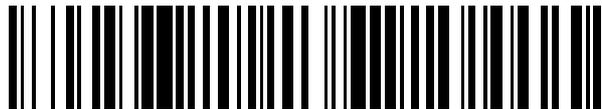


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 788**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.10.2008 PCT/US2008/011491**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2009 WO09048537**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2008 E 08836966 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2205631**

54 Título: **Métodos y composiciones para el diagnóstico y tratamiento de la amiloidosis**

30 Prioridad:

05.10.2007 US 960616 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.05.2017

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (50.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, US y
AC IMMUNE S.A. (50.0%)

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 612 788 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

Métodos y composiciones para el diagnóstico y tratamiento de la amiloidosis

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos y composiciones para el diagnóstico y tratamiento de la amiloidosis, un grupo de trastornos y anomalías asociadas con la proteína amiloide como la enfermedad de Alzheimer.

10 La amiloidosis no es una sola entidad de enfermedad, sino un grupo diverso de procesos de enfermedad progresiva caracterizados por depósitos tisulares extracelulares de una proteína cerosa similar al almidón llamada amiloide, que se acumula en uno o más órganos o sistemas corporales. A medida que los depósitos se acumulan, empiezan a interferir con la función normal del órgano o sistema corporal. Existen al menos 15 tipos diferentes de amiloidosis. Las formas principales son amiloidosis primaria sin antecedente conocido, amiloidosis secundaria seguido de alguna otra afección, y amiloidosis hereditaria.

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

15 Los depósitos de amiloide incluyen el componente amiloide P (pentagonal), una glicoproteína relacionada con el amiloide P del suero normal (SAP), y glicosaminoglicanos sulfatados (GAG), carbohidratos complejos del tejido conectivo. Las fibrillas de la proteína amiloide, que representan aproximadamente el 90% del material amiloide, comprenden uno de varios tipos diferentes de proteínas. Estas proteínas son capaces de plegarse en lo que se llaman fibrillas en láminas "beta-plegadas", una configuración proteica única que exhibe sitios de unión para el rojo Congo dando como resultado la única propiedad de tinción de la proteína amiloide.

20 Muchas enfermedades del envejecimiento están basadas en o asociadas con proteínas del tipo amiloide y se caracterizan, en parte, por el aumento progresivo de depósitos extracelulares de amiloide o material del tipo amiloide que contribuye a la patogénesis, así como a la progresión de la enfermedad. Estas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos como la enfermedad de Alzheimer (AD), la demencia con cuerpos de Lewy (LBD), síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandés), y complejo parkinsonismo-demencia de Guam. Otras enfermedades que están basadas en o asociadas con proteínas del tipo amiloide son parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia asociada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), Diabetes de Inicio en Adultos, amiloidosis cardiaca senil, tumores endocrinos, y otras enfermedades, incluyendo enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionadas con amiloide-beta en los tejidos del sistema visual, como degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como el córtex visual que da lugar a deficiencias visuales corticales, la cámara anterior y el nervio óptico dando lugar al glaucoma, el lente dando lugar a catarata debida a la deposición de beta-amiloide, el vítreo dando lugar a amiloidosis ocular, la retina dando lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular asociada con la edad, el nervio óptico dando lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica, y la córnea dando lugar a distrofia reticular.

25 Aunque la patogénesis de estas enfermedades puede ser diversa, sus depósitos característicos contienen frecuentemente muchos constituyentes moleculares compartidos. En un grado significativo, esto se puede atribuir a la activación local de vías pro-inflamatorias dando lugar de este modo a la deposición simultánea de componentes del complemento activados, reactantes de fase aguda, moduladores inmunes, y otros mediadores inflamatorios (McGeer et al., 1994).

30 La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurológico que fundamentalmente se creía causado por placas de amiloide, una acumulación de depósitos anómalos de proteínas en el cerebro. El tipo más frecuente de amiloide encontrado en el cerebro de individuos afectados se compone fundamentalmente de fibrillas A β . La evidencia científica demuestra que un incremento en la producción y acumulación de proteína beta-amiloide en placas da lugar a la muerte de la célula nerviosa, lo que contribuye al desarrollo y progresión de la AD. La pérdida de células nerviosas en áreas estratégicas del cerebro, causa sucesivamente reducción en los neurotransmisores y deterioro de la memoria. Las proteínas principalmente responsables para la construcción de la placa incluyen proteína precursora de amiloide (APP) y dos presenilinas (presenilina I y presenilina II). La escisión secuencial de la proteína precursora de amiloide (APP), que se expresa constitutivamente y se cataboliza en la mayoría de las células, por las enzimas secretasas β y γ da lugar a la liberación de un péptido A β de 39 a 43 aminoácidos. La degradación de APPs aumenta probablemente su propensión a agregarse en placas. Es especialmente el fragmento A β (1-42) el que tiene una propensión alta de construir agregados debido a dos aminoácidos muy hidrofóbicos en su extremo C-terminal.

35 El fragmento A β (1-42) se cree por lo tanto que está principalmente implicado y es responsable de la iniciación de la formación de la placa neurítica en la AD y tener, por lo tanto, un alto potencial patológico. Por lo tanto, existe la necesidad de agentes que prevengan la formación de placas de amiloide y que dispersen las placas existentes en la AD.

Los síntomas de la AD se manifiestan lentamente y el primer síntoma sólo puede ser leve olvido. En esta etapa, los individuos pueden olvidar eventos recientes, actividades, los nombres de personas o cosas conocidas y pueden no ser capaces de resolver problemas de matemáticas sencillos. A medida que la enfermedad progresa, los síntomas se notan más fácilmente y se vuelven suficiente serios para hacer que las personas con AD o sus familiares busquen ayuda médica. Los síntomas de la etapa media de la AD incluyen olvidar cómo hacer tareas sencillas como aseo, y problemas desarrollados con el habla, comprensión, lectura, o escritura. Los pacientes en la etapa avanzada pueden volverse ansiosos o agresivos, pueden alejarse de casa y finalmente necesitar atención total.

Actualmente, la única forma definitiva de diagnosticar la AD es identificar placas y entramados en tejido cerebral en una autopsia después de la muerte del individuo. Por lo tanto, los médicos solamente pueden hacer un diagnóstico de AD "posible" o "probable" mientras la persona sigue viva. Usando métodos actuales, los médicos pueden diagnosticar la AD de manera correcta hasta un 90% de las veces usando varias herramientas para diagnosticar AD "probable". Los médicos hacen preguntas acerca de la salud general de la persona, problemas médicos anteriores, y la historia de cualquier dificultad que tenga la persona para llevar a cabo actividades diarias. Las pruebas de comportamiento de la memoria, resolución de problemas, atención, cálculo, y lenguaje proporcionan información sobre la degeneración cognitiva y pruebas médicas como pruebas de sangre, orina, o líquido cefalorraquídeo, y escáneres cerebrales pueden proporcionar más información.

El manejo de la AD consiste en tratamientos basados en medicamentos y no basados en medicamentos. Los tratamientos destinados a cambiar el curso subyacente de la enfermedad (retrasar o revertir la progresión) no han tenido en gran medida éxito hasta ahora. Los medicamentos que restauran la deficiencia (defecto), o mal funcionamiento, en los mensajeros químicos de las células nerviosas (neurotransmisores), en particular los inhibidores de la colinesterasa (ChEIs) como tacrina y rivastigmina, se ha visto que mejoran los síntomas. Los ChEIs impiden la degradación enzimática de neurotransmisores aumentando por lo tanto la cantidad de mensajeros químicos disponibles para transmitir la señal nerviosa en el cerebro.

Para algunas personas en las etapas temprana y media de la enfermedad, los fármacos tacrina (COGNEX[®], Morris Plains, NJ), donepezilo (ARICEPT[®], Tokio, JP), rivastigmina (EXELON[®], East Hanover, NJ), o galantamina (REMINYL[®], New Brunswick, NJ) pueden ayudar a prevenir que algunos síntomas empeoren durante un tiempo limitado. Otro fármaco, memantina (NAMENDA[®], New York, NY) ha sido aprobado para tratamiento de la AD de moderada a severa. Los medicamentos también están disponibles para tratar las manifestaciones psiquiátricas de la AD. Además, algunos medicamentos pueden ayudar a controlar los síntomas de comportamiento de la AD como insomnio, agitación, vagabundeo, ansiedad y depresión. El tratamiento de estos síntomas hace a menudo que los pacientes se sientan más cómodos y facilite su cuidado para los cuidadores. Desafortunadamente, a pesar de los avances significativos en el tratamiento que muestran que esta clase de agentes es consistentemente mejor que un placebo, la enfermedad continua progresando, y el efecto promedio en el funcionamiento mental ha sido sólo modesto. Muchos de los fármacos usados en la medicación de la AD como ChEIs también tiene efectos secundarios que incluyen disfunción gastrointestinal, toxicidad hepática y pérdida de peso.

Las deficiencias visuales corticales se asocian a menudo con la AD, a pesar del hallazgo negativo de agudeza visual deteriorada o enfermedad ocular. La evidencia post-mortem de pacientes con AD ha mostrado cambios patológicos en las estructuras visuales pre-corticales y una reducción en las fibras nerviosas ópticas.

La disfunción de procesamiento visual en la AD se asocia también con cambios neurológicos y patología dentro de la vía ventral, que se extiende desde la retina con las células ganglionares P a través de las capas parvocelulares del núcleo geniculado lateral (LGN), llegando al córtex inferotemporal (IT) y la vía dorsal que se extiende desde la retina con las células ganglionares M a través de las capas magnocelulares del LGN, llegando al córtex temporal medio. Las placas seniles de los pacientes de AD crean anomalías y disfunciones dentro de estas regiones corticales. Las placas seniles también causan una pérdida en las tareas de percepción visual, como una disfunción en el reconocimiento facial de gente conocida, una afección conocida como prosopagnosia.

Otras enfermedades que están basadas o asociadas con la acumulación y depósito de proteína del tipo amiloide tienen deterioro cognitivo leve, demencia con cuerpos de Lewy (LBD), síndrome de Down (trisomía 21), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), miositis del cuerpo de inclusión (IBM), y enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con el amiloide-beta en los tejidos del sistema visual, como degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden ocurrir en diferentes tejidos del ojo, como el córtex visual dando lugar a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico dando lugar a glaucoma; el cristalino dando lugar a catarata debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo dando lugar a amiloidosis ocular; la retina dando lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico dando lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea dando lugar a distrofia reticular.

El defecto cognitivo leve (MCI) es un término general más comúnmente definido como un trastorno de la memoria sutil pero medible. Una persona con MCI experimenta mayores problemas de memoria que se esperan normalmente con el envejecimiento, pero no presentan otros síntomas de demencia, como juicio o razonamiento deteriorados. MCI es un trastorno que refleja frecuentemente una etapa preclínica de la AD.

La deposición de β -amiloide dentro del córtex entorrinal (EC) se cree que juega un papel clave en el desarrollo del defecto cognitivo leve (MCI) en la tercera edad. Esto está en línea con la observación de que los niveles de CSF-A $A\beta(1-42)$ disminuyen significativamente una vez que la AD se manifiesta clínicamente. En contraste con los niveles de CSF- $A\beta(1-42)$ CSF-tau están significativamente aumentados en la etapa MCI. Estos valores continúan estando elevados a partir de ahí, indicando que los niveles aumentados de CSF-tau pueden ayudar a detectar sujetos MCI que se prevé que desarrollen AD.

La demencia con cuerpos de Lewy (LBD) es un trastorno neurodegenerativo que puede ocurrir en personas mayores de 65 años de edad, que causa normalmente síntomas de deterioro cognitivo (pensamiento) y cambios de comportamiento anómalos. Los síntomas pueden incluir deterioro cognitivo, signos neurológicos, trastorno del sueño, y fallo de autonomía. El deterioro cognitivo es la característica de presentación de LBD en la mayoría de los casos. Los pacientes tienen episodios recurrentes de confusión que empeoran progresivamente. La fluctuación de la capacidad cognitiva se asocia frecuentemente con grados cambiantes de atención y alerta. El deterioro cognitivo y las fluctuaciones de pensamiento pueden variar en minutos, horas o días.

Los cuerpos de Lewy se forman a partir de proteínas neurofilamentosas fosforiladas y no fosforiladas; contienen la proteína sináptica alfa-sinucleína así como ubiquitina, que está involucrada en la eliminación de proteínas dañadas o anómalas. Además de los cuerpos de Lewy, también pueden estar presentes las neuritas de Lewy, que son cuerpos de inclusión en los procesos celulares de las células nerviosas. Pueden formarse placas de amiloide en los cerebros de pacientes aquejados de LBD. Sin embargo, tienden a ser menores en número que en pacientes con enfermedad de Alzheimer. Los entramados neurofibrilares, la otra marca distintiva micropatológica de AD, no son una característica principal de la AD pero frecuentemente están presentes además de las placas de amiloide.

El Síndrome de Down (DS), o trisomía 21, es un trastorno genético causado por la presencia de todo o parte de un cromosoma 21 adicional y se asocia a menudo con algún deterioro de la capacidad cognitiva y el crecimiento físico. DS se caracteriza por envejecimiento prematuro: la mayoría de los individuos afectados por la enfermedad desarrollan enfermedad de Alzheimer en su quinta década, que incluyen depósitos de la proteína formadora de placa amiloide-beta que a menudo son más graves que en la mayoría de los otros pacientes con Alzheimer. Además, muchas personas con DS desarrollan cataratas que comienzan en la infancia y muchas sufren glaucoma congénito. En humanos, el gen de la proteína precursora amiloide, que es escindida a la forma amiloide-beta, se localiza en el cromosoma 21. En individuos afectados de DS, tanto la beta-amiloide soluble como la intracelular se acumulan antes que la beta-amiloide extracelular, responsable de la formación de placas seniles. Aumentos en los niveles de beta-amiloide en el Síndrome de Down pueden reflejar el aumento de expresión y niveles de proteína de la enzima 2 de escisión de la proteína precursora beta-amiloide en el cromosoma 21.

La esclerosis lateral amiotrófica (ALS) se caracteriza por degeneración de las neuronas motoras superiores e inferiores. En algunos pacientes con ALS puede estar presente la demencia o afasia (ALS-D). La demencia es más comúnmente una demencia fronto-temporal (FTD), y muchos de estos casos tienen inclusiones ubiquitina-positivas, tau-negativas en neuronas del giro dentado y capas superficiales de los lóbulos frontal y temporal.

La miositis de cuerpos de inclusión (IBM) es una enfermedad incapacitante comúnmente encontrada en personas mayores de 50 años, en las cuales las fibras musculares desarrollan inflamación y comienzan a atrofiarse, pero en las cuales el cerebro se conserva y los pacientes conservan su intelecto completo. Se encontró que dos enzimas implicadas en la producción de proteína amiloide- β aumentaban dentro de las células musculares de pacientes con esta enfermedad muscular progresiva más común, en la que la amiloide- β también aumentaba.

Otra enfermedad que se basa o se asocia con la acumulación y el depósito de proteína del tipo amiloide es la degeneración macular.

La degeneración macular es una enfermedad ocular común que causa el deterioro de la mácula, que es el área central de la retina (el tejido fino como el papel en la parte posterior del ojo donde las células sensibles a la luz envían señales visuales al cerebro). La visión aguda, clara, fija al frente es procesada por la mácula. El daño de la mácula da como resultado el desarrollo de puntos ciegos y visión borrosa o distorsionada. La degeneración macular asociada con la edad (AMD) es una de las principales causas de discapacidad visual en los Estados Unidos y para personas mayores de 65 años es la principal causa de ceguera legal entre los caucásicos. Aproximadamente 1,8 millones de estadounidenses de 40 años o más tienen AMD avanzada, y otros 7,3 millones de personas con AMD intermedia corren un riesgo sustancial de pérdida de visión. El gobierno estima que en el 2020 habrá 2,9 millones de personas con AMD avanzada. Los afectados de AMD a menudo se sorprenden y se sienten frustrados al descubrir qué poco se sabe sobre las causas y el tratamiento de esta afección de ceguera.

Existen dos formas de degeneración macular: degeneración macular seca y degeneración macular húmeda. La forma seca, en la que las células de la mácula comienzan lentamente a descomponerse, se diagnostica en el 85 por ciento de los casos de degeneración macular. En la AMD seca suelen estar afectados ambos ojos, aunque un ojo puede perder la visión mientras que el otro ojo permanece intacto. Las drusas, que son depósitos amarillos debajo de la retina, son signos tempranos comunes de AMD seca. El riesgo de desarrollar AMD seca o AMD húmeda aumenta a medida que aumenta el número o el tamaño de las drusas. Es posible que la AMD seca avance y cause pérdida de visión sin convertirse en la forma húmeda de la enfermedad; sin embargo, también es posible que la

AMD seca en etapas tempranas cambie repentinamente a la forma húmeda.

La forma húmeda, aunque solo representa el 15 por ciento de los casos, da como resultado el 90 por ciento de la ceguera, y se considera AMD avanzada (no hay etapa temprana o intermedia de AMD húmeda). La AMD húmeda está siempre precedida por la forma seca de la enfermedad. A medida que la forma seca empeora, algunas personas comienzan a tener vasos sanguíneos anómalos creciendo detrás de la mácula. Estos vasos son muy frágiles y tienen fugas de líquido y sangre (de ahí degeneración macular "húmeda"), causando daño rápido a la mácula.

