

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 389**

51 Int. Cl.:

A61K 31/401 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2008 E 08774491 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016 EP 2173341**

54 Título: **Combinaciones de agentes que disminuyen SAP y anticuerpos antiSAP**

30 Prioridad:

27.06.2007 GB 0712503

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

12.09.2016

73 Titular/es:

**PENTRAXIN THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
The Network Building, 97 Tottenham Court Road
London W1T 4TP, GB**

72 Inventor/es:

PEPYS, MARK BRIAN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 582 389 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

Combinaciones de agentes que disminuyen SAP y anticuerpos antiSAP

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente del Reino Unido con número de serie 0712503.2 presentada el 27 de Junio de 2007.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general al tratamiento y/o prevención de enfermedades que implican deposición de amiloide. En particular, la invención se refiere al tratamiento de amiloidosis.

Antecedentes de la invención

10 Amiloidosis es una enfermedad grave y normalmente letal causada por acumulación en los tejidos de fibras de proteína insolubles anormales conocidas como fibrillas amiloideas¹. Estas derivan de diferentes proteínas en diferentes formas de la enfermedad pero todas las fibrillas amiloideas comparten una estructura de núcleo β -cruzado y todas derivan del despliegue de proteínas precursoras normalmente solubles.

15 Además de las propias fibrillas amiloideas, los depósitos de amiloide siempre son ricos en proteoglicanos, algunos de los cuales están fuertemente unidos a las fibrillas². Una proteína de plasma no fibrilar normal, componente de proteína amiloidea sérica (SAP), también está siempre presente en depósitos de amiloide debido a su avidéz específica dependiente de calcio que se fija a todos los tipos de fibrillas amiloideas^{3, 4}.

20 SAP humana es una proteína constitutiva del plasma⁵, a una concentración de alrededor de 20-40 mg/l y con un total de aproximadamente 50-100 mg de SAP en el plasma combinado y en compartimentos extravasculares tanto de individuos normales como de pacientes con enfermedades distintas a amiloidosis⁶. Por el contrario, en pacientes con amiloides, SAP también está específicamente concentrado en los depósitos de amiloides y en un individuo con amiloidosis sistémica extendida puede haber tanto como 20.000 mg de SAP en el amiloide⁷.

25 Los depósitos de amiloide son extracelulares y causan enfermedad por acumulación progresiva hasta que dañan la estructura y por tanto la función de cualquier tejido que invaden¹. Muy raramente se da una respuesta inflamatoria o de "cuerpo extraño" a la deposición de amiloide, ni se da localmente en los tejidos o sugerida por marcadores sistemáticos de inflamación. En la llamada amiloidosis sistémica los depósitos pueden estar presentes en cualquier tejido u órgano en el cuerpo pero los depósitos nunca se ven en la materia cerebral en esas formas de enfermedad. Amiloidosis sistémica es la causa de aproximadamente 1 por 1000 de todas las muertes en países desarrollados, y siempre es letal a menos que la abundancia de la proteína que es la precursora de las fibrillas amiloideas se pueda reducir suficientemente y persistentemente. Esto es difícil de lograr en muchas formas de amiloidosis y puede ser imposible, y hay por lo tanto una necesidad médica mayor insatisfecha^{1, 8}. Las formas locales de amiloidosis, en la que los depósitos se confinan en un lugar anatómico único o un sistema de tejido u órgano único también se dan y pueden causar enfermedades graves^{1, 8}.

35 En amiloidosis el daño a la estructura y función de tejidos y órganos que conduce a enfermedad clínica está causado inequívocamente por la acumulación progresiva de los propios depósitos de amiloide. Sin embargo, hay otros estados en los que los depósitos de amiloide siempre están presentes, el más importante la enfermedad de Alzheimer y la diabetes mellitus tipo 2, en los que la contribución de la deposición de amiloide a la patogénesis de la enfermedad, específicamente pérdida de la función cognitiva e islotes pancreáticos respectivamente, no es conocido¹. Sin embargo, los depósitos de amiloide en cualquier otra parte del cuerpo está demostrado que son patógenos y es probable que los depósitos de amiloide cerebral de la enfermedad de Alzheimer y los depósitos de amiloide de islotes de diabetes tipo 2 también sean dañinos. Ya que el tratamiento que libera depósitos de amiloide en amiloidosis sistémica y local será realmente terapéutico¹, la eliminación de depósitos de amiloide en enfermedad de Alzheimer y diabetes tipo 2 también debería ser clínicamente beneficioso.

45 La amiloidosis sistémica de proteína amiloide A (AA) se induce fácilmente en ratones por inflamación crónica seguido de inyección intravenosa de un extracto de tejido amiloidítico que contiene fibrillas amiloideas, y que se conoce como factor de aumento de amiloide⁹. Este modelo se parece mucho a la amiloidosis AA humana con mayor deposición amiloide en el bazo e hígado. Con el periodo relativamente breve de inducción amiloide, por ejemplo como se usa en los experimentos descritos en la presente memoria, hay muy poca deposición de amiloide en otro lugar. La proteína AA que forma las fibrillas amiloideas deriva de su precursor circulante, proteína amiloide sérica A (SAA), que es una proteína en fase aguda. La concentración en el plasma de SAA aumenta rápidamente desde su valor traza normal de menos de 5 mg/l en respuesta a casi cualquier forma de inflamación y daño de tejido y puede persistir hasta valores de 1.000 mg/l, o incluso más, frente a estimulación persistente. Esta producción incrementada de SAA es una precondition necesaria para desarrollar la amiloidosis AA, tanto en humanos como en ratones, cuando la concentración de SAA cae a valor normal, la deposición amiloide para y los depósitos de amiloides que existen pueden retroceder¹⁰⁻¹². En ausencia de producción continuada de SAA, el retroceso espontáneo de depósitos de amiloide AA es universal en el modelo¹¹ de ratón pero avanza a una velocidad variable que se debe acomodar adecuadamente en el diseño de experimentos terapéuticos.

La solicitud de patente europea EP 0915088 describe compuestos que son inhibidores que compiten por la fijación de SAP a fibrillas amiloideas, así como métodos para su fabricación. Un compuesto preferente que se describe en EP 0915088 es ácido (R)-1-[6-[(R)-2-carboxi-pirrolidina-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico (CPHPC), sin embargo, se puede usar cualquier otro de los compuestos descritos allí, o cualquier otro compuesto que disminuya SAP circulante en la práctica de la presente invención. La solicitud de patente internacional WO 2004/099173, incorporada en la presente memoria como referencia, también describe compuestos palindrómicos que también se podrían usar en la práctica de la presente invención.

En SAP humano en ratones transgénicos, SAP humano está presente tanto en la circulación como en los depósitos de amiloides. El fármaco ácido (R)-1-[6-[(R)-2-carboxi-pirrolidina-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico (CPHPC) es específicamente ligado por SAP humano en un complejo compuesto de dos moléculas SAP pentaméricas nativas y 5 moléculas¹⁶ CPHPC. Este complejo es reconocido como anormal por el hígado y los hepatocitos lo toman muy rápidamente y lo degradan, de ese modo liberan eficazmente SAP de la circulación¹⁶. Las concentraciones de SAP en plasma permanecen muy bajas mientras se administra¹⁶ el fármaco. CPHPC se tolera extremadamente bien y ni el propio fármaco ni la disminución de SAP que produce han causado ningún efecto adverso¹⁶. Hay evidencia de beneficios clínicos del tratamiento con CPHPC en pacientes humanos con amiloidosis sistémica, especialmente con respecto a la conservación de la función renal en individuos con amiloidosis predominantemente renal.

Sin embargo, a pesar de estas observaciones prometedoras con CPHPC, la eficacia terapéutica rápida y óptima capaz de conservar la función del órgano y prolongar la vida en pacientes con amiloidosis sistémica requiere liberación significativa o completa de los depósitos de amiloides.

La solicitud de patente internacional WO 04/059318 describe métodos que afirman la mejora de la formación de fibrocitos que comprenden el suministro de composiciones que fijan SAP. Tales composiciones incluyen anticuerpos antiSAP y CPHPC. Sin embargo, WO 04/059318 describe el tratamiento de enfermedades asociadas con deposición amiloidea. Además, WO 04/059318 no describe la combinación específica de un anticuerpo antiSAP y CPHPC. Además, datos recientes indican que SAP no está asociado con inhibición de fibrocitos, y por tanto esa disminución de SAP no mejora la producción²⁰ de fibrocitos.

Por consiguiente, hay una necesidad en la técnica para mejorar la eficacia terapéutica en pacientes con amiloidosis sistémica para conservar la función del órgano y prolongar la vida.

La citación o identificación de cualquier documento en la presente solicitud no es una admisión de que tal documento está disponible como técnica previa de la presente invención.

Compendio de la invención

La presente invención se basa, al menos en parte, en el sorprendente descubrimiento de que ahora esto se puede lograr por tratamiento con un compuesto que disminuye eficazmente SAP humano de la circulación, y adicionalmente tratamiento con un anticuerpo específico para SAP.

En un primer aspecto, por lo tanto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una D-prolina de fórmula IA o IB que disminuye el componente P amiloide sérico (SAP) de la circulación, en combinación con un anticuerpo específico para SAP.

Preferentemente, el compuesto que disminuye SAP de la circulación es una agente SAP reticulante. Se ha encontrado que compuestos capaces de reticular una pluralidad de moléculas SAP en la circulación causan que el SAP se elimine rápidamente de la circulación; véase WO 03/013508. Ejemplos de tales compuestos incluyen ligandos multivalentes específicos para SAP, por ejemplo inhibidores multivalentes que compiten por la fijación de SAP. Los inhibidores que compiten por la fijación de SAP a amiloides se describen, por ejemplo en EP 0915088, cuya descripción se incorpora en la presente memoria como referencia; el uso de estas, y otras moléculas para disminuir SAP de la circulación se describe, por ejemplo, en WO 03/013508 y Pepys et al¹⁶, que también se incorporan como referencia en su totalidad. La solicitud de patente internacional WO 2004/099173, incorporada en la presente memoria como referencia, también describe compuestos palindrómicos que también se pueden usar en la práctica de la presente invención. Alternativamente, cualquier compuesto que de cómo resultado la disminución de SAP circulante se puede usar en la práctica de la presente invención.

El compuesto que disminuye SAP de la circulación es una D-prolina; preferentemente son D-prolinas de la fórmula:

En un ejemplo de la presente descripción, la composición está indicada para usar en el tratamiento de la enfermedad amiloide, y en consecuencia proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto que disminuye SAP y un anticuerpo específico para SAP para usar en el tratamiento de la enfermedad amiloide.

5 La enfermedad amiloide, según se refiere en la presente memoria, puede ser cualquier enfermedad que está asociada con la deposición extracelular de fibrillas amiloideas en los tejidos. Por ejemplo, la enfermedad amiloide es una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cualquier forma de amiloidosis sistémica (visceral) o local, diabetes tipo 2 y enfermedad de Alzheimer.

En una realización preferente, SAP es SAP humano, y referencias a anticuerpos antiSAP y compuestos que disminuyen SAP preferentemente son referencias a compuestos que se dirigen y/o disminuyen SAP humano.

10 En un ejemplo, se proporciona el uso de un compuesto que disminuye SAP en combinación con un anticuerpo específico para SAP en la fabricación de una composición para el tratamiento o profilaxis de la enfermedad amiloide.

15 El tratamiento con un compuesto que disminuye SAP como se define en la presente memoria libera casi todo el SAP humano circulante pero deja cantidades significativas de SAP asociado con los depósitos de amiloide en los tejidos. La disminución de SAP más grande a partir de depósitos de amiloide que se ha observado en pacientes humanos es de aproximadamente 90% después de meses de administración continua de CPHPC. Las infusiones intravenosas de anticuerpos contra SAP humano en pacientes cuyo SAP circulante ha disminuido permite a los anticuerpos localizar y fijarse específicamente a los depósitos de amiloide y fomentar su retroceso rápido y extenso, con el correspondiente beneficio clínico.

20 El tratamiento combinado de individuos con depósitos de amiloide sistémico establecidos usando el compuesto que disminuye SAP y anticuerpos antiSAP causa de manera segura y eficaz la rápida y casi completa liberación de los depósitos. Según el mejor conocimiento del inventor, tal liberación deliberada, rápida y dirigida de depósitos de amiloide establecidos nunca se había logrado antes en ningún paciente o modelo animal o mediante cualquier otro método.

25 Ventajosamente, ya que SAP está presente en todos los depósitos de amiloide de todos los tipos de enfermedades humanas asociadas con deposición de amiloide, incluyendo amiloidosis, enfermedad de Alzheimer y diabetes tipo 2, este planteamiento de tratamiento es aplicable a todos esos estados. Preferentemente, la invención es para el tratamiento de amiloidosis.

30 En un aspecto más, se proporciona un método para tratar a un sujeto que sufre o tiene riesgo de enfermedad amiloide, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una composición que comprende un compuesto que disminuye SAP y un anticuerpo específico para SAP.

El compuesto que disminuye SAP y el anticuerpo se pueden administrar simultáneamente, por ejemplo por separado o mezclado, o secuencialmente. En una realización, la pauta de tratamiento comprende administrar el compuesto que disminuye SAP solo, seguido de administración del anticuerpo. Opcionalmente, la administración del compuesto que disminuye SAP puede continuar durante la administración del anticuerpo.

35 En un tercer aspecto, se proporciona un kit para usar en el tratamiento de amiloidosis que comprende un compuesto que disminuye SAP y un anticuerpo específico para SAP. Los componentes del kit se pueden proporcionar de forma simultánea, separado simultáneo o administración secuencial, o una combinación de ellos.

40 En una realización preferente, el compuesto que disminuye SAP y el anticuerpo antiSAP se administran secuencialmente, de modo que el compuesto que disminuye SAP se administra antes del anticuerpo. La administración se puede llevar a cabo durante un periodo extenso de tiempo, por infusión, en dosis de bolus repetidas o de cualquier otra forma; o se puede emplear administración en dosis únicas, en la que el compuesto que disminuye SAP y/o el anticuerpo se administran solo una vez.

En una realización específica, el compuesto que disminuye SAP se administra durante un periodo prolongado, pero el anticuerpo se administra en una dosis única.

45 En un ejemplo de la presente descripción, se proporciona un método para identificar un agente que se puede usar en combinación con el compuesto que disminuye SAP para el tratamiento de amiloidosis, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto un animal no humano con expresión transgénica de SAP humano en el que se ha inducido amiloidosis sistémica AA, con el compuesto que disminuye SAP de ese modo disminuyendo el SAP circulante; (b) poner en contacto dicho animal no humano con uno o más agentes; y (c) determinar si dicho agente(s) fomenta retroceso significativo o completo de los depósitos de amiloide en el animal no humano, en la que un agente que
50 causa retroceso significativo de los depósitos de amiloide en el animal no humano es indicativo de un agente que se puede usar para el tratamiento de amiloidosis.

Preferentemente, el animal no humano transgénico es un ratón, es adecuado un ratón C57BL/6 con el gen SAP de ratón disminuido y que es transgénico para SAP humano.

Se señala que en esta descripción y particularmente en las reivindicaciones y/o párrafos, términos tales como “comprende”, “comprendido”, “que comprende” y similares pueden tener el significado que se atribuye en la ley de patentes de EEUU; por ej., pueden significar “incluye”, “incluido”, “que incluye”, y similar; y que términos tales como “que consiste esencialmente en” y “consiste esencialmente en” tienen el significado que se les asigna en la ley de patentes de EEUU, por ej., permiten elementos que no se citan explícitamente, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica previa o que afectan a una característica básica o nueva de la invención.

Estas y otras realizaciones se describen o son obvias a partir de y se abarcan, en la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de las figuras.

La siguiente descripción detallada, que se da a modo de ejemplo, pero no pretende limitar la invención solamente las realizaciones específicas descritas, se entenderá mejor junto con los dibujos que la acompañan, en los que:

Figura 1. Depósitos de amiloide en bazo de ratones después del tratamiento.

Se trataron tres grupos de SAP de ratón C57BL/6 muy parecidos de ratones knockout de línea transgénica pura de SAP humano con amiloidosis sistémica AA establecida, con la misma carga inicial de amiloide como muestra el cuerpo¹²⁵ completo de retención I-SAP, respectivamente con CPHPC y una dosis única de anticuerpo antihumano antiSAP de ovino, con CPHPC solo o con nada, y después se sacrificaron para estimar la carga de amiloide 28 días después. Cada punto representa el dato de amiloide de un único animal: 0, no se detecta amiloide; 10⁰, trazas mínimas; 10¹, trazas perifoliculares; 10², perifolicular general; 10³, perifolicular fuerte; 10⁴, perifolicular e interfolicular fuerte. En la prueba U de Mann Whitney para la diferencia entre la puntuación en los grupos, los valores P fueron los siguientes: grupo 1 vs grupo 2 P = 0,0000; grupo 1 vs grupo 3 P = 0,0000; grupo 2 vs grupo 3 P = 0,2635. No había diferencias en la puntuación de amiloide entre machos y hembras en cualquiera de los grupos (no se muestra).

Figura 2. Depósitos de amiloide en el hígado de ratones después del tratamiento.

Se trataron tres grupos de SAP de ratón C57BL/6 muy parecidos de ratones knockout de línea transgénica pura de SAP humano con amiloidosis sistémica AA establecida, con la misma carga inicial de amiloide como muestra el cuerpo¹²⁵ completo de retención I-SAP, respectivamente con CPHPC y una dosis única de anticuerpo antihumano antiSAP de ovino, con CPHPC solo o con nada, y después se sacrificaron para estimar la carga de amiloide 28 días después. Cada punto representa el dato de amiloide de un único animal: 0, no se detecta amiloide; 10⁰, trazas mínimas; 10¹, trazas en/alrededor de la mayoría de tractos portal; 10², depósitos significativos en/alrededor de todos los tractos portal; 10³, depósitos portal y parenquimales; 10⁴, depósitos portal y parenquimales masivos. En la prueba U de Mann Whitney para la diferencia entre la puntuación en los grupos, los valores P fueron los siguientes: grupo 1 vs grupo 2 P = 0,0000; grupo 1 vs grupo 3 P = 0,0000; grupo 2 vs grupo 3 P = 0,4740. No había diferencias en la puntuación de amiloide entre machos y hembras en cualquiera de los grupos (no se muestra).

Figura 3. Depósitos de amiloide teñidos con rojo Congo y vistos con luz cruzada polarizada.

Amiloide se identifica por su birrenfringencia verde patognomónica que se debe distinguir del blanco u otra birrenfringencia de brillo de colágeno en los tejidos y artefactos de cuerpos extraños, polvo, etc. Datos de amiloide en bazo: 7.722, cero (no amiloide presente); 7.723, 10⁰ (única mota presente); 7.482, 10¹; 6.865, 10²; 7.481, 10³; 8.272, 10⁴. Datos de amiloide en hígado: 6.980, cero (no birrenfringencia verde de amiloide, sólo birrenfringencia blanco-amarillo de colágeno); 7.482, 10¹; 8.028, 10²; 8.156, 10³; 8.282, 10⁴.

Figura 4. Tiempo que transcurre de infiltración celular y destrucción de amiloide después de la administración de anticuerpo antiSAP.

Secciones de bazo teñidas con rojo Congo y vistas con luz polarizada (izquierda) y teñidas con hematoxilina y eosina (derecha) de animales sacrificados en los tiempos que se muestran después del tratamiento de anticuerpos. En el día 1 (figura 4A) hay birrenfringencia verde abundante de amiloide en la zona marginal perifolicular típica pero al contrario que su apariencia acelular usual está densamente infiltrado predominantemente con células inflamatorias mononucleares. En el día 2 (figura 4B) los macrófagos que rodean el amiloide ya se están fusionando para formar células gigantes multinucleadas. En el día 4 (figura 4C) los depósitos de amiloide son claramente menos abundantes y se están fragmentando en asociación con actividad fagocita macrófaga intensa y numerosas células gigantes multinucleadas que rodean y envuelven las islas de amiloide. En el día 7 (figura 4D) mucha menos amiloide está presente y hay menos células gigantes pero aún contienen claramente fragmentos degradados de amiloide.

