, diluidos a 10 $\mu\text{g/ml}$ para los anticuerpos ACL-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 en BSA al 2 %, azida sódica al 0,1 % en PBS. Las placas se lavaron de nuevo y se incubaron con anti-IgG de ratón, de cabra, conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson Immnunresearch West Grove, PA, USA.) durante 1 h a temperatura ambiente. Después del lavado final, las placas se incubaron con sustrato de fosfatasa (pNPP, Sigma Aldrich-, St Louis, MO, USA.) y se leyeron después de 3 horas de incubación a 405 nm utilizando un lector de placas de ELISA.

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

Se demostró también que el ACI-12-Ab-11 se unía de modo significativo a A β 1-42, pero similarmente al ACI-11-Ab-9, el ACI-12-Ab-11 no se unía a ninguno de los péptidos cortos de la biblioteca de péptidos.

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

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

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que el epítipo de ACI-11-Ab-9 está en la región 1-28 de A β y que o bien el epítipo tiene más de 8 aminoácidos de longitud y/o que la unión a A β es dependiente de la conformación de A β .

- 45 El ACI-12-Ab-11 mostró una unión significativa a A β 1-40 y A β 1-42 pero no mostró ninguna unión a A β 1-28 o A β 17-40. Por lo tanto, el ACI-12-Ab-11 sólo se podría unir a A β 1-40 y A β 1-42 de longitud completa y no a ninguno de los péptidos más cortos de A β . Estos resultados sugieren que el epítipo reconocido por ACI-12-Ab-11 es dependiente de la conformación de A β ya que incluso 24 o 28 meros de A β fueron insuficientes para la unión del anticuerpo.

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

Para evaluar la capacidad *in vivo* de los anticuerpos monoclonales ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 para unirse y aclarar el amiloide soluble del cerebro, se utilizan ratones hAPP sencillos de 6 meses de edad, agrupados por sexo y edad, para un estudio de inmunización pasiva con dosis diferentes. La carga de amiloide soluble se analiza al final del

estudio recogiendo el cerebro de los animales y realizando un ELISA específico para A β 1-40 y A β 1-42 (TGC, Alemania).

5 Ocho-trece animales por grupo reciben dos inyecciones a un intervalo de una semana de 100, 300 y 1000 μ g de anticuerpo monoclonal en 200 μ l de PBS mientras que la inyección de PBS solo sirve como control. Un día después de la segunda inyección, se sacrifican los animales para el análisis bioquímico de la fracción de amiloide soluble. Para cuantificar la cantidad de A β 1-40 humano y A β 1-42 humano en la fracción soluble de los productos homogeneizados del cerebro y/o del fluido cefalorraquídeo (CSF), se utilizan kits de ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) comercialmente disponibles (h Amyloid β 40 o β 42 ELISA high sensitive, TGC, Suiza). El ELISA se realiza según el protocolo del fabricante. En resumen, se preparan patrones (una dilución de A β 1-40 o A β 1-42 sintéticos) y muestras en una placa de polipropileno de 96 pocillos sin capacidad de unión a las proteínas (Greiner, Alemania). Las diluciones patrones con concentraciones finales de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3 y 15,6 pg/ml y las muestras se preparan en el diluyente de muestra, proporcionado con el kit de ELISA, hasta un volumen final de 60 μ l. Puesto que los niveles de amiloide se incrementan con la edad del ratón y puesto que la evaluación real requiere que las lecturas de las muestras estén dentro de la parte lineal de la curva estándar, las muestras para el análisis de A β 40 se diluyen 2:3, y las muestras para el análisis de A β 42 no se diluyen.

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

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

30 Para evaluar la capacidad *in vivo* de los anticuerpos monoclonales ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 para unirse y reducir las placas amiloides en el cerebro, se utilizan ratones hAPPxPS1 transgénicos dobles de 3,5 meses de edad, agrupados por sexo y edad, para un estudio de inmunización pasiva crónica de 4 meses de duración. Las placas amiloides se analizan al final del estudio mediante histoquímica del cerebro de los animales por la unión de tioflavina S.

35 Quince animales transgénicos reciben 16 inyecciones semanales de 500 μ g de anticuerpo monoclonal en PBS. Se inyectan 15 animales con PBS solo, sirviendo como controles. Todas las inyecciones se administran por vía intraperitoneal. En el sacrificio, los ratones se anestesian y se someten a lavado abundante trans-cardíaco con suero fisiológico a 4 °C para eliminar la sangre de los vasos cerebrales. Seguidamente, se retira el cerebro del cráneo y se separan el rombencéfalo y el prosencéfalo con un corte en el plano coronal/frontal. El prosencéfalo se divide uniformemente en hemisferio izquierdo y derecho utilizando un corte sagital en la línea media. Un hemisferio se fija con posterioridad durante la noche en paraformaldehído al 4 % para histología. Se cortan secciones sagitales con el vibrátomo (40 μ m) para incubaciones flotantes libres y se almacenan a 4 °C hasta la tinción en PBS con azida de sodio al 0,1 %. Se tiñen cinco secciones a diferentes niveles de placas densas con Tioflavina S. Las secciones de todos los animales utilizados se asignan al azar para la tinción y cuantificación a ciegas. Se toman las imágenes con un microscopio Leica DMR equipado con una cámara Sony DXC-9100P y se analizan con un ordenador utilizando el software Leica Q-Win. Los ajustes de intensidad de luz y de condensador para el microscopio se mantienen constantes durante todo el proceso de captación de imágenes. Todas las imágenes obtenidas se someten a las mismas subrutinas de ordenador para minimizar el sesgo del investigador. Se aplican los umbrales de segmentación de manera uniforme a lo largo de todo el análisis. Se selecciona la zona del subículo para la cuantificación automática de la carga de amiloide en la tinción de tioflavina S.

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

50 Para analizar la capacidad *in vivo* de los anticuerpos ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 para modificar o aumentar la funcionalidad cognitiva, se utilizan ratones hAPP sencillos de 9 meses de edad, agrupados por sexo y edad, para el estudio de la inmunización pasiva. Se mide la cognición no espacial al final del periodo de inmunización con un nuevo test de reconocimiento de objetos (ORT).

55 Doce animales por grupo reciben dos inyecciones intraperitoneales de 400 μ g de anticuerpo monoclonal en 200 μ l de PBS mientras que la inyección de PBS solo, sirve como control. Un día después de la segunda inyección, se estudia la capacidad cognitiva en un nuevo test de reconocimiento de objetos (ORT)^{12,13}. Para enrolosarlos en el ORT se colocan los ratones durante 10 minutos en una arena conductual y se enfrentan a un nuevo objeto desconocido. Se registra el tiempo de exploración. Tres horas más tarde, los mismos animales se vuelven a colocar en la misma arena para una segunda sesión, pero enfrentados con el objeto viejo, previamente explorado, y,

adicionalmente, con un objeto nuevo. Una vez más, se registran los tiempos de exploración para ambos objetos y se calcula el índice de cognición resultante como la relación del tiempo de exploración para el nuevo objeto con respecto al tiempo de exploración total y se expresa como cambios proporcionales con respecto al control.

5 Ejemplo 2.15 - Unión preferencial del anticuerpo monoclonal de ratón a la preparación de péptido A β 1-42 proto-fibrilar (PF) de alto peso molecular (HMW) enriquecida en oligómeros sobre la de monómeros de bajo peso molecular (LMW).

La unión de anticuerpos monoclonales de ratón anti-betaamiloide al péptido A β 1-42 de monómeros de bajo peso molecular (LMW) y a las preparaciones de péptido A β 1-42 proto-fibrilares (PF) de alto peso molecular enriquecidas en oligómeros, se pueden realizar utilizando ELISA.

10 Se utiliza cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) empleando 2 columnas de SEC Superdex 75 HR 10/30 (Intervalo 3-70 kDa) y Superose 6 HR 10/30 (Intervalo 5-5000 kDa), para preparar fracciones de péptido A β 1-42 que consisten en preparaciones de péptido A β 1-42 proto-fibrilares (PF) de alto peso molecular (HMW) enriquecidas en oligómeros y preparaciones de péptido A β 1-42 de monómeros de bajo peso molecular (LMW). Los eluatos resultantes se tiñen entonces con acetato de uranilo y se examinan por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (TEM) a 100 kV para verificar la morfología estructural de las fracciones de A β 1-42 eluidas.

15 Se realiza entonces un ensayo ELISA recubriendo las fracciones de A β 1-42 sobre la placa de ensayo de alta avidéz a 2 μ M durante la noche. Después, se bloquea la placa recubierta con BSA al 1,0 % y se añade el anticuerpo ACI-24-Ab-3 (EJ1A9 de ratón) en una dilución seriada empezando a 20 μ g/ml. También se utiliza una dilución en serie de un anticuerpo estándar (6E10, Chemicon). Para la detección de la unión se utiliza el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina y fosfato de 4-nitrofenilo. Se leen las placas a 405 nm. Todas las condiciones se ensayan por duplicado con coeficiente de variación (CV) <0,2.

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

25 Se evaluó la unión del anticuerpo ACI-12-Ab-11 anti-A β (clon: FK2A6A6) a monómeros y oligómeros del péptido A β 1-42. Antes de ser utilizado en el estudio, el anticuerpo se conservó a -80 °C. El péptido A β 1-42 (W.M. Keck Facility, Yale University) se conservó como polvo liofilizado, hasta el día de su uso. Todos los demás materiales eran de Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza) a menos que se indique otra cosa.

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

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

45 Estos resultados indican que el anticuerpo ACI-12-Ab-11 (clon: FK2A6A6) presenta una afinidad de unión superior para las preparaciones de A β 1-42 enriquecidas en oligómeros que la que tiene para las preparaciones monoméricas de A β 1-42.

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

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

55 Se diluye ApoE4 humana recombinante a 200 nM con PBS, y se conserva en alícuotas de 0,5 ml a -80 °C. Se resuspende 1 mg de péptido A β ₄₂-biotina en 20 μ l de DMSO y después en 1980 μ l de PBS/BSA al 0,1 %/azida de

sodio al 0,1 % para obtener una solución final de 0,5 mg/ml. Se utiliza un ensayo ELISA para determinar la unión de rhApoE4 a Aβ₄₂. Se incuba rhApoE4 (100 nM) durante 3 horas a 37 °C con Aβ₄₂-biotina (1 μM) para permitir la unión de la proteína al péptido. Se aplica la mezcla sobre una placa recubierta con estreptavidina previamente lavada 3 veces con PBST (PBS + Tween 20 al 0,05 %). Después de 1 h de incubación a temperatura ambiente se lava la placa 3 veces con PBST y se bloquea durante la noche a 4 °C con PBS que contiene BSA al 0,1 %. La ApoE4 unida se detecta con un anticuerpo IgG1 de ratón anti-ApoE humana utilizado a una dilución de 1:3000 en PBS y aplicado sobre la placa durante 2,5 horas a temperatura ambiente. Se lava la placa 4 veces con PBST y después se incuba 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo de detección, un anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (AP) a una dilución de 1:5000 en PBS. Después de un lavado final con 4x PBST, se incuban las placas durante 5,5 horas con pNPP en sustrato AP (sustrato de fosfatasa, hexahidrato de sal disódica de 4-nitrofenil-fosfato) y se lee a 405 nm utilizando un lector de placas ELISA. La Figura 17 resume el experimento.

El ensayo ELISA se desarrolla haciendo 8 veces diluciones al doble de una mezcla de rhApoE4 (por ejemplo 150 nM) y Aβ₄₂-biotina (1,5 μM). Se añaden los siguientes controles negativos: (1) rhApoE4 sola; (2) Aβ₄₂-biotina; y (3) rhApoE4-Aβ₄₂-biotina (protocolo sin anti-ApoE4 de ratón). La Figura 18 demuestra que se obtiene una señal positiva sólo cuando ambas rhApoE4 y Aβ₄₂-biotina están presentes y se sigue el protocolo completo de ELISA.

Para optimizar las concentraciones de rhApoE4 y Aβ₄₂-biotina en el ensayo, se analizan diluciones de rhApoE4 (por ejemplo, 150 nM) con una concentración constante de Aβ₄₂-biotina (por ejemplo, normal: 1,5 μM o exceso: 15 μM). La Figura 19 muestra que un exceso de Aβ₄₂-biotina diluye la señal del ensayo ELISA ya que se une a la placa menos Aβ₄₂-biotina complejada con rhApoE4. Sobre la base de esta prueba se selecciona una concentración óptima de rhApoE4.

La concentración de Aβ₄₂-biotina en el ensayo se optimiza utilizando una concentración constante de rhApoE4 de 100 nM. Las diluciones de Aβ₄₂-biotina (por ejemplo, con una concentración de partida de 1,5 M (diluida a concentraciones más bajas, por ejemplo tan bajas como 1500 nM)) se analizan en la configuración ELISA. En base a los resultados mostrados en la Figura 20, se selecciona una concentración óptima 1 μM de Aβ₄₂-biotina para determinar el efecto de los anticuerpos monoclonales sobre la unión de rhApoE4 a Aβ₄₂-biotina.