La forma seca de AMD causará inicialmente a menudo una visión ligeramente borrosa. El centro de visión en particular puede volverse después borroso y esta región se hace más grande a medida que la enfermedad progresa. Se pueden notar síntomas si solo se afecta un ojo. En AMD húmeda, las líneas rectas pueden aparecer onduladas y puede ocurrir rápidamente la pérdida de visión central.

El diagnóstico de la degeneración macular normalmente implica un examen de ojo dilatado, una prueba de agudeza visual, y una visión del fondo de ojo usando un procedimiento llamado fundoscopia para ayudar a diagnosticar la AMD, y si se sospecha una AMD húmeda, también se puede realizar angiografía con fluoresceína. Si la AMD seca alcanza las etapas avanzadas, no hay tratamiento actual para prevenir la pérdida de visión. Sin embargo, una fórmula específica de alta dosis de antioxidantes y zinc puede retrasar o prevenir que la AMD intermedia progrese a la etapa avanzada. Macugen® (inyección de pegaptanib de sodio), fotocoagulación láser y terapia fotodinámica pueden controlar el crecimiento anómalo de los vasos sanguíneos y el sangrado en la mácula, lo que es útil para algunas personas que tienen AMD húmeda; sin embargo, la visión que ya está perdida no se restaurará por estas técnicas. Si ya se pierde la visión, existen ayudas para visión reducida que pueden ayudar a mejorar la calidad de vida.

Uno de los primeros signos de la degeneración macular asociada con la edad (AMD) es la acumulación de depósitos extracelulares conocidos como drusas entre la lámina basal del epitelio pigmentado retiniano (RPE) y la membrana de Bruch (BM). Estudios recientes realizados por Anderson et al. han confirmado que las drusas contienen amiloide beta. (Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256).

La investigación en curso continua con estudios que exploran factores ambientales, genéticos y dietéticos que pueden contribuir a la AMD. También se están explorando nuevas estrategias de tratamiento, como los trasplantes de células de retina, fármacos que prevengan o frenen el progreso de la enfermedad, radioterapia, terapias génicas, un chip informático implantado en la retina que pueda ayudar a estimular la visión y agentes que prevengan el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos bajo la mácula.

Un factor importante a considerar cuando se desarrollan nuevos fármacos es la facilidad de uso para los pacientes objetivo. La administración oral de fármacos, específicamente comprimidos, cápsulas y cápsula de gel, representa el 70% de todas las formas de dosificación consumidas a causa de conveniencia del paciente. Los desarrolladores de fármacos coinciden en que los pacientes prefieren la administración oral en lugar de someterse a inyecciones u otras formas más invasivas de administración de medicamentos. También son preferidas formulaciones que dan como resultado intervalos de dosificación bajos (es decir, una vez al día o liberación sostenida). La facilidad de administrar antibióticos en formas de dosificación oral da como resultado un aumento de la conformidad del paciente durante el tratamiento.

Lo que se necesita son métodos y composiciones eficaces para prevenir o tratar las complicaciones asociadas con la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placa amiloide que incluye amiloidosis secundaria y amiloidosis asociada con la edad que incluye, pero no se limita a, trastornos neurológicos como la enfermedad de Alzheimer (AD), demencia con cuerpos de Lewy (LBD), síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo parkinsonismo-demencia de Guam, así como otras enfermedades que están basadas o asociadas con proteínas tipo amiloide como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia asociada con el VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), Diabetes de Inicio en Adultos, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos y otras enfermedades, que incluyen enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociados con anomalías/cambios patológicos relacionados con amiloide-beta en los tejidos del sistema visual, como degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como la corteza visual que da lugar a deficiencia visual cortical; la cámara anterior y el nervio óptico que dan lugar al glaucoma; el cristalino que da lugar a catarata debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo que da lugar a la amiloidosis ocular; la retina que da lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico que da lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea que da lugar a distrofia reticular. En particular, lo que se necesita son agentes capaces de contrarrestar las manifestaciones fisiológicas de la enfermedad como la formación de placas asociadas con la agregación de fibras de amiloide o péptido tipo amiloide.

Se informó que los anticuerpos anti-amiloide obtenidos mediante la inoculación de A β ₁₋₄₂ mezclado con adyuvante completo o incompleto de Freund redujeron la carga amiloide en ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer humana (Schenk et al., 1999). La inoculación intraperitoneal de A β ₁₋₁₆ tetrapalmitoilado reconstituido en

liposomas a ratones transgénicos NORBA provocó títulos significativos de anticuerpos anti-amiloide, que se informaron que solubilizaban fibras y placas de amiloide *in vitro* e *in vivo*. (Nicolau et al., 2002).

Un mecanismo posible mediante el cual se produjo la disolución de placas y fibras amiloides fue sugerido por primera vez por Bard et al., (2000), quien concluyó que los anticuerpos opsonizaron las placas, que posteriormente fueron destruidas por los macrófagos de la microglía. De Mattos et al., (2001) indicó que un anticuerpo monoclonal (mAb) dirigido frente al dominio central de β -amiloide era capaz de unirse y secuestrar completamente la amiloide plasmática. Argumentaron que la presencia de estos anticuerpos monoclonales en circulación desplazó el equilibrio de $A\beta$ entre el cerebro y el plasma, favoreciendo el aclaramiento y catabolismo periférico en lugar de la deposición dentro del cerebro.

La terapia humana prolongada con anticuerpos de roedor puede dar como resultado una respuesta de antiglobulina que es detectable a los 8-12 días después de la administración y alcanza un pico en aproximadamente 20-30 días. Si se obtiene tal respuesta de antiglobulina, el tratamiento debe interrumpirse después de no más de aproximadamente 10 días y se descarta normalmente el re-tratamiento en una fecha posterior porque daría lugar al comienzo rápido de una respuesta de antiglobulina secundaria. Aunque los anticuerpos de roedor comparten un grado considerable de conservación de secuencia con la de los anticuerpos humanos, existen muchas diferencias de secuencia entre anticuerpos de roedores y humanos para que los anticuerpos de roedor sean inmunogénicos en humanos.

Este problema se puede superar generando anticuerpos directamente en humanos o mediante la creación de anticuerpos "humanizados" (también conocidos como "remodelados"). Los anticuerpos humanizados tienen una secuencia de aminoácidos de región variable que contiene las CDRs derivadas de roedor intercaladas dentro de las secuencias estructurales humanas o de tipo humano. Dado que la especificidad del anticuerpo humanizado es proporcionada por las CDRs derivadas de roedor, se deben utilizar sus residuos esencialmente sin cambios estando permitidas solo modificaciones menores, que no interfieran significativamente con la afinidad y especificidad del anticuerpo para su antígeno objetivo. Los residuos estructurales se pueden derivar de cualquier primate o, particularmente, de cualquier región variable humana o pueden ser una combinación de los mismos y la región variable diseñada resultante se consideraría remodelada.

Para maximizar la probabilidad de que se mantenga la afinidad en el anticuerpo remodelado es importante hacer una apropiada selección de la región estructural. Se sabe que las secuencias estructurales sirven para mantener las CDR en su orientación espacial correcta para la interacción con el antígeno, y que los residuos estructurales a veces pueden incluso participar en la unión del antígeno. Con el fin de mantener la afinidad del anticuerpo con su antígeno, es ventajoso seleccionar secuencias estructurales humanas que son más similares a las secuencias de las estructuras de roedor. Puede entonces ser necesario sustituir uno o más aminoácidos en la secuencia estructural humana con el residuo correspondiente en la estructura de roedor para evitar pérdidas de afinidad. Esta sustitución se puede apoyar por modelado informático.

La presente invención proporciona nuevos métodos y composiciones que comprenden anticuerpos altamente específicos y altamente eficaces, particularmente anticuerpos quiméricos incluyendo fragmentos de los mismos, más particularmente anticuerpos parcial o completamente humanizados incluyendo fragmentos de los mismos, que tienen la capacidad de reconocer y unirse específicamente a epítopos específicos de una gama de antígenos β -amiloides, que pueden presentarse al anticuerpo en forma monomérica, dimérica, trimérica, etc., en una forma polimérica, en forma de un agregado, fibras, filamentos o en la forma condensada de una placa. Los anticuerpos habilitados por la enseñanza de la presente invención son particularmente útiles para el tratamiento de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placa amiloide que incluyen amiloidosis secundaria y amiloidosis asociada con la edad incluyendo, pero no se limitan a, trastornos neurológicos como la enfermedad de Alzheimer (AD), demencia de cuerpos de Lewy (LBD), síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo parkinsonismo-demencia de Guam, así como otras enfermedades que están basadas o asociadas con proteínas tipo amiloide como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeldt Jacob, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis tipo holandés, enfermedad de Parkinson, demencia asociada con el VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio en adultos; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos y otras enfermedades, que incluyen enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociados con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, como degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como la corteza visual que da lugar a deficiencia visual cortical; la cámara anterior y el nervio óptico que dan lugar al glaucoma; el cristalino que da lugar a catarata debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo que da lugar a amiloidosis ocular; la retina que da lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico que da lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea que da lugar a distrofia reticular.

El documento WO 2006/039327 (Mreck & Co, Inc) describe los anticuerpos 3D6 y 10D5 incluyendo variantes humanizadas de los mismos para usar en el tratamiento y profilaxis de enfermedades amiloidogénicas del ojo o nervio óptico mediante la reducción de depósitos de amiloide ópticos.

Compendio de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones representadas por las siguientes realizaciones:

La presente invención se refiere en una primera realización a un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos un sitio de unión distinto en la proteína beta-amiloide, para usar en la prevención, tratamiento o alivio de los efectos de una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta-amiloide en los tejidos del sistema visual seleccionados entre deficiencias visuales corticales, glaucoma, neuritis óptica, amiloidosis ocular, y distrofia reticular en un sujeto, particularmente un mamífero o un ser humano, en donde el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprende:

- (a) una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SED ID NO: 12; y
- (b) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SED ID NO: 15.

La invención se refiere además al anticuerpo humanizado o fragmento del mismo para usar según la primera realización como se describió anteriormente, en donde la prevención, tratamiento o alivio de dicha enfermedad ocular

- (i) reduce la carga de placa en la capa de células ganglionares retinianas de dichos sujetos;
- (ii) reduce la cantidad de placas en la capa de células ganglionares retinianas de dicho sujeto;
- (iii) disminuye la cantidad total de beta-amiloide soluble en la capa de células ganglionares retinianas de dicho sujeto; o
- (iv) conserva o disminuye la presión ocular en los ojos de dicho sujeto.

En una realización específica de la invención, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo como se describió anteriormente es para usar en prevención, tratamiento o alivio de los efectos del glaucoma, particularmente en donde el glaucoma se selecciona del grupo que consiste en glaucoma de ángulo abierto crónico (COAG), glaucoma de ángulo cerrado agudo (AACG), glaucoma de mecanismo mixto o combinado, glaucoma de tensión normal, glaucoma congénito, glaucoma secundario, glaucoma pigmentario, y glaucoma exfoliativo.

En otra realización específica de la invención, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo como se describió anteriormente es para usar en prevención, tratamiento o alivio de los efectos de deficiencias visuales corticales, neuritis óptica o distrofia reticular.

En una realización de la invención, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo para usar según cualquiera de las realizaciones precedentes como se describieron anteriormente es de un isotipo IgG4.

En otra realización, la invención se refiere al anticuerpo humanizado o fragmento del mismo para usar según cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el fragmento del mismo es un fragmento Fab, Fab/c, Fab' o F(ab')₂.

En una realización específica de la invención, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo para usar según cualquiera de las realizaciones precedentes como se describieron anteriormente, comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

En otra realización específica de la invención, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo para usar según cualquiera de las realizaciones precedentes como se describieron anteriormente, comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

En aún otra realización específica de la invención, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo para usar según cualquiera de las realizaciones precedentes como se describieron anteriormente, comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

En una realización de la invención, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo es del isotipo IgG4 para usar según cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el anticuerpo humanizado comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 que carece de la Lys C-terminal de la posición 439.

En una realización de la invención, el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo es del isotipo IgG4 para usar según cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el anticuerpo humanizado comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 que carece de la Lys C-terminal de la posición 439.

Se define la presente invención por las realizaciones precedentes y por las reivindicaciones. Cualquier contenido identificado en la solicitud como "invención", "realización", "aspecto", etc., que excede el alcance de la invención tal como se representa por las reivindicaciones no forma parte de la invención reivindicada sino que solo sirve como información de antecedentes para comprender mejor la invención.

- 5 En una realización, se proporciona un anticuerpo quimérico o fragmento del mismo, un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo, que reconoce y se une al menos a un sitio de unión distinto, particularmente al menos a dos sitios distintos de unión, y más particularmente a al menos tres sitios de unión distintos de la proteína β -amiloide en donde dicho uno, dichos al menos dos y dichos al menos tres sitios de unión comprenden al menos uno o dos residuos de aminoácidos consecutivos implicados predominantemente en la unión al anticuerpo.
- 10 En particular, un anticuerpo quimérico o fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo se une al menos a dos, particularmente al menos a tres sitios distintos de unión en la proteína β -amiloide en donde al menos dos de los tres sitios de unión distintos comprenden al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos implicados predominantemente en la unión al anticuerpo y al menos uno de los tres sitios de unión distintos comprende al menos un residuo de aminoácido.
- 15 Los al menos dos sitios de unión distintos que comprenden al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos predominantemente implicados en la unión al anticuerpo están localizados en estrecha proximidad entre sí en el antígeno, separados y/o flanqueados por al menos un residuo de aminoácido no implicado en la unión al anticuerpo o a una extensión significativamente menor en comparación con dichos al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, formando así una epítipo discontinuo conformacional.
- 20 Los al menos tres sitios de unión distintos que comprenden al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos y al menos un residuo de aminoácido, respectivamente, que están predominantemente implicados en la unión al anticuerpo están localizados en estrecha proximidad entre sí en el epítipo, separados y/o flanqueados por al menos un residuo de aminoácido no implicado en la unión al anticuerpo o a una extensión significativamente menor en comparación con los residuos de aminoácidos, que están predominantemente implicados en la unión al anticuerpo,
- 25 formando así una epítipo discontinuo conformacional.

- En particular, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que reconoce y se une al menos a un sitio de unión distinto, particularmente al menos a dos sitios de unión distintos, más particularmente al menos a tres sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide en donde al menos dicho uno, o al menos dichos dos sitios de unión distintos comprenden cada uno al menos dos
- 30 residuos de aminoácidos consecutivos implicados predominantemente en la unión al anticuerpo, en donde los al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos que representan un primer sitio de unión son -Phe-Phe- incorporados dentro de la secuencia principal siguiente (SEQ ID NO: 9):

Xaa₃ – Phe – Phe – Xaa₄ – Xaa₅ – Xaa₆, en donde:

Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;

- 35 Xaa₄ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile;

Xaa₅ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp;

Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp; y en donde dichos residuos de aminoácidos Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅ y Xaa₆ no están implicados en la unión al anticuerpo o a una extensión significativamente menor en comparación con el sitio de unión -Phe-Phe.

- 40 En otra realización, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde:

Xaa₃ es Val o Leu, pero particularmente Val;

Xaa₄ es Ala o Val, pero particularmente Ala;

Xaa₅ es Glu o Asp, pero particularmente Glu;

- 45 Xaa₆ es Glu o Asp, pero particularmente Asp.

- En particular, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos un sitio de unión distinto, particularmente al menos a dos sitios de unión distintos, más particularmente al menos a tres sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide en donde al menos dichos sitios de unión distintos comprenden al menos uno y al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, respectivamente, implicados predominantemente en la unión al anticuerpo, en donde los al menos dos
- 50 residuos de aminoácidos consecutivos que representan un primer sitio de unión son -Phe-Phe- incorporados y el al menos un residuo de aminoácido es -His- incorporado dentro de la secuencia principal siguiente:

- Xaa₁ -His - Xaa₃ - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆ - Phe - Phe - Xaa₇ - Xaa₈ - Xaa₉-,

En donde:

Xaa₁ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Asn, Gln, Lys y Arg;

Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln;

5 Xaa₄ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Asn, Gln, Lys y Arg;

Xaa₅ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile;

Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe e Ile;

Xaa₇ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu e Ile;

Xaa₈ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp;

10 Xaa₉ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp; y en donde dichos residuos de aminoácidos Xaa₁, Xaa₃, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈ y Xaa₉ no están implicados en la unión al anticuerpo o a una extensión significativamente menor en comparación con el sitio de unión -His- y -Phe-Phe, respectivamente.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde:

15 Xaa₃ es Gln o Asn, pero particularmente Gln;

Xaa₄ es Lys;

Xaa₅ es Leu;

Xaa₆ es Val o Leu, pero particularmente Val;

Xaa₇ es Ala o Val, pero particularmente Ala;

20 Xaa₈ es Glu o Asp, pero particularmente Glu; y

Xaa₉ es Asp o Glu, pero particularmente Asp.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une al menos a un sitio de unión distinto, particularmente al menos a dos sitios de unión distintos, más particularmente al menos a tres sitios de unión distintos en la proteína β-amiloide, en donde al menos dicho uno o al menos dichos dos sitios de unión distintos comprenden cada uno al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, implicados predominantemente en la unión al anticuerpo, en donde al menos los dos residuos de aminoácidos consecutivos que representan un segundo sitio de unión son -Lys-Leu- incorporados dentro de la secuencia principal siguiente (SEQ ID NO: 10):

Xaa₁ - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ en donde:

30 Xaa₁ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Asn, Gln, Lys y Arg;

Xaa₂ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln;

Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe e Ile; y en donde dichos residuos de aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, no están implicados en la unión al anticuerpo o a una extensión significativamente menor en comparación con el sitio de unión -Lys-Leu-.