Figura 5. Electro micrografías de bazo tomadas el día 1 después del tratamiento de anticuerpo antiSAP.

Figura 5A, macrófagos (arriba derecha) rodean depósitos de amiloide fibrilar típicos (centro e izquierda); aumento x4.500. Figura 5B, granulocitos (mitad superior de la imagen) y depósito de amiloide (mitad inferior de la imagen); neutrófilos y macrófagos tienen citoplasma más oscuro; se ve un eosinófilo en el centro de la imagen; x3.000. Figura 5C, fragmento aumentado de un depósito de amiloide, granulocitos y macrófagos (también se ven en 5B); x7.000.

Figura 6. Identificación inmunoquímica de células y proteínas en anticuerpo antiSAP con liberación de depósitos de amiloide AA. Los dos paneles superiores muestran infiltración macrófaga intensa, identificada por tinción fuerte con anti-F4/80, en todos los depósitos de amiloide congofílicos en bazo e hígado. Tal tinción está completamente ausente en depósitos de amiloide de ratones no tratados con anticuerpo antiSAP (no se muestra). El tercer panel muestra la colocalización de amiloide AA, CD68 (un marcador de actividad fagocita endocitótica), y ratón C3. El panel inferior muestra macrófagos fagocitadamente activos que rodean y envuelven un fragmento de amiloide AA de ratón. Figura 6A es el día 1 de bazo con rojo Congo, izquierda; anti-F4/80, derecha; Figura 6B es el día 1 de hígado con rojo Congo, izquierda; anti-F4/80, derecha; Figura 6C es el día 4 de bazo con proteína anti AA, izquierda; anti-CD68, centro; anti-ratón C3, derecha; Figura 6D es imagen confocal del día 4 con anti-CD68, rojo; proteína antiAA, verde; contrateñido nuclear, azul.

Figura 7. Tinción inmunohistoquímica con anticuerpo anti SAP humano en bazo de un ratón de tipo salvaje amiloidótico después de inyección de SAP humano puro aislado.

Hay una tinción fuertemente positiva de todos los depósitos de amiloide en su distribución de zona marginal típica. Este enlace de SAP humano es el objetivo del anticuerpo antiSAP terapéutico de la presente invención.

15 Descripción detallada de la invención.

Amiloidosis.

Aspectos de la presente invención se refieren al tratamiento y/o prevención de enfermedades causadas por deposición de amiloide en los tejidos, tal enfermedad es conocida como amiloidosis.

Los términos “profilaxis”, “prevención”, “prevenir”, “que previene”, “supresión”, “suprimir” y “que suprime” como se usan en la presente memoria se refieren al transcurso de una acción (tal como administrar uno o más compuestos o composiciones farmacéuticas) iniciadas (p. ej. antes del comienzo de un síntoma clínico de amiloidosis) de modo que prevenga, suprima o reduzca, o bien temporalmente o permanentemente, el comienzo de una manifestación clínica de amiloidosis.

Los términos “tratamiento”, “tratar” y “que trata” como se usan en la presente memoria se refieren al transcurso de una acción (tal como administrar uno o más compuestos o composiciones farmacéuticas) iniciadas después del comienzo de manifestaciones clínicas de amiloidosis de modo que se elimine o reduzca, o bien temporalmente o permanentemente, una manifestación clínica o evolución de amiloidosis.

La amiloidosis es cualquier enfermedad caracterizada por la acumulación extracelular de amiloide en varios órganos y tejidos del cuerpo.

El término “amiloide” se refiere a depósitos extracelulares en los tejidos de fibras de proteína insoluble compuestas por fibrillas con morfología ultraestructural característica, una estructura de núcleo β -cruzado y la propiedad de tinción histoquímica patognomónica de fijarse al tinte rojo Congo de disolución alcohólica alcalina y después dar dicromismo rojo-verde cuando se ve con microscopio en luz polarizada cruzada fuerte. Se sabe que aproximadamente 25 proteínas diferentes no relacionadas forman fibrillas amiloides que se depositan en tejidos humanos y comparten todas esas propiedades típicas. Los depósitos de amiloide en la materia del cerebro, amiloide cerebral, difieren de alguna manera de los depósitos de amiloide de otras partes del cuerpo en que siempre son de tamaño focal y microscópico, y comúnmente se nombran como placas de amiloide.

Amiloidosis, que es una enfermedad causada directamente por deposición de amiloide en los tejidos, comprende tanto amiloidosis local, en la que los depósitos se confinan en una región anatómica y/o un tejido o sistema de órgano, como amiloidosis sistémica en la que los depósitos se pueden dar en cualquier órgano o tejido en el cuerpo, que incluye vasos sanguíneos y tejidos conectivos. La causa de amiloidosis o bien se puede adquirir o heredar. La amiloidosis adquirida aparece como una complicación de un estado médico presente, que puede en sí mismo ser adquirido o heredado. Por tanto amiloidosis sistémica reactiva, conocida como tipo proteína (AA) amiloidea A es una complicación de enfermedades inflamatorias activas crónicas tales como artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Crohn, infecciones crónicas y sepsis crónicas, y síndromes de fiebre periódica hereditaria tales como fiebre mediterránea familiar, síndrome de Muckle-Wells y síndrome CINCA. Amiloidosis relacionada con diálisis está causada por acumulación de β_2 -microglobulina como resultado de fallo renal terminal. Amiloidosis de cadena ligera (AL) de inmunoglobulina monoclonal es una complicación de mieloma múltiple o si no gammapatía monoclonal benigna (gammapatía monoclonal de significado incierto, MGUS). Amiloidosis adquirida de tipo transtiretina se puede dar sin una enfermedad precedente y simplemente es una complicación de edad madura. Amiloidosis hereditaria se causa por mutaciones en los genes por diversas proteínas que codifican la expresión de proteínas variables que tienen un incremento de propensión a formar fibrillas amiloides, y que incluye enfermedades causadas por transtiretina, apolipoproteína AI, gelsolina, lisozima, cistatina C y β -proteína amiloide. En libros de texto y literatura científica^{1, 8, 21} están disponibles descripciones completas de todas las formas diferentes de amiloidosis y las proteínas implicadas.

La deposición local de amiloide, confinada a un órgano o tejido, puede ser clínicamente silente o puede causar graves daños a tejidos y enfermedad. Por ejemplo, angiopatía amiloide cerebral en la que los depósitos de amiloide

vascular están compuestos de proteína A β , normalmente es un estado adquirido esporádico que aparece por razones que no se entienden en ausencia de cualquier otra patología, y es una causa mayor de hemorragia y derrame cerebral. Hay muchas enfermedades muy importantes y comunes, particularmente enfermedad de Alzheimer y diabetes tipo 2, en las que los depósitos de amiloide están siempre presentes pero en los que aún no se conocen los mecanismos precisos que respectivamente causan esas enfermedades. Aun así la deposición local de amiloide en el cerebro y vasos sanguíneos cerebrales en la enfermedad de Alzheimer, y en las islas pancreáticas en diabetes es muy probable que empeoren la patología y enfermedad. Por consiguiente, en una realización, la invención se refiere al tratamiento tanto de la enfermedad de Alzheimer como de diabetes tipo 2, en realidad a cualquier estado asociado con la presencia de depósitos de amiloide en los tejidos.

10 Muchas formas de encefalopatía espongiiforme transmisibles (enfermedades priónicas) están asociadas a depósitos de amiloide en el cerebro, y por lo tanto la presente invención se refiere a todos estos estados, que incluyen la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en humanos, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en sí misma, kuru y varias otras formas de enfermedad priónica humana, y también encefalopatía espongiiforme bovina, enfermedad debilitante crónica de mulo-ciervo y alce, y encefalopatía transmisible de visión.

15 Se contempla el tratamiento de animales, que incluye aves tales como pollo, patos, pavos y gansos, y, preferentemente, mamíferos, que incluyen humanos, así como perros, gatos, caballos, vacas, ovejas, cerdos, cerdos de guinea, ratones y ratas. En particular, el tratamiento de humanos es preferente.

En consecuencia, en un aspecto, se proporciona un compuesto que disminuye SAP en combinación con un anticuerpo específico para SAP para usar en el tratamiento de amiloidosis.

20 Anticuerpo antiSAP.

Las referencias en la presente memoria a anticuerpos antiSAP, anticuerpos que fijan SAP y anticuerpos específicos para SAP son coincidentes y se refieren a anticuerpos, o fragmentos que se fijan que derivan de anticuerpos, que se fijan a SAP de una manera específica y significativamente no hacen reacción cruzada con otras moléculas presentes en la circulación. En particular, los anticuerpos según la presente invención se dirigen a SAP que está unido a fibrillas amiloideas en los depósitos de amiloide de tejidos.

25 SAP es un pentámero con 5 promotores idénticos asociados de forma no covalente que cada uno tiene un lugar de fijación dependiente de calcio para ligandos sobre una cara de un plano, la cara de fijación (B), de la molécula. En ausencia de calcio, SAP humano forma dímeros decaméricos estables, probablemente vía interacciones cara-A a cara-A. En presencia de calcio, SAP humano aislado rápidamente se agrega y precipita, como resultado de formación molecular cristalina debido a la fijación al carboxilato expuesto del resto Glu167 sobre una molécula SAP por el lugar de fijación dependiente de calcio para ligandos de otra molécula SAP. Esta autoagregación de SAP se inhibe por otros ligandos a los que se fija SAP.

30 Un "anticuerpo" como se usa en la presente memoria incluye, pero no está limitado a, policlonal, monoclonal, recombinante, quimérico, región determinante de complementariedad (CDR) injertado, cadena simple, biespecífica, fragmentos FAB y fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab. Tales fragmentos incluyen fragmentos de anticuerpos antiSAP completos que retienen su actividad de fijación a SAP, Fv, F(ab'), fragmentos F(ab')₂, y fragmentos de anticuerpo F(v) así como proteínas de fusión y otras proteínas sintéticas que comprenden el lugar de fijación del antígeno del anticuerpo antiSAP. Además, los anticuerpos y sus fragmentos pueden ser anticuerpos humanizados, como se describe en más detalle a continuación.

40 Regiones variables y CDRs en una secuencia de anticuerpos se pueden identificar alineando las secuencias frente a una base de datos de regiones variables conocidas. Métodos para identificar estas regiones se describen en, por ejemplo, Kontermann and Dubel, eds., *Antibody Engineering*, Springer, New York, NY, 2001. Bases de datos de secuencias de anticuerpos se describen en, por ejemplo, VBASE2 en www.vbse2.org, según se describe en Retter et al., *Nucl. Acids Res.*, 33 (Database issue): D671-D674 (2005).

45 Anticuerpo antiSAP monoclonal producido en ratones está disponible comercialmente de diversas fuentes – tales como Sigma-Aldrich, Gillingham, Dorset UK (catálogo número A9191); US Biological (catálogo número S1003-3, 1003-4); Acris Antibodies (catálogo número BM225); Kamy Biomedical Co. (catálogo número MC-978); Cell Sciences (catálogo número MON 6006); Abnova Corp. (catálogo número H00000325-MO7).

50 El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se obtiene de un único clon de linfocito B que deriva de células de plasma que produce un anticuerpo homogéneo de una clase de cadena pesada y ligera y un epítipo específico.

55 Los anticuerpos monoclonales típicamente son muy específicos, y se dirigen contra un sitio antígeno único (epítipo), al contrario que anticuerpos convencionales en un antisuero inducido en un animal entero por inmunización con un antígeno particular. Tales anticuerpos convencionales derivan de clones muy diferentes de linfocitos B que reconocen o bien el mismo o diferentes epítipos del antígeno a inmunizar, y se conocen como anticuerpos policlonales. Además de su especificidad muy restringida, los anticuerpos monoclonales se producen rápidamente en forma pura sin contaminar por otras inmunoglobulinas, mientras que el aislamiento de anticuerpos específicos a

partir de antisuero policlonal requiere practicar procedimientos de inmunopurificación. Anticuerpos monoclonales se pueden preparar por el método del hibridoma (véase Kohler et al., Nature, 256:495-7, 1975), o por métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales se pueden incluso aislar a partir de bibliotecas de anticuerpos usando técnicas conocidas.

5 En el método del hibridoma, un animal huésped, típicamente un ratón, se inmuniza con el antígeno deseado para inducir la generación de clones de linfocito B que producen o son capaces de producir anticuerpos que se fijan específicamente al antígeno. Los linfocitos que se cosechan a partir del animal inmunizado después se fusionan *in vitro* con una línea continua de células de mieloma que crecen *in vitro* para formar las llamadas células del hibridoma. Después éstas se seleccionan creciendo en un medio de cultivo adecuado que permite la supervivencia
10 sólo de células fusionadas y no sin fusionar, células de mieloma parenteral. Ejemplos de células de mieloma incluyen, pero no son limitantes, mieloma humano y líneas de células de heteromieloma de ratón-humano que se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos.

El medio de cultivo del crecimiento de células de hibridoma se puede ensayar para anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. La especificidad de fijación de los anticuerpos producidos por las células se puede
15 determinar por varios métodos – tal como inmunoprecipitación o un ensayo de fijación *in vitro* – tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).

Después de identificar las células del hibridoma que producen los anticuerpos deseados, los clones se pueden subclonar limitando los procedimientos de dilución y cultivando por métodos estándar. Los anticuerpos monoclonales ocultos por los subclones se separan a partir del medio de cultivo o suero mediante procedimientos de purificación
20 de inmunoglobulinas conocidos – tales como proteína a sefrosa, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía con hidroxapatita o cromatografía de afinidad.

Anticuerpos policlonales pueden aumentar en animales por inyecciones subcutáneas múltiples, intramusculares o intraperitoneales del antígeno relevante y un adyuvante. Se puede obtener una respuesta de anticuerpo mejorada conjugando el antígeno relevante a una proteína que es inmunogénica a las especies a inmunizar. Los animales se
25 pueden inmunizar frente al antígeno, conjugados inmunogénicos, o derivados por combinación, p. ej., 100 µg o 5 µg de proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con el adyuvante completo de Freund e inyectando la disolución intradérmicamente en múltiples sitios. Después los animales se pueden inyectar con 1/5 de la cantidad original del péptido o conjugado en el adyuvante completo de Freund por inyección subcutánea en múltiples sitios. A los 7-14 días de la segunda inyección los animales se sangran y el suero se somete a ensayo de
30 título de anticuerpos.

Los anticuerpos antiSAP y fragmentos también incluyen variantes de anticuerpos antiSAP y sus fragmentos. Las variantes incluyen péptidos y polipéptidos que comprenden uno o más sustituciones, deleciones y/o adiciones de secuencias de aminoácidos que tienen la misma o significativamente la misma afinidad y especificidad del epítipo de fijación que el anticuerpo antiSAP o sus fragmentos.

35 Las deleciones, inserciones o sustituciones de restos de aminoácidos pueden producir un cambio silente y dar como resultado una sustancia funcionalmente equivalente. Las sustituciones deliberadas de aminoácidos se pueden hacer en base a similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofobicidad y/o y la característica anfipática de los restos. Por ejemplo, aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y aminoácidos con grupos polares sin carga que
40 tienen valores de hidrofobicidad similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina, y tirosina.

Se pueden hacer sustituciones conservativas, por ejemplo según la tabla siguiente. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferentemente en la misma línea en la tercera columna se pueden sustituir entre ellos:

ALIFÁTICO	No polar	G A P
		I L V
	Polar – sin carga	C S T M
		N Q
	Polar – cargado	D E
		K R
AROMÁTICO		H F W Y

Sustituciones homólogas (sustitución y reemplazo se usan ambos en la presente memoria para referirse al intercambio de un resto de aminoácido que existe, con un resto alternativo) se pueden dar p. ej. sustitución de igual a igual tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. También se pueden dar sustituciones no homólogas p. ej. de una clase de resto a otra o alternativamente que implica la inclusión de aminoácidos no naturales – tales como ornitina (de aquí en adelante referido como Z) ornitina ácido diaminobutírico (de aquí en adelante referido como B), ornitina norleucina (de aquí en adelante referido como O), pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

También se pueden hacer reemplazos mediante aminoácidos no naturales que incluyen; aminoácidos alfa* y alfa-disustituidos*; N-alquil aminoácidos*, ácido láctico*, derivados halogenuros de aminoácidos naturales tales como trifluortirosina*, p-Cl-fenilalanina*, p-Br-fenilalanina*, p-I-fenilalanina*, L-alil-glicina*, β-alanina*, ácido L-α-amino butírico*, ácido L-γ-amino butírico*, ácido L-α-amino isobutírico*, ácido L-ε-amino caproico*, ácido 7-amino heptanoico*, L-metionina sulfona**, L-norleucina*, N-norvalina*, p-nitro-L-fenilalanina*, L-hidroxi prolina#, L-tioprolina*, metil derivados de fenilalanina (fe) tales como 4-metil-fe*, pentametil-fe*, L-fe (4-amino)#, L-tir-(metil)*, L-fe (4-isopropil)*, L-tic (ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico), ácido L-diaminopropiónico# y L-fe- (4-bencil)*. La nota * se ha utilizado con el propósito de la discusión anterior (relacionada con sustitución homóloga o no homóloga), para indicar la naturaleza hidrófoba del derivado mientras # se ha utilizado para indicar la naturaleza hidrófila del derivado, ** indica características anfipáticas.

Por tanto, variantes pueden incluir péptidos y polipéptidos que comprenden uno o más sustituciones, deleciones y/o adiciones de secuencias de aminoácidos en los anticuerpos antiSAP y sus fragmentos en las que tales sustituciones, deleciones y/o adiciones no causan cambios significativos en afinidad y especificidad del epítipo de fijación. Por ejemplo, una variante de un anticuerpo antiSAP o su fragmento puede resultar de uno o más cambios de un anticuerpo antiSAP o su fragmento, donde el anticuerpo antiSAP o su fragmento cambiado tiene la misma o significativamente la misma afinidad y especificidad del epítipo de fijación que la secuencia inicial. Las variantes se pueden dar de manera natural, tales como variantes alélicas o empalmadas, o se pueden crear artificialmente. Se pueden preparar variantes a partir de las moléculas de ácidos nucleicos correspondientes que codifican dichas variantes. Variantes de anticuerpos antiSAP o sus fragmentos pueden tener cambios en cadenas de secuencias de aminoácidos ligera y/o pesada que se dan de manera natural o se introducen por ingeniería *in vitro* de secuencias nativas que usan técnicas de ADN recombinante. Variantes que se dan de manera natural incluyen variantes "somáticas" que se generan *in vivo* en la correspondiente línea inicial de secuencia de nucleótidos durante la generación de una respuesta de anticuerpo a un antígeno extraño.

También se pueden preparar variantes de anticuerpos que se fijan a SAP por técnicas de mutagénesis. Por ejemplo, se pueden introducir cambios en aminoácidos al azar a través de una región que codifica un anticuerpo y las variantes que resultan se pueden examinar la afinidad de fijación para SAP u otra propiedad. Alternativamente, se pueden introducir cambios en aminoácidos en regiones seleccionadas del anticuerpo antiSAP, tal como en la cadena CDRs ligera y/o pesada, y/o en las regiones marco, y los anticuerpos que resultan se pueden examinar la afinidad de fijación para SAP u otra propiedad. Los cambios en aminoácidos incluyen uno o más sustituciones de aminoácidos en un CDR, que va desde una diferencia de aminoácido único hasta la introducción de permutaciones múltiples de aminoácidos en un CDR dado. También están incluidas variantes generadas por inserción de aminoácidos para incrementar el tamaño de un CDR.

Se pueden proporcionar anticuerpos antiSAP o sus fragmentos con una región Fc modificada donde una región Fc que se da de manera natural se modifica para incrementar la vida media del anticuerpo o fragmento en un medio biológico, por ejemplo, la vida media del suero o un vida media medida mediante un ensayo *in vitro*.