El efecto de uno o más de los anticuerpos de la invención sobre la unión de rhApoE4 a Aβ₄₂-biotina se evalúa utilizando el ensayo ELISA anteriormente descrito, pero incluyendo además el anticuerpo de la invención en la mezcla de unión antes del cultivo en placas. Por ejemplo, se pueden utilizar diluciones al doble del anticuerpo, empezando a una concentración de 50 μAg/mL. La inclusión del anticuerpo puede ser en el momento en que se combinan por primera vez ApoE4 y Aβ₄₂-biotina, o puede ser después (por ejemplo, varias horas después) de que la ApoE4 y Aβ₄₂-biotina se combinan por primera vez. En el primer caso, se evalúa la capacidad del anticuerpo de la invención para prevenir o inhibir la interacción de ApoE4 y Aβ₄₂-biotina, mientras que en el último caso, se evalúa la capacidad del anticuerpo de la invención para romper un complejo preexistente entre ApoE4 y Aβ₄₂-biotina.

Tablas

Tabla 1.1 Anticuerpos y constructos antigénicos utilizados para generar dichos anticuerpos

mAb de ratón	Clon	Isotipo	Antígeno/Secuencia	Enlace	Ancla	Adyuvante
mACI-24-Ab-3	EJ1A9	IgG1	Aβ ₁₋₁₅	-	Palmítico	Lípido A

Tabla 1.2. Unión de péptidos Aβ a ACI-24-Ab-3. Los resultados se expresan como D.O. después de restar el ruido de fondo.

Péptido		Anticuerpo	
			ACI-24-Ab-3
1-28 ¹	Media		0,13
	SD		0,08
	SEM		0,06
17-40 ¹	Media		-0,23
	SD		0,07
	SEM		0,05
1-40 ¹	Media		0,90

Péptido	Anticuerpo	
		ACI-24-Ab-3
	SD	0,22
	SEM	0,16
1-42A ¹	Media	0,31
	SD	0,35
	SEM	0,24
1-42B ²	Media	0,27
	SD	0,07
	SEM	0,05

¹Péptido de Anaspec

²Péptido de Bachem

Tabla 1.3. Unión de ACI-24-Ab-3 a 33 péptidos superpuestos de Aβ1-42 según análisis por ELISA ..

Péptido	Anticuerpo	
		ACI-24-Ab-3
1		0,32
2		0,26
3		0,37
4		0,36
5		0,32
6		0,34
7		0,30
8		0,21
9		0,19
10		0,20
11		0,23
12		0,34
13		0,23
14		0,30
15		0,32
16		0,34
17		0,31
18		0,30
19		0,30
20		0,22

Péptido	Anticuerpo
	ACI-24-Ab-3
21	0,21
22	0,21
23	0,20
24	0,18
25	0,23
26	0,25
27	0,26
28	0,26
29	0,27
30	0,29
31	0,31
32	0,31
33	0,26
Aβ1-42	0,36
Aβ1-42	0,36
Aβ1-42	0,35

Tabla 1.4. Unión del anticuerpo ACI-24-Ab-3 (EJ1A9 de ratón) a preparaciones del péptido Aβ1-42 proto-fibrilares de alto peso molecular (HMW) y monoméricas de bajo peso molecular (LMW).

ACI-24-Ab-3 (µg/ml)	Preparación de Aβ1-42		Diferencia D.O.
	Proto-fibrilar (D.O.)	Monomérica de bajo peso molecular (D.O.)	
20	3,765	1,946	1,82
10	2,546	0,836	1,71
5	1,629	0,619	1,01
2,5	1,101	0,331	0,77
1,25	0,642	0,295	0,35
0,6250	0,457	0,177	0,28
0,3125	0,253	0,143	0,11
0,1563	0,167	0,115	0,05

Tabla 1.5. Unión del anticuerpo de control 6E10 a preparaciones del péptido Aβ1-42 proto-fibrilares de alto peso molecular (HMW) y monoméricas de bajo peso molecular (LMW).

6E10 (µg/ml)	Preparación de Aβ1-42		Diferencia D.O.
	Proto-fibrilar (D.O.)	Monomérica de bajo peso molecular (D.O.)	
1	2,550	2,677	0,13
0,5	1,998	2,126	0,13
0,25	1,442	1,563	0,12
0,125	0,863	0,999	0,14
0,0625	0,544	0,574	0,03
0,0313	0,286	0,329	0,04
0,0156	0,201	0,207	0,01
0,0078	0,116	0,133	0,02

5 Tabla 1.6. Unión del anticuerpo ACI-24-Ab-3 (EJ1A9 de ratón) a preparaciones del péptido Aβ1-42 enriquecidas en oligómeros y monómeros

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

^aD.O.: densidad óptica a 405 nm

^bLa dilución de partida para ACI-24-Ab-3 (clon: EJ1A9) era 30 µg/ml

Tabla 1.7. Unión del anticuerpo de control 6E10 a preparaciones del péptido Aβ1-42 enriquecidas en oligómeros y monómeros

Dilución de anticuerpo	Monómeros (D.O.)					Oligómeros (D.O.)				
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Media	SEM	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Media	SEM
1:1	3,67	3,77	4,04	3,83	0,11	3,36	3,67	3,89	3,64	0,15
1:2	3,30	3,48	4,00	3,59	0,21	3,39	3,55	3,83	3,59	0,13
1:4	3,00	3,29	3,52	3,27	0,15	3,10	3,37	3,64	3,37	0,16
1:8	2,67	3,00	2,80	2,82	0,10	2,73	2,99	3,23	2,98	0,15

Dilución de anticuerpo	Monómeros (D.O.)					Oligómeros (D.O.)				
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Media	SEM	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Media	SEM
1:16	1,78	1,94	2,23	1,98	0,13	1,78	1,92	2,07	1,92	0,08
1:32	1,18	1,34	1,54	1,36	0,10	1,27	1,30	1,40	1,32	0,04
1:64	0,81	0,94	1,08	0,94	0,08	0,93	0,88	0,95	0,92	0,02
1:128	0,64	0,75	0,86	0,75	0,06	0,62	0,61	0,66	0,63	0,02

^aD.O.: densidad óptica a 405 nm

^bLa dilución de partida para 6E10 era 30 µg/ml

Tabla 2.1. Anticuerpos y constructos antigénicos utilizados para generar dichos anticuerpos

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

5 Tabla 2.2. Unión de péptidos Aβ a ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11. Los resultados se expresan como D.O. después de restar el ruido de fondo.

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

¹Péptido de Anaspec

²Péptido de Bachem

Tabla 2.3. Unión de ACI-11-Ab-9 y ACI-12-Ab-11 a 33 péptidos superpuestos de A β 1-42 según análisis por ELISA.

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

ES 2 548 102 T3

Péptido	Anticuerpo	Anticuerpo
	ACI-11-Ab-9	ACI-12-Ab-11
33	0,11	0,11
A β 1-42	0,80	0,69
A β 1-42	0,81	0,69
A β 1-42	0,80	0,69

Tabla 2.4. Unión del anticuerpo ACI-12-Ab-11 (clon: FK2A6A6) a preparaciones del péptido A β 1-42 enriquecidas en oligómeros y monómeros

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

^aD.O.: densidad óptica a 405 nm

^bLa dilución de partida para ACI-12-Ab-12 (clon: FK2A6A6) era 40 μ g/ml

5 Tabla 2.5. Unión del anticuerpo de control 6E10 a preparaciones del péptido A β 1-42 enriquecidas en oligómeros y monómeros

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

ES 2 548 102 T3

Dilución de anticuerpo	Monómeros (D.O.)					Oligómeros (D.O.)				
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Media	SEM	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Media	SEM
^a D.O.: densidad óptica a 405 nm										
^b La dilución de partida para 6E10 era 0,5 µg/ml										

Depósitos:

Las siguientes líneas celulares de hibridoma fueron depositadas en "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, según las disposiciones del Tratado de Budapest:

Denominación de la línea de hibridoma	Denominación del anticuerpo	Fecha de depósito	Nº de acceso
EJ1A9	ACI-24-Ab-3	25 de mayo, 2007	DSM ACC2844
FG1F9E4	ACI-11-Ab-9	25 de mayo, 2007	DSM ACC2845
FK2A6A6	ACI-12-Ab-11	25 de mayo, 2007	DSM ACC2846

5

Referencias

- Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T. (2000). *Nature Med.* 6,916-919.
- Barghom S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, Keller P, Janson B, Bahr M, Schmidt M, Bitner RS, Harlan J, Barlow E, Ebert U, Hillen H (2005) Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 95:834-847.
- Baschong W, Wrigley NG (1990) Small colloidal gold conjugated to Fab fragments or to immunoglobulin G as high-resolution labels for electron microscopy: a technical overview. *J Electron Microscop Tech* 14:313-323.
- Blond and Goldberg, 1987, *PNAS* March 1, 1987 Vol. 84 [no. 5 | 1147-1151
- Comilescu G, Delaglio F, Bax A. (1999) *J.Biomol.NMR*; 13: 289-302.
- Burdick, D. et al. Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J. Biol. Chem.* 267, 546-554 (1992).
- DeMattos, Bales, KR, Cummins, DJ, Dodart, JC, Paul, SM, Holtzman, D.M (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8850-8855.
- Dewachter I, Van DJ, Smeijers L, Gilis M, Kuiperi C, Laenen I, Caluwaerts N, Moechars D, Checler F, Vanderstichele H, Van LF (2000) Aging increased amyloid peptide and caused amyloid plaques in brain of old APP/V717I transgenic mice by a different mechanism than mutant presenilin1. *J Neurosci* 20:6452-6458.
- Dewachter I, Reverse D, Caluwaerts N, Ris L, Kuiperi C, Van den HC, Spittaels K, Umans L, Semeels L, Thiry E, Moechars D, Mercken M, Godaux E, Van Leuven F (2002) Neuronal deficiency of presenilin 1 inhibits amyloid plaque formation and corrects hippocampal long-term potentiation but not a cognitive defect of amyloid precursor protein [V717I] transgenic mice. *J Neurosci* 22:3445-3453.
- Glennner and Wong, *Biochem Biophys Res Comm* 129, 885-890 (1984)
- Harlow and Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988))
- Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Dewachter I, Walter J, Klockgether T, Van LF (2005) Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. *J Neuroinflammation* 2:22.
- Hodgson et al., *Bio/Technology*, 9:421 (1991)
- Iwadate M, Asakura T, Williamson MP. (1999) *J.Biomol.NMR*; 13: 199-211. Kirschner, D.A., Abraham, C., & Selkoe, D.J. X-ray diffraction from intraneuronal paired helical filaments and extraneuronal amyloid fibers in Alzheimer disease indicates cross-beta conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 503-507 (1986).
- Khaw, B. A. et al. *J. Nucl. Med.* 23:1011-1019 (1982)
- Kennedy, J. H., et al., 1976 (*Clin. Chim. Acta* 70:1-31)
- Klein WL (2002) Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41(5):345-352.
- Kohler and Milstein (*Nature* 256: 495-497 (1975))
- LeVine, H. III, (2002). *Arch Biochem Biophys* 404, 106-115.
- Luca et al., 2001
- McGeer et al., 1994
- Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, Van LF (1999) Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem* 274:6483-6492.
- Nelson, R. & Eisenberg, D. Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* (2006).
- Nicolau, C., Greferath, R., Balaban, T. S., Lazarte, J. E., and Hopkins, R. J. (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2332-2337.
- Queen et al., *Proc. Natl Acad Sci USA*, 86:10029-10032 (1989)
- Pearson W.R. (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98
- Petkova AT, Buntkowsky G, Dyda F, Leapman RD, Yau WM, Tycko R. *J.Mol.Biol.* 2004; 335: 247-260.
- Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, Antzutkin ON, Leapman RD, Delaglio F, Tycko R. (2002) *Proc.Nat..Acad.Sci.U.S.A*;

99: 16742-16747.

Rousseaux et al. *Methods Enzymology*, 121:663-69, Academic Press, 1986

Rzepecki, P., Nagel-Steger, L., Feuerstein, S., Linne, U., Molt, O., Zadnarski, R., Aschermann, K., Wehner, M., Schrader, T. and Riesner, D. (2004). *J Biol Chem* 279, 47497-47505. Sambrook et al. *Molecular Biology: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989

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

Schenk et al., 1999

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

Selkoe DJ. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2000, 924:17-25.

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

Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489

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

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

Ye, J., Dave, U. P., Grishin, N. V., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2000). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5123-5128.

Zrein et al. (1998), *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5(1): 45-49.

Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256

WO 2004/058258

WO96/1359

WO96/29605

Aspectos descritos y realizaciones reivindicadas en la solicitud

- 5 En un primer aspecto (1) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo reconoce un epítipo conformacional y se une a péptidos amiloides poliméricos solubles, péptidos amiloides oligoméricos, péptidos A β amiloides poliméricos solubles y/o péptidos A β amiloides oligoméricos que comprenden una pluralidad de péptidos A β 1-42 monoméricos, respectivamente.
- 10 En un segundo aspecto (2) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo según el primer aspecto (1), cuyo anticuerpo se une a un péptido A β 1-40 monomérico, a un péptido amiloide soluble polimérico y/o oligomérico que comprende una pluralidad de péptidos monoméricos A β 1-42, en donde el anticuerpo no tiene esencialmente ninguna unión al péptido A β 17-40 monomérico, tiene una unión sustancialmente más débil al péptido A β 1-28 monomérico, y/o una unión de nivel intermedio al péptido 1-42 monomérico.
- 15 En un tercer aspecto (3) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo según el primer aspecto (1), cuyo anticuerpo, tras la co-incubación con un péptido A β que comprende un número de residuos de aminoácidos seleccionado de al menos 30, al menos 35, al menos 38, al menos 40 residuos de aminoácidos, y 42 residuos de aminoácidos en una forma monomérica y/o oligomérica inhibe la agregación de los monómeros y/o oligómeros A β en fibrillas poliméricas de alto peso molecular.
- 20 En un cuarto aspecto (4) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo según el primer aspecto (1), en donde el anticuerpo se une preferentemente a un péptido A β 1-40 monomérico y también a péptidos A β 1-42, oligoméricos y/o poliméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil a un péptido A β 1-28 monomérico y/o una unión intermedia a un péptido 1-42 monomérico y/o esencialmente ninguna unión a un péptido A β 17-40 monomérico y, tras la co-incubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados, formados por la agregación de péptidos A β 1-42 monoméricos y/o oligoméricos es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados, particularmente en al menos un 10 %, al menos un 20 %, particularmente al menos un 30 %, más particularmente al menos un 40 %, incluso más particularmente al menos un 50 %, pero especialmente al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o más.
- 25 En un quinto aspecto (5) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal según el primer aspecto (1) incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo presenta una alta especificidad para los péptidos A β 1-40 monoméricos y para un péptido amiloide soluble polimérico y/o oligomérico que comprende una pluralidad de péptidos A β 1-42 monoméricos, pero no muestra esencialmente ninguna o solamente una reactividad cruzada moderada con los péptidos monoméricos A β 1-28, A β 17-40, A β 1-38, A β 1-39, A β 1-41, y/o A β 1-42.
- 30 En un sexto aspecto (6) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal según el primer aspecto (1) incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo es capaz de disminuir la cantidad total de A β soluble en el cerebro de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con un aumento de las concentraciones de A β soluble en el cerebro.
- 35 En un séptimo aspecto (7) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal según el primer aspecto (1) incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo es capaz de solubilizar y/o de romper las placas disminuyendo de este modo la carga de placa en el cerebro de un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con un aumento en la carga de placa en el cerebro.
- 40 En otro aspecto (8) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma EJ1A9 depositada el 25 de mayo de 2007 y que recibió el número de depósito DSM ACC2844.
- 45 En otro aspecto (9) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, producido por la línea celular de hibridoma EJ1A9, depositada el 25 de mayo de 2007 y que recibió el número de depósito DSM ACC2844.
- 50 En otro aspecto (10) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo se ha originado frente a un constructo antigénico supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del péptido β -amiloide, A β 1-15, modificada con restos de ácido palmítico hidrófobos, en donde dicho resto hidrófobo está unido covalentemente a cada terminal por medio de un aminoácido seleccionado de lisina o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado capaz de servir como una molécula de enlace.
- 55

- 5 En otro aspecto (11) la presente solicitud describe una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 7, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, al menos dos, o al menos 3 de las CDRs de la cadena ligera que tienen una secuencia polipeptídica seleccionada de una o más de SEQ ID NOs: 9-11.
- 10 En otro aspecto (12) la presente solicitud describe una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 8, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, al menos dos, o al menos 3 de las CDRs de la cadena pesada que tienen una secuencia polipeptídica seleccionada de una o más de SEQ ID NOs: 12-14.
- 15 En otro aspecto (13) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 7, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, al menos dos, o al menos 3 de las CDRs de la cadena ligera que tienen una secuencia polipeptídica seleccionada de una o más de SEQ ID NOs: 9-11.
- 20 En otro aspecto (14) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 8, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, al menos dos, o al menos 3 de las CDRs de la cadena pesada que tienen una secuencia polipeptídica seleccionada entre una o más de SEQ ID NOs: 12-14.
- 25 En una realización (15) la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOs: 7-8, en donde el anticuerpo ha sido alterado mediante la introducción de al menos una, al menos dos, o al menos 3 o más sustituciones conservativas en las secuencias SEQ ID NOs: 7-8, en donde el anticuerpo mantiene esencialmente su funcionalidad completa, y en donde el aminoácido de la posición 52 se selecciona de cualquier aminoácido, del grupo que consiste en cisteína, tirosina y serina, y de cisteína sola.
- 30 En otro aspecto (16) la presente solicitud describe una CDR aislada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 9-14.
- En otro aspecto (17) la presente solicitud describe un polinucleótido aislado que codifica la región variable de la cadena ligera del aspecto once (11).
- En otro aspecto (18) la presente solicitud describe un polinucleótido aislado que codifica la región variable de la cadena pesada del aspecto doce (12).
- 35 En otro aspecto (19) la presente solicitud describe un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo o partes funcionales del mismo según el aspecto trece (13).
- En otro aspecto (20) la presente solicitud describe un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo o partes funcionales del mismo según el aspecto catorce (14).
- 40 En otro aspecto (21) la presente solicitud describe un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo o partes funcionales del mismo del aspecto uno (1).
- En otro aspecto (22) la presente solicitud describe un polinucleótido aislado que comprende al menos una de las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NOs: 15-16.
- 45 En otro aspecto (23) la presente solicitud describe una composición terapéutica que comprende el anticuerpo o partes funcionales del mismo según el primer aspecto (1) en una cantidad terapéuticamente eficaz, y que comprende opcionalmente además un vehículo, un diluyente, y/o un excipiente, farmacéuticamente aceptables.
- En otro aspecto (24) la presente solicitud describe un método para el tratamiento de enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis, que comprende la administración del anticuerpo o parte funcional del mismo del aspecto uno (1).
- 50 En otro aspecto (25) la presente solicitud describe la composición del aspecto veintitrés (23), que comprende además una sustancia biológicamente activa adicional seleccionada de uno o más compuestos utilizados en el tratamiento de enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis, compuestos contra el estrés oxidativo, compuestos anti-apoptóticos, quelantes de metales, inhibidores de la reparación del ADN, tales como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de la secretasa, inhibidores de la β -

secretasa y γ -secretasa, proteínas tau, neurotransmisores, rompedores de láminas β , moléculas antiinflamatorias, o inhibidores de la colinesterasa (ChEs), tales como tacrina, rivastigmina, donepezilo, o galantamina y/o suplementos nutritivos.

5 En otro aspecto (26) la presente solicitud describe un método para producir un anticuerpo, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo según el primer aspecto (1), cuyo método comprende generar en un organismo hospedante adecuado anticuerpos contra un constructo antigénico supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un péptido β -amiloide seleccionado de péptido β -amiloide A β 1-15, péptido β -amiloide A β 1-15 modificado con uno o más restos hidrófobos, péptido β -amiloide A β 1-15 modificado con un resto de ácido palmítico, en donde dicho resto hidrófobo está unido covalentemente a cada terminal por medio de un aminoácido seleccionado de lisina o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado capaz de servir como una molécula de enlace; y aislar el anticuerpo.

10 En otro aspecto (27) la presente solicitud describe un método para tratar o aliviar los efectos de las enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide, incluyendo, la amiloidosis, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), y enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo de Parkinson-demencia de Guam y otras enfermedades que se basan en o están asociadas con las proteínas de tipo amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de inicio en la edad adulta; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y la degeneración macular en un sujeto, que comprende la administración de un anticuerpo monoclonal o parte funcional del mismo según el primer aspecto (1) al sujeto, de tal manera que los efectos de la enfermedad o trastorno sean tratados y/o aliviados.

25 En otro aspecto (28) la presente solicitud describe un método para tratar o aliviar los efectos de las enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide, incluyendo la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placa amiloide incluyendo la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, tales como las enfermedades que incluyen pero no se limitan a, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), y enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo de Parkinson-demencia de Guam, además de otras enfermedades que se basan en o están asociadas con las proteínas de tipo amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio en la edad adulta; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluyendo la degeneración macular, cuyo método comprende la administración de la composición del aspecto veintitrés (23).

35 En otro aspecto (29) la presente solicitud describe una composición terapéutica que comprende el anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo según el aspecto (10) en una cantidad terapéuticamente eficaz, y que opcionalmente comprende además un vehículo, un diluyente, y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

40 En otro aspecto (30) la presente solicitud describe un método para reducir la carga de placa en el cerebro de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con un aumento en la carga de placa en el cerebro, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal según el primer aspecto (1).

45 En otro aspecto (31) la presente solicitud describe un método para reducir la cantidad de placas en el cerebro de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con un aumento en la carga de placa en el cerebro, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal según el primer aspecto (1).

50 En otro aspecto (32) la presente solicitud describe un método para reducir la cantidad total de A β soluble en el cerebro de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con el aumento de las concentraciones de A β soluble en el cerebro, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal según el primer aspecto (1).

En otro aspecto (33) la presente solicitud describe un método para conservar o aumentar la capacidad de memoria cognitiva en un sujeto que presenta una enfermedad o afección asociada con los amiloides, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal del aspecto uno (1).

55 En otro aspecto (34) la presente solicitud describe una línea celular caracterizada porque produce un anticuerpo monoclonal del aspecto uno (1).

En otro aspecto (35) la presente solicitud describe una línea celular caracterizada porque produce un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo

anticuerpo tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por el hibridoma EJ1A9, depositado el 25 de mayo de 2007 y que recibió el número de depósito DSM ACC2844, o en donde la línea celular es el hibridoma EJ1A9, depositado el 25 de mayo de 2007 y que recibió el número de depósito DSM ACC2844.

5 En otro aspecto (36) la presente solicitud describe un método de diagnóstico de una enfermedad o afección asociada con el amiloide o de diagnóstico de una predisposición a la misma, en un paciente, que comprende detectar la unión inmuno-específica de un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo del mismo a un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ*, que incluye las etapas de:

10 (a) poner en contacto la muestra o una parte o zona específica del cuerpo que se sospecha que contiene la proteína amiloide, con un anticuerpo monoclonal según, cuyo anticuerpo se une a un epítipo conformacional de la proteína amiloide;

(b). dejar que el anticuerpo se una a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;

(c). detectar la formación del complejo inmunológico; y

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

15 En otro aspecto (37) la presente solicitud describe un método para determinar la extensión de la carga de placa amiloidogénica en un tejido de un sujeto, que comprende:

(a) obtener una muestra representativa del tejido del sujeto objeto de la investigación;

(b). analizar dicha muestra en cuanto a la presencia de proteína amiloide con un anticuerpo monoclonal según el primer aspecto (1);

20 (c). determinar la cantidad de anticuerpo unida al antígeno; y

(d). calcular la carga de placa en el tejido del sujeto.

En otro aspecto (38) la presente solicitud describe un método para el seguimiento de la enfermedad residual mínima en un sujeto después de tratamiento con al menos un anticuerpo monoclonal o parte funcional del mismo del aspecto uno (1), en donde dicho método comprende:

25 (a) poner en contacto la muestra o una parte o zona específica del cuerpo del sujeto que se sospecha que contiene la proteína amiloide, con un anticuerpo monoclonal según el primer aspecto (1), cuyo anticuerpo se une a un epítipo conformacional de la proteína amiloide;

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

(c) detectar la formación del complejo inmunológico;

30 (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína amiloide en la muestra o parte o zona específica del cuerpo; y

(e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor normal de control, en donde un aumento de la cantidad de dicho agregado en comparación con un valor normal de control indica que dicho sujeto todavía padece una enfermedad residual mínima.

35 En otro aspecto (39) la presente solicitud describe un método para predecir el grado de respuesta de un sujeto que está siendo tratado con al menos un anticuerpo monoclonal o parte funcional del mismo del aspecto uno (1), que comprende

40 (a) poner en contacto la muestra o una parte o zona específica del cuerpo del sujeto que se sospecha que contiene la proteína amiloide, con un anticuerpo monoclonal según el primer aspecto (1), cuyo anticuerpo se une a un epítipo conformacional de la proteína amiloide;

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

(c) detectar la formación del complejo inmunológico;

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

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

en donde una reducción de la cantidad de dicho agregado indica que dicho sujeto tiene altas posibilidades de responder al tratamiento.