35 En otra realización, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une al menos a un sitio de unión distinto, particularmente al menos a dos sitios de unión distintos, más particularmente al menos a tres sitios de unión distintos en la proteína β-amiloide, en donde al menos dichos sitios de unión distintos comprenden al menos uno y al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, respectivamente, implicados predominantemente en la unión al anticuerpo, en donde al menos el uno y al menos los dos residuos de aminoácidos consecutivos, que están separados por al menos un residuo de aminoácido no implicado en la unión al anticuerpo o a una extensión significativamente menor en comparación con los residuos de aminoácidos predominantemente implicados en la unión al anticuerpo, son -His- y -Lys-Leu- respectivamente, incorporados dentro de la secuencia principal siguiente:

His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆ - Xaa₇ - Xaa₈ - en donde:

45 Xaa₂ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln;

Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe e Ile;

Xaa₄ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe e Ile;

Xaa₅ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe e Ile;

Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile;

5 Xaa₇ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp;

Xaa₈ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp;

y en donde dichos residuos de aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, no están implicados en la unión al anticuerpo o a una extensión significativamente menor en comparación con el sitio de unión –His- y –Lys-Leu-, respectivamente.

10 En otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde:

Xaa₂ es Gln o Asn, pero particularmente Gln;

Xaa₃ es Val o Leu, pero particularmente Val;

Xaa₄ es Phe;

15 Xaa₅ es Phe;

Xaa₆ es Ala o Val, pero particularmente Ala;

Xaa₇ es Glu o Asp, pero particularmente Glu; y

Xaa₈ es Asp o Glu, pero particularmente Asp.

20 En otra realización, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une al menos a dos sitios de unión distintos en la proteína β-amiloide, en donde al menos dichos dos sitios de unión distintos comprenden cada uno al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos implicados predominantemente en la unión al anticuerpo, en donde al menos los dos residuos de aminoácidos consecutivos están separados por al menos un residuo de aminoácido no implicado en la unión al anticuerpo o a una extensión significativamente menor que dichos residuos de aminoácidos consecutivos,
25 que son –Phe-Phe- y –Lys-Leu-, respectivamente, que representan un primer y un segundo sitio de unión incorporado dentro de la secuencia principal siguiente:

Xaa₁ – Xaa₂ – Lys – Leu – Xaa₃ – Phe – Phe – Xaa₄ – Xaa₅ – Xaa₆, en donde:

Xaa₁ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Asn, Gln, Lys, y Arg;

Xaa₂ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln;

30 Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe e Ile;

Xaa₄ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile;

Xaa₅ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp;

35 Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp; y en donde dichos residuos de aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅ y Xaa₆ no están implicados en la unión al anticuerpo o a una extensión significativamente menor en comparación con el sitio de unión –Lys-Leu- y –Phe-Phe-, respectivamente.

40 En otra realización, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une al menos a un sitio de unión distinto, particularmente al menos a dos sitios de unión distintos, más particularmente al menos a tres sitios de unión distintos en la proteína β-amiloide, en donde al menos dichos sitios de unión distintos comprenden al menos uno y al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, respectivamente, implicados predominantemente en la unión al anticuerpo, en donde el al menos uno y los al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos están separados por al menos un residuo de aminoácido no implicado en la unión al anticuerpo o a una extensión significativamente menor en comparación con los residuos de aminoácidos, que están predominantemente implicados en la unión al anticuerpo, y en donde dichos residuos de aminoácidos son –His- y –Phe-Phe- y –Lys-Leu-, respectivamente, incorporados dentro de la
45 secuencia principal siguiente:

His – Xaa₂ – Lys – Leu – Xaa₃ – Phe – Phe – Xaa₄ – Xaa₅ – Xaa₆, en donde:

Xaa₂ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln;

Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;

Xaa₄ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile;

Xaa₅ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp;

- 5 Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp; y en donde dichos residuos de aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆ no están implicados en la unión al anticuerpo o a una extensión significativamente menor en comparación con el sitio de unión –His-, –Lys-Leu- y –Phe-Phe-, respectivamente.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde:

- 10 Xaa₂ es Gln o Asn, pero particularmente Gln;

Xaa₃ es Val o Leu, pero particularmente Val;

Xaa₄ es Ala o Val, pero particularmente Ala;

Xaa₅ es Glu o Asp, pero particularmente Glu; y

Xaa₆ es Asp o Glu, pero particularmente Asp.

- 15 En otra realización, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une al menos a dos sitios de unión distintos en la proteína β-amiloide en donde al menos dichos dos sitios de unión distintos comprenden al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos predominantemente implicados en la unión al anticuerpo, en donde los al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos están separados por al menos un residuo de aminoácido no implicado en la unión al anticuerpo o a una extensión significativamente menor que dichos residuos de aminoácidos consecutivos, que son –Phe-Phe- y –Lys-Leu-, respectivamente, que representan un primer y un segundo sitio de unión incorporados dentro de la secuencia principal siguiente:

Xaa₁ – Xaa₂ – Lys – Leu – Xaa₃ – Phe – Phe – Xaa₄ – Xaa₅ – Xaa₆, en donde:

Xaa₁ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Asn, Gln, Lys y Arg;

- 25 Xaa₂ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln;

Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Val, Ala, Leu, Met, Phe, norleucina e Ile;

Xaa₄ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu e Ile;

Xaa₅ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp;

- 30 Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp; y en donde dichos residuos de aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, no están implicados en la unión al anticuerpo o a una extensión significativamente menor en comparación con el sitio de unión –Lys-Leu- y –Phe-Phe-, respectivamente.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde:

Xaa₁ es His o Arg, pero particularmente His;

- 35 Xaa₂ es Gln o Asn, pero particularmente Gln;

Xaa₃ es Val o Leu, pero particularmente Val;

Xaa₄ es Ala o Val, pero particularmente Ala;

Xaa₅ es Glu o Asp, pero particularmente Glu; y

Xaa₆ es Asp o Glu, pero particularmente Asp.

- 40 En una realización, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que reconoce y se une al menos a dos sitios de unión distintos en la proteína β-amiloide en donde al menos dichos dos sitios de unión distintos comprenden cada uno al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos predominantemente implicados en la unión al anticuerpo, que son –Phe –Phe - Ala – Glu -, particularmente – Phe – Phe – Ala -, pero especialmente – Phe – Phe – y – Lys – Leu -, respectivamente, y en donde al menos dichos dos sitios de unión distintos exhiben una secuencia de aminoácidos – Val – Phe – Phe – Ala

– Glu – Asp – mostrada en SEQ ID NO: 7 y una secuencia de aminoácidos His – Gln – Lys – Leu – Val – mostrada en SEQ ID NO: 8, respectivamente.

5 En una realización, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une al menos a un sitio de unión distinto, particularmente al menos a dos sitios de unión distintos, más particularmente al menos a tres sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide en donde el dicho al menos uno o dichos al menos dos sitios de unión distintos comprenden al menos uno y al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, respectivamente, implicados predominantemente en la unión al anticuerpo, que son – Phe – Phe – y – Lys – Leu -, y – His – respectivamente, en donde dichos sitios de unión distintos están incorporados en la secuencia de aminoácidos – Val – Phe – Phe – Ala – Glu -, y la secuencia de aminoácidos – His – Gln – Lys – Leu – Val -, respectivamente.

10 En otra realización, el anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo comprende un un sitio de reconocimiento antigénico y de unión que reconoce y se une al menos a dos sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide en donde al menos dichos dos sitios de unión comprenden cada uno al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos dentro de la secuencia de aminoácidos dada en SEQ ID NOs: 7 y 8, respectivamente, en donde dichos residuos de aminoácidos consecutivos, particularmente – Phe – Phe – y –Lys-Leu-, están predominantemente implicados en la unión de la proteína β -amiloide.

15 En una realización específica adicional, se proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo, que se une a 4 sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide en donde dichos 4 sitios de unión distintos incluyen 2 sitios de unión que comprenden cada uno un residuo de aminoácido y 2 sitios de unión que comprenden cada uno dos residuos de aminoácidos consecutivos, tales residuos están predominantemente implicados en la unión del anticuerpo, en donde dichos 4 sitios de unión distintos están localizados muy cerca uno del otro en la proteína β -amiloide, y en donde dichos 4 sitios de unión distintos están separados por al menos un residuo de aminoácido no implicado en la unión al anticuerpo o implicado en la unión pero a una extensión significativamente menor en comparación a dicho residuo de aminoácido y dichos dos residuos de aminoácidos consecutivos de los 4 sitios de unión distintos que forman así un epítipo discontinuo conformacional.

20 En particular, el primero de los dos residuos de aminoácidos consecutivos que participan predominantemente en la unión del anticuerpo es –Lys-Leu-, y el segundo de los al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos es – Phe-Phe-, el primero de los residuos de aminoácidos individuales es –His- y el segundo de los residuos de aminoácidos individuales es –Asp- incorporados dentro de la secuencia principal siguiente:

25 Xaa₁- His – Xaa₂ – Lys – Leu- Xaa₃ – Phe –Phe – Xaa₄ – Xaa₅ – Asp – Xaa₆

En donde:

Xaa₁ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Asn, Gln, Lys y Arg, pero particularmente His;

35 Xaa₂ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln, pero particularmente Gln;

Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile, particularmente Val;

Xaa₄ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile, particularmente Ala;

40 Xaa₅ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp, particularmente Glu;

Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile, particularmente Val; y en donde dichos residuos de aminoácidos Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, no están implicados en la unión al anticuerpo o están implicados en la unión pero a una extensión significativamente menor en comparación con el sitio de unión –His-, -Asp-, –Lys-Leu- y –Phe-Phe-, respectivamente.

45 En una realización, se proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo, que se une a 4 sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide, en donde dichos 4 sitios de unión distintos incluyen 2 sitios de unión que comprenden cada uno un residuo de aminoácido y 2 sitios de unión que comprenden cada uno un residuo de aminoácido y 2 sitios de unión que comprenden cada uno dos residuos de aminoácidos consecutivos, en donde el primero de los dos residuos de aminoácidos consecutivos que participan predominantemente en la unión del anticuerpo es –Lys-Leu-, y el segundo de los al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos es –Phe-Phe-, el primero de los residuos de aminoácidos individuales es –His- y el segundo de los residuos de aminoácidos individuales es –Asp- incorporados dentro de la secuencia principal siguiente:

50 Xaa₁- His – Xaa₂ – Lys – Leu – Xaa₃ – Phe – Phe – Xaa₄ – Xaa₅ – Asp – Xaa₆

En donde:

Xaa₁ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Asn, Gln, Lys y Arg, pero particularmente His;

Xaa₂ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln, pero particularmente Gln;

5 Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe e Ile, particularmente Val;

Xaa₄ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile, particularmente Ala;

Xaa₅ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp, particularmente Glu;

10 Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile, particularmente Val; y en donde dichos residuos de aminoácidos Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, no están implicados en la unión al anticuerpo o están implicados en la unión pero a una extensión significativamente menor en comparación con el sitio de unión –His-, -Asp-, -Lys-Leu- y -Phe-Phe-, respectivamente.

15 En una realización específica, los sitios de reconocimiento y de unión como se definen anteriormente en esta memoria están formando un epítipo discontinuo conformacional localizado en una región de la proteína β-amiloide entre los residuos de aminoácidos 12 a 24, particularmente entre los residuos 14 a 23, más particularmente entre los residuos de aminoácidos 14 a 20, en donde al menos los dos sitios distintos de reconocimiento y de unión que comprenden cada uno al menos 2 residuos de aminoácidos, están localizados en la posición 16 y 17 y en la posición 19 y 20, respectivamente, y en donde el al menos un sitio distinto de reconocimiento y de unión que comprende al menos 1 residuo de aminoácido está localizado en la posición 14, cuyos residuos están predominantemente implicados en la unión de la proteína β-amiloide y en donde dichos sitios distintos de reconocimiento y unión están al menos flanqueados a un lado por residuos de aminoácidos, particularmente residuos 21 y 22, y separados por un residuo de aminoácido localizado en la posición 15 y 18, cuyos residuos de aminoácidos no están directamente implicados en la unión del antígeno o, al menos, a una extensión sustancialmente menor.

25 En aún otra realización al menos los dichos tres sitios de reconocimiento y unión distintos están flanqueados en ambos lados por residuos de aminoácidos, particularmente residuos 12 y 13, y residuos 21 y 22 y están separados por un residuo de aminoácido localizado en la posición 15 y 18, cuyos residuos de aminoácidos no están directamente implicados en la unión del antígeno o, al menos, a una extensión sustancialmente menor.

30 En una realización específica, dichos residuos de aminoácidos consecutivos, particularmente Lys-Leu- en la posición 16 y 17 y -Phe-Phe- en la posición 19 y 20, que están predominantemente implicados en la unión de la proteína β-amiloide, están incorporados dentro de la región principal siguiente:

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

35 En otra realización específica, dichos residuos de aminoácidos, particularmente -Lys-Leu- en la posición 16 y 17 y -Phe-Phe- en la posición 19 y 20, e -His- en la posición 14, que están predominantemente implicados en la unión de la proteína β-amiloide, están incorporados dentro de la región principal siguiente:

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

40 En otra realización, se proporciona un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende en la región variable de la cadena ligera y de la cadena pesada, respectivamente, al menos una CDR de origen no-humano, particularmente dos CDRs de origen no-humano, más particularmente tres CDR de origen no-humano, incorporados en una o más regiones estructurales derivadas de humano o primate y, opcionalmente, una región constante derivada de un anticuerpo de origen humano o de primate, cuyo anticuerpo humanizado o fragmento del mismo es capaz de reconocer y unirse específicamente a proteína β-amiloide, particularmente a un péptido monomérico β-amiloide, más particularmente a un péptido polimérico β-amiloide, incluso más particularmente a fibras, fibrillas o filamentos β-amiloides aislados o como parte de una placa β-amiloide, a un epítipo que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente (SEQ ID NO: 11):

45 Xaa₁ – Xaa₂ – Lys – Leu – Xaa₃ – Phe – Phe – Xaa₄ – Xaa₅ – Xaa₆, en donde:

Xaa₁ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Asn, Gln, pero particularmente His;

Xaa₂ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln, pero particularmente Gln, y

Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Val, Leu, e Ile, pero particularmente Val;

Xaa₄ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala y Val, pero particularmente Ala;

5 Xaa₅ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp, pero particularmente Glu;

Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp, pero particularmente Asp.

En aún otra realización, se proporciona un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende en la región variable de la cadena ligera y de la cadena pesada, respectivamente, al menos una CDR de origen no-humano, particularmente dos CDRs de origen no-humano, más particularmente tres CDR de origen no-humano, incorporadas en una o más regiones estructurales derivadas de humano o primate y, opcionalmente, una región constante derivada de un anticuerpo de origen humano o de primate, cuyo anticuerpo humanizado o fragmento del mismo es capaz de reconocer y unirse específicamente a proteína β -amiloide, particularmente a un péptido monomérico β -amiloide, más particularmente a un péptido polimérico β -amiloide, incluso más particularmente a fibras, fibrillas o filamentos β -amiloides aislados o como parte de una placa β -amiloide, a un epítipo que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

His – Xaa₂ – Lys – Leu – Xaa₃ – Phe – Phe – Xaa₄ – Xaa₅ – Xaa₆, en donde:

Xaa₂ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln, pero particularmente Gln; y

Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Val, Leu, e Ile, pero particularmente Val;

Xaa₄ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala y Val, pero particularmente Ala;

20 Xaa₅ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp, pero particularmente Glu;

Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp, pero particularmente Glu; y en donde dichos residuos de aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, no están implicados en la unión al anticuerpo o a una extensión menor en comparación con el sitio de unión –His-, y –Lys-Leu- y –Phe-Phe-.

En una realización específica, la CDR de origen no-humano se obtiene a partir de un anticuerpo donante, pero particularmente de un anticuerpo donante murino, creado contra un fragmento de antígeno que no contiene dicho sitio de unión distinto. Este cambio en la región epitópica puede al menos haber sido causado por el uso de un constructo antigénico supramolecular que comprende un péptido antigénico que se corresponde con la secuencia de aminoácidos del péptido β -amiloide, particularmente del péptido β -amiloide A β ₁₋₁₆, modificado con una fracción hidrofílica como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), en donde dicha fracción hidrofílica está covalentemente unida a cada uno de los terminales del péptido antigénico a través de al menos uno, particularmente uno o dos aminoácidos como, por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisteína o cualquier otro aminoácido adecuado o aminoácido análogo capaz de servir como un dispositivo de conexión para acoplar la fracción hidrofílica al fragmento peptídico, como se describe más adelante en esta memoria en el proceso de inmunización. Cuando se usa un PEG como fracción hidrofílica, los terminales libres de PEG están unidos covalentemente a fosfatidiletanolamina o a cualquier otro compuesto adecuado para funcionar como elemento de anclaje, por ejemplo, para incrustar el constructo antigénico en la bicapa de un liposoma como se describe en esta memoria.