Variantes también incluyen anticuerpo antiSAP o sus fragmentos que comprenden una región Fc modificada, donde la región Fc modificada comprende al menos una modificación de aminoácido en relación a la región Fc de tipo salvaje. La región Fc variante se puede diseñar, en relación a moléculas comparables, de modo que se fije a receptores FC con mayor o menor afinidad. Por ejemplo, los anticuerpos y sus fragmentos que fijan Fc pueden comprender una región Fc modificada. Región Fc se refiere a polipéptidos que se dan de manera natural o sintética homólogos al dominio C-terminal de IgG que se produce tras digestión de papaína de IgG. IgG Fc tiene un peso molecular de aproximadamente 50 kD. En los anticuerpos y fragmentos, se puede usar una región Fc completa, o solo una parte que mejore la vida media. Además, son aceptables muchas modificaciones en secuencias de aminoácidos, ya que la actividad original no es necesaria o deseada en todos los casos.

Los anticuerpos y sus fragmentos que se fijan a SAP también incluyen los derivados de los anticuerpos, fragmentos y secuencias descritos en la presente memoria. Derivados incluyen polipéptidos o péptidos, o variantes, fragmentos o sus derivados, que se han modificado químicamente. Ejemplos incluyen adjuntos covalentes de uno o más polímeros – tales como polímeros solubles en agua, hidratos de carbono unidos a N, o unidos a O, azúcares, fosfatos, y/o otra de tales moléculas. Los derivados se modifican de un modo que es diferente de péptidos o polipéptidos que se dan de manera natural o iniciales, o bien en el tipo o en la localización de las moléculas adjuntas. Derivados además incluyen deleción de uno o más grupos químicos que están presentes de manera natural sobre el péptido o polipéptido.

La presente invención también incluye anticuerpos que se fijan a SAP que incluyen dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa. Alternativamente, los anticuerpos que se fijan a SAP se pueden crear como anticuerpos de cadena única o anticuerpos “mini” que conservan actividad de fijación a SAP. Tales creaciones se pueden preparar mediante métodos conocidos en la técnica.

- 5 Métodos para crear versiones de ARN recombinante de las regiones que fijan antígeno de moléculas de anticuerpos que rodean la generación de anticuerpos monoclonales se contemplan para anticuerpos y sus fragmentos que fijan SAP. El ADN se clona en un sistema de expresión bacteriana. Un ejemplo de tal técnica usa un sistema vector lambda bacteriófago que tiene una secuencia líder que causa que la proteína Fab expresada migre al espacio periplásmico (entre la membrana celular bacteriana y la pared celular) o que se oculte. Rápidamente se puede
10 generar y examinar gran número de fragmentos Fab funcionales para los que fijan SAP. Tales agentes que fijan SAP (fragmentos SA con especificidad para un polipéptido SAP) se incluyen específicamente en los anticuerpos y sus fragmentos que fijan SAP.

- Los anticuerpos y sus fragmentos que fijan SAP pueden ser anticuerpos humanizados o de ingeniería humana. Como se usa en la presente memoria, “un anticuerpo humanizado”, o su fragmento que fija un antígeno, es un polipéptido recombinante que comprende una parte de un sitio que fija un antígeno a partir de un anticuerpo no humano y una parte de las regiones marco y/o constantes de un anticuerpo humano. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de ingeniería humana es un anticuerpo no humano (p. ej., ratón) que se ha sometido a ingeniería por modificación (p. ej., borrando, insertando o sustituyendo) aminoácidos en posiciones específicas de modo que se reduzca o elimine cualquier inmunogenicidad detectable del anticuerpo modificado en un humano.

- 20 Anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos quiméricos y anticuerpos CDR injertados. Anticuerpos quiméricos son anticuerpos que incluyen una región variable de anticuerpo no humano unida a una región constante humana. Por tanto, en anticuerpos quiméricos, la región variable es mayoritariamente no humana, y la región constante es humana. Anticuerpos quiméricos y métodos para hacerlos se describen en, por ejemplo, Proc. Natl. Sci. USA, 81:6841-6845 (1984). Aunque, pueden ser menos inmunogénicos que un anticuerpo monoclonal de ratón, la
25 administración de anticuerpos quiméricos se ha asociado con respuestas inmunes humanas (HAMA) a la parte no humana de los anticuerpos. Anticuerpos no humanos también se pueden producir por empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón con especificidad de fijar un antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada, tal como la capacidad de activar complemento humano y mediar en la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC).

- 30 Un ejemplo es la sustitución de una región Fc con la de un isotopo diferente.

- Anticuerpos CDR injertados son anticuerpos que incluyen el CDRs de un anticuerpo “donante” no humano unido a la región marco de un anticuerpo “recipiente” humano. Generalmente, anticuerpos CDR injertados incluyen mas secuencias de anticuerpos humanos que anticuerpos quiméricos porque incluyen ambas secuencias de región constante y secuencias de región (marco) variable a partir de anticuerpos humanos. Así, por ejemplo, un anticuerpo humanizado CDR injertado de la invención puede comprender una cadena pesada que comprende una secuencia
35 continua de aminoácidos (p. ej., aproximadamente 5 o más, 10 o más, o incluso 15 o más restos continuos de aminoácidos) a partir de la región marco de un anticuerpo humano (p. ej., FR-1, FR-2, o FR-3 de un anticuerpo humano) o, opcionalmente, la mayoría o toda la región marco de un anticuerpo humano. Anticuerpos CDR injertados y métodos para fabricarlos se describen en Nature, 321:522-525 (1986). Métodos que se pueden usar para producir anticuerpos humanizados también se describen en, por ejemplo, EEUU 5.721.367 y 6.180.377.

- “Anticuerpos revestidos” son anticuerpos no humanos o humanizados (p. ej., anticuerpos quiméricos o CDR injertados) que se han sometido a ingeniería para sustituir ciertos restos de aminoácidos expuestos a disolvente de modo que se reduce su inmunogenicidad o se mejoran sus funciones. Revestimiento de un anticuerpo quimérico puede comprender identificar restos expuesto disolvente en la región marco no humano de un anticuerpo quimérico y sustituir al menos uno de ellos con los correspondientes restos de superficie de una región marco humana. Revestimiento se puede lograr por cualquier técnica de ingeniería adecuada.

Más detalles de anticuerpos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de ingeniería humana, y métodos para su preparación se pueden encontrar en Antibody Engineering, Springer, New York, NY, 2001.

- 50 Ejemplos de anticuerpos humanizados o de ingeniería humana son anticuerpos IgG, IgM, IgE, IgA, y IgD. Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase (IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, etc) o isotopos y pueden comprender una cadena ligera kappa o lambda. Por ejemplo, un anticuerpo humano puede comprender una cadena pesada de IgG o fragmento definido, tal como al menos uno de los isotopos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Como un ejemplo más, los anticuerpos o sus fragmentos pueden comprender una cadena pesada IgG1 y una cadena ligera kappa o lambda.

- Los anticuerpos antiSAP o sus fragmentos pueden ser anticuerpos humanos – tales como anticuerpos que fijan los polipéptidos SAP y se codifican por secuencias de ácidos nucleicos que pueden ser variantes somáticas que se dan de manera natural, secuencia de ácidos nucleicos de línea germinal de inmunoglobulinas, y fragmentos, variantes sintéticos, derivados y sus fusiones. Tales anticuerpos se pueden producir por cualquier método conocido en la

técnica, tal como a través del uso de mamíferos transgénicos (tales como ratones transgénicos) en los que las inmunoglobulinas originales se han sustituido por genes V humanos en el cromosoma del mamífero.

También se pueden producir cromosomas humanos dirigidos a SAP usando animales transgénicos que no tienen producción de inmunoglobulina endógena y que se someten a ingeniería para contener loci para inmunoglobulina humana, según se describe en WO 98/24893 y WO 91/00906.

El uso de un animal transgénico descrito anteriormente, se puede producir una respuesta inmune a una molécula antigénica seleccionada, un anticuerpo que produce células se puede eliminar del animal y usar para producir hibridomas que ocultan anticuerpos monoclonales humanos. Los protocolos inmunización, adyuvantes, y similares se conocen en la técnica y se usan en inmunización de, por ejemplo, un ratón transgénico.

El desarrollo de técnicas para fabricar receptores de genes de anticuerpo humano recombinante y la colocación de los fragmentos de anticuerpo codificados sobre la superficie de bacteriófagos filamentosos, ha proporcionado un medio para fabricar anticuerpos humanos directamente. Los anticuerpos producidos por tecnología de fagos se producen como fragmentos que fijan antígenos – normalmente fragmentos Fv o Fab – en bacterias y por tanto carecen de funciones efectoras. Las funciones efectoras se pueden introducir mediante una o dos estrategias: los fragmentos por ingeniería pueden transformarse en o bien anticuerpos completos para expresión en células de mamíferos, o bien en fragmentos de anticuerpos biespecíficos con un segundo sitio de fijación capaz de desencadenar una función efectora.

Se pueden generar anticuerpos humanos a través de cribado *in vitro* de bibliotecas que exponen anticuerpos (J. Mol. Biol. (1991) 227:381). Se han descrito varias bibliotecas que exponen fagos que contienen anticuerpos y se pueden preparar rápidamente. Las bibliotecas pueden contener una diversidad de secuencias de anticuerpos, tales como fragmentos Fab, Fv, y scFv humano, que se pueden cribar con un objetivo adecuado. Las bibliotecas que exponen fagos pueden comprender péptidos o proteínas distintas de anticuerpos que se pueden cribar para identificar agentes capaces de fijación selectiva a SAP.

Los procesos que exhiben fagos imitan selección inmune a través de repertorios de anticuerpos sobre la superficie de bacteriófagos filamentosos, y posterior selección de fagos por su fijación a un antígeno elegido. Uno de tales métodos se describe en WO 99/10494. Se pueden aislar anticuerpos antiSAP por cribado de una biblioteca combinatorial de anticuerpo recombinante, preferentemente una biblioteca que exponga un fago scFv, que se prepara usando cADNs V_L y V_H humano preparado a partir de mRNA que deriva de linfocitos humanos. Las metodologías para preparar y cribar tales bibliotecas se conocen en la técnica. Comercialmente están disponibles kits para generar bibliotecas que exponen fagos.

Los anticuerpos y sus fragmentos que fijan SAP pueden comprender una o más partes que no fijan SAP pero que son responsables de otras funciones, tales como vida media circulante, efecto citotóxico directo, etiquetado detectable, o activación del complemento endógeno en cascada del recipiente o citotoxicidad celular endógena. Los anticuerpos o sus fragmentos pueden comprender todo o una parte de la región constante y puede ser cualquier isótopo, que incluye IgA (p. ej., IgA1, o IgA2), IgD, IgE, IgG (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), o IgM. Además, o en vez de, comprende una región constante, compuestos que fijan antígenos de la invención pueden incluir una etiqueta de epítipo, un epítipo receptor rescatado, una fracción marcada con propósitos de diagnóstico o purificación, o una fracción citotóxica tal como un radionucleido o toxina.

Por tanto el anticuerpo o su fragmento antiSAP se puede modificar para incrementar su vida media en suero, por ejemplo, añadiendo moléculas, tales como PEG u otros polímeros solubles en agua, que incluyen polímeros de polisacáridos para incrementar la vida media.

Por tanto los anticuerpos que fijan SAP y sus fragmentos pueden ser biespecíficos. Por ejemplo, anticuerpos biespecíficos pueden parecer anticuerpos sencillos (o fragmentos de anticuerpos) pero tienen dos sitios que fijan antígenos diferentes (regiones variables). Se pueden producir anticuerpos biespecíficos por varios métodos – tal como técnicas químicas, técnicas “polidoma” o técnicas de ADN recombinante. Anticuerpos biespecíficos pueden tener especificidad de fijación para al menos dos epítopos diferentes, al menos uno de los cuales es un epítipo de SAP.

Los anticuerpos y fragmentos que fijan SAP pueden ser heteroanticuerpos. Los heteroanticuerpos son dos o más anticuerpos, o fragmentos que fijan anticuerpos (Fab) unidos juntos, cada anticuerpo o fragmento tiene una especificidad diferente.

Como se usa en la presente memoria, el término “fragmentos de anticuerpo” se refiere a partes de un anticuerpo de longitud completa intacto – tal como un fijador de antígeno o región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única (p. ej., scFv); fragmentos de anticuerpos multiespecíficos tales como biespecíficos, triespecíficos, y anticuerpos multiespecíficos (p. ej., diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos); fijador de proteínas de dominio de fusión de inmunoglobulinas; anticuerpos camelizados; minicuerpos; anticuerpos quelantes recombinantes; tricuerpos o bicuerpos; intracuerpos; nanocuerpos; inmunofármacos modulares pequeños (SMIP); anticuerpos que contienen V_{HH}; y cualquier otro polipéptido que se forma a través de fragmentos de anticuerpos.

En el contexto de la presente invención, los términos anticuerpo antiSAP y anticuerpo que fija antiSAP incluyen fragmentos de anticuerpo que fijan SAP que comprenden cualquier parte de la secuencia de cadena pesada o ligera de los anticuerpos de longitud completa, y que fija SAP.

El término "fragmentos" como se usa en la presente memoria se refiere a fragmentos capaces de fijar SAP, por ejemplo cualquiera de al menos 3 aminoácidos contiguos (p. ej., al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más aminoácidos contiguos, por ejemplo de un CDR) o el anticuerpo implicado en fijar un antígeno, e incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv, o las regiones variables individuales de cadena ligera o pesada o sus porciones. Fragmentos que fijan SAP incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y scFv. Estos fragmentos carecen del fragmento Fc de un anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación, y pueden tener menos fijación por tejidos no específicos que un anticuerpo intacto. Estos fragmentos se pueden producir a partir de anticuerpos intactos usando métodos bien conocidos, por ejemplo por segmentación proteolítica con enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂).

Los anticuerpos y fragmentos que fijan SAP también incluyen fragmentos de anticuerpo de cadena única (scFv) que se fijan a SAP. Un scFv comprende una región variable de cadena pesada de anticuerpo (V_H) unida operativamente a una región variable de cadena ligera de anticuerpo (V_L) en la que la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera, juntas o individualmente, forman un sitio de fijación que fija SAP. Un scFv puede comprender una región V_H en el extremo amino terminal y una región V_L en el extremo carboxi terminal. Alternativamente, scFv puede comprender una región V_L en el extremo amino terminal y una región V_H en el extremo carboxi terminal. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, están codificados mediante genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un enlace sintético que permite crearlos como una cadena de proteína simple en que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv)). Un scFv opcionalmente además puede comprender un enlace polipéptido entre la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera.

Los anticuerpos y fragmentos que fijan SAP también comprenden fragmentos de anticuerpos de dominio (dAb) según se describe en *Nature* 341:544-546 (1989) que consiste en un dominio V_H.

Los anticuerpos y fragmentos que fijan SAP también incluyen anticuerpos de cadena pesada (HCAb). Estos anticuerpos aparentemente pueden formar regiones antígeno-anticuerpo usando sólo región variable de cadena pesada, en ella estos anticuerpos funcionales son dímeros solo de cadenas pesadas (referidos como "anticuerpos de cadena pesada" o "HCAbs"). Por consiguiente, anticuerpos y fragmentos que fijan SAP pueden ser anticuerpos de cadena pesada (HCAbs) que se fijan específicamente a SAP.

Los anticuerpos y fragmentos que fijan SAP también incluyen anticuerpos que son SMIPs o fijador de proteínas de dominio de fusión de inmunoglobulinas específico para proteína SAP. Esas construcciones son polipéptidos de cadena simple que comprenden dominios de fijación de antígenos fusionados a dominios de inmunoglobulinas necesarios para llevar a cabo funciones efectoras de anticuerpos (véase WO03/041600).

Los anticuerpos y fragmentos que fijan SAP también incluyen diacuerpos. Estos son anticuerpos bivalentes en los que los dominios V_H y V_L se expresan sobre una cadena de polipéptidos simple, pero usando un enlace que es demasiado corto para permitir emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Esto fuerza a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y por tanto crea dos sitios de fijación a antígenos (véase, por ejemplo, WO 93/11161). Los diacuerpos pueden ser biespecíficos y monoespecíficos.

Los anticuerpos y sus fragmentos que fijan SAP también incluyen inmunoadesinas. Se pueden incorporar uno o más CDRs en la molécula o bien de manera covalente o bien no covalente para hacer una inmunoadesina. Una inmunoadesina puede incorporar el CDR(s) como parte de una cadena de polipéptido más larga, puede unir de manera covalente el CDR(s) a otra cadena de polipéptido, o puede incorporar el CDR(s) de manera no covalente. El CDRs permite que la inmunoadesina se fije específicamente a SAP.

Los anticuerpos y sus fragmentos que fijan SAP también incluyen anticuerpos imitadores que comprenden una o más partes que fijan SAP construida sobre andamiaje orgánico o molecular (tal como una proteína o hidrato de carbono de andamiaje). Las proteínas que tienen estructura tridimensional relativamente definida, comúnmente referidas como proteínas de andamiaje, se pueden usar como reactivos para el diseño de anticuerpos imitadores. Estos andamiajes típicamente contienen una o más regiones que están dispuestas en variaciones de secuencias específicas o aleatorias, y tal aleatoriedad de secuencia a menudo se lleva a cabo para producir bibliotecas de proteínas a partir de las que se pueden seleccionar los productos deseados. Por ejemplo, un anticuerpo imitador puede comprender un polipéptido de fijación de tipo no inmunoglobulina quimérico que tiene un dominio de tipo inmunoglobulina que contiene un andamiaje que tiene dos o más bucles expuestos a disolvente que contiene un CDR diferente de un anticuerpo parenteral insertado en cada uno de los bucles y muestran actividad de fijación selectiva hacia un enlace ligante por el anticuerpo parenteral. Las proteínas no inmunoglobulinas de andamiaje se han propuesto para obtener proteínas con propiedades de fijación novedosas.

Los anticuerpos o sus fragmentos de anticuerpo antiSAP típicamente se fijan a SAP humano con alta afinidad (p. ej., según se determina con BIACORE), tal como por ejemplo con una constante de disociación de fijación de equilibrio

y 1,4-fenilen, donde los grupos fenilen opcionalmente se sustituyen por sustituyentes 1-4, seleccionados de halógenos, alquilo más corto, alcoxi más corto, hidroxilo, carboxi, -COO-alquilo más corto, nitrilo, 5-tetrazol, (ácido 2-carboxílico pirrolidona-1-il)-2-oxo-etoxi, N-hidroxicarbamimidil, 5-oxo[1,2,3,5]oxatiadiazolil, 5-tioxo[1,2,4]oxodiazolil y 5-terc-butilsulfanil-[1,2,4]oxodiazolil;

5 X' es $-(CH_2)_n-$; $-(CH_2)_nCH(R^2)-$; $-(CH_2)_nOCH_2-$; $-NHCH_2-$; benzil, $-CH=C(R^2)-$; $CH(OH)CH_2$; o tiazol-2,5-diil;

R² es alquil inferior, alcoxi inferior o bencil y

n es 0-3,

o una sal o su mono o diéster farmacéuticamente aceptable. El compuesto que disminuye SAP de la circulación, según la reivindicación 1 se refiere de aquí en adelante como un compuesto que disminuye SAP.

10 En una realización, D-prolina de la fórmula IA anterior se puede escribir como ligando-enlace-ligando, donde el medio de X-Y-X' de IA formales forma el enlace. Está en el ámbito de la presente invención que el enlace (X-Y-X') puede ser de 4 a 20 átomos de carbono lineales en longitud, que incluye de 4-15 átomos de carbono lineales, 5-10 átomos de carbono lineales, y 6-8 átomos de carbono lineales en longitud. El enlace puede ser una cadena recta o ramificada, o opcionalmente puede formar una o más estructuras de anillo, con la condición de que al menos 4
15 átomos de carbono de cadena lineal o recta estén presentes en el enlace. En una realización, al menos uno de los átomos de C de la cadena lineal o recta opcionalmente se puede sustituir por al menos un heteroátomo seleccionado de N, O, o S, ventajosamente O o S, preferentemente O.