- 5 En otro aspecto (40) la presente solicitud describe un kit de ensayo que comprende al menos un anticuerpo o parte funcional del mismo del aspecto uno (1), y que comprende opcionalmente además instrucciones para utilizar los anticuerpos con el fin de que se unan a la proteína amiloide y formen un complejo inmunológico, y para detectar la formación del complejo inmunológico de tal manera que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de la proteína amiloide.
- 10 En otro aspecto (41) la presente solicitud describe un epítipo A β que es reconocido específicamente por un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo ha sido generado contra un constructo antigénico supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del péptido β -amiloide, A β 1-15, modificada con restos de ácido palmítico hidrófobos, en donde dicho resto hidrófobo está unido covalentemente a cada terminal por medio de un aminoácido tal como, por ejemplo, lisina o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado capaz de servir como una molécula de enlace.
- 15 En otro aspecto (42) la presente solicitud describe un epítipo A β que es reconocido específicamente por el anticuerpo monoclonal o parte funcional del mismo del aspecto quince (15)
- 20 En otro aspecto (43) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, según el primer aspecto (1), cuyo anticuerpo se une a péptidos A β monoméricos que tienen al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, incluso más particularmente al menos 40 residuos de aminoácidos, pero no muestra esencialmente ninguna unión al péptido A β 17-40 monomérico.
- En otro aspecto (44) la presente solicitud describe un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de polinucleótido del aspecto veintiuno (21).
- En otro aspecto (45) la presente solicitud describe un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de polinucleótido del aspecto veintidós (22).
- 25 En otro aspecto (46) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo reconoce y se une a un epítipo conformacional y se une a un amiloide polimérico soluble, fibrillas de amiloide, fibras amiloides, a péptidos A β poliméricos solubles que comprenden una pluralidad de péptidos A β 1-42 monoméricos y/o a fibrillas o fibras A β que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos, respectivamente.
- 30 En otro aspecto (47) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, según el aspecto cuarenta y seis (46), cuyo anticuerpo se une al péptido A β 1-42 monomérico, en donde el anticuerpo no tiene esencialmente ninguna unión a un péptido A β 17-40 monomérico y tiene una unión sustancialmente más débil al péptido A β 1-28 monomérico.
- 35 En otro aspecto (48) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo según el aspecto cuarenta y seis (46), cuyo anticuerpo, tras la co-incubación con un péptido A β que comprende un número de residuos de aminoácidos seleccionado de al menos 30, al menos 35, al menos 38, al menos 40 residuos de aminoácidos, y 42 residuos de aminoácidos en una forma monomérica y/o oligomérica, inhibe la agregación de los monómeros y/o oligómeros A β en fibrillas poliméricas de alto peso molecular.
- 40 En otro aspecto (49) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo según el aspecto cuarenta y seis (46), en donde el anticuerpo se une a un péptido monomérico A β 1-42 y también a péptidos A β poliméricos solubles que comprenden una pluralidad de péptidos A β 1-42 monoméricos y a fibrillas o fibras A β que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos, pero muestra una unión sustancialmente más débil al péptido A β 1-28 monomérico y/o esencialmente ninguna unión al péptido A β 17-40 monomérico y, tras la co-incubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados, formados por la agregación de péptidos A β 1-42 monoméricos y/o oligoméricos es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados, en al menos un 10 %, al menos un 20 %, particularmente al menos un 30 %, más particularmente al menos un 40 %, incluso más particularmente al menos un 50 %, pero especialmente al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o más.
- 45 En otro aspecto (50) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal según el aspecto cuarenta y seis (46) incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo presenta una alta especificidad para los péptidos A β 1-42 monoméricos y para los péptidos A β poliméricos solubles que comprenden una pluralidad de péptidos A β 1-42 monoméricos y para las fibrillas o fibras A β que incorporan una pluralidad de dichos péptidos poliméricos, pero no muestra esencialmente ninguna o solamente una moderada reactividad cruzada para los péptidos monoméricos A β 1-28 y/o A β 17-40.
- 50 En otro aspecto (51) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal según el aspecto cuarenta y seis (46) incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo es
- 55

capaz de reducir la cantidad total de A β soluble en el cerebro de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con un aumento de las concentraciones de A β soluble en el cerebro.

5 En otro aspecto (52) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal según el aspecto cuarenta y seis (46) incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo es capaz de solubilizar y/o romper las placas disminuyendo así la carga de placa en el cerebro de un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad o afección asociada con un aumento en la carga de placa en el cerebro.

10 El aspecto cincuenta y tres (53) de la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma FG1F9E4, depositada el 25 de mayo de 2007 y que recibió el número de depósito DSM ACC2845.

Una realización (54) de la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, producido por la línea celular de hibridoma FG1F9E4, depositada el 25 de mayo de 2007 y que recibió el número de depósito DSM ACC2845.

15 En otro aspecto (55) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma FK2A6A6, depositada el 25 de mayo de 2007 y que recibió el número de depósito DSM ACC2846.

20 Otra realización (56) de la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, producido por la línea celular de hibridoma FK2A6A6, depositada el 25 de mayo de 2007 y que recibió el número de depósito DSM ACC2846.

25 En otro aspecto (57) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo ha sido generado contra un constructo antigénico supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del péptido β -amiloide, A β 22-35 y A β 29-40, respectivamente, modificada con un resto de polietilenglicol hidrófilo (PEG), en donde dicho resto hidrófilo está unido covalentemente a cada terminal por medio de un aminoácido seleccionado de lisina, ácido glutámico, cisteína, y cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado capaz de servir como una molécula de enlace.

30 En otro aspecto (58) la presente solicitud describe una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 19, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, al menos dos, o al menos 3 de las CDRs de la cadena ligera que tienen una secuencia de polipéptido seleccionada de una o más de SEQ ID NOS: 21-23.

35 En otro aspecto (59) la presente solicitud describe una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, al menos dos, o al menos 3 de las CDRs de la cadena pesada que tienen una secuencia de polipéptido seleccionada de una o más de SEQ ID NOS: 24-26.

40 En otro aspecto (60) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 19, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, al menos dos, o al menos 3 de las CDRs de la cadena ligera que tienen una secuencia de polipéptido seleccionada de una o más de SEQ ID NOS: 21-23.

45 En otro aspecto (61) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20, o una parte funcional de la misma que comprende al menos una, al menos dos, o al menos 3 de las CDR de la cadena pesada que tienen una secuencia de polipéptido seleccionada entre una o más de SEQ ID NOS: 24-26.

55 En una realización adicional (62) la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 17-18, en donde el anticuerpo ha sido alterado por la introducción de al menos una, al menos dos, o al menos 3 o más sustituciones conservativas en las secuencias de SEQ ID NOS: 17-18, en donde el

anticuerpo mantiene esencialmente su funcionalidad completa, y en donde el aminoácido de la posición 52 se selecciona de cualquier aminoácido, del grupo que consiste en cisteína, tirosina, serina, y de cisteína sola.

5 En otra realización (63) la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 19-20, en donde el anticuerpo ha sido alterado por la introducción de al menos una, al menos dos, o al menos 3 o más sustituciones conservativas en las secuencias de SEQ ID NOs: 19-20, en donde el anticuerpo mantiene esencialmente su funcionalidad completa, y en donde el aminoácido de la posición 52 se selecciona de cualquier aminoácido, del grupo que consiste en cisteína, tirosina, serina, y de cisteína sola.

10 En otro aspecto (64) la presente solicitud describe una CDR aislada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 21-23.

En otro aspecto (65) la presente solicitud describe un polinucleótido aislado que codifica la región variable de la cadena ligera del aspecto cincuenta y ocho (58).

En otro aspecto (66) la presente solicitud describe un polinucleótido aislado que codifica la región variable de la cadena pesada del aspecto cincuenta y nueve (59).

15 En otro aspecto (67) la presente solicitud describe un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo o partes funcionales del mismo según el aspecto sesenta (60).

En otro aspecto (68) la presente solicitud describe un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo o partes funcionales del mismo según el aspecto sesenta y uno (61).

20 En otro aspecto (69) la presente solicitud describe un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo o partes funcionales del mismo según el aspecto cuarenta y seis (46).

En otro aspecto (70) la presente solicitud describe un polinucleótido aislado que comprende al menos una de las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NOs: 27-28.

En otro aspecto (71) la presente solicitud describe un polinucleótido aislado que comprende al menos una de las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NOs: 29-30.

25 En otro aspecto (72) la presente solicitud describe una composición terapéutica que comprende el anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, según el aspecto cuarenta y seis (46) en una cantidad terapéuticamente eficaz, y que comprende opcionalmente además un vehículo, un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables..

30 En otro aspecto (73) la presente solicitud describe un método para tratar enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis, que comprende la administración del anticuerpo o parte funcional del mismo del aspecto cuarenta y seis (46).

35 En otro aspecto (74) la presente solicitud describe la composición del aspecto setenta y dos (72), que comprende además una sustancia biológicamente activa adicional seleccionada de uno o más compuestos utilizados en el tratamiento de enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis, compuestos contra el estrés oxidativo, compuestos anti-apoptóticos, quelantes de metales, inhibidores de la reparación del ADN, tales como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de la secretasa, inhibidores de la β -secretasa y γ -secretasa, proteínas tau, neurotransmisores, rompedores de láminas β , moléculas antiinflamatorias, o inhibidores de la colinesterasa (ChEIs), tales como tacrina, rivastigmina, donepezilo, o galantamina y/o suplementos nutritivos.

40

45 En otro aspecto (75) la presente solicitud describe un método para producir un anticuerpo, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, según el aspecto cuarenta y seis (46), cuyo método comprende generar en un organismo hospedante adecuado anticuerpos contra un constructo antigénico supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un péptido β -amiloide seleccionado de A β 22-35 y A β 29-40, respectivamente, modificada con uno o más restos hidrófilos, o modificada con un resto hidrófilo de polietilenglicol (PEG), en donde dicho resto hidrófilo está unido covalentemente a cada terminal por medio de un aminoácido seleccionado de lisina, ácido glutámico, cisteína, y cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado capaz de servir como una molécula de enlace; y aislar el anticuerpo.

50 En otro aspecto (76) la presente solicitud describe un método para tratar o aliviar los efectos de las enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide, incluyendo, la amiloidosis, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), y enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo de Parkinson-demencia de Guam y otras enfermedades que se basan en o están

asociadas con proteínas de tipo amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de inicio en la edad adulta; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y degeneración macular en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de un anticuerpo monoclonal o parte funcional del mismo según el aspecto cuarenta y seis (46) de tal manera que los efectos de la enfermedad o trastorno sean tratados y/o aliviados.

En otro aspecto (77) la presente solicitud describe un método para tratar o aliviar en un sujeto que lo necesite, los efectos de las enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide, incluyendo la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placa amiloide incluyendo la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, tales como las enfermedades que incluyen pero no se limitan a, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), y enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo de Parkinson-demencia de Guam, además de otras enfermedades que se basan en o están asociadas con las proteínas de tipo amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio en la edad adulta; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluyendo la degeneración macular, en un sujeto que lo necesite, que comprende la administración de la composición del aspecto setenta y dos (72).

En otro aspecto (78) la presente solicitud describe una composición terapéutica que comprende el anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo según el aspecto cincuenta y siete (57) en una cantidad terapéuticamente eficaz, y que comprende opcionalmente además un vehículo, un diluyente, y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto (79) la presente solicitud describe un método para reducir la carga de placa en el cerebro de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con un aumento en la carga de placa en el cerebro que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal según el aspecto cuarenta y seis (46).

En otro aspecto (80) la presente solicitud describe un método para reducir la cantidad de placas en el cerebro de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con un aumento en la carga de placa en el cerebro que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal según el aspecto cuarenta y seis (46).

En otro aspecto (81) la presente solicitud describe un método para reducir la cantidad total de A β soluble en el cerebro de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con el aumento de las concentraciones de A β soluble en el cerebro, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal según el aspecto cuarenta y seis (46).

En otro aspecto (82) la presente solicitud describe un método para conservar o aumentar la capacidad de memoria cognitiva en un sujeto que presenta una enfermedad o afección asociada a los amiloides, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal del aspecto cuarenta y seis (46).

En otro aspecto (83) la presente solicitud describe una línea celular caracterizada porque produce un anticuerpo monoclonal del aspecto cuarenta y seis (46).

En otro aspecto (84) la presente solicitud describe una línea celular caracterizada porque produce un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por el hibridoma FG1F9E4, depositado el 25 de mayo de 2007 y que recibió el número de depósito DSM ACC2845, o en donde la línea celular es el hibridoma FG1F9E4, depositado el 25 de mayo de 2007 y que recibió el número de depósito DSM ACC2845.

En otro aspecto (85) la presente solicitud describe una línea celular caracterizada porque produce un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por el hibridoma FK2A6A6, depositado el 25 de mayo de 2007 y que recibió el número de depósito DSM ACC2846, o en donde la línea celular es el hibridoma FK2A6A6, depositado el 25 de mayo de 2007 y que recibió el número de depósito DSM ACC2846.