En particular, la CDR de origen no humano se obtiene de un anticuerpo donante murino que exhibe las propiedades características de ACI-01-Ab7C2 (también llamado "mC2" a lo largo de la solicitud) depositado el 01 de diciembre de 2.005 con la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest con el n° de acceso DSM ACC2750).

En una realización, la CRD de origen no humano se obtiene de un anticuerpo donante murino ACI-01-Ab7C2 (también llamado "mC2" a lo largo de la solicitud) depositado el 1 de diciembre de 2.005 con la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest con el n° de acceso DSM ACC2750).

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

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

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

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

10 En particular, se proporciona una Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) que comprende, integrado en regiones estructurales derivadas de humano o primate, al menos un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 que representa CDR1 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR).

15 En otra realización específica, se proporciona una Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) que comprende integrado en regiones estructurales derivadas de humano o primate, al menos un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consisten en SEQ ID NO: 2 que representa CDR2 y SEQ ID NO: 3 que representa CDR3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR).

20 Se proporciona además un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo, que comprende integrados en regiones estructurales derivadas de humano o primate, al menos dos péptidos, cuyos péptidos son diferentes y exhiben una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en SEQ ID NO: 1 que representa CDR1, SEQ ID NO: 2 que representa CDR2 y SEQ ID NO: 3 que representa CDR3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) y SEQ ID NO: 4 que representa CDR1, SEQ ID NO: 5 que representa CDR2 y SEQ ID NO: 6 que representa CDR3 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) en donde la misma CDR no puede estar presente dos veces en el anticuerpo. En particular, si al menos las dos CDRs presentes son ambas CDRs de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR), al menos una de dichas CDRs debe ser CDR1 representada por la SEQ ID NO: 4.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

25 En aún otra realización, se proporciona un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende, integrados en regiones estructurales derivadas de humano o primate, péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que representa CDR1, SEQ ID NO: 2 que representa CDR2 y SEQ ID NO: 3 que representa CDR3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) y SEQ ID NO: 4 que representa CDR1, SEQ ID NO: 5 que representa CDR2 y SEQ ID NO: 6 que representa CDR3 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR).

30 En una realización específica, se proporciona un anticuerpo humanizado, una Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR), o un fragmento de los mismos, en donde dicho anticuerpo humanizado, Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) o fragmento de los mismos comprende, integrado en regiones estructurales de cadena pesada derivadas de humano o primate, al menos un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 que representa CDR2 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR).

35 En otra realización específica, se proporciona un anticuerpo humanizado, una Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR), o un fragmento de los mismos, en donde dicho anticuerpo humanizado, Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) o fragmento de los mismos comprende, integrado en regiones estructurales de cadena pesada derivadas de humano o primate, al menos un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 que representa CDR3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR).

40 En otra realización específica, se proporciona un anticuerpo humanizado, una Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR), o un fragmento de los mismos, cuyo anticuerpo, Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR), o un fragmento de los mismos comprende, integrados en regiones estructurales de cadena pesada derivadas de humano o primate, al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que representa CDR1 y SEQ ID NO: 2 que representa CDR2 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR).

45 En otra realización específica, se proporciona un anticuerpo humanizado, una Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR), o un fragmento de los mismos, cuyo anticuerpo, Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR), o un fragmento de los mismos comprende, integrados en regiones estructurales de cadena pesada derivadas de humano o primate, al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que representa CDR1 y SEQ ID NO: 3 que representa CDR3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR).

50 En otra realización específica, se proporciona un anticuerpo humanizado, una Región Variable de la Cadena Pesada

(HCVR), o un fragmento de los mismos, cuyo anticuerpo, Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR), o un fragmento de los mismos comprende, integrados en regiones estructurales de cadena pesada derivadas de humano o primate, al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 que representa CDR2 y SEQ ID NO: 3 que representa CDR3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR).

- 5 En otra realización específica, se proporciona un anticuerpo humanizado, una Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR), o un fragmento de los mismos, cuyo anticuerpo, Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR), o un fragmento de los mismos comprende, integrados en regiones estructurales de cadena pesada derivadas de humano o primate, al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 que representa CDR1 y SEQ ID NO: 5 que representa CDR2 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR).
- 10 En otra realización específica, se proporciona un anticuerpo humanizado, una Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR), o un fragmento de los mismos, cuyo anticuerpo, Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR), o un fragmento de los mismos comprende, integrados en regiones estructurales de cadena pesada derivadas de humano o primate, al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 que representa CDR1 y SEQ ID NO: 6 que representa CDR3 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR).
- 15 Se describe además un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde tanto la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) como la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) del anticuerpo C2 de ratón cada una aporta al menos una de sus regiones CDR a las al menos dos regiones CDR del anticuerpo humanizado. El anticuerpo humanizado resultante o un fragmento del mismo puede comprender de este modo
- 20 • al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que representa CDR1 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 que representa CDR1 (LCVR);
 - al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 que representa CDR2 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 que representa CDR1 (LCVR);
 - al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 que representa CDR3 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 que representa CDR1 (LCVR);
 - 25 • al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que representa CDR1 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 que representa CDR2 (LCVR);
 - al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 que representa CDR2 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 que representa CDR2 (LCVR);
 - 30 • al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 que representa CDR2 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 que representa CDR3 (LCVR);
 - al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que representa CDR1 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 que representa CDR3 (LCVR);
 - al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 que representa CDR3 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 que representa CDR2 (LCVR);
 - 35 • al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 que representa CDR3 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 que representa CDR3 (LCVR).

En aún otra realización, se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describe anteriormente en esta memoria, cuyo anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera y/o cadena pesada de origen humano o primate.

- 40 En una realización adicional, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde al menos uno, particularmente al menos uno pero no más de 5, más particularmente al menos uno pero no más de 4, incluso más particularmente al menos uno pero no más de 3, pero especialmente al menos uno pero no más de 2, de los aminoácidos representativos de las regiones CDR de la cadena ligera y/o pesada como se indica en SEQ ID NOS: 1-6 se cambia a través de una sustitución conservativa de modo que el anticuerpo mantiene su funcionalidad completa.
- 45

En particular, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde se reemplaza la Lys en la posición Kabat 50 en la CDR2 de la región variable de la cadena ligera (LCVR) como se indica en SEQ ID NO: 5, por un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gln y Glu, particularmente por Arg.

- 50 En particular, se proporciona una región variable de la cadena ligera (LCVR) en donde se reemplaza la Lys en la posición Kabat 50 en la CDR2 de la región variable de la cadena ligera (LCVR) como se indica en SEQ ID NO: 5 por un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gln y Glu, particularmente por Arg.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde se reemplaza la Ser en la posición Kabat 53 en la CDR2 de la región variable de la cadena ligera (LCVR) como se indica en SEQ ID NO: 5, por un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn o Thr, pero particularmente por Asn.

- 5 En particular, se proporciona una región variable de la cadena ligera (LCVR) en donde se reemplaza la Ser en la posición Kabat 53 en la CDR2 como se indica en SEQ ID NO: 5 por un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn o Thr, pero particularmente por Asn.

- 10 En una realización, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es 90%, particularmente 95%, más particularmente 98% idéntica a la secuencia indicada en SEQ ID NO: 15 y 16, respectivamente.

- 15 En otra realización, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es 90%, particularmente 95%, más particularmente 98% idéntica a la secuencia indicada en SEQ ID NO: 12 y 13, respectivamente.

En aún otra realización, se proporciona un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde al menos dos, pero especialmente tres, de las regiones CDR de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) tienen una secuencia de aminoácidos que es 90%, particularmente 95%, más particularmente 98% idéntica a la región CDR correspondiente como se indica en SEQ ID NO: 1-3.

- 20 En una realización adicional, se proporciona un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde al menos dos, pero especialmente tres, de las regiones CDR de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) tienen una secuencia de aminoácidos que es 90%, particularmente 95%, más particularmente 98% idéntica a la región CDR correspondiente como se indica en SEQ ID NO: 4-6.

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

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

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

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

- 45 En aún otra realización, se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado como se describe anteriormente en esta memoria, en donde al menos uno de los aminoácidos representativo de secuencias estructurales aceptoras obtenidas las secuencias V_H y V_K de línea germinal humana, respectivamente se cambia a través de una sustitución de un aminoácido de la región correspondiente del anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2 o una sustitución conservadora del mismo.

- 50 En particular, se describen en esta memoria una Región Variable de la Cadena Pesada y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Pesada, respectivamente, en donde el Trp en la posición Kabat 47 en la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias V_H de línea germinal humana del subgrupo KABAT V_{HIII} de la Región Variable de la Cadena Pesada se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, norleucina, Ile, Val, Met, Ala, y Phe, particularmente Leu e Ile, pero especialmente Leu como se muestra en SEQ ID NO: 15.

- 55 Además, se describen en esta memoria, una Región Variable de la Cadena Pesada y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Pesada, respectivamente, en donde la Arg en la posición Kabat 94 en la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias V_H de línea germinal humana del subgrupo KABAT V_{HIII} de la Región Variable de la Cadena Pesada se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que

consiste en Ser y Thr, pero especialmente por Ser como se muestra en SEQ ID NO: 15.

- 5 En aún otra realización, se describen en esta memoria una Región Variable de la Cadena Pesada y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Pesada, respectivamente, en donde el Trp en la posición Kabat 47 en la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias V_H de línea germinal humana del subgrupo KABAT V_{HIII} de la Región Variable de la Cadena Pesada se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, norleucina, Ile, Val, Met, Ala, y Phe, particularmente Leu e Ile, pero especialmente por Leu y la Arg en la posición Kabat 94 se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Thr, pero especialmente por Ser como se muestra en SEQ ID NO: 15.
- 10 Además, se describen en esta memoria una Región Variable de la Cadena Ligera y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Ligera, respectivamente, en donde la Gln en la posición Kabat 45 en la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias V_K de línea germinal humana del subgrupo KABAT V_{KII} de la Región Variable de la Cadena Ligera se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg, Gln, y Asn, particularmente por Lys, pero especialmente por Lys.
- 15 Además, se describen en esta memoria una Región Variable de la Cadena Ligera y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Ligera, respectivamente, en donde la Tyr en la posición Kabat 87 en la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias V_K de línea germinal humana del subgrupo KABAT V_{KII} de la Región Variable de la Cadena Ligera se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Phe, Leu, Val, Ile, y Ala, particularmente por Leu y Phe, pero especialmente por Phe.
- 20 Además, se describen en esta memoria una Región Variable de la Cadena Ligera y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Ligera, respectivamente, en donde la Lys en la posición Kabat 50 en la región CDR2 obtenida de un anticuerpo monoclonal de ratón, particularmente anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2, como se indica en SEQ ID NO: 12 se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gln, His, y Asn, pero especialmente por Arg.
- 25 En aún otra realización, se describen además en esta memoria una Región Variable de la Cadena Ligera y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Ligera, respectivamente, en donde la Asn en la posición Kabat 53 en la región CDR2 obtenida de un anticuerpo monoclonal de ratón, particularmente anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2, como se indica en SEQ ID NO: 12 se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile; pero especialmente Ser.
- 30 En aún otra realización, se proporciona un anticuerpo humanizado, en donde el Trp en la posición Kabat 47 en la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias V_H de línea germinal humana del subgrupo KABAT V_{HIII} de la Región Variable de la Cadena Pesada se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, norleucina, Ile, Val, Met, Ala, y Phe, particularmente Leu e Ile, pero especialmente Leu y la Arg en la posición Kabat 94 en la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias V_H de línea germinal humana del subgrupo KABAT V_{HIII} de la Región Variable de la Cadena Pesada se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Thr, pero especialmente por Ser como se muestra en SEQ ID NO: 15, y la Tyr en la posición Kabat 87 en la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias V_K de línea germinal humana del subgrupo KABAT V_{KII} de la Región Variable de la Cadena Ligera se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Phe, Leu, Val, Ile, y Ala, particularmente por Leu, pero especialmente por Phe.
- 35 En aún otra realización, se describen en esta memoria una Región Variable de la Cadena Pesada y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Pesada, respectivamente, en donde el Trp en la posición Kabat 47 en la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias V_H de línea germinal humana del subgrupo KABAT V_{HIII} de la Región Variable de la Cadena Pesada como se muestra en SEQ ID NO: 15 se reemplaza por Leu.
- 40 En aún otra realización, se describen en esta memoria una Región Variable de la Cadena Pesada y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Pesada, respectivamente, en donde la Arg en la posición Kabat 94 en la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias V_H de línea germinal humana del subgrupo KABAT V_{HIII} de la Región Variable de la Cadena Pesada se reemplaza por Ser como se muestra en SEQ ID NO: 15.
- 45 En aún otra realización, se describen en esta memoria una Región Variable de la Cadena Pesada y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Pesada, respectivamente, en donde el Trp en la posición Kabat 47 en la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias V_H de línea germinal humana del subgrupo KABAT V_{HIII} de la Región Variable de la Cadena Pesada se reemplaza por Leu e Ile, pero especialmente Leu y la Arg en la posición Kabat 94 en la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias V_H de línea germinal humana del subgrupo KABAT V_{HIII} de la Región Variable de la Cadena Pesada se reemplaza por Ser como se muestra en SEQ ID NO: 15.
- 50 En aún otra realización, se describen en esta memoria una Región Variable de la Cadena Ligera y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Pesada, respectivamente, en donde la Tyr en la posición Kabat 87 en la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias V_K de línea germinal humana del
- 55

subgrupo KABAT V_KII de la Región Variable de la Cadena Ligera se reemplaza por Phe.

5 En aún otra realización, se describen en esta memoria una Región Variable de la Cadena Pesada y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Pesada, respectivamente, en donde el Trp en la posición Kabat 47 en la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias V_H de línea germinal humana del subgrupo KABAT V_HIII de la Región Variable de la Cadena Pesada se reemplaza por Leu e Ile, pero especialmente Leu y la Arg en la posición Kabat 94 en la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias V_H de línea germinal humana del subgrupo KABAT V_HIII de la Región Variable de la Cadena Pesada se reemplaza por Ser como se muestra en SEQ ID NO: 15 y la Tyr en la posición Kabat 87 en la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias V_K de línea germinal humana del subgrupo KABAT V_KII de la Región Variable de la Cadena Ligera se reemplaza por Phe.

15 En una realización, se describen en esta memoria una Región Variable de la Cadena Pesada y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Pesada, respectivamente, en donde el Trp en la posición Kabat 47 en la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias V_H de línea germinal humana del subgrupo KABAT V_HIII de la Región Variable de la Cadena Pesada se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, norleucina, Ile, Val, Met, Ala, y Phe, particularmente Leu e Ile, pero especialmente Leu y la Arg en la posición Kabat 94 se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Thr, pero especialmente por Ser como se muestra en SEQ ID NO: 15 y en donde la Lys en la posición Kabat 50 en la región CDR2 obtenida de un anticuerpo monoclonal de ratón, particularmente anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2, se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gln, His, y Asn, pero especialmente por Arg.

20 En una realización, se describen en esta memoria una Región Variable de la Cadena Pesada y un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de la Cadena Pesada, respectivamente, en donde el Trp en la posición Kabat 47 en la secuencia estructural aceptora obtenida de secuencias V_H de línea germinal humana del subgrupo KABAT V_HIII de la Región Variable de la Cadena Pesada se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, norleucina, Ile, Val, Met, Ala, y Phe, particularmente Leu e Ile, pero especialmente Leu y la Arg en la posición Kabat 94 se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Thr, pero especialmente por Ser como se muestra en SEQ ID NO: 15 y en donde la Asn en la posición Kabat 53 en la región CDR2 obtenida de un anticuerpo monoclonal de ratón, particularmente anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2, se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile; pero especialmente Ser.

25 En una realización específica, se proporciona la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 12.

En otra realización específica, se proporciona un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 12.

En una realización específica, se proporciona la cadena ligera como se indica en SEQ ID NO: 13.

35 En otra realización específica, se proporciona un anticuerpo humanizado, que comprende la cadena ligera completa como se indica en SEQ ID NO: 13.

En otra realización específica, se proporciona un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 12 y la región constante de la cadena ligera de SEQ ID NO: 14.

40 En otra realización específica se proporciona un anticuerpo humanizado, que comprende la cadena ligera completa de SEQ ID NO: 13 que incluye la región constante de la cadena ligera de SEQ ID NO: 14.

En una realización específica, se proporciona la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 15.

En otra realización específica, se proporciona un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 15.

En una realización específica, se proporciona la cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 16.

45 En otra realización específica, se proporciona un anticuerpo humanizado, que comprende la cadena pesada completa como se indica en SEQ ID NO: 16.

En otra realización específica, se proporciona un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 15 y la región constante de la cadena ligera de SEQ ID NO: 17.

50 En otra realización específica se proporciona un anticuerpo humanizado, que comprende la cadena pesada de SEQ ID NO: 16 que incluye la región constante de la cadena pesada de SEQ ID NO: 17.