Por tanto, un "enlace opcionalmente sustituido" puede tener una o más sustituciones que llevan a ramificar y/o una o más sustituciones de átomo(s) de carbono de la cadena de átomos de carbono linear o recta de la unión, p. ej., la
20 unión puede ser un éter o un éter sustituido.

Composiciones farmacéuticas.

Adecuadamente, el compuesto que disminuye SAP como se describe en la presente memoria y el anticuerpo o su fragmento antiSAP humano descritos en la presente memoria se administrarán como composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades terapéuticamente eficaces.

25 Como se usa en la presente memoria el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de compuesto que disminuye SAP y el anticuerpo o su fragmento antiSAP humano o como una parte de una composición farmacéutica, que es capaz de tener cualquier efecto detectable, positivo sobre cualquier síntoma, aspecto o característica de amiloidosis cuando se administra a un paciente (p. ej., como una o más dosis).

30 La combinación de un compuesto que disminuye SAP y el anticuerpo o su fragmento antiSAP se puede administrar separadamente, simultáneamente, secuencialmente, concurrentemente o consecutivamente, o la combinación puede estar presente en la forma de una formulación farmacéutica.

Por tanto, la presente invención también implica el compuesto que disminuye SAP y el anticuerpo o su fragmento antiSAP como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento terapéutico o profiláctico de amiloidosis.

35 La composición farmacéutica que comprende el compuesto que disminuye SAP se puede administrar separadamente de los anticuerpos o sus fragmentos antiSAP, y tal administración por separado se puede llevar a cabo en el mismo momento o en diferentes momentos en el tiempo, tal como el mismo o diferentes días. Si la combinación del compuesto que disminuye SAP y el anticuerpo o su fragmento antiSAP se administran secuencialmente entonces el compuesto que disminuye SAP se administra primero de modo que el tratamiento con
40 compuesto que disminuye SAP puede eliminar casi todo el SAP circulante. Ya que esto deja cantidades significativas de SAP asociado con los depósitos de amiloide en los tejidos la administración secuencial del anticuerpo o su fragmento antiSAP permite la localización y fijación específica de los depósitos de amiloide para fomentar su disminución rápida y extensa. Adecuadamente, el anticuerpo o su fragmento antiSAP se puede administrar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20 o 25 o más días después del tratamiento(s) con el compuesto que
45 disminuye SAP.

La administración secuencial puede implicar dos o más tratamientos secuenciales con compuesto que disminuye SAP seguido de dos o más tratamientos secuenciales con el anticuerpo o su fragmento antiSAP.

La administración secuencial puede implicar un tratamiento con compuesto que disminuye SAP seguido de un tratamiento secuencial con el anticuerpo o su fragmento antiSAP, que después se repite una o más veces.

50 La dosis secuencial/posterior puede ser una cantidad que es más que la dosis inicial/previa o menos que la dosis inicial/previa.

La administración de una dosis inicial de compuesto que disminuye SAP y/o el anticuerpo o su fragmento antiSAP puede seguir por la administración de una o más dosis (p. ej., posteriores) secuenciales del compuesto que

disminuye SAP y/o el anticuerpo o su fragmento antiSAP, y en la que dicha una o más dosis secuenciales pueden estar en una cantidad que es aproximadamente la misma o menor que la dosis inicial.

5 La administración de una dosis inicial del compuesto que disminuye SAP y/o el anticuerpo o su fragmento antiSAP puede seguir por la administración de uno o más dosis (p. ej. posteriores) secuenciales, y en la que al menos una de las dosis posteriores está en una cantidad que es más que la dosis inicial.

10 Por consiguiente, la administración puede usar un programa predeterminado o rutinario para la administración, por tanto da como resultado un periodo de tiempo diseñado predeterminado entre administración de dosis. El programa puede incluir periodos de tiempo que son idénticos o que difieren en longitud, siempre que el programa esté predeterminado. Cualquier combinación particular estaría cubierta por el programa siempre que se determine antes del momento que el programa apropiado implique administración en un cierto día.

15 Las combinaciones farmacéuticas pueden ser para uso humano o animal en medicina humana y veterinaria y típicamente comprenderá cualquiera de una o más compuesto farmacéuticamente aceptables – tales como vehículos, excipientes, diluyentes, antioxidantes, conservantes, colorantes, saborizantes y agentes que disuelven, agentes de suspensión, disolventes, rellenanates, agentes de volumen, tampones, vehículos de liberación, agentes tonificantes, codisolventes, agentes humectantes, agentes complejantes, agentes tampón, antimicrobianos y surfactantes. Compuestos aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985).

20 Las composiciones farmacéuticas pueden incluir antioxidantes – tal como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas – tal como albúmina sérica y/o gelatina; polímeros hidrófilos – tal como polivinilpirrolidona; agentes quelantes – tal como EDTA; azúcares alcoholes – tal como manitol y/o sorbitol; aminoácidos; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono; contraiones que forman sales – tal como sodio; y/o surfactantes no iónicos – tal como Tween, plurónicos, o polietileno glicol (PEG). También a modo de ejemplo, agentes adecuados que mejoran la tonicidad incluyen haluros de metales alcalinos (preferentemente cloruro de sodio o potasio), manitol, sorbitol, y similar. Conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio, timerosal, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina fenetil alcohol y ácido sórbico. Codisolventes adecuados incluyen glicina y/o propilén glicol. Agentes complejantes adecuados incluyen cafeína y/o polivinilpirrolidona. Surfactantes o agentes humectantes adecuados incluyen ésteres de sorbitán y/o polisorbatos. Los tampones pueden ser tampones convencionales tal como citrato, acetato, borato, bicarbonato, o tri-HCl. Tampones de acetato pueden tener aproximadamente pH 4-5,5, y tampones Tris puede tener aproximadamente pH 7-8,5. Agentes farmacéuticos adicionales se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990.

Los vehículos, excipientes o diluyentes, etc, farmacéuticos se pueden seleccionar en base a la vía de administración que se pretende y a la práctica farmacéutica estándar.

35 Los requerimientos de la composición/formulación pueden diferir dependiendo de los diferentes sistemas de liberación.

40 La composición puede estar en forma líquida, liofilizada o deshidratado por congelación y puede incluir uno o más lioprotectores, excipientes, surfactantes, aditivos estructurales de alto peso molecular y/o agentes de volumen. En una realización, se incluye un lioprotector, que es un azúcar no reductor – tal como sacarosa y/o lactosa. La cantidad de lioprotector generalmente incluida es tal que, tal la reconstitución, la formulación que resulta típicamente será isotónica. Se puede incluir un surfactante – tal como surfactantes no iónicos o surfactantes iónicos. Cantidades de ejemplo de surfactantes que pueden estar presente en la formulación preliofilizada son de aproximadamente 0,001-0,5%. Se pueden incluir aditivos estructurales de alto peso molecular (p. ej., rellenanates, aglutinantes). Concentraciones de ejemplo de aditivos estructurales de alto peso molecular son desde 0,1% a 10% en peso. En otras realizaciones, se puede incluir un agente de volumen (p. ej., manitol, glicina).

45 Las composiciones pueden ser adecuadas para administración parenteral. Las composiciones pueden ser adecuadas para inyección o infusión en un animal mediante cualquier vía disponible por la persona experta, tal como vía intraarticular, subcutáneo, intravenoso, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intralesional, oral e inhalada. Una formulación típicamente parenteral será una disolución acuosa estéril, sin pirógenos, isotónica, que opcionalmente contiene conservantes aceptables farmacéuticamente.

50 Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para liberación controlada o prolongada de un modo que proporcione concentración local de la liberación prolongada del producto (p. ej., efecto bolo, almacén) y/o incremento de la estabilidad o vida media en un ambiente local particular. En ciertas realizaciones tales composiciones pueden incluir una cantidad significativamente mayor del compuesto que disminuye SAP y/o el anticuerpo o su fragmento antiSAP en el depósito inicial, mientras que la cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento realmente liberada y disponible en cualquier momento es una cantidad mucho más baja que el depósito inicial. Las composiciones pueden incluir la formulación con preparaciones en partículas de compuestos poliméricos así como agentes tales como matriz biodegradable, microesferas inyectables, partículas microcapsulares, microcápsulas, píldoras de

partículas biocorrosibles, liposomas, y aparatos que liberan implantables que proporcionan liberación controlada o prolongada del agente activo que se puede liberar como una inyección de almacén.

Se conocen técnicas para formular tales medios de liberación prolongada – o controlada- y se han desarrollado una variedad de polímeros y se usan para el lanzamiento y liberación de fármacos. Hidrogeles de polímeros, incluyendo los que se forman por complejo de un polímero enantiomérico, o segmentos de polipéptido y hidrogeles con propiedades de percibir temperatura o pH, pueden ser deseables para proporcionar efecto de almacén de fármaco debido a las condiciones suaves y acuosas implicadas en mantener los agentes proteicos bioactivos (p. ej., anticuerpos).

Polímeros bioadhesivos también se pueden usar en las composiciones. Los bioadhesivos son materiales que se dan de manera sintética o natural capaces de adherirse a sustratos biológicos durante periodos de tiempo prolongados. Por ejemplo, Carbopol y policarbofil son ambos derivados sintéticos reticulados de poli (ácido acrílico).

La composición farmacéutica se puede formular por inhalación, tal como por ejemplo, como un polvo seco. Las disoluciones por inhalación también se pueden formular en un propelente licuado para liberación por aerosol. En aún otra formulación, las disoluciones se pueden nebulizar. Composiciones farmacéuticas adicionales para administración pulmonar incluyen, las descritas, por ejemplo, en la publicación de solicitud de PCT WO 94/20069, que describe liberación pulmonar de proteínas químicamente modificadas. Para liberación pulmonar, el tamaño de partícula debería ser adecuado para liberar en el pulmón distal. Por ejemplo, el tamaño de partícula puede ser de 1 µm a 5 µm; sin embargo, se pueden usar partículas más grandes, por ejemplo, si cada partícula es bastante porosa.

Otra preparación puede implicar una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de tabletas. Por disolución de las tabletas en agua estéril, u otro vehículo apropiado, se pueden preparar disoluciones en forma de dosis única. Excipientes adecuados incluyen, pero no son limitantes, diluyentes inertes, tales como carbonato cálcico, carbonato sódico o bicarbonato, lactosa o fosfato cálcico; o agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina, o acacia; o agentes lubricantes tales como estearato magnésico, ácido esteárico, o talco.

Ciertas formulaciones se pueden administrar oralmente. Formulaciones administradas de este modo se pueden formular con o sin esos vehículos que habitualmente se usan en las composiciones de formas de fármacos sólidos tales como tabletas y cápsulas. Por ejemplo, una cápsula se puede diseñar para liberar la parte activa de la formulación en el punto en el tracto gastrointestinal cuando se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación presistémica. Se pueden incluir agentes adicionales para facilitar la absorción de un agente aglutinante específico. También se pueden emplear diluyentes, saborizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes desintegrantes de tabletas, y aglutinantes.

Las composiciones farmacéuticas usadas en la invención pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz o una cantidad profilácticamente eficaz del compuesto que disminuye SAP y/o el anticuerpo o su fragmento antiSAP.

“Una cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o parte de anticuerpo puede variar según factores tales como estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o parte de anticuerpo de provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es la que cualquier efecto tóxico o perjudicial se compensa por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

“Una cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado.

Una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de la composición farmacéutica dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos – tales como la indicación por la que se usa la composición, la vía de administración, y el estado del sujeto. Composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz para tratar amiloidosis. Una “cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz” es esa cantidad que puede tratar o prevenir uno o más síntomas de amiloidosis en un sujeto.

La composición farmacéutica descrita en la presente memoria también se puede usar en combinación con tratamientos convencionales para amiloidosis.

Sales farmacéuticas.

El compuesto que disminuye SAP se puede administrar en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

Sales farmacéuticamente aceptables son conocidas por los expertos en la técnica, y por ejemplo, incluidos los que se mencionan en Berge et al, en *J. Pharm, Sci*, 66, 1-19 (1977). Sales de adición de ácido adecuadas se forman a partir de ácidos que forman sales no tóxicas y que incluyen las sales de hidrocloreuro, hidrobromuro, hidrioduro, nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, hidrogenfosfato, acetato, trifluoroacetato, gluconato, lactato, salicilato, citrato, tartrato, ascorbato, succinato, maleato, fumarato, gluconato, formato, benzoato, metanosulfonato, etanosulfonato, benzenosulfonato y p-toluenosulfonato.

Cuando están presentes uno o más restos ácidos, sales de adición de bases adecuadas farmacéuticamente aceptables se pueden formar a partir de bases que forman bases no tóxicas e incluyen sales de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio, zinc, y aminas farmacéuticamente activas tal como dietalonamina.

5 Una sal farmacéuticamente aceptable se puede preparar rápidamente mezclando disoluciones del compuesto que disminuye SAP y el ácido o base deseado, según convenga. La sal puede precipitar a partir de una disolución y se puede recolectar por filtración o se puede recuperar por filtración del disolvente.

Administración.

10 Los componentes se pueden administrar solos pero generalmente se administrarán como una composición farmacéutica – p. ej., cuando los componentes están como una mezcla con el excipiente farmacéutico, diluyente o vehículo adecuado seleccionado en relación con la vía de administración que se pretende y práctica farmacéutica estándar.

Por ejemplo, los componentes se pueden administrar en la forma de tabletas, cápsulas, óvulos, elixires, disoluciones o suspensiones, que pueden contener agentes edulcorantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retrasada, modificada, sostenida, pulsada o controlada.

15 Si el fármaco es una tableta, entonces la tableta puede contener excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato sódico, carbonato cálcico, fosfato dibásico de calcio y glicina, desintegrantes tales como almidón (preferentemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato de almidón sódico, croscarmelosa de sodio y ciertos silicatos complejos, y aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilclulosa (HPC), sacarosa, gelatina y acacia. Además, se pueden incluir agentes lubricantes tal como estearato magnésico, ácido esteárico, gliceril behenato y talco.

25 También se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como rellenos en cápsulas de gelatina. Excipientes preferentes en este sentido incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de leche o polietileno glicol de alto peso molecular. Para suspensiones acuosas y/o elixires, el agente se puede combinar con diversos edulcorantes y agentes saborizantes, materias colorantes o tintes, con agentes emulsionantes o de suspensión y con diluyentes como agua, etanol, propilén glicol y glicerina, y sus combinaciones.

30 Las vías de administración (liberación) pueden incluir, pero no están limitadas, uno o más oral (p. ej., tableta, cápsula, o como una disolución que se puede ingerir), topical, mucosal (p. ej., como un spray nasal o aerosol por inhalación), nasal, parenteral (p. ej., mediante una forma inyectable), gastrointestinal, intraperitoneal, intramuscular, intravenoso, intrauterina, intraocular, intradermal, intracraneal, intratraqueal, intravaginal, intracerebroventricular, intracerebral, subcutáneo, oftálmico (que incluye intravitreal o intracamerar) transdermal, rectal, bucal, vaginal, epidural o sublingual.

En una realización específica, el modo de administración es infusión intravenosa.

Niveles de dosis.

35 Formulaciones farmacéuticas adecuadas y/o preferentes se pueden determinar en vista de la presente descripción y conocimiento general de tecnología de formulación, dependiendo de la vía de administración que se pretende, formato de liberación, y dosis deseada.

Típicamente un físico determinará la dosis real que será más adecuada para un sujeto individual.

40 El nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación para cualquier paciente particular puede variar y dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y longitud de acción de tal compuesto, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, modo y tiempo de administración, grado de excreción, combinación de fármacos, la gravedad del estado particular, y la terapia particular a la que se somete. Por ejemplo, el compuesto que disminuye SAP se puede administrar en una dosis entre 2 mg/kg y 0,1 mg/kg, dependiendo de su actividad.

45 El anticuerpo o su fragmento antiSAP se puede administrar como una dosis fija, independiente de la dosis por proporción del peso del sujeto. El anticuerpo o su fragmento se puede administrar en una o más dosis separadas, simultáneas o secuenciales de 3.000 mg o menos de anticuerpo o su fragmento, 2.700 mg o menos de anticuerpo o su fragmento, 2.500 mg o menos de anticuerpo o su fragmento, 2.200 mg o menos de anticuerpo o su fragmento, o 2.100 mg o menos de anticuerpo o su fragmento, 1.700 mg o menos de anticuerpo o su fragmento, 1.500 mg o menos de anticuerpo o su fragmento, 1.200 mg o menos de anticuerpo o su fragmento, o 1.100 mg o menos de anticuerpo o su fragmento, 1.000 mg o menos de anticuerpo o su fragmento, 700 mg o menos de anticuerpo o su fragmento, 500 mg o menos de anticuerpo o su fragmento, 200 mg o menos de anticuerpo o su fragmento, o 100 mg o menos de anticuerpo o su fragmento. En otra realización, el anticuerpo o fragmento se administra en una o más dosis de al menos 20 mg de anticuerpo o su fragmento.

El compuesto que disminuye SAP se puede administrar como una dosis fija, independientemente de una dosis por proporción de peso del sujeto. El compuesto que disminuye SAP se puede administrar en una o más dosis parenteral separadas, simultáneas o secuenciales de 100 mg o menos, de 50 mg o menos, 25 mg o menos, o 10 mg o menos. Alternativamente, el compuesto que disminuye SAP se puede administrar en una dosis por proporción de peso del sujeto según se determina fácilmente por un experto en la técnica.

Formulación.

El componente(s) se puede formular en una composición farmacéutica, tal como mezclando con uno o más vehículo, diluyente o excipiente adecuado, mediante el uso de técnicas que son conocidas en la técnica.

Expresión.

Están disponibles una amplia variedad sistemas de expresión para la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos antiSAP que incluye fragmentos Fab, scFv, y V_{HHS}. Por ejemplo, se pueden usar sistemas de expresión de origen tanto procariótico como eucariótico para la producción a gran escala de fragmentos de anticuerpo y proteínas de fusión de anticuerpos.

La bacteria gram negativa de *E. coli* se usa ampliamente como huésped para genes de expresión heterólogos. Sin embargo, cantidades grandes de proteína heteróloga tienden a acumularse dentro de la célula. La posterior purificación de la proteína deseada a partir del grueso de proteínas intracelulares de *E. coli* a veces puede ser difícil.

Al contrario que *E. coli*, las bacterias del género *Bacillus* son muy adecuadas como huéspedes heterólogos debido a su capacidad de segregar proteínas en el medio de cultivo. Otras bacterias adecuadas como huéspedes son las de los géneros *Streptomyces* y *Pseudomonas*.

Dependiendo de la naturaleza del polinucleótido que codifica el polipéptido, y/o el deseo de posterior procesado de la proteína expresada, pueden ser preferentes huéspedes eucarióticos tales como levadura u otros hongos. En general, son preferentes células de levadura sobre células fúngicas porque son más fáciles de manipular. Sin embargo, algunas proteínas o bien se segregan pobremente de la célula de levadura, o en algunos casos no se procesan adecuadamente (p. ej., hiperglicosilación en levadura). En estos casos, se debería seleccionar un organismo huésped fúngico diferente.

Ejemplos de huésped de expresión adecuada en el ámbito de la presente invención son levaduras tales como especie *Aspergillus* (tales como las descritas en EP-A-0184438 y EP-A-0284603) y especie *Trichoderma*; bacterias tales como especie *Bacillus* (tales como las descritas en EP-A-0134048 y EP-A-0253455), especie *Streptomyces* y especie *Pseudomonas*; y levaduras tales como especie *Kluyveromyces* (tales como las descritas en EP-A-0096430 y EP-A-0301670) y especie *Saccharomyces*.