En otro aspecto (86) la presente solicitud describe un método de diagnóstico de una enfermedad o afección asociada con el amiloide o de diagnóstico de una predisposición a la misma, en un sujeto, que comprende detectar la unión inmunespecífica de un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo del mismo con un epitopo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ*, que incluye las etapas de:

(a) poner en contacto la muestra o una parte o zona específica del cuerpo que se sospecha que contiene la proteína amiloide, con un anticuerpo monoclonal según el aspecto cuarenta y seis (46), cuyo anticuerpo se une a un epítipo conformacional de la proteína amiloide;

(b). dejar que el anticuerpo se una a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;

5 (c). detectar la formación del complejo inmunológico; y

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

En otro aspecto (87) la presente solicitud describe un método para determinar la extensión de la carga de placa amiloidogénica en un tejido de un sujeto que lo necesite, que comprende:

10 (a) obtener una muestra representativa del tejido del sujeto objeto de la investigación;

(b). analizar dicha muestra en cuanto a la presencia de proteína amiloide con un anticuerpo monoclonal según el aspecto cuarenta y seis (46);

(c). determinar la cantidad de anticuerpo unida al antígeno; y

(d). calcular la carga de placa en el tejido del sujeto.

15 En otro aspecto (88) la presente solicitud describe un método para el seguimiento de la enfermedad residual mínima en un sujeto después de tratamiento con al menos un anticuerpo monoclonal o parte funcional del mismo del aspecto cuarenta y seis (46), en donde dicho método comprende:

20 (a) poner en contacto la muestra o una parte o zona específica del cuerpo del sujeto que se sospecha que contiene la proteína amiloide, con un anticuerpo monoclonal según el aspecto cuarenta y seis (46), cuyo anticuerpo se une a un epítipo conformacional de la proteína amiloide;

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

(c) detectar la formación del complejo inmunológico;

(d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína amiloide en la muestra o parte o zona específica del cuerpo del sujeto; y

25 (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor normal de control, en donde un aumento de la cantidad de dicho agregado en comparación con un valor normal de control indica que dicho sujeto todavía padece una enfermedad residual mínima.

En otro aspecto (89) la presente solicitud describe un método para predecir el grado de respuesta de un sujeto que está siendo tratado con al menos un anticuerpo monoclonal o parte funcional del mismo del aspecto cuarenta y seis (46), que comprende

30 (a) poner en contacto la muestra o una parte o zona específica del cuerpo del sujeto que se sospecha que contiene la proteína amiloide, con un anticuerpo monoclonal según el aspecto cuarenta y seis (46), cuyo anticuerpo se une a un epítipo conformacional de la proteína amiloide;

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

35 (c) detectar la formación del complejo inmunológico;

(d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína amiloide en la muestra o parte o zona específica del cuerpo del sujeto; y

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

40 en donde una reducción de la cantidad de dicho agregado indica que dicho sujeto tiene altas posibilidades de responder al tratamiento.

En otro aspecto (90) la presente solicitud describe un kit de ensayo que comprende al menos un anticuerpo o parte funcional del mismo del aspecto cuarenta y seis (46), y que comprende opcionalmente además instrucciones para utilizar los anticuerpos con el fin de que se unan a la proteína amiloide y formen un complejo inmunológico, y para detectar la formación del complejo inmunológico de tal manera que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de la proteína amiloide.

45 En otro aspecto (91) la presente solicitud describe un epítipo A β que es reconocido específicamente por un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo,

- cuyo anticuerpo ha sido generado contra un constructo antigénico supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del péptido β -amiloide, A β 22-35 y A β 29-40, respectivamente, modificada con un resto hidrófilo de polietilenglicol (PEG), en donde dicho resto hidrófilo está unido covalentemente a cada terminal por medio de un aminoácido tal como, por ejemplo, lisina o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado capaz de servir como una molécula de enlace.
- 5 En otro aspecto (92) la presente solicitud describe un epítipo A β que es reconocido específicamente por el anticuerpo monoclonal o parte funcional del mismo del aspecto sesenta y dos (62).
- En otro aspecto (93) la presente solicitud describe un epítipo A β que es reconocido específicamente por el anticuerpo monoclonal o parte funcional del mismo del aspecto sesenta y tres (63).
- 10 En otro aspecto (94) la presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo según el aspecto cuarenta y seis (46), cuyo anticuerpo se une a péptidos A β monoméricos que tienen al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, incluso más particularmente al menos 40 residuos de aminoácidos, pero no muestra esencialmente ninguna unión al péptido A β 17-40 monomérico.
- 15 En otro aspecto (95) la presente solicitud describe un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de polinucleótido del aspecto sesenta y nueve (69).
- En otro aspecto (96) la presente solicitud describe un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de polinucleótido del aspecto setenta (70).
- 20 En otro aspecto (97) la presente solicitud describe un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de polinucleótido del aspecto setenta y uno (71).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> AC Immune S.A.

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES

<130> 089667-0105

<160> 30

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> RASGO-MISC

<223> péptido antigénico AB 22-35

<400> 1

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

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> RASGO-MISC

<223> péptido antigénico AB 29-40

<400> 2

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

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> RASGO-MISC

<223> fragmento de péptido A-beta AB 1-28

<400> 3

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

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

<210> 4

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> RASGO-MISC

<223> fragmento de péptido A-beta AB 17-40

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

<210> 8
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> RASGO-MISC
 <223> Dominio variable de cadena pesada de ACI-24-Ab-3 X puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> RASGO-MISC
 <222> (52)..(52)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 8
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Arg Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Xaa Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Val Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Ile Tyr Tyr Gly Arg Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

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

<220>

<221> RASGO-MISC

<223> CDR1 de cadena ligera

<400> 9

Lys Ala Ser Gln Asn Val Ala Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> RASGO-MISC

<223> CDR2 de cadena ligera

<400> 10

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> RASGO-MISC

<223> CDR3 de cadena ligera

<400> 11

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> RASGO-MISC

<223> CDR1 de cadena pesada

<400> 12

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

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> RASGO-MISC

<223> CDR2 de cadena pesada

X puede ser cualquier aminoácido

<220>

<221> RASGO-MISC

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 13

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

Gly

ES 2 548 102 T3

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

<220>
 <221> RASGO-MISC
 <223> CDR3 de cadena pesada

<400> 14
 Ser Ile Tyr Tyr Gly Arg Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

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

<220>
 <221> RASGO-MISC
 <223> Secuencia que codifica la región variable de cadena ligera de ACI-24-Ab-3

<400> 15
 gatatcgtga tgaccagtc tcaactcttc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
 gtcacctgca aggccagtca gaatgtggct actaatgtag cctgggatca acagaaacca 120
 gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcacccctacc ggtacagtgg agtccctgat 180
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgcagtct 240
 gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atccgctcac gttcgggtgct 300
 gggaccaagc tggagctgaa a 321

<210> 16
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> RASGO-MISC
 <223> Secuencia que codifica la región variable de cadena pesada de ACI-24-Ab-3

<400> 16
 caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctggcgaggc ctggggcttc agtgaagctg 60
 tcttgcaagg cttctgggta caccttcaca agctatggta taagggtgggt gaagcagaga 120
 actggacagg gccttgagtg gattggagag atttgtccta gaagtggcaa tacttactac 180
 aatgagaagt tcaagggcaa ggccacagtg actgcagaca aatcctccag cacagcgtac 240
 atggagetcc gcagcctgac atctgaggac tetgcggtct atttctgtgc aagatcgatt 300
 tactacggta gaccctacta ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 360
 tca 363

<210> 17
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> RASGO-MISC
 <223> Dominio variable de cadena ligera de ACI-11-Ab-9

<400> 17

```

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

<210> 18

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> RASGO-MISC

<223> Dominio variable de cadena pesada de ACI-11-14b-9

<400> 18

```

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

<210> 19

<211> 109

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> RASGO-MISC

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

<400> 19

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

<210> 20

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> RASGO-MISC

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

<400> 20

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

<210> 21

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> RASGO_MISC

<223> CDR1 de cadena ligera

<400> 21

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn

1 5 10

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> RASGO-MISC

<223> CDR2 de cadena ligera

<400> 22

Gly Thr Ser Asn Arg Ala Pro

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> RASGO-MISC

<223> CDR3 de cadena ligera

<400> 23

Ala Leu Trp Tyr Ser Thr His Tyr Val

1 5

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> RASGO-MISC

<223> CDR1 de cadena pesada

<400> 24

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Thr Ile His

1 5 10

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> RASGO-MISC

<223> CDR2 de cadena pesada

<400> 25

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

1 5 10 15

Gly

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> RASGO-MISC

<223> CDR3 de cadena pesada

<400> 26

Asp Tyr Gly Tyr Ala Phe Asp Tyr

1 5

<210> 27

<211> 327

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> RASGO-MISC

<223> Secuencia que codifica la región variable de cadena ligera de ACI-11-Ab-9

<400> 27

```

caggcagttg tgactcagga atctgcactc accaogtcac ctggtggaac agtcatactc 60
acttgtogct caagtactgg ggctgttaca actagtaact atgccaactg ggtccaagaa 120
aaaccagatc atttattcac tggcttaata ggtggtaoca gcaaccgagc tccaggtgtt 180
cctgtcagat tctcaggctc cctgattgga gacaaggctg coctcaccat cacaggggca 240
cagactgagg atgatgcaat gtatttctgt gctctatggt acagcaccca ttatgttttc 300
ggcgggtgaa ccaaggtcac tgtccta 327
    
```

<210> 28

<211> 351

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> RASGO-MISC

<223> Secuencia que codifica la región variable de cadena pesada de ACI-11-Ab-9

<400> 28

```

caggttcagc tgcagcagtc tgaogctgag ttggtgaaac ctggagcttc agtgaagata 60
tcttgcaagg tttctggcta caccttcact gaccatacta ttcaactggat gaagcagagg 120
cctgaacagg gcoctggaatg gattggatat atttatocta gagatggtag tactaagtac 180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgcagaca aatcoctccag cacagocctac 240
atgcagctca acagcctgac atctgaggac tctgcagtct atttctgtgc aagagactat 300
ggttacgcct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctctc a 351
    
```

<210> 29

<211> 327

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> RASGO-MISC

<223> Secuencia que codifica el dominio variable de cadena ligera de ACI-12-Ab-11

<400> 29

```

caggcogttg tgactcagga atctgcactc accaogtccc ctggtggaac agtcatactc 60
acttgtogct caagtactgg ggctgttaca actagtaact atgccaactg ggtccaagaa 120
aaaccagatc atttattcac tggcttaata ggtggtaoca gcaaccgagc tccaggtgtt 180
cctgtcagat tctcaggctc cctgattgga gacaaggctg coctcaccat cacaggggca 240
cagactgagg atgatgcaat gtatttctgt gctctatggt acagcaccca ttatgttttc 300
ggcgggtgaa ccaaggtcac tgtccta 327
    
```

<210> 30

<211> 351

<212> ADN

<213> Mus musculus

ES 2 548 102 T3

<220>

<221> RASGO-MISC

<223> Secuencia que codifica el dominio variable de cadena pesada de ACI-12-Ab-11

<400> 30

```
caggttcagc tgcagcagtc tgaogctgag ttggtgaaac ctggagcttc agtgaagata    60
tctgcaagg tttctggcta caccttcact gaccatacta ttcactggat gaagcagagg    120
cctgaacagg goctggaatg gattggatat atttacctta gagatggtag tactaagtac    180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgcagaca aatcctccag cacagcctac    240
atgcagctca acagcctgac atctgaggac tctgcagtct atttctgtgc aagagactat    300
ggttacgctt ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcttc a              351
```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o una parte funcional del mismo capaz de unirse específicamente a un beta amiloide, en donde el anticuerpo o la parte funcional del mismo comprende:

- 5 a. (i) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 7, o una parte funcional de la misma que comprende tres CDRs de la cadena ligera que tiene las secuencias de polipéptidos de SEQ ID NOS: 9-11; y
- 10 (ii) un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 8, o una parte funcional de la misma que comprende tres CDRs de la cadena pesada que tiene las secuencias de polipéptidos de SEQ ID NOS: 12-14; o
- b. las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 7 y 8, en donde el anticuerpo ha sido alterado introduciendo al menos una, al menos dos, o al menos 3 sustituciones en las secuencias de SEQ ID NOS: 7 y 8; o
- 15 c. (i) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a la secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 19, o una parte funcional de la misma que comprende tres CDRs de la cadena ligera que tiene las secuencias de polipéptidos de SEQ ID NOS: 21-23; y
- 20 (ii) un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20, o una parte funcional de la misma que comprende tres CDRs de la cadena pesada que tiene las secuencias de polipéptidos de SEQ ID NOS: 24-26; o
- 25 d. las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 17 y 18, en donde el anticuerpo ha sido alterado introduciendo al menos una, al menos dos, o al menos 3 sustituciones conservativas en las secuencias de SEQ ID NOS: 17 y 18; o
- 30 e. las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 19 y 20, en donde el anticuerpo ha sido alterado introduciendo al menos una, al menos dos, o al menos 3 sustituciones conservativas en las secuencias de SEQ ID NOS: 19 y 20,

35 en donde dicho anticuerpo tras la co-incubación con un péptido Abeta1-42 monomérico y/o oligomérico, inhibe la agregación de los monómeros Abeta en fibrillas amiloides poliméricas de alto peso molecular y, en adición tras la co-incubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados, formados por la agregación de péptidos Abeta1-42 monoméricos y/o oligoméricos, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados, en una relación de concentración molar de 1:100 después de incubación durante 24 horas a 37 °C.