En una realización el anticuerpo humanizado como se describe en esta memoria, tras la co-incubación con un péptido monomérico Aβ que tiene al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, incluso más particularmente al menos 40 residuos de aminoácidos y/o un péptido amiloide soluble polimérico Aβ que

5 comprende una multitud de dichas unidades monoméricas A β , pero especialmente con un péptido amiloide soluble monomérico A β_{1-42} y/o polimérico A β que comprende una multitud de dichas unidades monoméricas A β_{1-42} , particularmente a una relación de concentración molar de anticuerpo y A β_{1-42} de hasta 1:1.000, particularmente de hasta 1:500, más particularmente de hasta 1:300, incluso más particularmente de hasta 1:200, pero especialmente a una relación de concentración molar de entre 1:10 y 1:100, inhibe la agregación de los monómeros A β a fibrillas poliméricas de alto peso molecular.

10 En particular, la co-incubación del anticuerpo con amiloide monomérico y/o péptidos amiloides solubles poliméricos se lleva a cabo durante 24 horas a 60 horas, particularmente durante 30 horas a 50 horas, más particularmente durante 48 horas, pero especialmente 24 horas, a una temperatura de entre 28°C y 38°C, más particularmente a 37°C.

En una realización específica, la co-incubación con amiloide monomérico y/o péptidos amiloides solubles poliméricos se realiza durante 24 horas a una temperatura de 37°C.

15 En particular, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado que incluye cualquier anticuerpo equivalente funcional o partes funcionales del mismo se une al péptido monomérico A β_{1-42} y/o al péptido amiloide soluble polimérico A β que comprende una multitud de dichas unidades monoméricas A β_{1-42} y, tras la co-incubación con péptido monomérico A β_{1-42} y/o péptido amiloide soluble polimérico A β que comprende una multitud de dichas unidades monoméricas inhibe la agregación de los monómeros A β y/o polímeros a fibrillas poliméricas de alto peso molecular.

20 En una realización, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado que incluye cualquier anticuerpo equivalente funcional o partes funcionales del mismo inhibe la agregación de los monómeros A β y/o polímeros solubles A β que comprenden una multitud de dichas unidades monoméricas A β a fibrillas poliméricas de alto peso molecular en al menos 50%, particularmente en al menos 60%, particularmente en al menos 65%, más particularmente en al menos 75%, incluso más particularmente en al menos 80%, pero especialmente en al menos 85%-90%, o más comparado con monómeros de péptido amiloide respectivos incubados en tampón (control), a una relación de concentración molar de anticuerpo a A β_{1-42} de hasta 1:1.000, particularmente a una relación de concentración molar de entre 1:10 y 1:100, pero especialmente a una relación de concentración molar de 1:10.

30 En una realización específica, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado que incluye cualquier anticuerpo equivalente funcional o partes funcionales del mismo inhibe la agregación de los monómeros A β y/o polímeros solubles A β que comprenden una multitud de dichas unidades monoméricas A β a fibrillas poliméricas de alto peso molecular en al menos 30% a una relación de concentración molar de anticuerpo a A β_{1-42} de 1:100.

En otra realización específica, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado que incluye cualquier anticuerpo equivalente funcional o partes funcionales del mismo inhibe la agregación de los monómeros A β y/o polímeros solubles A β que comprenden una multitud de dichas unidades monoméricas A β a fibrillas poliméricas de alto peso molecular en al menos 80% a una relación de concentración molar de anticuerpo a A β_{1-42} de 1:10.

35 La unión de los anticuerpos según la invención y como se describe en esta memoria a péptidos amiloidogénicos monoméricos y/o poliméricos pero, particularmente, a la forma amiloide (1-42) da lugar a la inhibición de la agregación de péptidos amiloidogénicos monoméricos y/o poliméricos a fibrillas o filamentos de alto peso molecular. A través de la inhibición de la agregación de péptidos amiloidogénicos monoméricos y/o poliméricos, los anticuerpos según la presente invención son capaces de prevenir o disminuir la formación de placas de amiloide, particularmente la forma amiloide (1-42), que se sabe que se vuelve insoluble por cambio de conformación secundaria y por ser la parte principal de las placas de amiloide en cerebros de sujetos o humanos enfermos.

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

50 En una realización, se proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo humanizado como se describe en esta memoria que incluye cualquier anticuerpo equivalente funcional o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo, después de la co-incubación, particularmente a una relación de concentración molar de entre 1:5 y 1:1.000, particularmente de entre 1:10 y 1:500, más particularmente a una relación de 1:10 a 1:300, incluso más particularmente a una relación de entre 1:10 y 1:100, con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptidos monoméricos A β que tienen al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, incluso más particularmente al menos 40 residuos de aminoácidos y, pero especialmente péptidos monoméricos A β_{1-42} , es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en al menos 20%, particularmente en al menos 30%, más particularmente en al menos 35%, incluso más particularmente en al menos 40%, pero especialmente en al menos 50% o más.

En una realización específica, la inhibición de agregación y el potencial de desagregación del anticuerpo,

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

En otra realización específica, la inhibición de agregación y el potencial de desagregación del anticuerpo, respectivamente, se determina por ensayo fluorescente de tioflavina T (Th-T).

- 5 En otra realización específica, el anticuerpo se co-incuba con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados con amiloide durante 12 horas a 36 horas, particularmente durante 18 horas a 30 horas, más particularmente durante 24 horas a una temperatura de entre 28°C y 40°C, particularmente de entre 32°C y 38°C, más particularmente a 37°C.

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

En una realización específica, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado que incluye cualquier anticuerpo equivalente funcional o partes funcionales del mismo es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en al menos 24% a una relación de concentración molar de anticuerpo a A β ₁₋₄₂ de 1:100.

- 15 En otra realización específica, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado que incluye cualquier anticuerpo equivalente funcional o partes funcionales del mismo es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en al menos 32% a una relación de concentración molar de anticuerpo a A β ₁₋₄₂ de 1:10.

A través de la desagregación de las fibrillas o filamentos poliméricos amiloidogénicos, los anticuerpos son capaces de prevenir o disminuir la formación de placas de amiloide lo que da lugar a un alivio de los síntomas asociados con la enfermedad y a un retraso o reversión de su progresión.

- 20 Por consiguiente, es una realización adicional proporcionar un anticuerpo, particularmente un anticuerpo humanizado, que incluye cualquier anticuerpo equivalente funcional o partes funcionales del mismo como se describe en esta memoria, cuyo anticuerpo es capaz de disminuir la cantidad total de A β en el cerebro de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que sufre una enfermedad o afección que da lugar a una concentración aumentada de A β en el cerebro.

- 25 En otra realización, se describe en esta memoria un anticuerpo humanizado como se describió anteriormente en esta memoria, cuyo anticuerpo es bi-efectivo en tanto que exhibe tanto una propiedad de inhibición de agregación como una propiedad de desagregación, particularmente emparejada con un alto grado de susceptibilidad conformacional.

- 30 En particular, se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describió anteriormente en esta memoria, cuyo anticuerpo, después de co-incubación con amiloide monomérico y/o péptidos amiloides solubles poliméricos, particularmente con péptidos monoméricos de β -amiloide como, por ejemplo, péptidos monoméricos A β 1-39; 1-40, 1-41, o 1-42, y/o un péptido β -amiloide soluble polimérico que comprende una multitud de dichas unidades monoméricas A β , pero especialmente con un péptido amiloide soluble monomérico A β ₁₋₄₂ y/o polimérico A β que comprende una multitud de dichas unidades monoméricas A β ₁₋₄₂, inhibe la agregación de los monómeros A β en fibrillas o filamentos poliméricos de alto peso molecular y, además, después de co-incubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados formados por agregación de péptidos monoméricos amiloides, particularmente péptidos monoméricos β -amiloide como, por ejemplo, péptidos monoméricos A β 1-39; 1-40, 1-41, o 1-42, pero especialmente péptidos monoméricos A β ₁₋₄₂, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados.

- 40 En otro aspecto, se describe en esta memoria un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo descrito anteriormente en esta memoria, cuyo anticuerpo es capaz de inducir una transición de la conformación en lámina β hacia una conformación en α -hélice y/o aleatoria en espiral, pero particularmente una conformación aleatoria en espiral, incluso más particularmente una conformación aleatoria en espiral en una localización dada en la molécula, especialmente en el entorno de Tyr 10 y Val12 de la proteína A β , que da lugar a un aumento de la conformación aleatoria en espiral a expensas de la conformación en lámina β y a una solubilización mejorada de las fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados. En particular la disminución de las cantidades de conformación en lámina β hasta al menos 30%, particularmente hasta al menos 35%, y más particularmente hasta al menos 40% y más comparado con las fibrillas o filamentos poliméricos de amiloide preformados respectivos incubados en tampón (control).

- 50 El potencial del anticuerpo en inducir una transición en la estructura secundaria se determina mediante espectroscopía ¹³C NMR en estado sólido pero, en particular, midiendo las intensidades integrales de las conformaciones de Tyr10 y Val12 C β en el péptido A β ₁₋₄₂.

- 55 En una realización adicional, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo descrito anteriormente en esta memoria que comprende al menos una cadena ligera o un fragmento de la misma o al menos una cadena pesada o un fragmento de la misma, en donde

- 5 dicho anticuerpo o fragmento se une a un monómero A β con una alta afinidad de unión con una K_D en un intervalo entre al menos aproximadamente 1 x 10⁻⁷ M a al menos aproximadamente 1 x 10⁻¹² M, particularmente de al menos aproximadamente 1 x 10⁻⁸ M a al menos aproximadamente 1 x 10⁻¹¹ M, más particularmente de al menos aproximadamente 1 x 10⁻⁹ M a al menos aproximadamente 1 x 10⁻¹⁰ M, incluso más particularmente de al menos aproximadamente 1 x 10⁻⁸ M a al menos aproximadamente 2 x 10⁻⁸ M pero, preferiblemente, no muestra ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora amiloide (APP).
- 10 En otra realización, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo descrito anteriormente en esta memoria que comprende al menos una cadena ligera o un fragmento de la misma o al menos una cadena pesada o un fragmento de la misma, en donde dicho anticuerpo o fragmento se une a una fibra, fibrilla o filamento A β con una alta afinidad de unión con una K_D en un intervalo entre al menos aproximadamente 1 x 10⁻⁷ M a al menos aproximadamente 1 x 10⁻¹² M, particularmente de al menos aproximadamente 1 x 10⁻⁸ M a al menos aproximadamente 1 x 10⁻¹¹ M, más particularmente de al menos aproximadamente 1 x 10⁻⁹ M a al menos aproximadamente 1 x 10⁻¹⁰ M, incluso más particularmente de al menos aproximadamente 2 x 10⁻⁹ M a al menos aproximadamente 5 x 10⁻⁹ M, pero, preferiblemente, no muestra ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora amiloide (APP).
- 15 En otra realización, el anticuerpo como se describe anteriormente en esta memoria o un fragmento del mismo, exhibe una afinidad de unión por una fibra, fibrilla o filamento A β que es al menos 2 veces, particularmente al menos 4 veces, particularmente al menos 10 veces, particularmente al menos 15 veces, más particularmente al menos 20 veces, pero especialmente al menos 25 veces mayor que la afinidad de unión por un monómero A β .
- 20 En aún otra realización, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo descrito anteriormente en esta memoria, cuyo anticuerpo se une sustancialmente a A β agregada, incluyendo placas A β , en el cerebro de los mamíferos, particularmente humano pero, preferiblemente, no presenta ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora amiloide (APP).
- 25 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo descrito anteriormente en esta memoria, cuyo anticuerpo se une sustancialmente a amiloide polimérico soluble, particularmente amiloide β (A β), incluyendo monómeros A β , en el cerebro de los mamíferos, particularmente humano, pero, preferiblemente, no presenta ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora amiloide (APP).
- 30 Se proporciona además un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo descrito anteriormente en esta memoria, cuyo anticuerpo reduce significativamente la carga de placa A β en el cerebro de los mamíferos, particularmente humano. Esto puede conseguirse ya sea mediante la unión del anticuerpo a la placa o desplazando el equilibrio entre el amiloide, particularmente amiloide β (A β), en su estado insoluble y agregado hacia su forma soluble desagregando fibras a formas poli- y monoméricas solubles
- 35 induciendo un cambio en conformación y uniendo y estabilizando las formas amiloides desagregadas y solubilizadas, particularmente formas amiloide β (A β), en el tejido y/o fluidos corporales, particularmente en el cerebro. A través de la actividad del anticuerpo según la invención, el aclaramiento y catabolismo periférico está así favorecido en lugar de la deposición dentro del tejido y/o fluidos corporales, particularmente el cerebro. El efecto beneficioso del anticuerpo según la invención puede obtenerse así sin unión del anticuerpo a la placa.
- 40 A través de esta actividad estabilizadora, el anticuerpo según la invención es capaz de neutralizar los efectos tóxicos de la proteína amiloide soluble polimérica y menos agregada, particularmente la proteína β amiloide (A β), en el tejido y/o fluidos corporales. En una realización específica el anticuerpo puede así lograr sus efectos beneficiosos sin unirse necesariamente a la amiloide β agregada en el cerebro.
- 45 En un aspecto adicional se proporciona un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describe anteriormente en esta memoria que comprende al menos una cadena ligera o un fragmento de la misma o al menos una cadena pesada o un fragmento de la misma que incorpora al menos una, particularmente dos y más particularmente tres regiones CDR obtenidas de un anticuerpo donante de ratón, particularmente de un anticuerpo de ratón ACI-01-Ab7C2 (llamado "mC2" y hC2 para el anticuerpo humanizado C2, a lo largo de la solicitud) depositado el 01 de diciembre de 2.005 con la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
- 50 (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Branuschweig, con el n° de acceso DSM ACC2750), en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo tiene una afinidad con el antígeno A β que es al menos 5 veces, particularmente al menos 8 veces, más particularmente al menos 10 veces, pero especialmente al menos 15 veces mayor que aquella del anticuerpo donante de ratón.
- 55 El anticuerpo puede ser, en una realización, un anticuerpo completo (p. ej., con dos cadenas ligeras de longitud completa y dos cadenas pesadas de longitud completa) de cualquier isotipo y subtipo (p. ej., IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA1 e IgA2); pero especialmente un anticuerpo del isotipo IgG4; alternativamente, en otra realización, puede ser un fragmento de unión a antígeno (p. ej., Fab, F(ab')₂, y Fv) del anticuerpo completo.
- Así también se proporcionan los fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos descritos en esta memoria. En

una realización, el fragmento se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab)₂, y un fragmento Fv, que incluye los productos de una biblioteca de expresión de inmunoglobulina Fab y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anticuerpos y fragmentos mencionados anteriormente.

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

- 10 Además se proporciona una molécula de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describió antes en esta memoria.

En particular, se proporciona una molécula de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un tramo de moléculas de aminoácidos contiguos como se indica en SEQ ID NO: 2 y 3, respectivamente, o la secuencia complementaria, que representa las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDRs) 2 y 3 de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR).

- 15 Más particularmente, se proporciona una molécula de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un tramo de moléculas de aminoácidos contiguos como se indica en SEQ ID NO: 4, o la secuencia complementaria, que representa las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDRs) 1 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR).

- 20 En otra realización se proporciona una molécula de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos como se indica en SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19, o la secuencia complementaria, que codifica la secuencia de aminoácidos de CDR2 y CDR3, respectivamente, de la Región Variable de la Cadena Pesada (HCVR).

En otra realización se proporciona una molécula de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos como se indica en SEQ ID NO: 20, o la secuencia complementaria, que codifica la secuencia de nucleótidos de CDR1 de la Región Variable de la Cadena Ligera (LCVR).

- 25 En otra realización se proporciona una molécula de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 21, o la secuencia complementaria, que codifica la región variable de la cadena ligera.

En otra realización se proporciona una molécula de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 22, o la secuencia complementaria, que codifica la región variable de la cadena ligera completa que incluye secuencias señal.

- 30 En otra realización se proporciona una molécula de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 22 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 23. También se describe la cadena complementaria de dicha molécula de nucleótidos.

- 35 En otra realización se proporciona una molécula de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 24 que codifica la región variable de la cadena pesada. También se describe la cadena complementaria de dicha molécula de nucleótidos.

En otra realización se proporciona una molécula de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 25 que codifica la región variable de la cadena pesada completa que incluye secuencias señal. También se describe la cadena complementaria de dicha molécula de nucleótidos.

- 40 En otra realización se proporciona una molécula de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 25 y la región constante de la cadena pesada de SEQ ID NO: 26. También se describe la cadena complementaria de dicha molécula de nucleótidos.

También se describe una secuencia de nucleótidos que hibrida con una de las secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpo descritas anteriormente, particularmente con la cadena complementaria de la misma, ya sea de forma aislada o como parte de una molécula de nucleótidos más grande.

- 45 En particular, se proporciona una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones de hibridación convencionales, particularmente en condiciones de hibridación astringentes, con cualquiera de las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID Nos: 18-26 y 29-32, particularmente con la cadena complementaria de la misma.

En otra realización se proporciona un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico como se mencionó anteriormente en esta memoria.

- 50 En otra realización se proporciona una célula que comprende un vector de expresión que comprende el ácido nucleico como se mencionó anteriormente en esta memoria.

Aún en otra realización, se proporciona una composición que comprende el anticuerpo, pero particularmente un

anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describió anteriormente en esta memoria, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o cualquier parte funcional o derivada del mismo, en una cantidad terapéuticamente eficaz, en particular una composición que es una composición farmacéutica que comprende opcionalmente además un soporte farmacéuticamente aceptable.