El uso de células huésped adecuadas – tales como células huésped de levaduras, hongos y plantas- puede proporcionar modificaciones post translacionales (p. ej., miristoilación, glicosilación, truncación, lapidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina) según se necesite para conferir actividad biológica óptima sobre productos de expresión recombinante.

Particularmente ventajosos son sistemas de expresión que permiten la secreción de grandes cantidades de fragmentos de anticuerpo en el medio de cultivo.

Kit.

En otra realización de la invención, se proporciona un conjunto de fabricación, o "kit", que contiene materiales útiles para el tratamiento de la amiloidosis.

Adecuadamente, el kit está formulado para la administración separada o secuencial de la D-prolina o el anticuerpo o uno de sus fragmento antiSAP.

En una realización, el kit comprende un contenedor que comprende el compuesto que disminuye SAP y el anticuerpo o su fragmento antiSAP. En otra realización, el kit comprende un primer contenedor que comprende el compuesto que disminuye SAP y un segundo contenedor que comprende el anticuerpo o su fragmento antiSAP.

Adecuadamente, el compuesto que disminuye SAP y el anticuerpo o su fragmento antiSAP están presentes en cantidades eficaces terapéuticamente o profilácticamente para el tratamiento y/o prevención de amiloidosis.

Contenedores adecuados incluyen, por ejemplo, botes, viales, jeringas, bláster, etc. El contenedor se puede formar a partir de una variedad de materiales tal como cristal o plástico.

El contenedor mantiene el compuesto de disminuye SAP o su formulación farmacéutica y/o el anticuerpo o su fragmento antiSAP, en una cantidad eficaz para tratar amiloidosis, y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede estar en una bolsa o un vial de disolución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja hipodérmica de inyección).

El kit además puede comprender una etiqueta o envase inserto sobre o asociado al contenedor. La etiqueta o envase inserto puede indicar que la composición(es) se usa para tratar amiloidosis.

5 Alternativamente, o adicionalmente, el kit además puede comprender un contenedor adicional que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección, sal fosfato tamponada, disolución Ringer, y disolución de dextrosa. Además puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial o del usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, agujas y jeringas.

10 El kit además puede comprender instrucciones para la administración del compuesto que disminuye SAP y el anticuerpo o su fragmento antiSAP para tratar o prevenir amiloidosis. Por ejemplo, si el kit comprende una primera composición que comprende el compuesto que disminuye SAP y una segunda composición que comprende el anticuerpo antiSAP, el kit además puede comprender instrucciones para la administración simultánea, secuencial o separada de la primera y segunda composición farmacéutica a un sujeto que lo necesita.

15 En otra realización, el kit puede ser adecuado para la liberación de formas orales sólidas de la composición – tal como tabletas o cápsulas. Tal kit incluye, por ejemplo, un número de dosis unitarias. Tales kit pueden incluir una carta que tenga la dosificación orientativa ordenada para el uso que se pretende. Un ejemplo de tal kit es un “envase blíster”. Los envases blíster son conocidos en la industria de envasado y son ampliamente usados para envasar formas farmacéuticas de dosificación unitaria. Si se desea, se puede proporcionar un ayudante para recordar la toma, por ejemplo en la forma de números, letras, u otras marcas o con un calendario inserto, que señala los días del programa del tratamiento en los que se puede administrar la dosis.

20 En ciertas otras realizaciones en las que el kit comprende una formulación farmacéutica del compuesto que disminuye SAP y una segunda formulación que comprende el anticuerpo o su frangmento antiSAP, el kit puede comprender un contenedor separado para contener las formulaciones separadas, tal como una botella dividida o un envase de papel dividido; sin embargo, las composiciones separadas también pueden estar contenidas en un contenedor único, sin dividir. Típicamente, el kit comprende instrucciones para la administración de los componentes separados. Esta forma de kit es particularmente ventajosa cuando los componentes separados se administran en formas de dosificación diferentes (p. ej., oral y parenteral), se administran en intervalos de dosificación diferentes, o cuando se desea la titulación de los componentes individuales de la combinación por el físico que hace la prescripción.

Método de ensayo.

30 En un aspecto más, la presente invención proporciona un método de ensayo para identificar uno o más agentes que se pueden usar en combinación con un compuesto que disminuye SAP como se describe en la presente memoria para el tratamiento de amiloidosis, en particular, para la eliminación esencialmente completa de los depósitos de amiloide.

35 El agente puede ser un compuesto orgánico u otro químico. El agente puede ser un compuesto, que se obtiene o se produce a partir de cualquier fuente disponible, bien sea natural o artificial. El agente puede ser una molécula de aminoácido, un polipéptido, o un derivado químico de ellos, o una combinación de ellos. El agente puede incluso ser una molécula de polinucleótido – que puede ser una molécula sentido o antisentido, o un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo monoclonal humanizado.

En una realización, el agente es un anticuerpo – tal como un anticuerpo que deriva o es derivable de un anticuerpo antiSAP.

40 El agente se puede preparar mediante técnicas de síntesis química.

Técnicas generales de metodología de ADN recombinante.

45 La presente invención emplea, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las capacidades de una persona con conocimientos ordinarios en la técnica. Tales técnicas se explican en la bibliografía. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Books 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 y suplementos periódicos; *Current Protocols in Molecular Biology*, ch. 9, 13, John Wiley & Sons, New York, N. Y.); B. Roe, J. Crabtree, y A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; M. J. Gail (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; y, D. M. J. Lilley y J.E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press. Cada uno de estos textos generales se incorpora en la presente memoria como referencia.

A continuación la invención se describirá con más detalle a modo de ejemplos que tienen la intención de asistir al experto en la técnica en llevar a cabo la invención y no se pretende que limiten el ámbito de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: eliminación de depósitos de amiloide sistémicos en ratones transgénicos que expresan SAP humano.

En el presente estudio se indujo amiloidosis AA en ratones por inyección de factor que realza amiloide seguido de inyecciones de caseína repetidas para provocar inflamación aguda persistente y por tanto incremento suficientemente sustancial en producción de SAP para favorecer la deposición de amiloide AA en todos los animales. Se usó un única cepa de animales de línea pura C57BL/6 en los que se había borrado¹³ el gen de ratón SAP y se había introducido^{14, 15} un transgen SAP humano. Por lo tanto no expresan ningún SAP de ratón si no que expresan SAP humano y a unas concentraciones significativamente más altas que las vistas en humanos. Se confirma que todos los ratones han desarrollado depósitos de amiloide sistémicos abundantes demostrando positivamente el incremento de retención en todo el cuerpo de una traza de SAP humano radiomarcada comparado con los ratones control sin tratar sin amiloide. Después se trataron tres grupos muy cercanos como sigue:

Grupo 1, ácido (R)-1-[6-[(R)-2-carboxi-pirrolidina-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico (CPHPC), el fármaco^{16, 17} que disminuye SAP, y una única dosis de anticuerpo antihumano SAP de ovino;

Grupo 2, CPHPC y IgG control de ovino de antisuero no relacionado;

Grupo 3, sin tratamiento.

Estos grupos control son esenciales para proporcionar una comparación con el retroceso espontáneo de depósitos de amiloide cuando cesa la inflamación. Los grupos también necesitan ser suficientemente grandes para compensar las diferentes proporciones de retroceso de amiloide en ratones individuales diferentes, incluso en estos animales de línea pura endogámica. Igualmente el experimento no se puede realizar mientras continua la inducción de amiloide debido a las proporciones variables a las que se da la deposición de amiloide. En un experimento preliminar sobre grupos de 15 ratones cada uno, realizado según el mismo preciso protocolo y con los mismos reactivos según se describe en la presente memoria, obtenemos los mismos resultados que se muestran a continuación. Después el presente experimento se llevó a cabo con más ejemplares en cada grupo para confirmar que el efecto observado se reproducía y no se debía a un suceso casual de retroceso acelerado de amiloide en uno de los grupos no relacionado con el tratamiento dado.

En los ratones transgénicos con SAP humano, SAP humano está presente tanto en circulación como en depósitos de amiloide. El fármaco CPHPC está específicamente ligado mediante SAP humano a un complejo compuesto por dos moléculas de SAP pentaméricas nativas y 5 moléculas¹⁶ CPHPC. Este complejo es reconocido como anormal por el hígado y se toma muy rápidamente por los hematocitos y se degrada, eliminándolo así eficazmente de la circulación¹⁶. Las concentraciones de SAP en plasma permanecen muy bajas durante mucho tiempo siempre que el fármaco se administre¹⁶. CPHPC se tolera extremadamente bien y ni el fármaco en sí mismo ni la disminución de SAP que produce causan ningún efecto adverso¹⁶ (y resultados no publicados). Hay evidencia de beneficios clínicos a partir de tratamiento con CPHPC en pacientes humanos con amiloidosis sistémica, especialmente con respecto a la conservación de la función renal en individuos con amiloidosis predominantemente renal (resultados sin publicar). A pesar de estas observaciones prometedoras, la eficacia terapéutica rápida y óptima capaz de conservar función orgánica y prolongar la vida en pacientes con amiloidosis sistémica requerirá eliminación significativa o completa de los depósitos de amiloide. Como se demuestra en la presente memoria, esto se puede lograr ahora según la presente invención por tratamiento con una combinación de CPHPC y anticuerpos antiSAP.

El tratamiento con CPHPC elimina casi todo el SAP circulante humano pero deja cantidades significativas de SAP asociado con los depósitos de amiloide en los tejidos (observaciones sin publicar). La disminución más grande de SAP de depósitos de amiloide que se ha observado en pacientes humanos se da aproximadamente 90% después de meses de administración continua de CPHPC. La infusión intravenosa de anticuerpos monoespecíficos contra SAP humano en pacientes cuyo SAP circulante ha disminuido permite a los anticuerpos localizar y fijarse específicamente a los depósitos de amiloide y favorecen su retroceso rápido y extenso. Aquí se muestra la eficacia de este procedimiento en amiloidosis AA del modelo de ratón transgénico con SAP humano.

Protocolo y métodos experimentales.

Se indujo amiloidosis AA sistémica en machos (n=61) y hembras (n=32) adultos de ratones de línea pura C57BL/6 con el gen SAP borrado y que eran transgénicos para SAP¹⁵ humano. Cada ratón recibió una dosis única de factor⁹ que realza amiloide por inyección intravenosa seguido 4 días después de 10 inyecciones diarias subcutáneas de 10% p/v de caseína en disolución de NaHCO₃ 0,1 M administrado durante un periodo¹³ de 12 días. Siete días después de la última inyección de caseína, se introdujo KI en el agua de bebida de todos los ratones y 3 días después cada ratón recibió una inyección intravenosa de una dosis estándar de¹²⁵ SAP^{6, 18} humano I-etiquetado. Cuatro machos y cuatro hembras adultos de ratones de la misma colonia pero que no habían recibido ningún otro tratamiento también se les dio KI y¹²⁵ I-SAP como controles. Todos los ratones se sometieron a conteo en todo el cuerpo 24, 48, 72, 96 y 168 horas después de la inyección de contraste para determinar la retención de radiactividad como un índice de carga de amiloide en todo el cuerpo. Constantemente había más retención en todos los ratones tratados comparado con los controles en todos los momentos del tiempo, indicando que todos ellos tenían depósitos¹⁸ de amiloidosis sistémica significativos. Después los ratones se recolocaron en tres grupos muy cercanos

y lo más parecidos posible en cuanto al número total y distribución de sexos en cada grupo. Diez días después de¹²⁵ inyección de I-SAP los grupos uno y dos comenzaron con CPHPC en su agua de bebida a 1 mg/ml y continuaron con ese tratamiento hasta el final del experimento. El grupo tres no recibió tratamiento en esta o ninguna etapa posterior del estudio. Cinco días después del comienzo de CPHPC cada animal del grupo uno recibió una inyección peritoneal que comprende 1 ml de la fracción IgG completa del antisuero SAP antihumano ovino monoespecífico a 50 mg/ml que contenía 7 mg/ml de anticuerpos específicos en disolución en sal fisiológica tamponada con fosfato. El antisuero se cultivó por inmunización de ovino con SAP humano 100% puro. Al mismo tiempo todos los animales del grupo 2 recibieron una inyección intraperitoneal que comprende 1 ml de la fracción IgG completa del antisuero receptor de oncostatina M antihumano ovino monoespecífica a 50 mg/ml en disolución en sal fisiológica tamponada con fosfato. Este antisuero, usado en la presente memoria como un control para el reactivo antiSAP, no mostró reacción con SAP humano, con plasma de ratones o con tejidos de ratones normales por ensayos estándar inmunoquímicos e inmunohistoquímicos. Veinte días después de las inyecciones intraperitoneales todos los ratones se sacrificaron por sangrado bajo anestesia terminal y se sacó el hígado y el bazo de cada uno. Cada órgano se pesó y se dividió en tres partes, una de ellas también se pesó y se usó para extracción de SAP, mientras que la segunda parte se congeló instantáneamente para posterior análisis inmunohistoquímico e histoquímico sin fijación, y la última parte se fijó en formalina tamponada para rutina histológica y estimación de amiloide por tinción con rojo Congo. Todos los ratones se pesaron al mismo momento de asignación a los grupos después de inducción de amiloidosis pero antes de la administración de¹²⁵ I-SAP. Todos se pesaron otra vez antes del sacrificio y al final del experimento. Todos los ratones se sangraron cuatro veces: (1) inmediatamente antes de que los grupos dos y tres comenzaran con CPHPC; (2) el día antes de la inyección de las preparaciones IgG en los grupos dos y tres; (3) 14 días antes de las inyecciones IgG; (4) en el momento del sacrificio. Las secciones de bazo e hígado de todos los animales teñidas con rojo Congo se examinaron independientemente por tres observadores expertos diferentes ciegos al tratamiento que cada ratón había recibido y puntuaron la cantidad de amiloide presente como se indicó previamente. Las puntuaciones 10^0 - 10^4 representan un logaritmo aproximado de base 10 en una escala desde 10^0 , que corresponde a uno o dos diminutas motas de amiloidosis entre muchas secciones de un órgano particular, hasta 10^4 que corresponde a amplios depósitos abundantes que comprenden aproximadamente 10.000 veces más amiloide¹³. Había casi 100% de concordancia entre las puntuaciones de los diferentes observadores, y las puntuaciones de la mayoría de los observadores experimentados se usaron por tanto para el presente análisis. Las concentraciones de SAP humano en el suero y extractos de órganos se midieron por electroinmunoensayo⁵.

El cronograma del protocolo se resume a continuación:

Día	Procedimiento
-41	Inyección AEF i.v. en todos los ratones
-36 a -31	Inyecciones s.c. de caseína diarias en todos los ratones
-29 a -24	Inyecciones s.c. de caseína diarias en todos los ratones
-20	Pesado de todos los ratones
-17	Iniciar KI en agua de bebida en todos los ratones
-14	Inyección ¹²⁵ I-SAP i.v. en todos los ratones
-13 a -10 y -7	Recuento de cuerpo completo de todos los ratones cada día
-5	Sangrado de todos para muestra de pretratamiento
-4	Iniciar CPHPC 1 mg/ml en agua de bebida para los grupos 1 y 2; no tratamiento para el grupo 3
-1	Sangrado para muestra de tratamiento post CPHPC pre anticuerpo
0	Inyección IgG anticuerpo antihumano SAP de ovino en grupo 1
	Inyección control IgG ovino para grupo 2
	Grupo 3 sin tratamiento

- 14 Sangrado de todos
- 23 Pesado de todos
- 28 Desangrar y sacrificar a todos los ratones, tomar los órganos

Resultados.

Peso corporal y supervivencia. El peso corporal no era significativamente diferente entre los grupos. Los pesos medios (SD) en gramos el día -20, esto es después de la inducción de amiloide y antes de la inyección de contraste, eran:

Grupo 1, 28,0 (2,7)

Grupo 2, 27,7 (3,2)

Grupo 3, 27,3 (3,1)

Los pesos medios (SD) en gramos el día 23, justo antes del final del estudio eran:

Grupo 1, 28,5 (2,8)

Grupo 2, 28,4 (3,6)

Grupo 3, 27,8 (3,3)

Ningún animal murió durante la fase de tratamiento del experimento. Sumado a los pesos corporales constantes está claro que la administración de CPHPC y anticuerpo antiSAP no tuvo efectos clínicos significativamente adversos.

Valores de SAP humano. Las concentraciones en suero de SAP humano eran las mismas en todos los grupos en la primera toma de sangre después de la inducción de amiloidosis y antes de cualquier otro tratamiento, con valores significativamente más altos entre los ratones hembras que entre los machos (tabla 1), como se ha observado previamente en esta cepa. En el segundo sangrado, tomado 4 días después del comienzo del tratamiento CPHPC en los grupos uno y dos, y antes de la administración de anticuerpo antiSAP o IgG ovino control, había más de 90% de disminución de SAP humano circulante (tabla 1) como se ha informado^{16, 17} previamente. Estimaciones de la concentración de SAP humano no eran posibles en suero de animales del grupo uno y dos en los días 14 y 28 después de la inyección de anticuerpo antiSAP ovino o IgG control debido a que había interferencias en el ensayo por persistencia de esos reactivos en la circulación. En el grupo tres, que no recibían ningún otro tratamiento, los valores de SAP humano no cambiaron en el día 14 pero eran significativamente más bajos en el día 28 (tabla 1), posiblemente debido al daño en el hígado por la amiloidosis.

Las cantidades de SAP humano presentes en los bazo que se eliminaron al final del experimento se muestran en la tabla 3. SAP, incluyendo SAP transgénico humano en estos ratones, se produce en el hígado. La interpretación de los resultados del ensayo de SAP humano en los hígados al final del experimento es por tanto complicada por el hecho de que algo de SAP está inevitablemente presente como resultado de su síntesis por hepatocitos y no sólo debido a la fijación de SAP circulante a depósitos de amiloide en el hígado, si es que están presentes. También las hembras tienen consistentemente más alta circulación (tabla 1) y concentraciones en hígado de SAP humano que los machos (tabla 3). Aun así, el contenido de SAP humano de los hígados en los diferentes grupos estaba en el mismo orden que los resultados del contenido de SAP inequívocamente humano en bazo.

Carga de amiloide. La carga de amiloide del cuerpo entero era la misma en los tres grupos después de la inducción de amiloide y antes del comienzo de los diferentes tratamientos. A 72 h después de la inyección del¹²⁵ marcador I-SAP la retención de radioactividad del cuerpo entero era justo 10-11% de la dosis inyectada en cada uno de los 8 controles no amiloidóticos. Entre los ratones amiloidóticos la retención media (SD) era:

Grupo 1, 57,1% (21,6)

Grupo 2, 44,0% (19,5)

Grupo 3, 50,1% (21,5)

Estas diferencias no eran significativas, P=0,054 mediante ANOVA de una vía.

Al final del experimento, las valoraciones histológicas de amiloide en el bazo e hígado mostraron diferencias muy significativas entre los grupos, P=0,0000 mediante análisis de varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis. Había radicalmente menos amiloide en el grupo 1 (CPHPC más antiSAP) que en los otros dos grupos pero no había

diferencia entre los grupos 2 (CPHPC sólo) y 3 (sin tratamiento control) (figs 1 y 2). Entre los 31 ratones del grupo 1 no se detectó amiloide en 23 y los 8 restantes tenían ocasionalmente motas microscópicas. Por el contrario no había animales entre los 62 individuos en los dos grupos control que no recibieron antiSAP que no tuvieran nada de amiloide. Esta diferencia era muy significativa mediante la prueba exacta de Fisher, $P < 0,0001$.

	Amiloide presente	Amiloide ausente
Grupo 1: CPHPC + antiSAP	8	23
Grupo 2: CPHPC + control IgG	30	0
Grupo 3: sin tratamiento	32	0

5

Entre los 62 ratones control, sólo 12 tenían trazas o pequeñas cantidades de amiloide, los depósitos del resto eran moderados o fuertes. Ejemplos típicos de la tinción histoquímica para amiloide se corresponden con cada uno de las puntuaciones que se muestran en la tabla 3.