2. Un anticuerpo o una parte funcional del mismo capaz de unirse específicamente a un beta amiloide, en donde:

- a. las regiones CDR (regiones determinantes de complementariedad) del anticuerpo o parte funcional del mismo, son:
- 40 i. la CDR1 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9;
- ii. la CDR2 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10;
- 45 iii. la CDR3 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;
- iv. la CDR1 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;
- v. la CDR2 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; y
- 50 vi. la CDR3 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14;

o

b. las regiones CDR del anticuerpo o parte funcional del mismo, son:

i. la CDR1 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;

5 ii. la CDR2 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22;

iii. la CDR3 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23;

10 iv. la CDR1 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24;

v. la CDR2 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y

vi. la CDR3 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26;

15 en donde dicho anticuerpo tras la co-incubación con un péptido Abeta1-42 monomérico y/o oligomérico, inhibe la agregación de los monómeros Abeta en fibrillas amiloides poliméricas de alto peso molecular y, en adición tras la co-incubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados, formados por la agregación de péptidos Abeta1-42 monoméricos y/o oligoméricos, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados, en una relación de concentración molar de 1:100 después de incubación durante 24 horas a 37 °C.

20

3. El anticuerpo o una parte funcional del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que es un anticuerpo monoclonal o la parte funcional del mismo.

4. El anticuerpo o una parte funcional del mismo de la reivindicación 3, en donde el anticuerpo o la parte funcional del mismo comprende:

25 (i) un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8; o

30 (ii) un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 18; o

(iii) un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 19 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 20.

35 5. El anticuerpo o una parte funcional del mismo de la reivindicación 3, en donde el anticuerpo o la parte funcional del mismo comprende:

a. las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 7 y 8, en donde el anticuerpo ha sido alterado introduciendo al menos una, al menos dos, o al menos tres sustituciones conservativas en las secuencias de SEQ ID NOs: 7 y 8; en donde el aminoácido de la posición 52 se selecciona de cualquier aminoácido, o del grupo que consiste en cisteína, tirosina, y serina; o

40 b. las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 17 y 18, en donde el anticuerpo ha sido alterado introduciendo al menos una, al menos dos, o al menos tres sustituciones conservativas en las secuencias de SEQ ID NOs: 17 y 18; en donde el aminoácido de la posición 52 se selecciona de cualquier aminoácido, o del grupo que consiste en cisteína, tirosina, y serina; o

45 c. las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 19 y 20, en donde el anticuerpo ha sido alterado introduciendo al menos una, al menos dos, o al menos tres sustituciones conservativas en las secuencias de SEQ ID NOs: 19 y 20; en donde el aminoácido de la posición 52 se selecciona de cualquier aminoácido, o del grupo que consiste en cisteína, tirosina, y serina.

6. El anticuerpo o una parte funcional del mismo de la reivindicación 3, en donde el anticuerpo o la parte funcional del mismo comprende:
- a. las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 7 y 8, en donde el anticuerpo ha sido alterado introduciendo al menos una, al menos dos, o al menos tres sustituciones conservativas en las secuencias de SEQ ID NOs: 7 y 8; en donde el aminoácido de la posición 52 es cisteína; o
 - b. las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 17 y 18, en donde el anticuerpo ha sido alterado introduciendo al menos una, al menos dos, o al menos tres sustituciones conservativas en las secuencias de SEQ ID NOs: 17 y 18; en donde el aminoácido de la posición 52 es cisteína; o
 - c. las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 19 y 20, en donde el anticuerpo ha sido alterado introduciendo al menos una, al menos dos, o al menos tres sustituciones conservativas en las secuencias de SEQ ID NOs: 19 y 20; en donde el aminoácido de la posición 52 es cisteína.
7. El anticuerpo o una parte funcional del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que es un anticuerpo quimérico o la parte funcional del mismo:
8. El anticuerpo o una parte funcional del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que es un anticuerpo humanizado o la parte funcional del mismo:
9. El anticuerpo o una parte funcional del mismo según las reivindicaciones 4-6, en donde el anticuerpo o la parte funcional del mismo ha sido producido por la línea celular de hibridoma EJ1A9, depositada con el número de depósito DSM ACC2844, o la línea celular de hibridoma FG1F9E4, depositada con el número de depósito DSM ACC2845, o la línea celular de hibridoma FK2A6A6, depositada con el número de depósito DSM ACC2846.
10. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo o la parte funcional del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. El polinucleótido de la reivindicación 10, en donde el polinucleótido codifica el dominio variable de la cadena ligera y el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo o fragmento funcional del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
12. El polinucleótido según las reivindicaciones 10 u 11, que comprende al menos una de las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NOs: 15-16, y SEQ ID NOs: 27-30.
13. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que es un polinucleótido aislado.
14. Una composición terapéutica que comprende el anticuerpo o la parte funcional del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en una cantidad terapéuticamente eficaz.
15. La composición terapéutica según la reivindicación 14, que comprende además una sustancia biológicamente activa seleccionada de uno o más compuestos utilizados en el tratamiento de enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide, incluyendo la amiloidosis, compuestos contra el estrés oxidativo, compuestos anti-apoptóticos, quelantes de metales, inhibidores de la reparación del ADN tales como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de la secretasa, inhibidores de la β -secretasa y γ -secretasa, proteínas tau, neurotransmisores, rompedores de láminas β , moléculas antiinflamatorias, o inhibidores de la colinesterasa (ChEIs), tales como tacrina, rivastigmina, donepezilo, galantamina y/o suplementos nutritivos.
16. La composición terapéutica según la reivindicación 14, que comprende además un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptables.
17. El anticuerpo o la parte funcional del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para uso en:
- a. el tratamiento de enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis; o
 - b. el tratamiento o alivio de los efectos de enfermedades y trastornos que están causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyendo la amiloidosis, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), y enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo de Parkinson-demencia de Guam y otras enfermedades que se basan en o están asociadas con proteínas de tipo amiloide tales como la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de inicio en la edad adulta, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y degeneración macular en un sujeto; o

- c. el tratamiento de un sujeto mediante la reducción de la carga de placa en el cerebro del sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con un aumento de la carga de placa en el cerebro; o
- d. el tratamiento de un sujeto mediante la reducción de la cantidad de placas en el cerebro del sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con un aumento de la carga de placa en el cerebro; o
- 5 e. el tratamiento de un sujeto mediante la reducción de la cantidad total de A β soluble en el cerebro del sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con el aumento de las concentraciones de A β soluble en el cerebro; o
- f. el tratamiento de un sujeto mediante la conservación o el incremento de la capacidad de memoria cognitiva en el sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con el amiloide.
- 10 18. Una línea celular caracterizada porque produce el anticuerpo o la parte funcional del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
19. Una línea celular según la reivindicación 18, en donde la línea celular es:
- a. hibridoma EJ1A9, depositado el 25 de mayo de 2007 y que recibió el número de depósito DSM ACC2844, o
- 15 b. hibridoma FG1F9E4, depositado el 25 de mayo de 2007 y que recibió el número de depósito DSM ACC2845, o
- c. hibridoma FK2A6A6, depositado el 25 de mayo de 2007 y que recibió el número de depósito DSM ACC2846.
- 20 20. Un método de diagnóstico de una enfermedad o afección asociada con el amiloide, o de diagnóstico de una predisposición a la misma, en un sujeto, que comprende detectar la unión inmunoespecífica de un anticuerpo o un fragmento activo del mismo a un epítipo de la proteína amiloide en una muestra del sujeto, que incluye las etapas de:
- a. poner en contacto una muestra del sujeto que se sospecha que contiene la proteína amiloide con el anticuerpo o la parte funcional del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9;
- 25 b. dejar que el anticuerpo o la parte funcional del mismo se una a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;
- c. detectar la formación del complejo inmunológico; y
- d. correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína amiloide en la muestra del sujeto.
- 30 21. Un método para determinar la extensión de la carga de placa amiloidogénica en un tejido del sujeto, que comprende:
- a. analizar una muestra del sujeto en cuanto a la presencia de proteína amiloide con el anticuerpo o la parte funcional del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9;
- b. determinar la cantidad de anticuerpo unida al antígeno; y
- 35 c. calcular la carga de placa en el tejido del sujeto.
22. Un método para el seguimiento de la enfermedad residual mínima en un sujeto después de tratamiento con el anticuerpo o la parte funcional del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho método comprende:
- a. poner en contacto una muestra del sujeto que se sospecha que contiene la proteína amiloide, con el anticuerpo o la parte funcional del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9;
- 40 b. dejar que el anticuerpo o la parte funcional del mismo se una a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;
- c. detectar la formación del complejo inmunológico;
- d. correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína amiloide en la muestra; y
- 45 e. comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor normal de control,

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

23. Un método para predecir el grado de respuesta de un sujeto al tratamiento con el anticuerpo o la parte funcional del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende:

- 5 a. poner en contacto una muestra del sujeto que se sospecha que contiene la proteína amiloide con el anticuerpo o la parte funcional del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9;
- b. dejar que el anticuerpo o la parte funcional del mismo se una a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;
- c. detectar la formación del complejo inmunológico;
- 10 d. correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína amiloide en la muestra del sujeto; y
- e. comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico antes y después del inicio del tratamiento,

en donde una reducción de la cantidad de dicho agregado indica que dicho sujeto tiene altas posibilidades de responder al tratamiento

15 24. Un kit de ensayo que comprende el anticuerpo o la parte funcional del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

20 25. El kit de ensayo según la reivindicación 24, que comprende además instrucciones para utilizar el anticuerpo o la parte funcional del mismo con el fin de que se una a la proteína amiloide y forme un complejo inmunológico, y para detectar la formación del complejo inmunológico de tal manera que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de la proteína amiloide.

26. Un método para producir el anticuerpo o la parte funcional del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende cultivar la línea celular de la reivindicación 18.

25 27. Un método para producir el anticuerpo o el fragmento funcional del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende cultivar la línea celular de la reivindicación 18 o 19, o expresar el polinucleótido de las reivindicaciones 9 a 13 en una célula para producir el anticuerpo o fragmento funcional del mismo.