5 En otra realización, dicha composición comprende el anticuerpo en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Se describe además una composición o mezcla que comprende un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describió anteriormente en esta memoria que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o cualquier parte funcional o derivada del mismo, en una cantidad terapéuticamente eficaz y, opcionalmente, además una sustancia biológicamente activa y/o un soporte farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente y/o un excipiente.

10 En particular, se proporciona una composición o mezcla, en donde la sustancia biológicamente activa adicional es un compuesto usado en la medicación de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con proteína amiloide o tipo amiloide como la proteína A β implicada en la enfermedad de Alzheimer.

15 En otra realización, la otra sustancia o compuesto biológicamente activo puede ser también un agente terapéutico que se puede usar en el tratamiento de amiloidosis causada por amiloide β o se puede usar en la medicación de otros trastornos neurológicos.

La otra sustancia o compuesto biológicamente activo puede ejercer su efecto biológico mediante el mismo mecanismo o uno similar que el anticuerpo o mediante un mecanismo de acción no relacionado o mediante una multitud de mecanismos de acción relacionados o no relacionados.

20 Generalmente, el otro compuesto biológicamente activo puede incluir potenciadores de transmisión de neutrones, fármacos psicoterapéuticos, inhibidores de acetilcolinesterasa, bloqueantes de canales de calcio, aminas biogénicas, tranquilizantes de benzodiacepina, síntesis de acetilcolina, potenciadores de almacenamiento o de liberación, agonistas del receptor post-sináptico de acetilcolina, inhibidores de monoamina oxidasa-A o -B, antagonistas del receptor N-metil-D-aspartato glutamato, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, antioxidantes, y antagonistas del receptor serotoninérgico.

Más particularmente, se proporciona una composición o mezcla que comprende al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos eficaces frente al estrés oxidativo, compuestos anti-apoptóticos, quelantes de metales, inhibidores de la reparación de DNA como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanedisulfonato (1,3PDS), activadores de α -secretasa, inhibidores de β - y γ -secretasa, proteínas tau, neurotransmisor, destructor de lámina β , atractores de componentes celulares de aclaramiento/disminución de beta amiloide, inhibidores de beta amiloide truncado N-terminal que incluye amiloide piroglutamato, beta 3-42, moléculas anti-inflamatorias, o inhibidores de colinesterasa (ChEIs) como tacrina, rivastigmina, donepezilo, y/o galantamina, agonistas M1 y otros fármacos que incluyen cualquier fármaco que modifica amiloide o tau y suplementos nutritivos, y suplementos nutritivos, junto con un anticuerpo y, opcionalmente, un soporte farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente y/o un excipiente.

Se proporciona además una composición o una mezcla, en donde el compuesto es un inhibidor de colinesterasa (ChEIs), particularmente una mezcla, en donde el compuesto es uno seleccionado del grupo que consiste en tacrina, rivastigmina, donepezilo, galantamina, niacina y memantina.

40 En una realización adicional, las composiciones pueden comprender niacina o memantina junto con un anticuerpo y, opcionalmente, un soporte farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente y/o un excipiente.

Aún en otra realización se proporcionan composiciones que comprenden "anti-psicóticos atípicos" como clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol o olanzapina, para el tratamiento de síntomas psicóticos positivos y negativos, que incluyen alucinaciones, delirios, trastornos del pensamiento (manifestados por marcada incoherencia, descarrilamiento, tangencialidad), y comportamiento extraño o desorganizado, así como anhedonia, afecto aplanado, apatía, aislamiento social, junto con un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se definió en esta memoria y, opcionalmente, un soporte farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente y/o un excipiente.

50 En una realización específica, las composiciones y mezclas como se describen anteriormente en esta memoria comprenden el anticuerpo y la sustancia biológicamente activa, respectivamente, en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Otros compuestos que pueden ser adecuadamente usados en mezclas en combinación con el anticuerpo se describen en WO2004/058258 (véanse específicamente páginas 16 y 17) que incluyen fármacos terapéuticos objetivo (página 36-39), ácidos alcanosulfónicos y ácidos alcanosulfúricos (páginas 39-51), inhibidores de colinesterasa (páginas 51-56), antagonistas del receptor NMDA (páginas 56-58), estrógenos (páginas 58-59),

fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (páginas 60-61), antioxidantes (páginas 61-62), agonistas del receptor activado por proliferadores de peroxisoma (PPAR) (páginas 63-67), agentes reductores de colesterol (páginas 68-75); inhibidores de amiloide (páginas 75-77), inhibidores de formación de amiloide (páginas 77-78), quelantes de metales (páginas 78-79), anti-psicóticos y anti-depresivos (páginas 80-82), suplementos nutricionales (páginas 83-89) y compuestos que aumentan la disponibilidad de sustancias biológicamente activas en el cerebro (véanse páginas 89-93) y pro-fármacos (páginas 93 y 94).

En otra realización, se proporciona una composición que comprende el anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, más particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describe anteriormente en esta memoria y/o la sustancia biológicamente activa en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Se describe además en esta memoria el uso de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, más particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describe anteriormente en esta memoria, y/o una parte funcional del mismo y/o una composición farmacéutica, o una mezcla que comprende dicho anticuerpo, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o el alivio de los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placa amiloide que incluyen amiloidosis secundaria y amiloidosis asociada con la edad como enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos como la Enfermedad de Alzheimer (AD), demencia con cuerpos de Lewy (LBD), síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Holandés); complejo parkinsonismo-demencia de Guam; así como otras enfermedades que están basadas en o asociadas con proteínas tipo amiloide como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia asociada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), Diabetes de Inicio en Adultos; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos, y otras enfermedades, incluyendo enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionadas con beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, como degradación neuronal. Estas anomalías patológicas pueden ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales, la cámara anterior y el nervio óptico dando lugar al glaucoma, el cristalino dando lugar a catarata debida a la deposición de beta-amiloide, el vítreo dando lugar a amiloidosis ocular, la retina dando lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular asociada con la edad, el nervio óptico dando lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica, y la córnea dando lugar a distrofia reticular.

También se proporciona un método para la preparación de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, más particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describe en esta memoria, y/o una parte funcional del mismo y/o una composición farmacéutica, o una mezcla que comprende dicho anticuerpo y/o una parte funcional del mismo, particularmente en una cantidad terapéuticamente eficaz, para usar en un método de prevención, tratamiento o alivio de los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placa amiloide incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis asociada con la edad como enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos como la Enfermedad de Alzheimer (AD), demencia con cuerpos de Lewy (LBD), síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Holandés), complejo parkinsonismo-demencia de Guam; así como otras enfermedades que están basadas en o asociadas con proteínas tipo amiloide como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia asociada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), Diabetes de Inicio en Adultos; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos, y otras enfermedades, incluyendo enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionadas con beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, como degradación neuronal, que comprende la formulación de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, más particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo en una forma farmacéuticamente aceptable. Las anomalías patológicas pueden ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico dando lugar al glaucoma; el cristalino dando lugar a catarata debida a la deposición de beta-amiloide; el vítreo dando lugar a amiloidosis ocular; la retina dando lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico dando lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica, y la córnea dando lugar a distrofia reticular.

Se proporciona además un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placa amiloide incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis asociada con la edad en un sujeto que lo necesite, administrando un anticuerpo y/o una parte funcional del mismo, más particularmente un anticuerpo humanizado y/o una parte funcional del mismo, o una composición o mezcla que comprende dicho anticuerpo y/o una parte funcional del mismo, como se describe en esta memoria, a un sujeto, en particular un mamífero, más particularmente un humano afectado por tal trastorno. Estas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos como la Enfermedad de Alzheimer (AD), demencia con cuerpos de Lewy (LBD), síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Holandés); complejo parkinsonismo-demencia de Guam, así como otras enfermedades que están basadas en o asociadas con proteínas tipo amiloide como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeldt Jacob,

5 enfermedad de Parkinson, demencia asociada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), Diabetes de Inicio en Adultos; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos, y otras enfermedades, incluyendo enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionadas con beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, como degradación neuronal, en donde las anomalías patológicas pueden ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como el
10 córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico dando lugar al glaucoma; el cristalino dando lugar a catarata debida a la deposición de beta-amiloide; el vítreo dando lugar a amiloidosis ocular; la retina dando lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico dando lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea dando lugar a distrofia reticular.

15 Se proporciona además un método para el tratamiento de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placa amiloide que incluye amiloidosis secundaria y amiloidosis asociada con la edad que incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos, como enfermedad de Alzheimer (AD), y otras enfermedades, incluyendo enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con amiloide-beta en los tejidos del sistema visual, como degradación neuronal. Las anomalías patológicas pueden ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico dando lugar al glaucoma; el cristalino dando lugar a catarata debida a la deposición de beta-amiloide; el vítreo dando lugar a amiloidosis ocular; la retina dando lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico dando lugar a drusas del nervio
20 óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea dando lugar a distrofia reticular.

25 En una realización específica se proporciona un método para retener o aumentar la capacidad de memoria cognitiva pero, particularmente, para restaurar la capacidad de memoria cognitiva de un sujeto, particularmente un mamífero o un humano, que padece deterioro de la memoria administrando a un sujeto, particularmente un mamífero o un humano, un anticuerpo, particularmente una composición farmacéutica como se describió anteriormente en esta memoria.

30 Se proporciona además una composición terapéutica y un método de producir dicha composición así como un método para el tratamiento de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placa amiloide que incluye amiloidosis secundaria y amiloidosis asociada con la edad, en un sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un humano. Estas enfermedades y trastornos incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos, como enfermedad de Alzheimer (AD), y otras enfermedades, incluyendo enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con amiloide-beta en los tejidos del sistema visual, como degradación neuronal. Las anomalías patológicas pueden ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico dando lugar al glaucoma; el cristalino dando lugar a catarata debida a la deposición de beta-amiloide; el vítreo dando lugar a amiloidosis ocular; la retina dando lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico dando lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la
35 córnea dando lugar a distrofia reticular.

40 Se proporciona además un método de diagnóstico de la enfermedad o afección asociadas con amiloide en un sujeto que lo necesite, que comprende detectar la unión inmunespecífica de un anticuerpo o un fragmento activo del mismo a un epítopo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ* que incluye las etapas de

- 45 (a) poner en contacto la muestra o una parte corporal o área corporal específica sospechosa de contener la proteína amiloide con el anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, más particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describió en esta memoria, y/o una parte funcional del mismo, cuyo anticuerpo se une a un epítopo de la proteína amiloide;
- (b) permitir que el anticuerpo y/o una parte funcional del mismo, se una a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;
- 50 (c) detectar la formación del complejo inmunológico; y
- (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra o parte o área corporal específica del sujeto.

También comprende un método para determinar la extensión de carga de placa amiloidogénica en un tejido y/o fluidos biológicos en un sujeto que lo necesite que comprende

- 55 (a) obtener una muestra representativa del tejido y/o fluidos biológicos en investigación;
- (b) probar dicha muestra para la presencia de proteína amiloide con un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, más particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un

anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describió anteriormente en esta memoria, y/o una parte funcional del mismo;

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

(d) calcular la carga de placa en el tejido y/o fluidos biológicos.

5 En particular, se proporciona un método para determinar el grado de carga de placa amiloidogénica en un tejido y/o fluidos biológicos, en donde se determina la formación del complejo inmunoalérgico en la etapa c) de modo que la presencia o ausencia del complejo inmunoalérgico se correlaciona con la presencia o ausencia de proteína amiloide.

10 En otra realización, se proporciona un kit de prueba para la detección y diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas con amiloide que comprende un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, más particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describió anteriormente en esta memoria, y/o una parte funcional del mismo.

15 En particular, se proporciona un kit de prueba para la detección y diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas con amiloide que comprende un contenedor que contiene uno o más anticuerpos, y/o parte funcional de los mismos, instrucciones para usar los anticuerpos con el fin de unirse a la proteína amiloide para formar un complejo inmunoalérgico y detectar la formación del complejo inmunoalérgico de modo que la presencia o ausencia del complejo inmunoalérgico se correlacione con la presencia o ausencia de proteína amiloide.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que comprende una región variable como se narra en SEQ ID NO: 27, o una variante de la misma. En una realización, se proporciona una línea celular que expresa el anticuerpo.

20 En otro aspecto, se proporciona un gen de anticuerpo que comprende una región variable como se describe en SEQ ID NO: 29, o una variante del mismo. En una realización, una línea celular expresa el anticuerpo.

En otro aspecto, se proporciona un método para desagregar fibras de beta-amiloide preformadas, que comprende hacer interaccionar un anticuerpo hC2 con fibras de beta-amiloide preformadas.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo protege a las neuronas de la degradación inducida por Abeta.

25 En otro aspecto, se proporciona un método para prevenir la degradación neuronal inducida por Abeta en un sujeto que lo necesita que comprende tratar las neuronas con una cantidad eficaz de un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la descripción en esta memoria.

30 En otro aspecto, se describe en esta memoria el uso de un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la descripción en esta memoria para la preparación de un medicamento para prevenir la degeneración de neuronas tras la exposición a oligómero Abeta.

Estos y otros objetos, características y ventajas de la descripción se harán evidentes después de una revisión de la siguiente descripción detallada de la realización descrita y de las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

35 Figuras 1-1 y 1-2 (Ejemplo 2): Casete de Expresión de la región variable de la cadena ligera de ratón del Anticuerpo Quimérico.

Figuras 2-1 y 2-2 (Ejemplo 2): Casete de Expresión de la región variable de la cadena pesada de ratón del Anticuerpo Quimérico.

Figura 3 (Ejemplo 5.2): Comparación de la secuencia de la región variable de la cadena pesada de ratón con la de la línea germinal murina más cercana.

40 Figura 4 (Ejemplo 8): Actividad de anticuerpos C2 humanizados purificados.

Figura 5 (Ejemplo 9): Actividad de unión de anticuerpos producidos por expresión transitoria de constructos CDRL2 modificados de C2 en conjunto con la cadena pesada quimérica de C2, comparado con el anticuerpo quimérico C2ChVHAF/ChVK, producido por transfección transitoria y el anticuerpo purificado.

45 Figura 6 (Ejemplo 11): Resultados del Ensayo de Unión Inmunohistoquímica con anticuerpo quimérico AF y anticuerpo humanizado H4K1.

Figura 7 (Ejemplo 12): Funcionalidad de mC2 sobre fibras de Amiloide. (A) Comparación de espectros de ¹³C CPMAS y ajustes para Tyr 10 y Val12 marcadas con U-¹³C de fibras de amiloide β1-42 incubadas con PBS (el de la izquierda sirve como control) o ACI-7-C2 (derecha) durante 24 horas y después liofilizadas. El pico a c33 ppm corresponde con la conformación en lámina beta de las fibras mientras que el pico a 30 ppm es un resultado de

conformación aleatoria en espiral. (B) Comparación de los parámetros ajustados para las dos conformaciones de Val12 C β . Los cambios químicos ajustados para las dos conformaciones son bastante similares pero las intensidades integrales son bastante diferentes, reflejando una reducción de la conformación en lámina beta original en aproximadamente 35% (1-(53,5/81,7)), de acuerdo con el valor obtenido de medida de fluorescencia.

5 Figura 8 (Ejemplo 12): Afinidad de Unión de C2 humanizado en ELISA.

Figura 9 (Ejemplo 14): Unión específica de conformación de mC2 a diferentes clases de proteína amiloide. Preparación de precipitado en la leyenda de esta figura se refiere a fibras de A β ₁₋₄₂, preparación de sobrenadante se refiere a monómeros de amiloide.

10 Figura 10: Secuencias VK de C2 humanizado comparadas con secuencia murina y secuencias de aceptor humano DPK15 y J κ 1.

Figura 11: Secuencias VH de C2 humanizado comparadas con secuencia murina y secuencias de aceptor humano DPK54 y J μ 6.

Figuras 12-1 y 12-2: Secuencia completa de DNA y proteína de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado C2, C2HuVK1.

15 Figuras 13-1-13-10: Secuencia completa de DNA y proteína de la región constante (kappa C humana) de la cadena ligera del anticuerpo humanizado C2.

Figuras 14-1-14-14: Secuencia completa de DNA y proteína de la región constante (ser228-pro IgG4 humana) de la cadena pesada del anticuerpo humanizado C2.

20 Figura 15A-C (Ejemplo 15): Mapeo de Epítipo del anticuerpo monoclonal humanizado hC2 realizado por ELISA. Los resultados se expresan como DO. (A) Unión de hC2 a péptidos solapantes A β ₁₋₄₂. Se usaron la unión al A β ₁₋₄₂ completo y la unión a un anticuerpo control quimérico que no se une como controles positivo y negativo, respectivamente. El número del péptido se corresponde con el aminoácido en la secuencia de A β ₁₋₄₂ en el que empieza el péptido. (B) Unión de hC2 a A β ₁₂₋₂₀ y a A β ₁₂₋₂₀ con alanina sustituida. Se usó la unión al A β ₁₋₄₂ completo como control positivo. El número del péptido se corresponde con el aminoácido que está sustituido por alanina. (C)
25 Unión de hC2 a los péptidos A β 13-21, 13-21G21, 14-22, 14-22A22, 15-23 y 15-23A23. Se usó la unión al A β ₁₋₄₂ completo como control positivo.