10 Apariencias histológicas. Las secciones teñidas de hematoxilina y eosina de todos los tejidos de bazo e hígado fueron examinados "en ciego" a los grupos y tratamientos por el Profesor AP Dhillon, Profesor de Histopatología de University College London. A parte de los depósitos de amiloide presentes en los grupos dos y tres, y ausencia en el grupo 1, había cambios modestos que eran coherentes con inflamación crónica, aunque no todos, de los tejidos y no había diferencia entre los grupos.

Discusión.

15 Los ratones fueron todos sacrificados para estimar su carga amiloidea en el día 60 después de la última inyección de caseína y 28 días después del tratamiento de los grupos de prueba con anticuerpos antiSAP. Todos los ratones tenían depósitos de amiloide significativos antes de los tratamientos antiSAP o control, como se demuestra por¹²⁵ retención de I-SAP medida 10 días después de la última inyección de caseína. No había diferencias significativas entre los grupos y había, como se esperaba, algún retroceso de depósitos de amiloide en unos pocos ratones de control al final del estudio. Sin embargo no había un único ratón entre los 62 animales control en grupos dos y tres que no tuviera nada de amiloide. Por el contrario 23 de los 31 ratones que recibieron anticuerpo antiSAP así como CPHPC no tenían amiloide detectable en el bazo o hígado. Los únicos depósitos de amiloide encontrados en animales tratados con antiSAP eran unas pocas motas microscópicas, de magnitud de orden menor que la mayoría de los depósitos presentes en 50 de 62 ratones que no recibieron antiSAP. Queda inequívocamente claro que el tratamiento antiSAP era responsable de esta notoria eliminación de los depósitos de amiloide en el grupo uno, mientras que los ratones que recibieron CPHPC y fracciones IgG de ovino control de un antisero no relacionado (grupo dos) tenían abundante amiloide idéntico en cantidad a los controles del grupo tres que no recibieron ningún tratamiento.

30 Los resultados del análisis histoquímico por tinción con rojo Congo se confirmaron por estimación del contenido de SAP humano de los bazos e hígados. No había SAP humano detectable en los bazos de 29 de 31 ratones en el grupo uno y solo cantidades traza en los dos animales restantes. Los animales del grupo tres control tenían cantidades significativas de SAP presente, que corresponde a su alta carga de amiloide, y los ratones del grupo dos tenían aproximadamente un cuarto del contenido de SAP humano, a pesar de que tenían la misma carga amiloide, ya que habían recibido CPHPC continuamente durante 33 días antes del sacrificio. Las concentraciones de SAP humano se redujeron en >90% en el suero de todos los ratones que recibieron CPHPC en ambos grupos uno y dos, comparado con el grupo control tres. Estos resultados demuestran la capacidad de CPHPC de disminuir SAP humano de la circulación mientras que cantidades significativas de SAP humano permanecen en los depósitos de amiloide para proporcionar el objetivo de los efectos terapéuticos de los anticuerpos antiSAP. La combinación de CPHPC y anticuerpos antiSAP por tanto es esencial para la presente invención: el fármaco de molécula pequeña limpia el plasma y los compartimentos de fluido extravascular de SAP humano de modo que la posterior administración de anticuerpo antiSAP puede alcanzar el SAP específicamente localizado en los depósitos de amiloide y allí realiza su función crucial de desencadenar el retroceso y eliminación de las fibrillas amiloideas.

Conclusión.

45 La combinación de tratamientos de individuos con depósitos de amiloide sistémico establecidos usando CPHPC y anticuerpos antiSAP causa de manera segura y eficaz la eliminación rápida y esencialmente completa de los depósitos. Nunca se ha logrado antes en ningún paciente o modelo animal o mediante cualquier método. La invención será aplicable a todas las formas de amiloidosis sistémica y local adquirida y heredada, y también a todas las otras enfermedades que están asociadas con depósitos de amiloide, que incluye enfermedad de Alzheimer y diabetes tipo 2.

50 Ejemplo: tratamiento de un paciente con amiloidosis sistémica usando CPHPC y anticuerpo antiSAP.

Un paciente que sufre amiloidosis sistémica se diagnostica por examen clínico e investigaciones rutinarias que llevan a sospechar amiloidosis, seguido de confirmación específica por examen histoquímico experto de biopsias en los tejidos afectados. Se lleva a cabo escintigrafía de SAP radiomarcado en UK NHS National Amyloidosis Centre en el Centre for Amyloidosis and Acute Phase Proteins en el Departamento de Medicina de University College London en Royal Free Hospital. El examen de tejidos identifica el tipo particular de amiloide presente y el escáner, sumado a un examen ecocardiográfico del corazón, muestra donde está presente el amiloide y en qué cantidades. Las investigaciones clínicas rutinarias de función de órganos establecen la extensión y gravedad del daño en tejido y órgano causado por los depósitos de amiloide, así como la presencia y gravedad de cualquier enfermedad primaria subyacente que puede llevar a deposición de amiloide.

Convencionalmente, los dos primeros pasos esenciales en el tratamiento de tal paciente consiste en: (1) mantenimiento de la función del órgano mediante todos los medios posibles, que incluye terapia con fármaco según sea apropiado y sustitución del órgano si es necesario que comprende diálisis renal y trasplante de órgano, y (2) aplicación de cualquier terapia que pueda estar disponible para reducir la abundancia de proteína precursora que está formando las fibrillas amiloideas. Lo último puede ser muy difícil de lograr y algunas veces imposible, de modo que el daño en el órgano progresa a fallo orgánico, morbilidad seria y normalmente conduce a la muerte.

Según la presente invención, en este ejemplo el paciente se trata para detener la deposición amiloidea y para eliminar de los tejidos depósitos de amiloide establecidos que existen, lo que lleva a un beneficio clínico.

El paciente se trata con el fármaco que disminuye SAP, CPHPC, que se administra por inyección intravenosa de bolus en una dosis de 100 mg. Al día siguiente se toma una muestra de sangre. Esto confirma por inmunoensayo específico que la concentración de SAP en el suero se ha reducido en un 90%. Después comienza una infusión intravenosa de anticuerpo antiSAP y durante un periodo de tiempo de varias horas se administra una dosis de 1.000 mg de anticuerpo suficiente para fijar SAP en los depósitos de amiloide en el cuerpo. CPHPC se administra parenteralmente dos veces al día durante las siguientes dos semanas, para asegurar que los valores de SAP del plasma permanecen contenidos. Todos los aspectos del estado clínico del paciente y función de órganos se monitorizan con detalle diariamente, y las mejoras en la función de órganos se detectan en días después de la infusión de anticuerpos. Un mes después del tratamiento, cuando el CPHPC se ha eliminado del cuerpo y el anticuerpo antiSAP se ha catabolizado, el paciente se somete a repetición de escintigrafía de SAP para estimar la presencia y extensión de cualquier depósito residual de amiloide. A partir de ahí se recomienda tratamiento con CPHPC dando 0,5 mg/kg dos veces al día de inyección subcutánea para asegurar que el mínimo SAP como sea posible se reacumule sobre cualquier amiloide residual en los tejidos. Después la escintigrafía de SAP se repite cada 3 meses para monitorizar el retroceso continuo de amiloide, con interrupción de CPHPC una semana antes de cada escaneo y se restituye inmediatamente después. Después de que se considera que el paciente está libre de depósitos de amiloide, se para la administración de CPHPC, pero se continua la monitorización por escintigrafía de SAP para detectar cualquier deposición anormal posterior de amiloide. El paciente permanece libre de enfermedad durante el periodo de observación, pero si los depósitos de amiloide se reiteran se repite el tratamiento con CPHPC y antiSAP según se requiera para eliminar y mantener la eliminación de amiloide.

Tabla 1. Concentraciones de SAP humano en suero [media (SD) mg/l].

Grupo	machos				hembras	
	1 (n = 21)	2 (n = 20)	3 (n = 20)	1 (n = 10)	2 (n = 10)	3 (n = 12)
Tratamiento	CPHPC + antiSAP	CPHPC	ninguno	CPHPC + antiSAP	CPHPC	ninguno
Pre-sangrado día 2	37,1 (14,1)	35,1 (7,9)	35,8 (12,0)	72,0 (14,3)	82,6 (20,2)	78,2 (21,3)
Post CPHPC antes del anticuerpo día 0	2,6 (2,5)	2,9 (1,3)	35,4 (14,6)	3,1 (1,9)	4,0 (1,4)	74,3 (17,3)
Post anticuerpo día 14	NI	trazas	33,2 (11,1)	NI	Trazas	67,9 (20,9)
Post anticuerpo día 28	NI	trazas	*24,0 (6,4)	NI	Trazas	**54,0 (12,6)

NI, no interpretable debido a la persistencia de antisuero antiSAP en suero; trazas, concentración muy baja pero no cuantificable debido a interferencia por persistencia de IgG ovino en suero. *significativamente más baja que sangrados previos, P = 0,0047 mediante ANOVA. **significativamente más baja que sangrados previos, P = 0,0131 mediante ANOVA.

Tabla 2. Contenido de SAP humano de bazo al final del experimento (µg/órgano entero).

	Machos y hembras		
Grupo	1 (n = 31)	2 (n = 30)	3 (n = 32)
Tratamiento	CPHPC + antiSAP	CPHPC + IgG control	Ninguno
Media	0	15	69
Intervalo IQ	0-0	1-18	38-113
Intervalo	0-4	0-35	3-304

5 SAP no se expresa en el bazo y no había diferencia entre los machos y las hembras en relación o bien a la cantidad de amiloide en bazo o bien a la cantidad de SAP humano en cualquiera de los tres grupos. El contenido de SAP en los bazos por tanto se muestra aquí para la totalidad de cada grupo. Significativas diferencias estadísticas entre grupos (pruebas de Mann Whitney): grupo 1 vs grupo 2, $P = 0,0000$; grupo 1 vs grupo 3, $P = 0,0000$; grupo 2 vs grupo 3, $P = 0,0000$.

Tabla 3. Contenido de SAP humano de hígado al final del experimento ($\mu\text{g}/\text{órgano}$ entero).

	Machos			Hembras		
Grupo	1 (n = 20)	2 (n = 20)	3 (n = 20)	1 (n = 10*)	2 (n = 10)	1 (n = 12)
Tratamiento	CPHPC + antiSAP	CPHPC + IgG control	Ninguno	CPHPC + antiSAP	CPHPC + IgG control	Ninguno
Media	0	59	82	58	78	142
Intervalo IQ	0-0	42-75	56-117	40-76	60-112	76-289
Intervalo	0-56	0-100	7-150	24-87	52-148	35-735

10 *la muestra de un ratón no estaba disponible para ensayo. Significativas diferencias estadísticas entre grupos (pruebas de Mann Whitney): machos grupo 1 vs grupo 2 o grupo 3, $P = 0,0000$; grupo 2 vs grupo 3, $P = 0,0337$; hembras grupo 1 vs grupo 2, $P = 0,0413$; grupo 1 vs grupo 3, $P = 0,0069$; grupo 2 vs grupo 3, $P = 0,0698$.

Ejemplo 3. Efecto de diferentes dosis de anticuerpo antiSAP sobre eliminación de amiloide.

Protocolo y métodos experimentales.

15 En un experimento que usa precisamente el mismo protocolo y reactivos que se describen en el ejemplo 1 anterior, diferentes grupos de 5 ratones cada uno recibieron las siguientes dosis de la misma fracción IgG de antisuero antiSAP no humano ovino como en el ejemplo 1: 50 mg (misma dosis que en ejemplo 1); 10 mg; 2 mg; 0,4 mg; nada. La cantidad de anticuerpo antiSAP en estas dosis era 7 mg, 1,4 mg, 0,28 mg, 0,056 mg y cero respectivamente.

Resultados.

20 En los dos grupos que recibieron las dosis más altas de anticuerpo antiSAP esencialmente todos los depósitos de amiloide en el bazo e hígado se eliminaron. En ninguno de los otros grupos tratados con anticuerpo hubo ninguna reducción de depósitos de amiloide y no había diferencia con el grupo control que no recibió anticuerpo.

Discusión.

La dosis mínima eficaz de este anticuerpo antiSAP policlonal de ovino particular administrado en una única dosis en el protocolo descrito en el ejemplo 1 era mayor de 0,28 mg, y una dosis de 1,4 mg mostró eficacia máxima.

25 Usando el ejemplo anterior, un experto en la técnica sería capaz de determinar dosificaciones apropiadas para administrar en humanos teniendo en cuenta las diferencias que se conocen en eliminación y metabolismo entre las dos especies.

Ejemplo 4. Secuencia temporal, mecanismo y efectos clínicos de eliminación de amiloide por anticuerpo antiSAP.

Protocolo y métodos experimentales.

En un experimento usando precisamente el mismo protocolo y reactivos que los descritos en el ejemplo 1 anterior, diferentes grupos de 5 ratones cada uno recibieron precisamente los mismos tratamientos que en ese experimento, que incluye la dosis de 50 mg de la fracción IgG que contiene 7 mg de anticuerpo antiSAP, y después se sacrificaron respectivamente los días 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, 21 y 25 después de la administración del anticuerpo. Las muestras de plasma obtenidas de cada animal en el momento en que se sacrificó cada grupo de ratones se almacenaron congeladas antes del análisis bioquímico en un lote único al final del experimento. Se tomó el bazo e hígado de cada ratón en el momento de la muerte y se procesó para el análisis preciso descrito en el ejemplo 1. Además de la tinción con rojo Congo para determinar la extensión de la deposición de amiloide, se examinaron secciones de tejido fijo tintadas de manera estándar con hematoxilina y eosina para valoración histopatológica y se analizaron tejidos procesados adecuados mediante tinción inmunohistoquímica e inmunocitoquímica para marcadores proteínas y células relevantes usando reactivos y métodos disponibles validados por la rutina. También se examinaron algunos tejidos con microscopio electrónico de transmisión estándar. Todos los exámenes, lecturas y puntuación de portaobjetos se llevaron a cabo por observadores expertos que se cegaron para identificar las muestras. Los tejidos control fueron proporcionados por ratones que se habían sometido precisamente a la misma inducción de amiloidosis sistémica AA pero que habían recibido IgG ovino control sin actividad antiSAP.

Resultados.

En el momento más cercano, 24 horas después de la inyección del anticuerpo antiSAP, ya había infiltración masiva de depósitos de amiloide por células inflamatorias, identificadas por tinción de hematoxilina y eosina predominantemente como macrófagos con algunos granulocitos (fig. 4). Esta apariencia tenía un contraste marcado con los depósitos de amiloide acelulares típicos en ratones control que no reciben el anticuerpo. Las micrografías electrónicas en tejidos en el día 1 mostraron unión íntima de macrófagos y granulocitos con los depósitos de amiloide (fig. 5). En los siguientes días la infiltración celular de los depósitos de amiloide persistió, se hizo casi únicamente mononuclear, y contenía cantidades incrementadas de células gigantes multinucleadas circundantes y que aparentemente envuelven los grumos progresivamente fragmentados y menguantes de amiloide (fig. 4). El infiltrado celular y la cantidad de amiloide menguada notablemente en 7-10 días y en 15 días los depósitos de amiloide y las células infiltradas casi habían desaparecido. Las apariencias histológicas los días 21 y 25 eran casi idénticos a normal, sin tejido amiloidótico.

La tinción inmunohistoquímica con anticuerpo F4/80, un marcador macrófago global, los identificó como el componente predominante de la invasión celular temprana masiva de los depósitos de amiloide (fig. 6). Casi no había tinción de F4/80 en los depósitos de amiloide de ratones control que no recibieron anticuerpo antiSAP, ni tampoco había tinción incrementada de F4/80 en los tejidos de los ratones tratados con antiSAP distintos de los de y alrededor de los depósitos de amiloide. El día 4 hubo tinción intensa de CD68, un marcador de actividad fagocita de macrófagos, en todas las células y alrededor de los depósitos de amiloide, como se muestra tanto por histoquímica inmunoperoxidasa como por microscopio confocal (fig. 6). Los restos fragmentados de amiloide, en ese momento mayoritariamente rodeados o internalizados por macrófagos y células gigantes, teñidos con anticuerpo de ratón AA que se colocaliza con tinción de antiSAP humano, IgG anti ovino y anticuerpos C3 anti ratón (fig. 6). C3 es el componente complementario más abundante y es responsable de la llave quimiotáctica y actividad opsónica del sistema complementario.

No había anomalías significativas ni ninguna diferencia significativa entre los grupos en ninguno de los analitos analizado, que comprende: sodio, potasio, cloro, urea, creatina, calcio, fosfato, fosfatasa alcalina, transaminasa alanina, proteína total, albúmina, colesterol total, triglicéridos, glucosa, bilirrubina total, creatina quinasa, lactato deshidrogenasa.

Discusión.

La administración de anticuerpo antiSAP a ratones amiloidóticos en los que SAP circulante ha disminuido por CPHPC, indujo infiltración predominantemente macrófaga muy rápida e intensa de los depósitos de amiloide. Muchas de estas células se fusionaron rápidamente para formar células gigantes multinucleadas que rodean y envuelven islas de amiloide y a esto siguió la rápida y casi completa eliminación de los depósitos. En 15 días después de la administración del anticuerpo el amiloide había desaparecido virtualmente y la población celular de los tejidos rápidamente volvió a normal. No había efecto adverso clínicamente aparente del tratamiento y las muestras de plasma tomadas el día del sacrificio de todos los ratones de cada grupo no mostraron perturbación de la función del riñón o hígado, lípidos del plasma, proteína o albúmina total, o evidencia bioquímica de daño muscular. Por tanto la eliminación esencialmente completa de los depósitos de amiloide significativamente viscerales en estos animales se silenció clínicamente y no eran dañinos.

El tipo de célula predominante que invade persistentemente los depósitos de amiloide se identificó por tinción de hematoxilina y eosina como macrófagos y esto se confirmó por microscopio electrónico e inmunocitoquímica, así como su papel activo en fagocitosis y destrucción de amiloide. La presencia de SAP humano, IgG ovino y C3 de ratón sobre los depósitos AA de amiloide en y rodeados por macrófagos es congruente con el siguiente mecanismo. El anticuerpo antiSAP humano se fija a SAP humano asociado con los depósitos de amiloide y activa complementario, que genera atrayentes quimiotácticos potentes, C3a y C5a. Las células fagocitas, mayoritariamente macrófagos,

después rodean e infiltran los depósitos de amiloide e ingieren activamente el amiloide que se ha opsonizado por el complementario y anticuerpo IgG, y la degradación mediada por macrófago elimina rápidamente los depósitos.

Ejemplo 5. Validación de protocolos simplificados para usar el anticuerpo antiSAP.

5 El protocolo estándar descrito en detalle en el ejemplo 1 usa ratones en los que el gen SAP de ratón se ha borrado y el transgen SAP humano se ha injertado para proporcionar expresión de SAP humano. También se usa administración de CPHPC en el agua de bebida empezando poco antes de la administración del anticuerpo antiSAP y continuando a lo largo del resto del experimento. Para explorar la necesidad de tal tratamiento prolongado con CPHPC, se usó una dosis única de CPHPC parenteral en ratones que eran transgénicos en SAP humano sobre un antecedente de tipo salvaje, mejor que desactivación de SAP de ratones como en los ejemplos previos. En otro
10 acercamiento, que es crítico para estudios en ratones con modificaciones genéticas no relacionadas con SAP, ratones no transgénicos de tipo salvaje amiloidóticos tenían los depósitos de amiloide "cargados" con SAP humano por una inyección parenteral única de SAP humano puro aislado.

Protocolo y métodos experimentales.

15 Se indujo amiloidosis AA y se confirmó en ratones transgénicos de SAP humano sobre el antecedente de tipo salvaje precisado en el ejemplo 1 anterior. Después recibieron una única inyección intraparenteral de 1 mg de CPHPC, seguido 5 horas después, en el grupo de prueba (n = 10), de inyección intraperitoneal de 25 mg de fracción IgG del mismo suero SAP antihumano ovino según se usó en todos los ejemplos previos. Los ratones control (n = 8) recibieron IgG ovino sin actividad antiSAP. Sesenta días después se sacrificaron todos los ratones para estimar la carga de amiloide por tinción con rojo Congo.