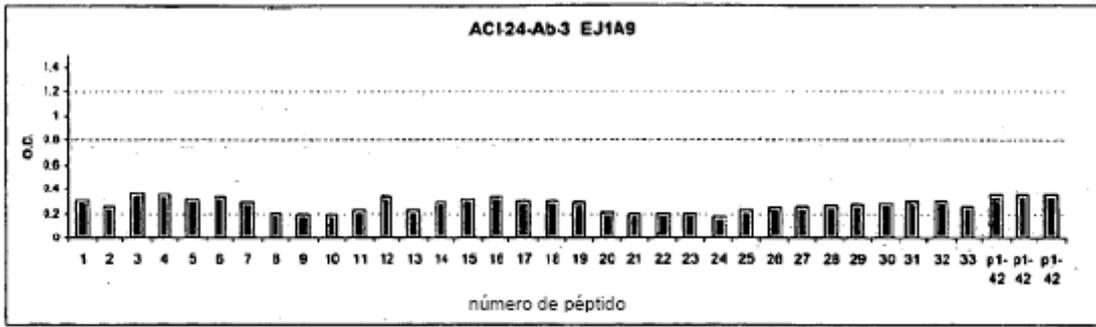


Figura 1

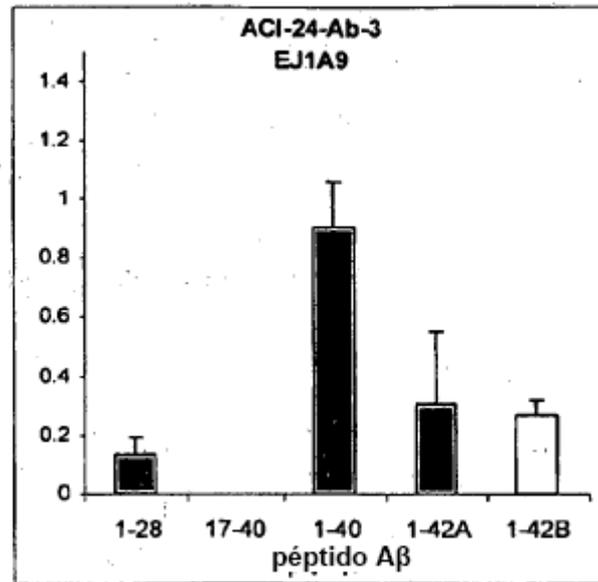


Figura 2

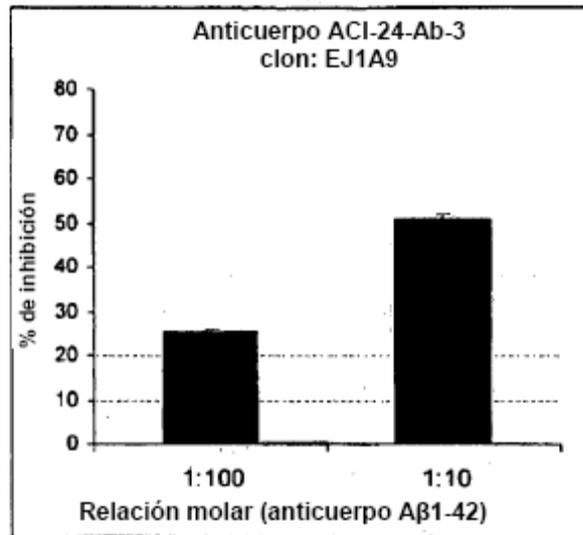


Figura 3

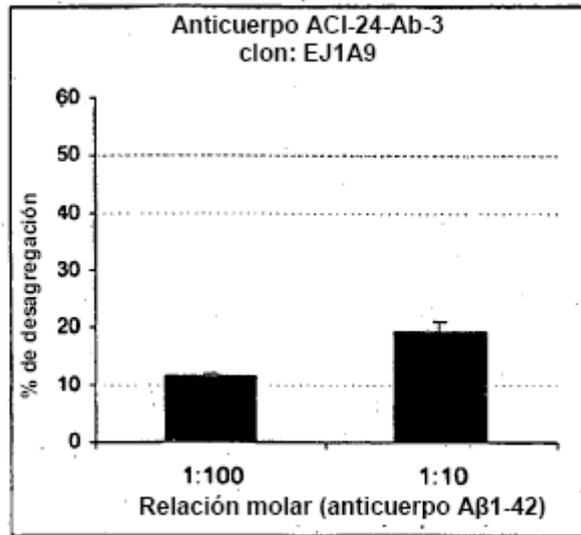


Figura 4

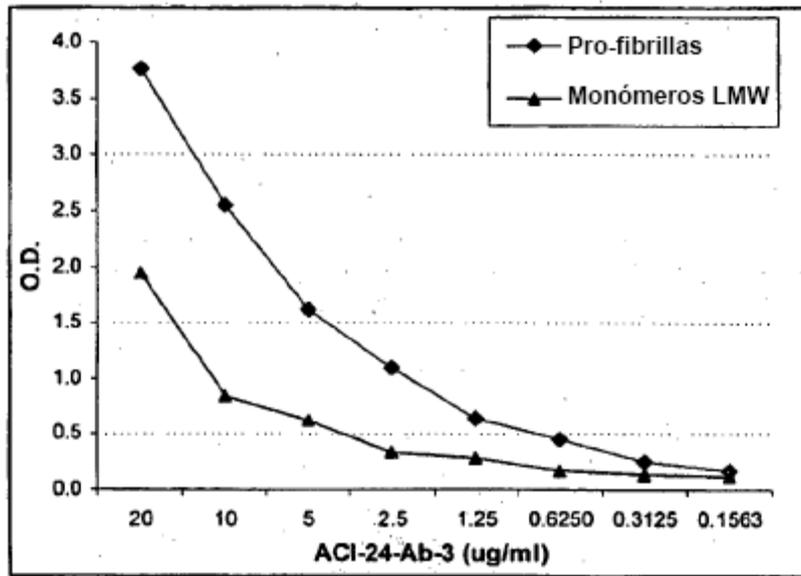


Figura 5

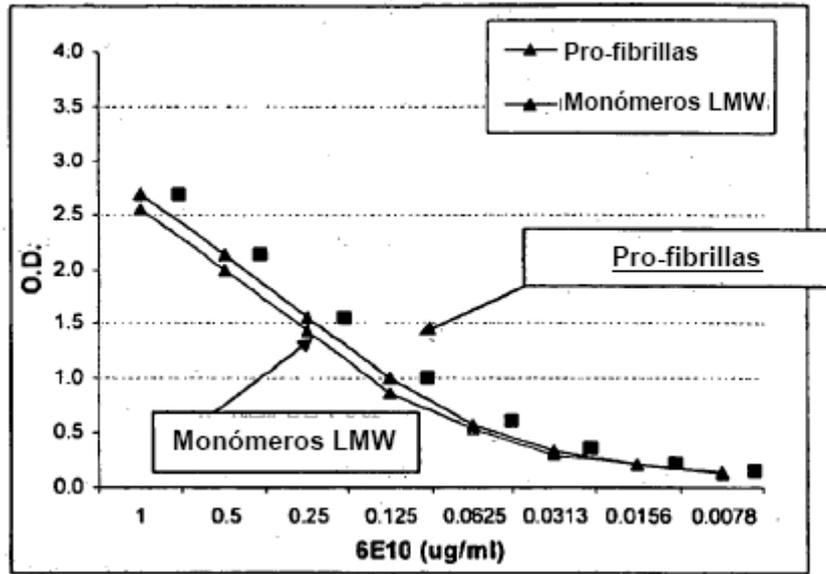


Figura 6

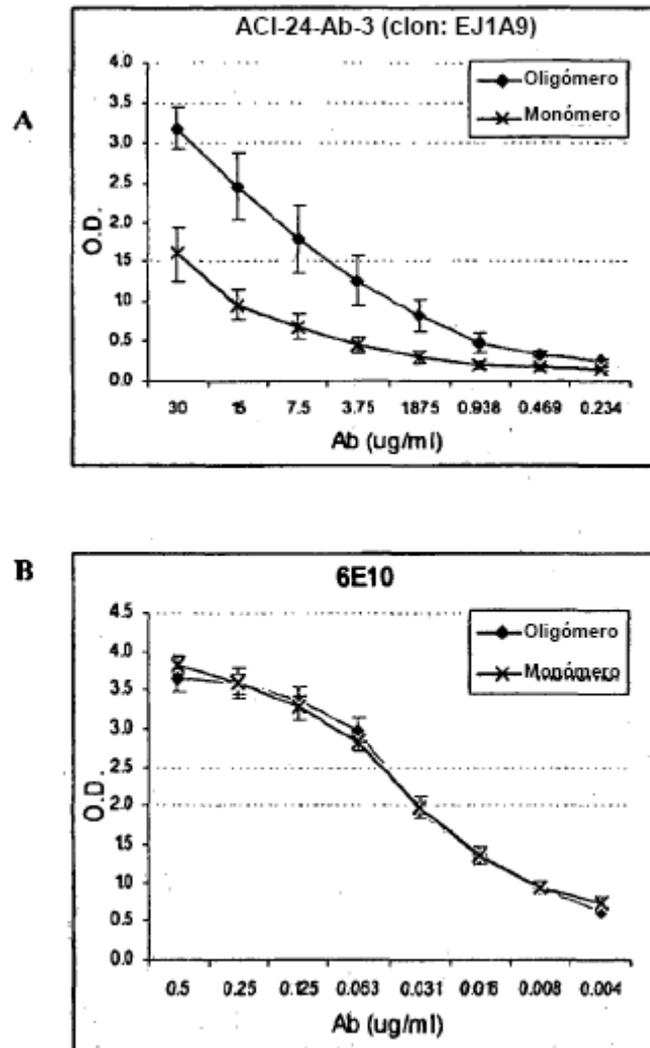


Figura 7

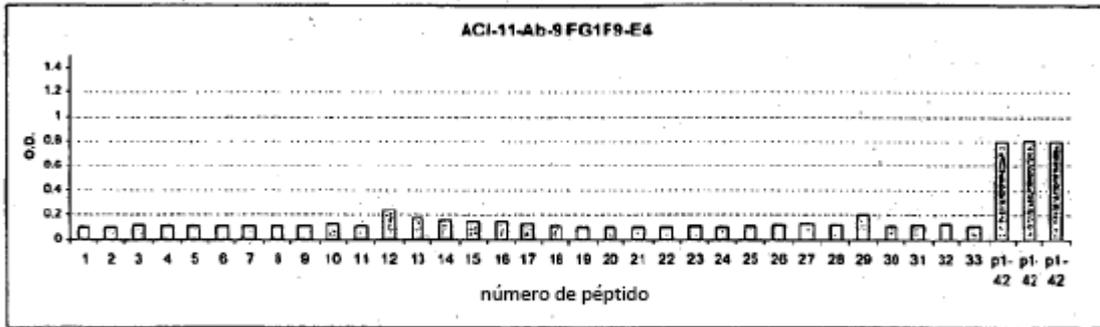


Figura 8

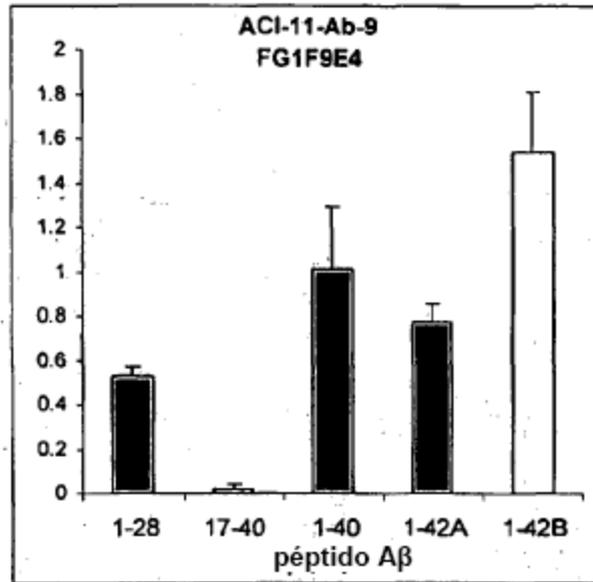


Figura 9

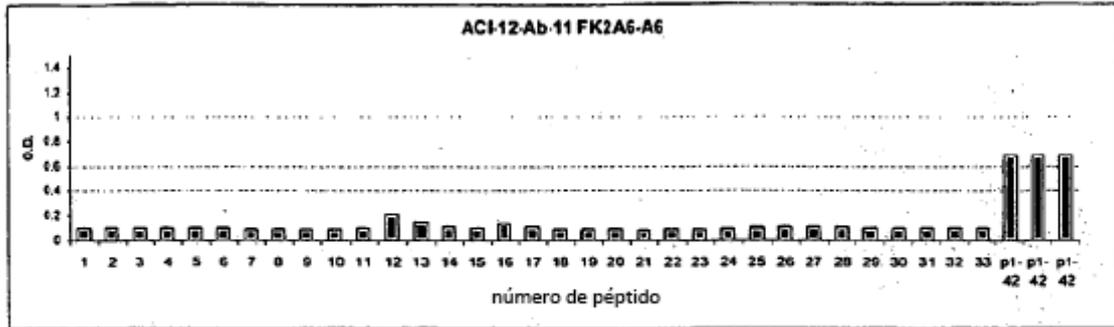


Figura 10