Figura 16 (Ejemplo 13): Resultados de experimentos del ensayo de agregación.

Figura 17 (Ejemplo 13): Resultados de experimentos del ensayo de desagregación.

Figura 18 (Ejemplo 16): Resultados de experimentos de neuroprotección con anticuerpo humanizado C2.

30 **Breve descripción de las secuencias**

SEQ ID NO: 1. Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (CDR1) de C2 HuVH AF 4 humanizado.

SEQ ID NO: 2. Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (CDR2) de C2 HuVH AF 4 humanizado.

35 SEQ ID NO: 3. Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (CDR3) de C2 HuVH AF 4 humanizado.

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

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

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

SEQ ID NO: 7. Secuencia de aminoácidos de la región 2 del epítipo A β .

SEQ ID NO: 8. Secuencia de aminoácidos de la región 1 del epítipo A β .

45 SEQ ID NO: 9. Secuencia de aminoácidos de la región 2 modificada del epítipo A β .

SEQ ID NO: 10. Secuencia de aminoácidos de la región 1 modificada del epítipo A β .

- SEQ ID NO: 11. Secuencia de aminoácidos de la región modificada completa del Epítipo.
- SEQ ID NO: 12. Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de C2 HuVK 1 humanizado.
- SEQ ID NO: 13. Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de C2 humanizado.
- SEQ ID NO: 14. Secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera de C2 humanizado.
- 5 SEQ ID NO: 15. Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de C2 HuVH AF 4 humanizado.
- SEQ ID NO: 16. Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de C2 humanizado.
- SEQ ID NO: 17. Secuencia de aminoácidos de la región modificada de la cadena C de IG GAMMA-4.
- 10 SEQ ID NO: 18. Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada CDR2 de C2 HuVH AF 4 humanizado.
- SEQ ID NO: 19. Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada CDR3 de C2 HuVH AF 4 humanizado.
- SEQ ID NO: 20. Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera CDR1 de C2 HuVK 1 humanizado.
- 15 SEQ ID NO: 21. Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de C2 HuVK 1 humanizado.
- SEQ ID NO: 22. Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de C2 humanizado.
- SEQ ID NO: 23. Secuencia de nucleótidos de la región constante de la cadena ligera de C2 humanizado.
- SEQ ID NO: 24. Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada de C2 HuVH AF 4 humanizado.
- SEQ ID NO: 25. Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de C2 humanizado.
- 20 SEQ ID NO: 26. Secuencia de nucleótidos de la región constante de la cadena pesada de C2 humanizado.
- SEQ ID NO: 27. Secuencia de aminoácidos de la Región Variable de la Cadena Ligera de C2 de ratón.
- SEQ ID NO: 28. Secuencia de aminoácidos de la Región Variable de la Cadena Pesada de C2 de ratón.
- SEQ ID NO: 29. Secuencia de nucleótidos de la Región Variable de la Cadena Ligera de C2 de ratón.
- SEQ ID NO: 30. Secuencia de nucleótidos de la Cadena Ligera de C2 de ratón.
- 25 SEQ ID NO: 31. Secuencia de nucleótidos de la Región Variable de la Cadena Pesada de C2 de ratón.
- SEQ ID NO: 32. Secuencia de nucleótidos de la Cadena Pesada de C2 de ratón.

Descripción detallada de la invención

30 Los anticuerpos que incluyen cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales de los mismos, o, más particularmente, un anticuerpo humanizado que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales de los mismos, como se describió en esta memoria se pueden usar para el tratamiento de enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con amiloide-beta en los tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, degradación neuronal. Las anomalías patológicas pueden ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico dando lugar al glaucoma; el cristalino dando lugar a catarata debida a la deposición de beta-amiloide; el vítreo dando lugar a amiloidosis ocular; la retina dando lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico dando lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea dando lugar a distrofia reticular.

40 En particular, se puede usar una composición, particularmente una composición terapéutica que comprende un anticuerpo, particularmente un anticuerpo humanizado que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales de los mismos, como se describió en esta memoria en una cantidad terapéuticamente eficaz para el tratamiento de enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con amiloide-beta en los tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, degradación neuronal. Las anomalías patológicas pueden ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico dando lugar al glaucoma; el cristalino dando lugar a catarata debida a la deposición de

45

beta-amiloide; el vítreo dando lugar a amiloidosis ocular; la retina dando lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico dando lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea dando lugar a distrofia reticular.

5 En otra realización, se proporciona la composición a usar en el tratamiento de enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con amiloide-beta en los tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, degradación neuronal, en forma de una mezcla, en donde el anticuerpo y otras sustancias biológicamente activas se entremezclan en o con el mismo solvente y/o soporte farmacéuticamente aceptable, o se puede proporcionar el anticuerpo o la otra sustancia biológicamente activa separadamente como parte de una composición separada, que se puede ofrecer separadamente o juntas en forma de un kit de las partes. Las anomalías patológicas pueden ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico dando lugar al glaucoma; el cristalino dando lugar a catarata debida a la deposición de beta-amiloide; el vítreo dando lugar a amiloidosis ocular; la retina dando lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico dando lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea dando lugar a distrofia reticular.

20 El glaucoma es un grupo de enfermedades del nervio óptico que implican pérdida de células ganglionares retinianas (RGCs) en un patrón característico de neuropatía óptica. El glaucoma se acompaña frecuentemente, pero no siempre, por un incremento de la presión ocular, que puede dar lugar a un bloqueo de la circulación del acuoso, o su drenaje.

Aunque la presión intraocular aumentada es un factor de riesgo significativo para el desarrollo de glaucoma, no se puede definir un umbral de presión intraocular que sería determinante para causar glaucoma.

Este daño también puede ser causado por aporte pobre de sangre a las fibras del nervio óptico vitales, una debilidad en la estructura del nervio, y/o un problema en la salud de las fibras nerviosas en sí mismas.

25 El glaucoma no tratado da lugar a un daño permanente del nervio óptico y pérdida del campo visual resultante, que puede progresar hacia ceguera.

30 Las RGCs son las células nerviosas que transmiten señales visuales desde el ojo hasta el cerebro. La Caspasa-3 y la Caspasa-8, dos enzimas principales en el proceso apoptótico, se activan en el proceso dando lugar a apoptosis de RGCs. La Caspasa-3 rompe la proteína precursora amiloide (APP) para producir fragmentos neurotóxicos, que incluyen Amiloide β . Sin el efecto protector de APP, la acumulación de Amiloide β en la capa celular ganglionar retiniana da lugar a la muerte de RGCs y pérdida irreversible de visión.

Los diferentes tipos de glaucomas se clasifican en glaucomas de ángulo abierto, si la afección es crónica, o glaucomas de ángulo cerrado, si el glaucoma agudo ocurre repentinamente. El glaucoma afecta normalmente a ambos ojos, pero la enfermedad puede progresar más rápidamente en un ojo que en el otro.

35 El glaucoma de ángulo abierto (COAG), también conocido como glaucoma de ángulo abierto primario (POAG), es el tipo de glaucoma más común. El COAG es causado por bloqueo microscópico en el entramado trabecular, que disminuye el drenaje del flujo acuoso dentro del canal de Schlemm y aumenta la presión intraocular (IOP). El POAG normalmente afecta a ambos ojos y está fuertemente asociado con la edad y una historia familiar positiva. Su frecuencia aumenta en la gente mayor ya que el mecanismo de drenaje del ojo se puede atascar gradualmente con el envejecimiento. El aumento de la presión intraocular en sujetos afectados por glaucoma de ángulo abierto crónico no se acompaña de ningún síntoma hasta que se siente la pérdida en el área visual central.

45 El glaucoma de ángulo cerrado agudo (AACG) o glaucoma de ángulo cerrado es un tipo de glaucoma relativamente raro caracterizado por un aumento repentino en la presión intraocular de 35 a 80 mmHg, dando lugar a un dolor severo y pérdida de visión irreversible. El aumento de presión repentino es causado por el cierre del ángulo de filtrado y bloqueo de los canales de drenaje. Individuos con ángulos estrechos tienen un riesgo aumentado de cierre repentino del ángulo. La AACG ocurre normalmente de modo monocular, pero existe el riesgo en ambos ojos. La edad, catarata y pseudoexfoliación son también factores de riesgo ya que están asociadas con agrandamiento de las lentes y aglomeración o estrechamiento del ángulo. Un ataque de glaucoma repentino puede estar asociado con dolor ocular y dolor de cabeza severos, ojo inflamado, náusea, vómito, y visión borrosa.

50 El Glaucoma de Mecanismo Mixto o Combinado es una mezcla o combinación de glaucoma de ángulo abierto y cerrado. Afecta a pacientes con ACG cuyo ángulo se abre tras iridotomía láser, pero que continúan requiriendo medicación para controlar la IOP, así como pacientes con POAG o glaucoma pseudoexfoliativo que gradualmente desarrollan estrechamiento del ángulo.

55 El glaucoma de tensión normal (NTG), también conocido como glaucoma de baja tensión (LTG), se caracteriza por daño progresivo del nervio óptico y pérdida de visión periférica similar a la que se ve en otros tipos de glaucoma; sin embargo, la presión intraocular está dentro del intervalo normal o incluso por debajo de lo normal.

El glaucoma congénito (infantil) es un tipo de glaucoma de ángulo abierto heredado, relativamente raro. El desarrollo insuficiente del área de drenaje da como resultado una presión aumentada en el ojo que puede dar lugar a una pérdida de visión desde el daño del nervio óptico hasta un ojo agrandado. El diagnóstico y tratamiento tempranos son críticos para preservar la visión en bebés y niños afectados por la enfermedad.

- 5 El glaucoma secundario puede ser resultado de un daño ocular, inflamación en el iris del ojo (iritis), diabetes, catarata, o uso de esteroides en individuos susceptibles a esteroides. El glaucoma secundario puede estar también asociado con desprendimiento de retina u oclusión o bloqueo de vena retiniana.

El glaucoma pigmentario se caracteriza por el desprendimiento de gránulos de pigmento del iris. Los gránulos causan bloqueo del sistema de drenaje del ojo, dando lugar a presión intraocular elevada y daño del nervio óptico.

- 10 El glaucoma exfoliativo (pseudoexfoliación) se caracteriza por depósitos de material escamoso en la cápsula anterior y en el ángulo del ojo. La acumulación de material escamoso bloquea el sistema de drenaje y eleva la presión del ojo.

Se puede hacer el diagnóstico del glaucoma usando varias pruebas. La tonometría determina la presión en el ojo midiendo el tono o firmeza de su superficie. Para esta prueba están disponibles varios tipos de tonómetros, siendo el más común el tonómetro de aplanación. La paquimetría determina el grosor de la córnea que, a su vez, mide presión intraocular. La gonioscopia permite el examen del ángulo de filtrado y el área de drenaje del ojo. La gonioscopia también puede determinar si los vasos sanguíneos anómalos pueden estar bloqueando el drenaje del fluido acuoso fuera del ojo. La oftalmoscopia permite el examen del nervio óptico y puede detectar el desprendimiento de la capa de fibra nerviosa o cambios en el disco óptico, o indentación (ahuecado) de esta estructura, que puede ser causada por presión intraocular aumentada o desprendimiento axonal. La gonioscopia puede también ser útil en valoración del daño del nervio por flujo sanguíneo pobre o presión intraocular elevada. Las pruebas de Campo Visual traza un mapa del campo de visión, subjetivamente, que puede detectar signos de daño glaucomatoso del nervio óptico. Esto se representa por patrones específicos de pérdida de campo visual. La tomografía de coherencia ocular, una medida objetiva de la pérdida de la capa de fibra nerviosa, se lleva a cabo mirando el grosor de la capa de fibra del nervio óptico (alterada en el glaucoma) a través de un diferencial de transmisión de luz a través del tejido axonal dañado.

Las drusas del nervio óptico son concreciones globulares de proteína y sales de calcio que se considera que representan secreciones a través de estructuras vasculares alteradas que afectan a la capa de fibra nerviosa axonal. Estas acumulaciones tienen lugar en la capa de fibra nerviosa peripapilar y se considera que dañan la capa de fibra nerviosa ya sea directamente por compresión o indirectamente a través de interrupción del suministro vascular a la capa de fibra nerviosa. Normalmente se hacen visibles después de la primera década de la vida en individuos afectados. Ocurren más frecuentemente en ambos ojos pero también pueden afectar a un ojo, y pueden causar pérdida ligera de visión periférica durante muchos años.

La neuropatía óptica es una enfermedad caracterizada por daño al nervio óptico causado por desmielinización, bloqueo del suministro sanguíneo, deficiencias nutricionales, o toxinas. Las neuropatías ópticas desmielinizantes (véase más adelante neuritis óptica) están típicamente causadas por un proceso desmielinizante subyacente como la esclerosis múltiple. El bloqueo del suministro sanguíneo, conocido como neuropatía óptica isquémica, puede dar lugar a la muerte o disfunción de las células nerviosas ópticas. La neuropatía óptica isquémica no arterítica tiene lugar en gente de mediana edad. Factores de riesgo incluyen presión sanguínea alta, diabetes y arterioesclerosis. La neuropatía óptica isquémica arterítica normalmente tiene lugar en gente mayor seguido de inflamación de las arterias (arteritis), particularmente la arteria temporal (arteritis temporal). La pérdida de visión puede ser rápida o desarrollarse gradualmente durante 2 a 7 días y el daño puede ser en uno o en ambos ojos. En personas con neuropatía óptica causada por exposición a una toxina o a una deficiencia nutricional, normalmente están afectados ambos ojos.

Alrededor del 40% de las personas con neuropatía óptica isquémica no arterítica experimentan mejoría espontánea a lo largo del tiempo. La neuropatía óptica isquémica no arterítica se trata mediante control de los niveles de presión arterial, diabetes y colesterol. La neuropatía óptica isquémica arterítica se trata con altas dosis de corticoesteroides para prevenir la pérdida de visión en el segundo ojo.

La neuritis óptica se asocia con pérdida de visión ligera o severa en uno o ambos ojos y puede estar causada por un proceso desmielinizante sistémico (véase anteriormente), infección viral, vacunación, meningitis, sífilis, esclerosis múltiple e inflamación intraocular (uveítis). El movimiento ocular puede ser doloroso y la visión se puede deteriorar con episodios repetidos. El diagnóstico implica examen de las reacciones de las pupilas y determinar si el disco óptico está dilatado. La imagen por resonancia magnética (MRI) puede mostrar evidencia de esclerosis múltiple o, raramente, un tumor que presiona sobre el nervio óptico, en cuyo caso mejora la visión una vez que la presión del tumor se alivia. La mayoría de los casos de neuritis óptica mejoran durante unos pocos meses sin tratamiento. En algunos casos puede ser necesario el tratamiento con corticoesteroides intravenosos.

La catarata es una opacidad que se desarrolla en la lente del cristalino del ojo o en su envoltura. Las cataratas causan típicamente pérdida de visión progresiva y pueden causar ceguera si permanecen sin tratar. En la Catarata Morgagniana, el córtex de la catarata se licúa progresivamente para formar un fluido blanco lechoso y puede causar

inflamación severa si la cápsula del cristalino se rompe y se filtra. Si no se trata, la catarata también puede causar glaucoma facomórfico. Las cataratas pueden ser congénitas por naturaleza o causadas por factores genéticos, edad avanzada, exposición prolongada a radiación ultravioleta, exposición a radiación, diabetes, daño o trauma físico ocular.

- 5 La cirugía extra-capsular (ECCE) es el tratamiento más efectivo para tratar la catarata. En cirugía, se extrae el cristalino, pero la mayor parte de la cápsula del cristalino permanece intacta. La facoemulsificación, una pequeña incisión en un lado de la córnea, se usa típicamente para romper el cristalino antes de la extracción.

10 La amiloidosis ocular es un trastorno hereditario asociado con Polineuropatía Amiloidótica Familiar Tipo I (FAP) y caracterizada por vasos conjuntivos anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías pupilares y, en algunos casos, opacidades del vítreo y glaucoma secundario. La FAP Tipo I se asocia con mutaciones en transtiretina (TTR), una proteína plasmática tetramérica (prealbúmina) sintetizada en el hígado, el pigmento retiniano epitelial 2 y los plexos coroideos del cerebro. Distintas mutaciones causan que la transtiretina se polimerice en una estructura plegada de fibrilla amiloide, dando lugar a la amiloidosis hereditaria. La mutación más frecuente es TTR-met303, en la que la metionina reemplaza la valina en la posición 30 de la transtiretina.