20 Posteriormente 15 ratones de tipo salvaje en los que se había inducido y confirmado con precisión amiloidosis AA como se detalla en el ejemplo 1, se cargaron con SAP humano mediante una única inyección intraperitoneal de 10 mg por ratón de SAP humano puro aislado. El SAP inyectado en los ratones amiloidóticos se localiza en los depósitos de amiloide y persiste allí (fig. 7) con un tiempo medio de aproximadamente 3-4 días mientras que cualquier SAP humano no fijado a amiloide se elimina de la circulación con una vida media de aproximadamente 3-4
25 horas^{16, 18}.

Tres días después de la inyección de SAP humano, cuando el SAP humano ya no era detectable en la circulación, cada ratón recibió una única inyección intraperitoneal de 50 mg de la fracción IgG del antisero antiSAP ovino y todos los ratones se sacrificaron 15 días después para estimar la carga de amiloide por tinción con rojo Congo.

Resultados.

30 Los depósitos de amiloide en los ratones transgénicos de SAP humano sobre el antecedente de tipo salvaje se eliminaron tan eficazmente por la dosis única de anticuerpo antiSAP como se había visto en todos los experimentos previos en ratones transgénicos de SAP humano de ratón desactivado.

Igualmente, después de cargar con depósitos de amiloide AA de ratón a ratones de tipo salvaje con SAP humano administrado pasivamente, la administración de anticuerpo antiSAP produjo la misma eliminación notable de depósitos según se vio previamente.
35

Discusión.

Estos resultados demuestran que la presencia de SAP humano sobre los depósitos de amiloide y la ausencia de una concentración significativa de SAP humano en la circulación son suficientes para el efecto terapéutico de anticuerpo antiSAP según la presente invención. Estas condiciones suficientes se lograron más fácilmente o bien usando una
40 única dosis parenteral de CPHPC en animales transgénicos de SAP humano o bien cargando los depósitos de amiloide en ratones de tipo salvaje con SAP humano mediante una única inyección parenteral. El último modelo es extremadamente útil debido a que permite el análisis de los mecanismos de acción de anticuerpo antiSAP en ratones genéticamente modificados (véase ejemplo 6 anterior) sin necesidad de hacer cruzamientos prolongados.

De manera importante, CPHPC es esencial en sujetos humanos en los que siempre hay producción continua de SAP a 50-100 mg por día⁶ y donde es absolutamente necesario disminuir el SAP del plasma antes de administrar anticuerpo antiSAP.
45

Ejemplo 6. Complemento dependiente de eliminación de amiloide por el anticuerpo antiSAP.

Se investigó el papel del complemento en eliminación de amiloide por el anticuerpo antiSAP comparando la eficacia del tratamiento entre ratones con deficiencia del complemento y complemento normal suficiente en animales de tipo
50 salvaje. La eliminación del objetivo del gen de activación de bloques C1q de la vía del complemento clásica, que se inicia por la fijación de C1q a complejos anticuerpo-antígeno, pero con activación de C3, el paso funcional crucial responsable de quimiotaxis y opsonización, las mayores funciones biológicas del complemento, aún puede seguir por medio de las vías alternativas y lectinas así como mediante escisión directa de C3 mediante proteinasas de serina no complementarias. La eliminación del objetivo del gen para C3 suspende estas funciones.

Protocolos y métodos experimentales.

Se indujo y se confirmó amiloidosis AA, precisamente como se detalla en el ejemplo 1 anterior, en dos grupos de ratones con deficiencia del complemento: desactivación C3 (n = 4) y desactivación C1q (n = 12). Después todos los ratones se cargaron con SAP humano y todos excepto dos de cada grupo se trataron con antiSAP según se describe en el ejemplo 5, antes de sacrificarlos el día 15 para estimar la carga de amiloide.

Resultados.

Al contrario de la eliminación eficaz de depósitos de amiloide en todos los ratones complementarios suficiente tratados previamente con antiSAP, y descrito en los ejemplos 1-5, aún había abundante amiloide presente en ambos grupos de animales con complemento deficiente aunque tienden a tener una apariencia más fragmentada que en los dos ratones control de complemento deficiente de cada tipo. Las puntuaciones de amiloide en bazo eran ligeramente más altas en los ratones deficientes en C1q (media 10^4 , intervalo 10^2 - 10^4) que en los deficientes en C3 (media 10^3 , intervalo 10^2 - 10^4) pero esto no tiene significancia estadística.

Discusión.

En ratones que carecen o de C1q o de C3, el tratamiento antiSAP no eliminó los depósitos de amiloide. La eficacia terapéutica de antiSAP es por tanto muy significativamente dependiente de complemento y no está mediado por anticuerpo IgG sólo que podría, en teoría, unir células fagocitas vía sus receptores Fc(γ). Aun así a más apariencia fragmentada de los depósitos de amiloide persistente en los ratones con complemento deficiente sugieren al menos algún efecto del anticuerpo sólo. También la tendencia de más eliminación en animales deficientes en C1q comparado con deficientes en C3 sugiere que la activación de C3 es crítica y eso incluso en ausencia de C1q y la vía clásica, que se activa típicamente por anticuerpo IgG, alguna activación complementaria puede darse.

Ejemplo 7. Requerimientos de anticuerpo antiSAP IgG completo.

La activación complementaria por anticuerpo IgG requiere la molécula completa intacta, incluyendo la región Fc, y procede por medio de la vía clásica iniciada por fijación de C1q. En algunos sistemas anticuerpo-antigen la activación complementaria menos eficaz por medio de vías alternativas puede estar mediada por el fragmento F(ab)₂. Para confirmar la dependencia del complemento de eliminación de amiloide por anticuerpo antiSAP y para investigar el requerimiento potencial de la región Fc del anticuerpo, se probó el efecto del anticuerpo antiSAP F(ab)₂.

Protocolo y métodos.

Se indujo y se confirmó amiloidosis AA en ratones C57BL/6 de tipo salvaje precisamente como se describe en el ejemplo 1 anterior. Después de cargar los depósitos de amiloide con SAP humano según se detalla en el ejemplo 5, se trataron grupos de ratones con fracción IgG completa del antisero antiSAP humano policlonal de ovino (n = 8) o con el fragmento F(ab)₂ de la fracción IgG (n = 5) producido por digestión de pepsina a pH 4,0. La dosis de actividad de anticuerpo antiSAP inyectado era 7,28 mg por ratón que recibe F(ab)₂ y 7 mg (50 mg de IgG total como lo usual) por ratón que recibe IgG completo. Todos los ratones se sacrificaron 14 días después para estimar la carga de amiloide por tinción con rojo Congo.

Resultados.

La eliminación de depósitos de amiloide fue casi completa en ratones que recibieron anticuerpo IgG antiSAP, que tenían una puntuación media de amiloide en bazo (intervalo) de 10^0 (10^0 - 10^3), comparado con los depósitos de amiloide masivos en los ratones control con puntuación media de amiloide en bazo (intervalo) de 10^5 (10^4 - 10^5). Los ratones que recibieron F(ab)₂ tenían menos amiloide que los controles sin tratar, puntuación media 10^2 , intervalo 10^0 - 10^4 , pero aún era significativamente más que los ratones tratados con anticuerpo IgG antiSAP.

Discusión.

La dosis molar de anticuerpo F(ab)₂ antiSAP usada en este estudio era aproximadamente un tercio mayor que el anticuerpo IgG, dado el peso molecular más pequeño del fragmento F(ab)₂ comparado con IgG completo. El efecto de la eliminación de amiloide, sin embargo, era significativamente menor, demostrando que la mayor acción del anticuerpo antiSAP requiere la región Fc. Esto no es debido a la implicación directa del reconocimiento celular por receptores Fc(γ) ya que IgG era incluso menos eficaz en animales deficientes en complemento que F(ab)₂ en ratones suficientes en complemento. Es probable que la alta dosis de F(ab)₂ que se usó fuera capaz de activar algunos complementos por medio de la vía alternativa.

Ejemplo 8. Requerimientos de macrófagos.

Los estudios histológicos e histoquímicos descritos en la presente memoria muestran que las células que infiltran, rodean y fagocitan los depósitos de amiloide en ratones tratados con anticuerpo antiSAP son macrófagos. Para confirmar que realmente son responsables de la eliminación de amiloide, se probó el efecto del tratamiento antiSAP en ratones en los que la actividad de macrófagos se había inhibido por administración de clodronato liposomal. Los

reactivos, protocolo experimental y efectos de la función macrófaga de clodronato liposomal están bien establecidos y extensamente documentados.

Protocolo y métodos.

5 Después de inducción y confirmación de amiloidosis AA en ratones de tipo salvaje, usando precisamente el protocolo detallado en el ejemplo 1 anterior, todos los animales recibieron una única dosis intraperitoneal de 10 mg de SAP humano puro aislado para cargar sus depósitos de amiloide con SAP humano. Después el grupo de prueba (n = 13) recibió 0,3 ml de clodronato liposomal intraperitonealmente inmediatamente y los días 2, 7 y 14 días después. Un grupo control (n = 12) y el grupo de prueba recibió una única dosis intraperitoneal de 50 mg de la fracción IgG de antisuero antihumano SAP de ovino el día 3 después de la inyección de SAP humano. Un segundo grupo control (n = 12) no recibió antiSAP ni ningún otro tratamiento adicional. Todos los ratones se sacrificaron para estimar la carga de amiloide mediante tinción con rojo Congo 14 días después de la administración de antiSAP a los grupos de prueba y de control anticuerpo.

Resultados.

15 El tratamiento con antiSAP produjo casi eliminación completa de depósitos de amiloide comparado con el grupo que no recibió anticuerpo, siendo las puntuaciones medias (intervalo) en bazo 10^0 (0- 10^3), y 10^3 (10^3 - 10^4) respectivamente. En ratones que recibieron el clodronato liposomal en un régimen que se sabe que elimina completamente la función macrófaga, no hubo eliminación de depósitos de amiloide, siendo la puntuación de la carga de amiloide 10^5 (10^2 - 10^5).

Discusión.

20 Los resultados de este experimento confirmaron que la función macrófaga es esencial para la eliminación de depósitos de amiloide por anticuerpo antiSAP humano.

Conclusiones de los ejemplos 3-8.

25 La administración de anticuerpo antiSAP de manera repetida causa eliminación rápida y casi completa de depósitos de amiloide visceral en ratones amiloidóticos AA en los que SAP humano está presente en los depósitos de amiloide pero está ausente de la circulación, o bien a través de tratamiento de ratones transgénicos de SAP humano con CPHPC o bien por eliminación natural después de administración pasiva de SAP humano a ratones de tipo salvaje.

No hay efectos adversos clínicos o bioquímicos asociados.

30 A la inyección de anticuerpo antiSAP rápidamente le sigue infiltración intensa de los depósitos de amiloide por macrófagos que rodean y envuelven el amiloide, forma muchas células gigantes multinucleadas, y destruye los depósitos.

La degradación de amiloide es completa en 15 días y la histología normal se restaura en 21-25 días después de la administración de una única dosis de anticuerpo antiSAP.

La eliminación de amiloide requiere un sistema complementario intacto y es absolutamente dependiente de macrófagos.

35 Referencias

1. Pepys, M.B. (2006) Amyloidosis. *Annu. Rev. Med.*, 57:223-241.
2. Nelson, S.R., Lyon, M., Gallagher, J.T., Johnson, E.A. and Pepys, M.B. (1991) Isolation and characterization of the integral glycosaminoglycan constituents of human amyloid A and monoclonal light-chain amyloid fibrils. *Biochem. J.*, 275: 67-73.
- 40 3. Pepys, M.B., Dyck, R.F., de Beer, F.C., Skinner, M. and Cohen, A.S. (1979) Binding of serum amyloid P component (SAP) by amyloid fibrils. *Clin. Exp. Immunol.*, 38:284-293.
4. Pepys, M.B., Booth, D.R., Hutchinson, W.L., Gallimore, J.R., Collins, P.M. and Hohenester, E. (1997) Amyloid P component. A critical review. *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.*, 4:274-295.
- 45 5. Nelson, S.R., Tennent, G.A., Sethi, D., Gower, P.E., Ballardie, F.W., Amatayakul-Chantler, S. and Pepys, M.B. (1991) Serum amyloid P component in chronic renal failure and dialysis. *Clin. Chim. Acta*, 200: 191-200.
6. Hawkins, P.N., Wootton, R. and Pepys, M.B. (1990) Metabolic studies of radioiodinated serum amyloid P component in normal subjects and patients with systemic amyloidosis. *J. Clin. Invest.* 86: 1862-1869.
7. Pepys, M.B., Rademacher, T.W., Amatayakul-Chantler, S., Williams, P., Noble, G.E., Hutchinson, W.L. Hawkins, P.N., Nelson S.R. Gallimore, J.R., Herbert, J., Hutton, T. and Dwek, R.A. (1994) Human serum amyloid P

component is an invariant constituent of amyloid deposits and has a uniquely homogeneous glycostructure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 5602-5606.

8. Pepys, M.B. and Hawkins, P.N. (2003) Amyloidosis. In: *Oxford Textbook of Medicine, 4th Ed., Vol. 2* (Warrell, D.A., Cox, T.M., Furth, J.D. and Benz, E.J., Jr., eds.), Oxford University Press, Oxford, pp. 162-173.

5 9. Baltz, M.L., Caspi, D., Hind, C.R.K., Feinstein, A. and Pepys, M.B. (1986) Isolations and characterisation of amyloid enhancing factor. In: *Amyloidosis* (Glennner, G.G., Osserman E.F., Benditt, E.P., Calkins, E., Cohen, A.S. and Zucker-Franklin, D., eds.), Plenum Press, New York, pp. 115-121.

10 Wechalekar, A.D., Goodman, H.J.B., Lachmann, H.J., Offer, M., Hawkins, P.N. and Gillmore, J.D. (2007) Safety and efficacy of risk-adapted cyclophosphamide, thalidomide, and dexamethasone in systemic AL amyloidosis. *Blood*, 109: 457-464.

11. Hawkins, P.N. and Pepys, M.B. (1991) A primed state exists *in vivo* following regression of murine AA amyloidosis. In: *Amyloid and Amyloidosis 1990* (Natvig, J.B., Forre, O., Husby, G., Husebekk, A., Skogen, B., Sletten, K. and Westermark, P., eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 264-267.

12. Gillmore, J.D., Lovat, L.B., Persey, M.R., Pepys, M.B. and Hawkins, P.N. (2001) Amyloid load and clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein. *Lancet*, 358:24-29.

13. Botto, M., Hawkins, P.N., Bickerstaff, M.C.M., Herbert, J., Bygrave, A.E., McBride, A., Hutchinson, W.L., Tennent, G.A., Walport, M.J. and Pepys, M.B. (1997) Amyloid deposition is delayed in mice with targeted deletion of the serum amyloid P component gene. *Nature Med.*, 3:855-859.

14. Yamamura, K.I., Tashiro, F., Yi, S., Wakasugi, S., Araki, S., Maeda, S., and Shimada, K. (1993) Transgenic mouse model for human genetic disease. *Mol. Reprod. Dev.*, 36:248-250.

15 Gillmore, J.D., Hutchinson, W.L., Herbert, J., Bybee, A., Mitchell, D.A., Hasserjian, R.P., Yamamura, K., Suzuki, M., Sabin, C.A. and Pepys, M.B. (2004) Autoimmunity and glomerulonephritis in mice with targeted deletion of the serum amyloid P component gene: SAP deficiency or strain combination. *Immunology*, 112:255-264.

16. Pepys, M.B., Herbert, J., Hutchinson, W.L., Tennent, G.A., Lachmann, H.J., Gallimore, J.R., Lovat, L.B., Bartfai, T., Alamine, A., Hertel, C., Hoffmann, T., Jakob-Roetne, R., Norcross, R.D., Kemp, J.A., Yamamura, K., Suzuki, M., Taylor, G.W., Murray, S., Thompson, D., Purvis, A., Kolstoe, S., Wood, S.P. and Hawkins, P.N. (2002) Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. *Nature*, 417:254-259.

17. Pepys, M.B. Therapeutic agent. Pentraxin Therapeutics Limited, London (GB). US Patent N° US 7.045.499 B2, issued May 16, 2006.

18. Hawkins, P.N., Myers, M.J., Epenetos, A.A., Caspi, D., and Pepys, M.B. (1998) Specific localization and imaging of amyloid deposits *in vivo* using ¹²⁵I-labelled serum amyloid component. *J. Exp. Med.*, 167:903-913.

19. Puchtler, H., Sweat, F. and Levine, M. (1962) On the binding of Congo red by amyloid. *J. Histochem. Cytochem.*, 10:355-364.

20. Tennent, G.A., Dziadzio, M., Triantafyllidou, E., Davies, P., Gallimore, R., Denton, P. and Pepys, M.B., (In Press) Normal Circulating Serum Amyloid P Component.

21. Pepys, M.B. and Hawkins, P.N. (2001) Amyloidosis. In: *Samter's Immunologic Diseases, Sixth Ed., Vol. 1* (Austen, K.F., Frank, M.M., Atkinson, J.P. and Cantor, H., eds), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 401-412.

22. Van Rooijen N., Van Kesteren-Hendriks, E., 2002. Clodronate liposomes: perspectives in research and therapeutics. *J. Liposome Research*. vol 12. pp. 81-94.

Habiendo así descrito en detalle realizaciones preferentes de la presente invención, se entiende que la invención definida por los párrafos anteriores no está limitada a detalles particulares señalados en la descripción anterior ya que son posibles muchas variaciones aparentes del espíritu o ámbito de la presente invención. Varias modificaciones o variaciones de los métodos y sistema descritos en la invención serán aparentes para los expertos en la técnica sin separarse del ámbito y espíritu de la invención. Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas preferentes, se entiende que la invención según se reivindica no se debe limitar en exceso a tales realizaciones específicas. En realidad, varias modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvios para los expertos en la técnica en farmacología y biología molecular o campos relacionados se pretende que estén dentro del ámbito de las siguientes reivindicaciones.

50

R¹ es hidrógeno o halógeno;

X-Y-X' es un enlace opcionalmente sustituido que tiene de 4-20 átomos de carbono de cadena lineal o recta, donde

X es (CH₂)_n; -CH(R²)(CH₂)_n; CH₂O(CH₂)_n; CH₂NH-; bencil, -C(R²)=CH-; CH₂CH(OH)-; o tiazol-2,5-diil;

5 Y es -S-S-; -(CH₂)_n-; -O-; -NH-; -N(R²)-; -CH=CH-; -NHC(O)NH-; -N(R²)C(O)N(R²)-; -N[CH₂C₆H₃(OCH₃)₂]-; -N(CH₂C₆H₅)-; -N(CH₂C₆H₅)C(O)N(CH₂C₆H₅)-; N(alcoxilalquil)-; N(cicloalquil-metil)-; 2,6-piridil; 2,5-furanil; 2,5-tienil; 1,2-ciclohexil; 1,3-ciclohexil; 1,4-ciclohexil; 1,2-naftil; 1,4-naftil; 1,5-naftil; 1,6-naftil; bifenilen; o 1,2-fenilen, 1,3-fenilen y 1,4-fenilen, donde los grupos fenilen opcionalmente se sustituyen por sustituyentes 1-4, seleccionados de halógenos, alquilo más corto, alcoxi más corto, hidroxilo, carboxi, -COO-alquilo más corto, nitrilo, 5-tetrazol, (ácido 2-carboxílico pirrolidona-1-il)-2-oxo-etoxi, N-hidroxicarbamimiodil, 5-oxo[1,2,4oxadiazolil, 2-oxo[1,2,3,5]oxatiadiazolil, 5-tioxo[1,2,4]oxodiazolil y 5-terc-butilsulfanil-[1,2,4]oxodiazolil; y

10 X' es -(CH₂)_n-; -(CH₂)_nCH(R²)-; -(CH₂)_nOCH₂-; -NHCH₂-; benzil, -CH=C(R²)-; CH(OH)CH₂; o tiazol-2,5-diil;

R² es alquil inferior, alcoxi inferior o bencil y

15 n es 0-3,

o una sal o su mono o diéster farmacéuticamente aceptable, que disminuye el componente amiloide P del suero de la circulación y un anticuerpo específico para componente amiloide P del suero.