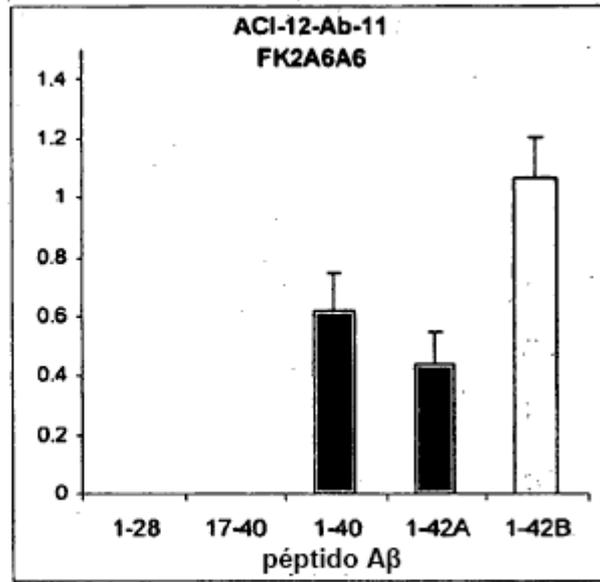


Figura 11

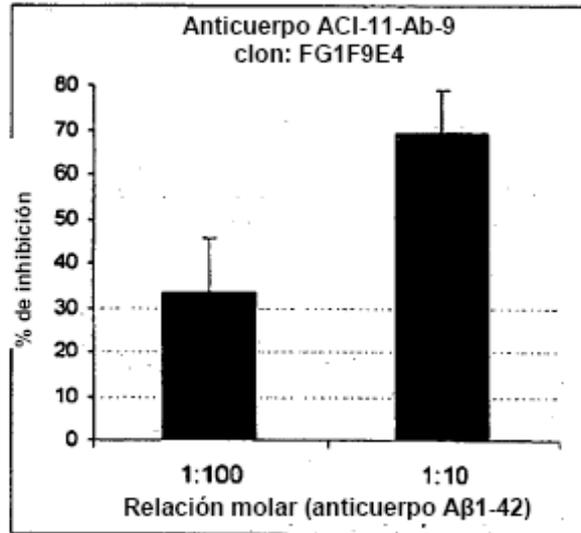


Figura 12

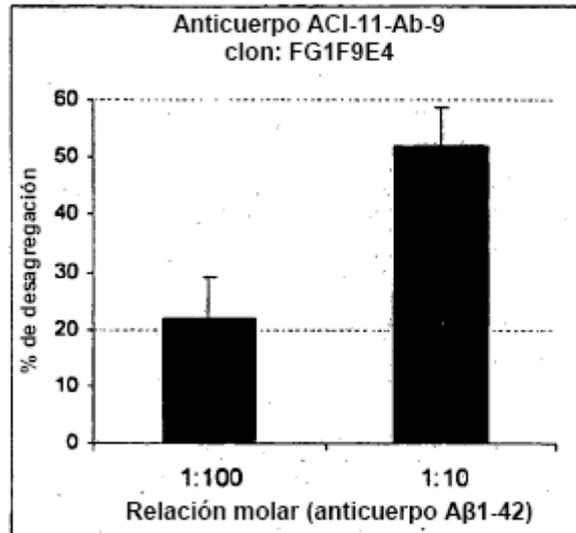


Figura 13

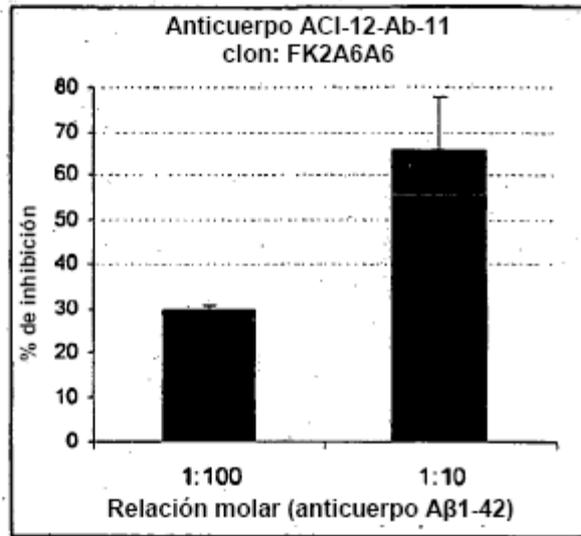


Figura 14

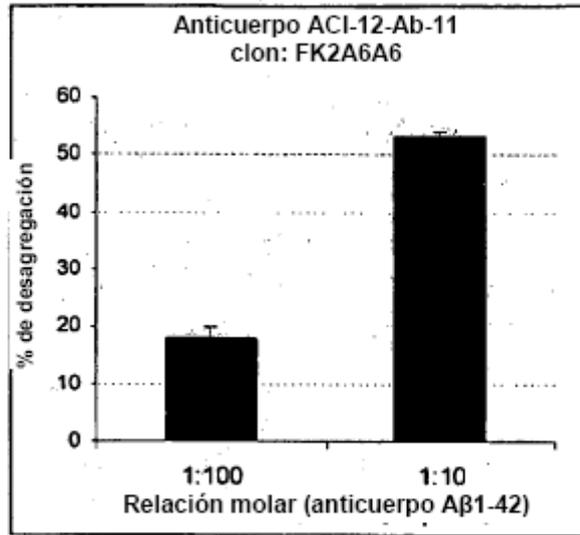


Figura 15

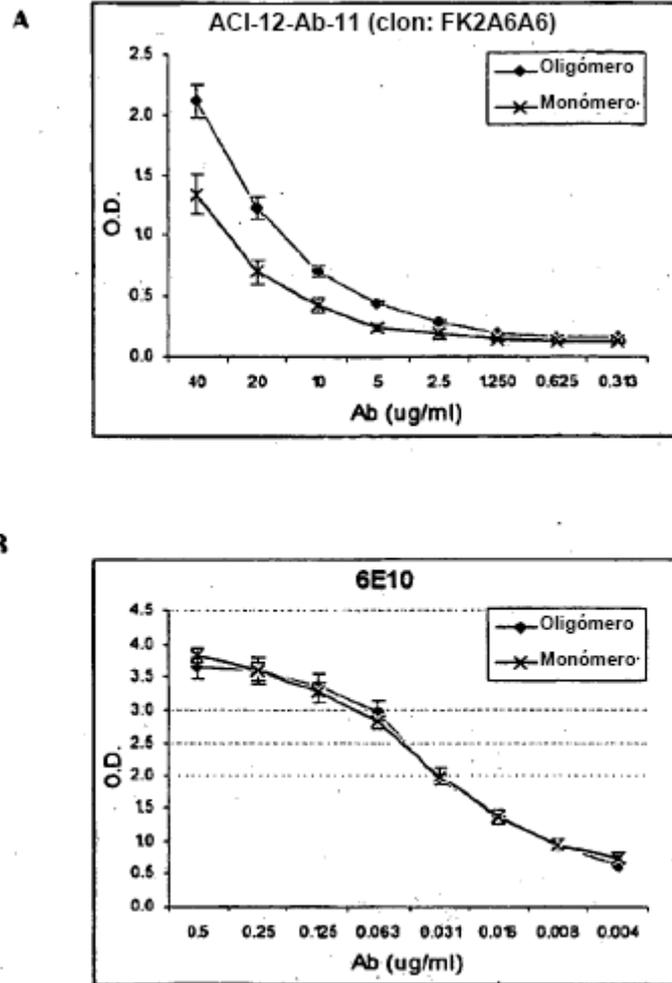


Figura 16

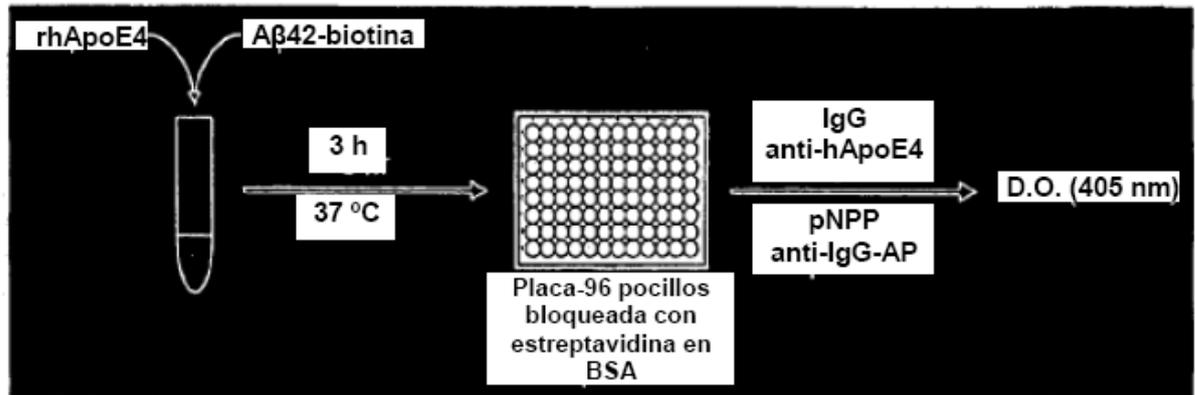


Figura 17

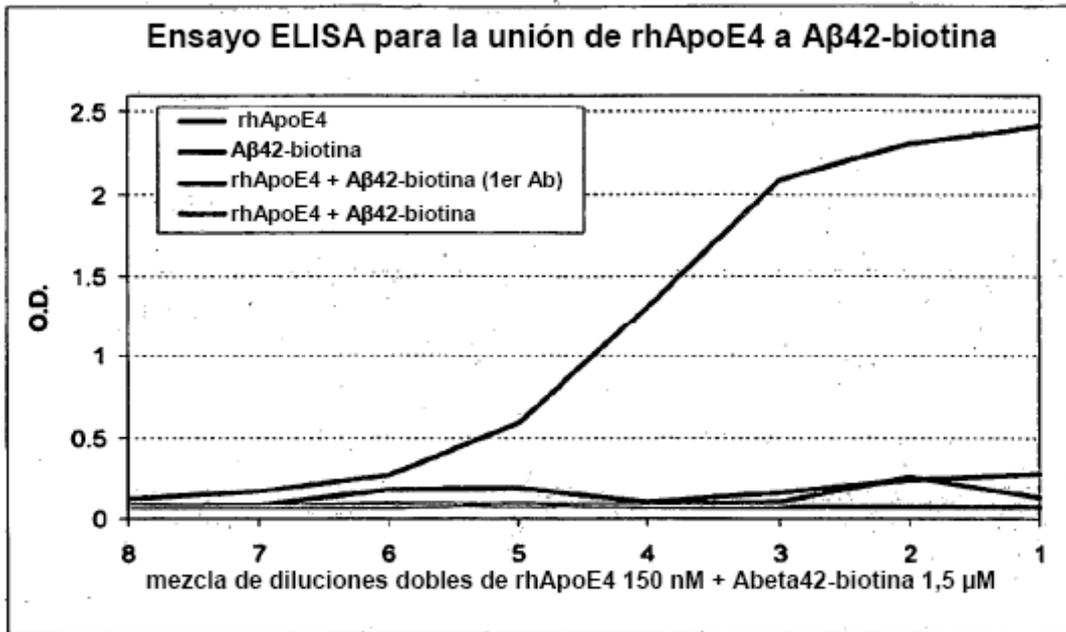


Figura 18

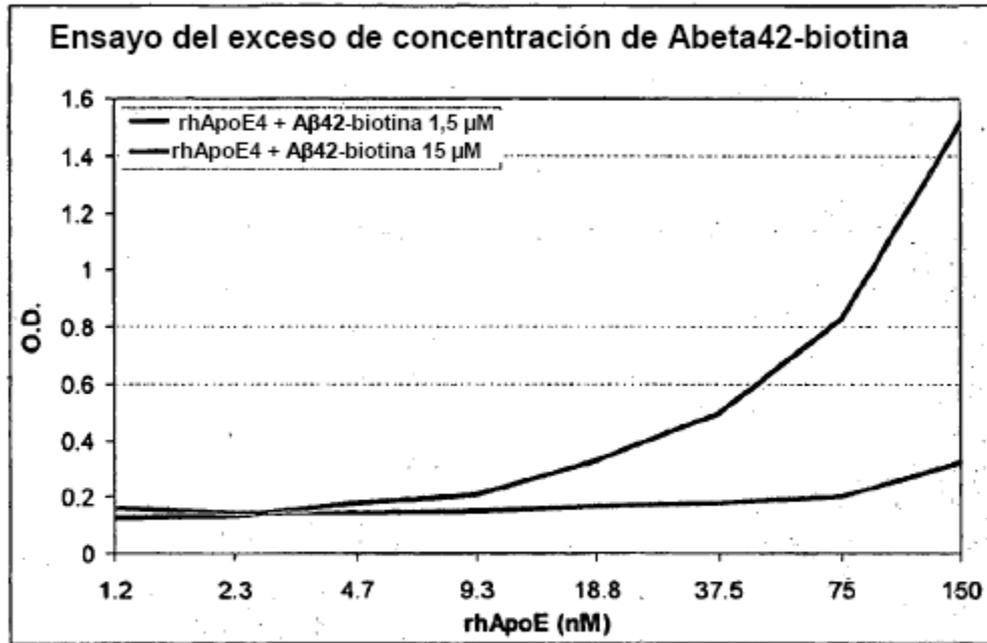


Figura 19

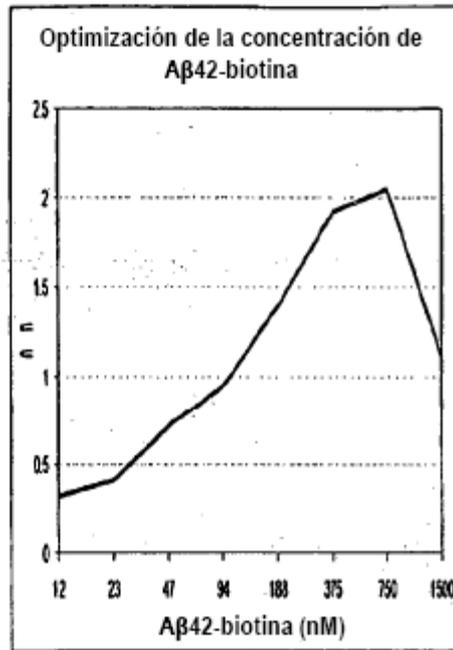


Figura 20