20 6. El kit según la reivindicación 5 para usar según la reivindicación 5, en el que dicho kit se formula para la administración simultáneamente separada o secuencial de la D-prolina y el anticuerpo específico para el componente amiloide P del suero.

7. Un compuesto y anticuerpo según la reivindicación 1, para uso simultáneo, simultáneo por separado o secuencial en el tratamiento o profilaxis de la enfermedad amiloide en el que la D-prolina es ácido (R)-1-[6-[(R)-2-carboxi-pirrolidina-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico (CPHPC) o una sal o su mono o diéster farmacéuticamente aceptable.

25 8. Un anticuerpo según la reivindicación 2, para usar en tratamiento o prevención de la enfermedad amiloide en un paciente al que previamente se ha administrado una D-prolina, en el que la D-prolina es ácido (R)-1-[6-[(R)-2-carboxi-pirrolidina-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico (CPHPC) o una sal o su mono o diéster farmacéuticamente aceptable.

30 9. Un compuesto según la reivindicación 3, para usar en el tratamiento o prevención de la enfermedad amiloide en un paciente al que previamente se ha administrado un anticuerpo específico para el componente amiloide P del suero, en el que la D-prolina es ácido (R)-1-[6-[(R)-2-carboxi-pirrolidina-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico (CPHPC) o una sal o su mono o diéster farmacéuticamente aceptable.

35 10. Un kit según la reivindicación 5 o reivindicación 6, para usar en el tratamiento de amiloidosis, en el que la D-prolina es ácido (R)-1-[6-[(R)-2-carboxi-pirrolidina-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico (CPHPC) o una sal o su mono o diéster farmacéuticamente aceptable.

11. Un compuesto y anticuerpo según la reivindicación 1, para usar según la reivindicación 1, en el que el enlace X-Y-X' tiene de 5-8 átomos de carbono.

12. Un compuesto según la reivindicación 2, para usar según la reivindicación 2, en el que el enlace X-Y-X' tiene de 5-8 átomos de carbono.

40 13. Un compuesto según la reivindicación 3, para usar en tratamiento o prevención de la enfermedad amiloide en un paciente que a partir de ahí se le ha administrado un anticuerpo específico para el componente amiloide P del suero, en el que el enlace X-Y-X' tiene de 5-8 átomos de carbono.

14. Un kit según la reivindicación 5 o reivindicación 6, para usar según la reivindicación 5 o reivindicación 6, en el que el enlace X-Y-X' tiene de 5-8 átomos de carbono.

45

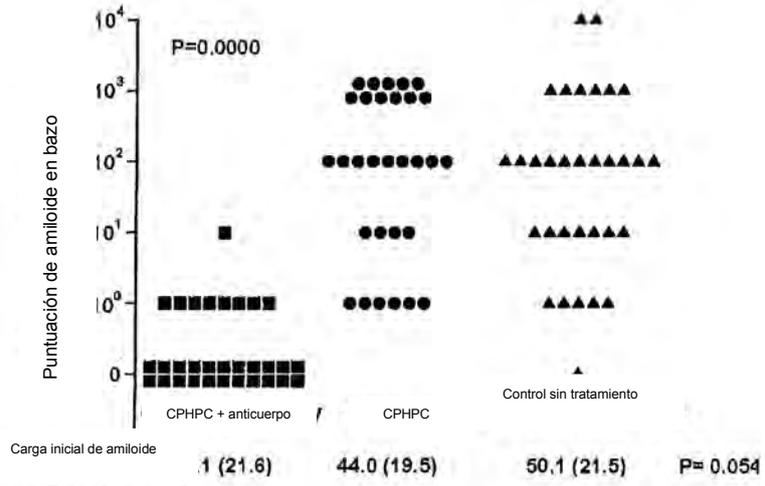


Figura 1

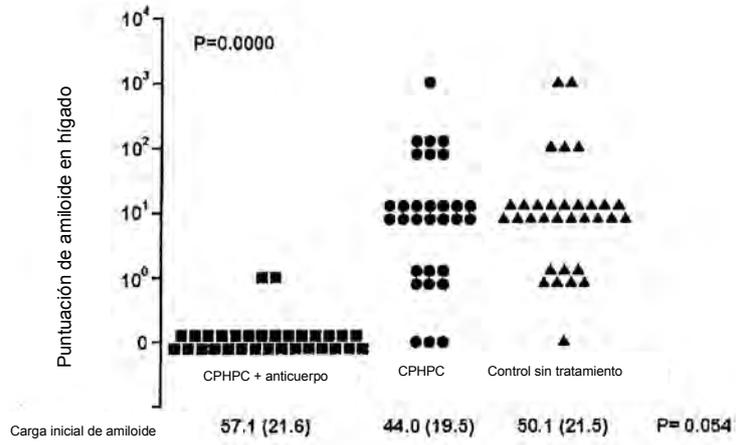


Figura 2

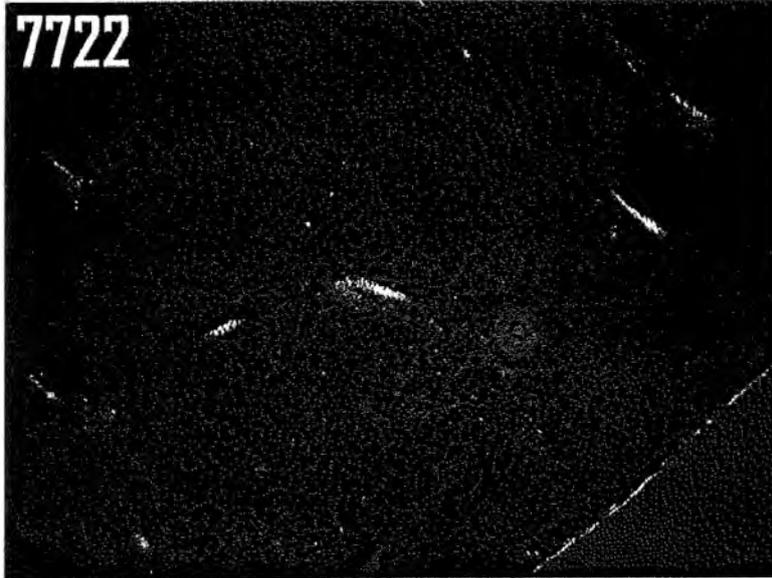


FIGURE 3A

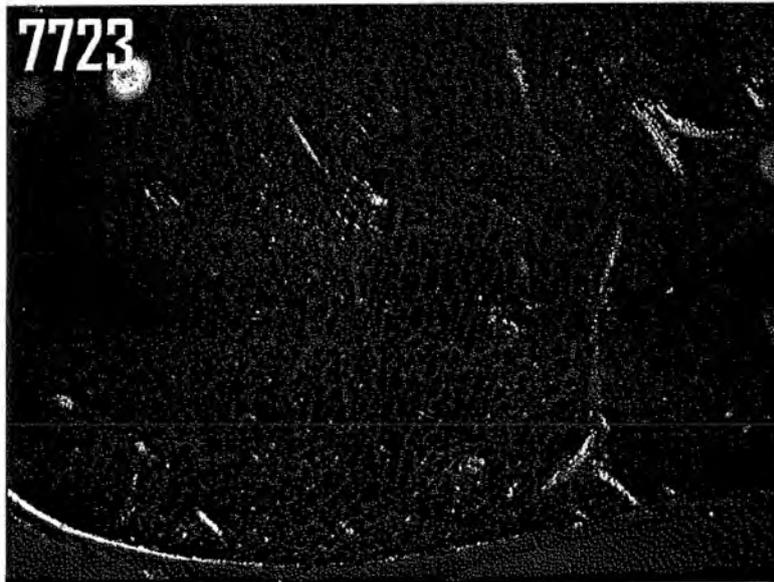


FIGURE 3B



FIGURA 3C



FIGURA 3D

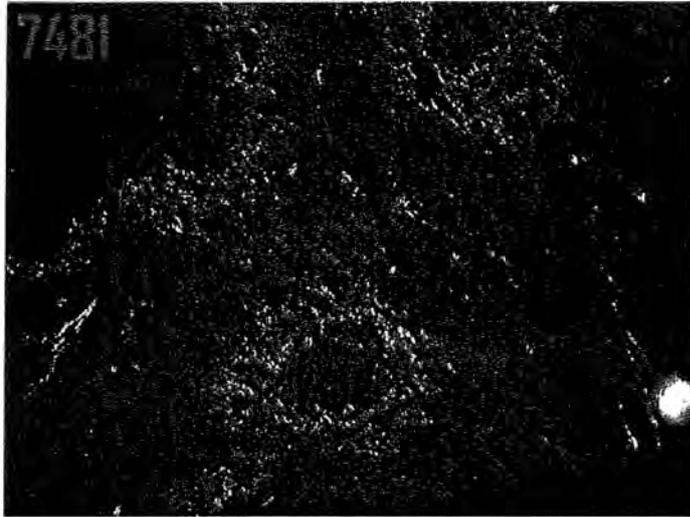


FIGURA 3E

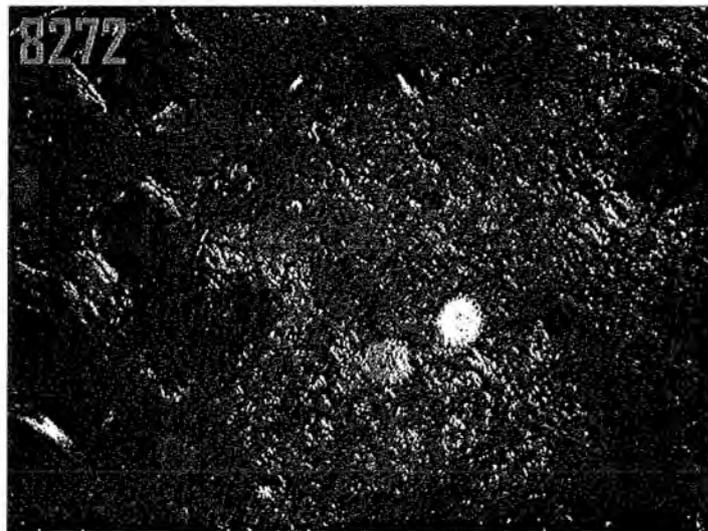


FIGURA 3F



FIGURA 3G



FIGURA 3I



FIGURA 3J



FIGURA 3K

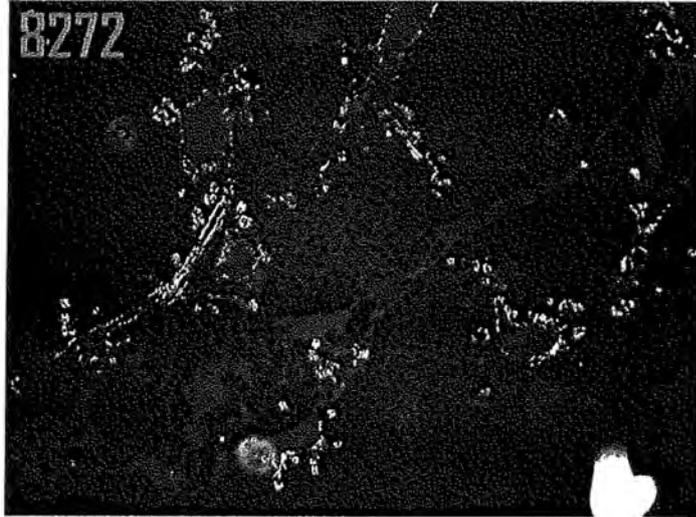


FIGURA 3L

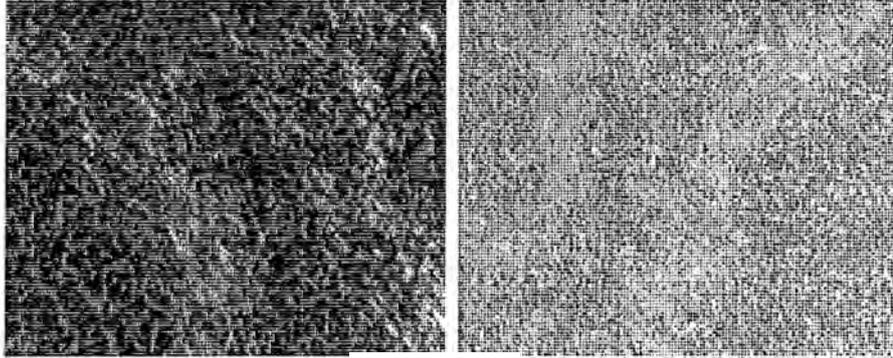


FIGURA 4A

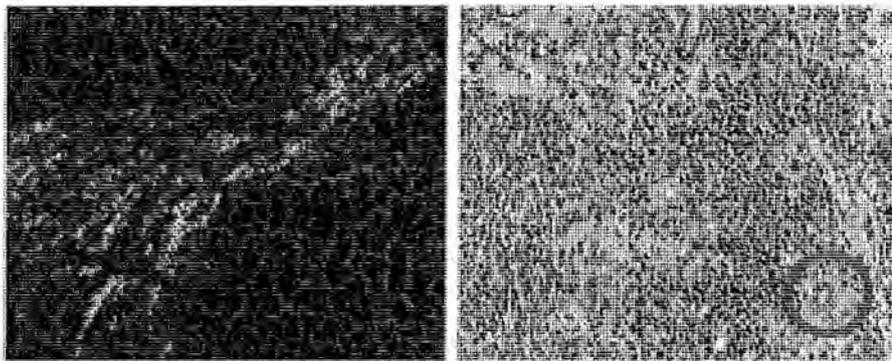


FIGURA 4B

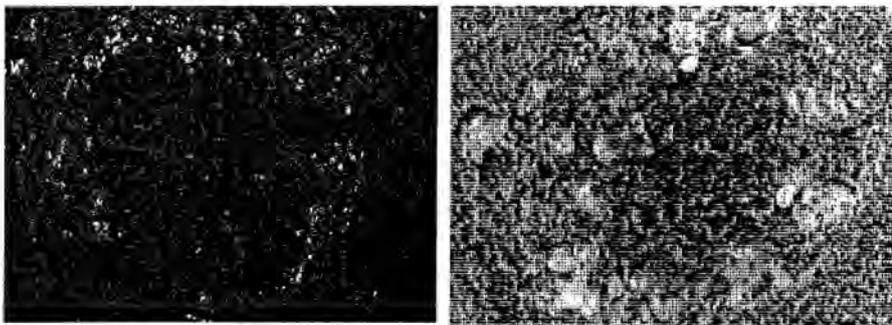


FIGURA 4C

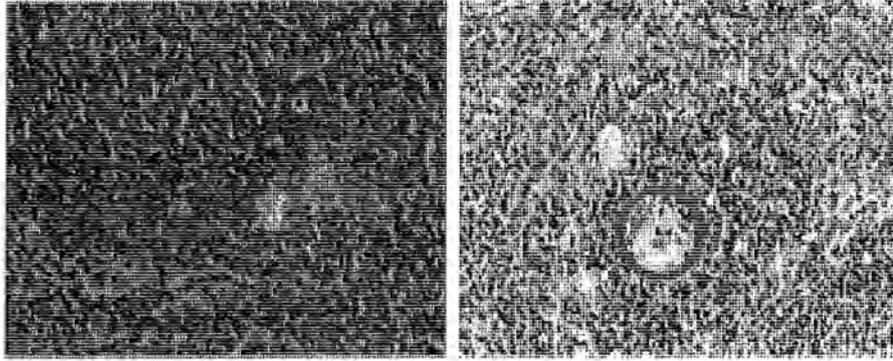


FIGURA 4D

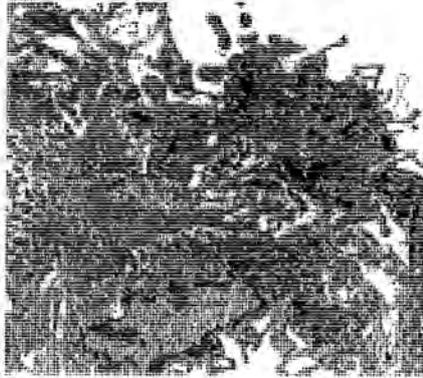


FIGURA 5A



FIGURA 5B



FIGURA 5C

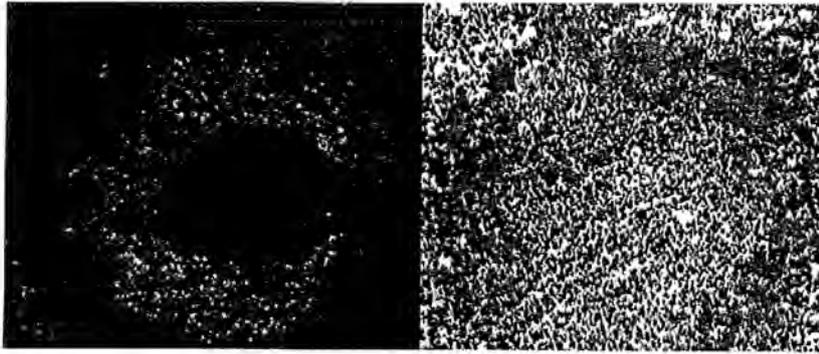


FIGURA 6A

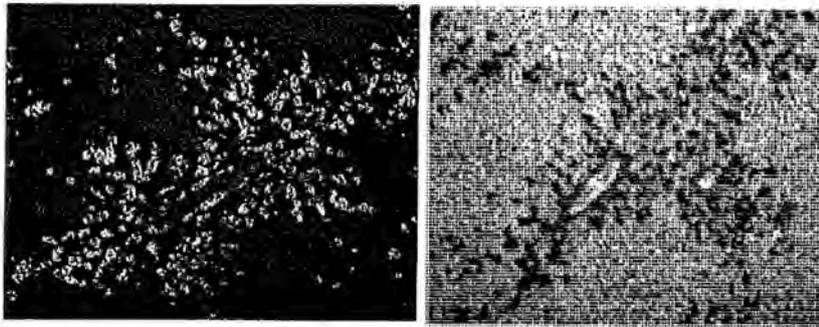


FIGURA 6B

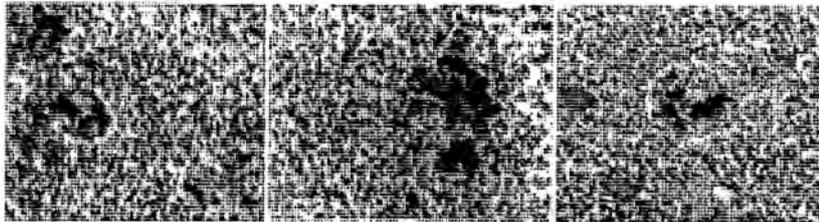


FIGURA 6C

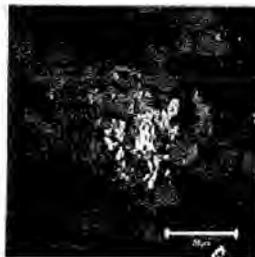


FIGURA 6D

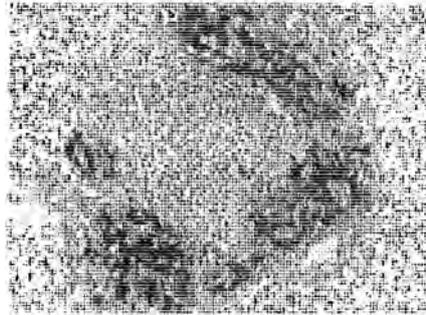


FIGURA 7