15 La FAP Tipo IV está asociada con distrofia corneal reticular (LCD). La distrofia corneal reticular es una amiloidosis corneal heredada, primaria, normalmente bilateral caracterizada por la presencia líneas reticulares retráctiles con un doble contorno en el estroma corneal. La LCD tipo I (Biber-Haab-Dimmer) es un trastorno corneal simétrico bilateral autosómico dominante caracterizado por la presencia de numerosas líneas reticulares finas translúcidas con puntos blancos y neblina débil en las capas superficial y media del estroma central. Los síntomas comienzan durante la
20 primera o segunda década de vida, causando una pérdida de visión progresiva. La mayoría de los pacientes requieren un trasplante de córnea alrededor de los 40 años de edad. La LCD tipo II está asociada con la amiloidosis sistémica (síndrome de Meretoja) y se caracteriza por la presencia de líneas reticulares gruesas en el limbo, córnea central y estroma. La visión no se ve afectada hasta más adelante en la vida. La LCD tipo III afecta a personas de mediana edad y se caracteriza por la presencia de líneas reticulares gruesas que se extienden de limbo a limbo. La
25 LCD tipo III A se caracteriza por la acumulación de depósitos de amiloide en el estroma y la presencia de cordones de amiloide entre el estroma y la capa de Bowman. La LCD tipo III A se diferencia de la LCD tipo III por la presencia de erosiones corneales, la ocurrencia en personas de raza blanca y de herencia autosómica dominante.

30 El Síndrome de Down (DS) o trisomía 21 es el trastorno genético más común con una incidencia de aproximadamente 1:700 de nacimientos vivos, y se asocia frecuentemente con varias anomalías congénitas. El trastorno, que es causado por la presencia de un cromosoma 21 extra, está asociado con depósitos prematuros de proteína amiloide-beta formadora de placa y desarrollo de enfermedad de Alzheimer a mediana edad. Además, muchas personas afectadas por DS padecen de cataratas que comienzan en la infancia y muchas padecen de glaucoma congénito. Dado que el gen de la proteína precursora amiloide, que es escindida a la forma beta amiloide, se localiza en el brazo largo del cromosoma 21 en humano, la sobre-expresión de este gen puede dar lugar a
35 niveles aumentados de proteína precursora amiloide y deposición de amiloide en el Síndrome de Down.

No hay cura para el glaucoma. Las medicaciones para el tratamiento del glaucoma incluyen agentes que disminuyen la producción del humor acuoso en el ojo, como beta bloqueantes (Timoptic, Betoptic), inhibidores de anhidrasa carbónica (Trusopt, Azopt), y agonistas alfa (Alphagan, lopiclina), y agentes que redirigen el drenaje del humor acuoso a través de una vía diferente hacia el fondo del ojo, como prostaglandina (Xalatan). Las cirugías láser
40 incluyen trabeculoplastia, un procedimiento que ayuda a que el humor acuoso salga del ojo más eficazmente. Según la Fundación Glaucoma, cerca del 80% de pacientes responden bastante bien al procedimiento de retrasar o evitar cirugía posterior. Sin embargo, la presión aumenta de nuevo en los ojos de la mitad de todos los pacientes dentro de los dos años posteriores a la cirugía láser, según el Instituto Nacional del Ojo. La cirugía incisional se realiza si la medicación y los tratamientos de láser iniciales son insatisfactorios en reducir la presión dentro del ojo. Un tipo de
45 cirugía, una trabeculectomía, crea una abertura en la pared del ojo para que el humor acuoso pueda drenar. Sin embargo, aproximadamente un tercio de pacientes trabeculectomizados desarrollan cataratas dentro de los cinco años, según la Fundación de Glaucoma. Si la trabeculectomía falla, procedimientos incisionales adicionales incluyen colocación de un tubo de drenaje dentro del ojo entre la córnea y el iris y el uso de un tratamiento de láser o congelación para destruir tejido en el ojo que produce humor acuoso. La cirugía puede salvar la visión residual en el
50 paciente, pero no mejora la visión. La visión puede realmente empeorar tras la cirugía.

La degeneración macular asociada con la edad (AMD) es la principal causa de ceguera entre Caucásicos mayores de 65 años de edad. Aunque se ha hecho mucho progreso en la actualidad, no hay tratamientos en la investigación de la degeneración macular que rescaten la muerte celular neuronal que ocurre durante el curso de la enfermedad. No hay tratamientos definitivos para otras enfermedades asociadas con la degradación neuronal asociada con
55 amiloide beta, como deficiencias visuales corticales, drusas del nervio óptico, neuropatía óptica, neuritis óptica, amiloidosis ocular y distrofia reticular.

Por consiguiente, existe una necesidad urgente en la técnica para opciones de tratamiento mejoradas para sujetos afectados por enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionadas con el beta-amiloide en los
60 tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, degradación neuronal. Las anomalías patológicas pueden ocurrir, por

ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales, la cámara anterior y el nervio óptico dando lugar a glaucoma; la lente dando lugar a catarata debida a la deposición de beta-amiloide; el vítreo dando lugar a amiloidosis ocular; la retina dando lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico dando lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea dando lugar a distrofia reticular. La presente invención satisface esta necesidad, proporcionando soluciones que eligen como objetivo el proceso que causa una enfermedad ocular asociada con degradación neuronal asociada con amiloide beta en un paciente afectado por la enfermedad.

Además de este objetivo, se describe en esta memoria el uso de un anticuerpo como se describe en esta memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal humanizado que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo y/o de una composición farmacéutica como se describe en esta memoria, para la preparación de un medicamento para tratar o aliviar los efectos de enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionadas con el beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, degradación neuronal, en un sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un humano, que lo necesite. Las anomalías patológicas pueden ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico dando lugar al glaucoma; la lente dando lugar a catarata debida a la deposición de beta-amiloide; el vítreo dando lugar a amiloidosis ocular; la retina dando lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico dando lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea dando lugar a distrofia reticular.

En una realización, se describe en esta memoria una composición farmacéutica o una mezcla como se describe en esta memoria que usa un anticuerpo como se describe en esta memoria, particularmente un anticuerpo monoclonal humanizado que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo para usar en el tratamiento o alivio de los efectos de enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionadas con el beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, degradación neuronal, en un sujeto que lo necesite. Las anomalías patológicas pueden ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico dando lugar al glaucoma; el cristalino dando lugar a catarata debida a la deposición de beta-amiloide; el vítreo dando lugar a amiloidosis ocular; la retina dando lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico dando lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea dando lugar a distrofia reticular.

En otra realización, se proporciona un medicamento que comprende un anticuerpo monoclonal humanizado que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, una composición farmacéutica o una mezcla que comprende el anticuerpo como se describe en esta memoria en una cantidad terapéuticamente eficaz, para prevenir, tratar o aliviar los efectos de enfermedades asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionadas con el beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, degradación neuronal, en un sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un humano, que lo necesite. Las anomalías patológicas pueden ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico dando lugar al glaucoma; el cristalino dando lugar a catarata debida a la deposición de beta-amiloide; el vítreo dando lugar a amiloidosis ocular; la retina dando lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico dando lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea dando lugar a distrofia reticular.

En un aspecto, se proporciona un método para reducir la carga de placa en la capa celular ganglionar retiniana de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un humano que padece una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionadas con el beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, degradación neuronal, que comprende la administración al sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un humano, que necesite tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal humanizado que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla como se describe en esta memoria. Las anomalías patológicas pueden ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico dando lugar al glaucoma; el cristalino dando lugar a catarata debida a la deposición de beta-amiloide; el vítreo dando lugar a amiloidosis ocular; la retina dando lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico dando lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea dando lugar a distrofia reticular. En un aspecto adicional el anticuerpo monoclonal humanizado usado en tales métodos es el C2 humanizado o una parte funcional del mismo como se describe en esta memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal humanizado se produce a partir de un anticuerpo de ratón ACI-01-Ab7C2, depositado el 1 de Diciembre, 2.005, con la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig,

Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, con el nº de acceso DSM ACC2750. En particular, la carga de palca se reduce en al menos 20%, particularmente en al menos 25%, más particularmente en al menos 30%, incluso más particularmente en más del 30%.

5 En otro aspecto, se proporciona un método para reducir la cantidad de placas en la capa celular ganglionar retiniana de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un humano que padece una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionadas con el beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, degradación neuronal, que comprende la administración al sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un humano, que necesite tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal humanizado que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla según la invención y como se describe en esta memoria. Las anomalías patológicas pueden ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico dando lugar al glaucoma; el cristalino dando lugar a catarata debida a la deposición de beta-amiloide; el vítreo dando lugar a amiloidosis ocular; 10 la retina dando lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico dando lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea dando lugar a distrofia reticular. En un aspecto adicional de la invención el anticuerpo monoclonal humanizado usado en tales métodos es el C2 humanizado o una parte funcional del mismo como se describe en esta memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal humanizado se produce a partir de un anticuerpo de ratón ACI-01-Ab7C2, depositado el 1 de Diciembre, 2.005, con la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, con el nº de acceso DSM ACC2750. En particular, la carga de palca en el cerebro se reduce en al menos 10%, particularmente en al menos 15%, más particularmente en más del 15%.

25 Aún en otro aspecto, se proporciona un método para disminuir la cantidad total de A β soluble en la capa celular ganglionar retiniana de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un humano que padece una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionadas con el beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, degradación neuronal, que comprende la administración al sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un humano, que necesite tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal humanizado que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla como se describe en esta memoria. Las anomalías patológicas pueden ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico dando lugar al glaucoma; el cristalino dando lugar a catarata debida a la deposición de beta-amiloide; el vítreo dando lugar a amiloidosis ocular; la retina dando lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico dando lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea dando lugar a distrofia reticular. En un aspecto adicional el anticuerpo monoclonal humanizado usado en tales métodos es el C2 humanizado o una parte funcional del mismo como se describe en esta memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal humanizado se produce a partir de un anticuerpo de ratón ACI-01-Ab7C2, depositado el 1 de Diciembre, 2.005, con la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, con el nº de acceso DSM ACC2750.

45 En otro aspecto, se proporciona un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionadas con el beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, degradación neuronal, en un sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un humano, que necesite tal tratamiento, administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal humanizado que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla como se describe en esta memoria al sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un humano que necesite tal tratamiento. Las anomalías patológicas pueden ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico dando lugar al glaucoma; el cristalino dando lugar a catarata debida a la deposición de beta-amiloide; el vítreo dando lugar a amiloidosis ocular; la retina dando lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico dando lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea dando lugar a distrofia reticular. En un aspecto adicional el anticuerpo monoclonal humanizado usado en tales métodos es el C2 humanizado o una parte funcional del mismo como se describe en esta memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal humanizado se produce a partir de un anticuerpo de ratón ACI-01-Ab7C2, depositado el 1 de Diciembre, 2.005, con la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, con el nº de acceso DSM ACC2750.

60 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionadas con el beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, degradación

neuronal, en un sujeto que comprende detectar la unión inespecífica de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal humanizado, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla como se describe en esta memoria, a un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o in situ que incluye las etapas de: (a) poner en contacto la muestra o una parte corporal o área corporal específica sospechosa de contener la proteína amiloide con el anticuerpo, cuyo anticuerpo se une a un epítipo conformacional de la proteína amiloide; (b) permitir que el anticuerpo se una a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico; (c) detectar la formación del complejo inmunológico, particularmente tal que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlaciona con la presencia o ausencia de proteína amiloide; y (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra o parte o área corporal específica. En un aspecto adicional el anticuerpo monoclonal humanizado usado en tales métodos es el C2 humanizado o una parte funcional del mismo como se describe en esta memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal humanizado se produce a partir de un anticuerpo de ratón ACI-01-Ab7C2, depositado el 1 de Diciembre, 2.005, con la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, con el n° de acceso DSM ACC2750.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para diagnosticar una predisposición a una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionadas con el beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, como degradación neuronal, en un sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un humano que lo necesita, que comprende detectar la unión específica de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal humanizado, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla como se describe en esta memoria, a un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o in situ que incluye las etapas de: (a) poner en contacto la muestra o una parte corporal o área corporal específica sospechosa de contener la proteína amiloide con el anticuerpo, en donde el anticuerpo se une a un epítipo conformacional de la proteína amiloide; (b) permitir que el anticuerpo se una a la proteína amiloide en la muestra para formar un complejo inmunológico; (c) detectar la formación del complejo inmunológico; (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra o parte o área corporal específica, (e) y comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor control normal, en donde un aumento en la cantidad del complejo comparado con el valor del control normal indica que el sujeto está padeciendo o está en riesgo de desarrollar una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionadas con el beta-amiloide en los tejidos del sistema visual. En un aspecto adicional el anticuerpo monoclonal humanizado usado en tales métodos es el C2 humanizado o una parte funcional del mismo como se describe en esta memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal humanizado se produce a partir de un anticuerpo de ratón ACI-01-Ab7C2, depositado el 1 de Diciembre, 2.005, con la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, con el n° de acceso DSM ACC2750.

En otro aspecto, se proporciona un método para monitorizar enfermedad ocular residual mínima asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionadas con el beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, como degradación neuronal, en un sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un humano, seguido de tratamiento con una composición farmacéutica, en donde el método comprende: (a) poner en contacto la muestra o una parte corporal o área corporal específica sospechosa de contener la proteína amiloide con el anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal humanizado, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo o una composición o una mezcla como se describe en esta memoria, cuyo anticuerpo se une a un epítipo de la proteína amiloide; (b) permitir que el anticuerpo se una a la proteína amiloide en la muestra para formar un complejo inmunológico; (c) detectar la formación del complejo inmunológico; (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra o parte o área corporal específica, y (e) comparar la cantidad del complejo inmunológico con un valor control normal, en donde un aumento en la cantidad del complejo comparado con el valor del control normal indica que el sujeto aún padece o está una enfermedad ocular residual mínima asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías/cambios patológicos relacionadas con el beta-amiloide en los tejidos del sistema visual. En un aspecto adicional el anticuerpo monoclonal humanizado usado en tales métodos es el C2 humanizado o una parte funcional del mismo como se describe en esta memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal humanizado se produce a partir de un anticuerpo de ratón ACI-01-Ab7C2, depositado el 1 de Diciembre, 2.005, con la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, con el n° de acceso DSM ACC2750.

Aún en otro aspecto, se proporciona un método para predecir el grado de respuesta de un sujeto que está tratándose con una composición farmacéutica que comprende las etapas de: (a) poner en contacto la muestra o una parte corporal o área corporal específica sospechosa de contener la proteína amiloide con el anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal humanizado, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla como se describe en esta memoria, cuyo anticuerpo se une a un epítipo de la proteína amiloide; (b) permitir que el anticuerpo se una a la proteína amiloide

- para formar un complejo inmunológico; (c) detectar la formación del complejo inmunológico; (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra o parte o área corporal específica, y (e) comparar la cantidad del complejo inmunológico antes y después del comienzo del tratamiento, en donde una disminución en la cantidad del complejo indica que el sujeto tiene un alto potencial de ser sensible al tratamiento. En un aspecto adicional el anticuerpo monoclonal humanizado usado en tales métodos es el C2 humanizado o una parte funcional del mismo como se describe en esta memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal humanizado se produce a partir de un anticuerpo de ratón ACI-01-Ab7C2, depositado el 1 de Diciembre, 2.005, con la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Branuschweig, con el n° de acceso DSM ACC2750.
- En otro aspecto se proporciona un método para retener o disminuir presión ocular en los ojos de un sujeto, específicamente un mamífero, más específicamente un humano que padece una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con el beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, degradación neuronal, que comprende la administración a un sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un humano, que necesite tal tratamiento, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal humanizado que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla como se describe en esta memoria. Las anomalías patológicas pueden ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico dando lugar al glaucoma; el cristalino dando lugar a catarata debida a la deposición de beta-amiloide; el vítreo dando lugar a amiloidosis ocular; la retina dando lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico dando lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea dando lugar a distrofia reticular. En un aspecto adicional el anticuerpo monoclonal humanizado usado en tales métodos es el C2 humanizado o una parte funcional del mismo como se describe en esta memoria. En particular, el anticuerpo monoclonal humanizado se produce a partir de un anticuerpo de ratón ACI-01-Ab7C2, depositado el 1 de Diciembre, 2.005, con la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Branuschweig, con el n° de acceso DSM ACC2750.

Definiciones

- Los términos “polipéptido”, “péptido”, y “proteína”, como se usan en esta memoria, son intercambiables y se define que significa una biomolécula compuesta de aminoácidos unidos por un enlace polipeptídico.

Los términos “uno/a”, y “el/la/los/las” como se usan en esta memoria se define que significan “uno/a o más” e incluyen el plural a no ser que en el contexto sea inapropiado.

- El lenguaje “enfermedades y trastornos que son causados por o asociados con proteínas tipo amiloide” incluye, pero no se limita a, enfermedades y trastornos causados por la presencia o actividad de proteínas tipo amiloide en estado monomérico, fibrilla o polimérico, o cualquier combinación de las tres. Tales enfermedades y trastornos incluyen, pero no se limitan a, amiloidosis, tumores endocrinos, y otras enfermedades, que incluyen enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionadas con el beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico dando lugar al glaucoma; el cristalino dando lugar a catarata debida a la deposición de beta-amiloide; el vítreo dando lugar a amiloidosis ocular; la retina dando lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico dando lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea dando lugar a distrofia reticular.

- La frase “enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionadas con el beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, degradación neuronal” se refiere a anomalías patológicas asociadas con función o deposición aberrante de β -amiloide que da lugar a degeneración neuronal, que puede ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico dando lugar al glaucoma; el cristalino dando lugar a catarata debida a la deposición de beta-amiloide; el vítreo dando lugar a amiloidosis ocular; la retina dando lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico dando lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea dando lugar a distrofia reticular.

- El término “amiloidosis” se refiere a un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placa amiloide que incluyen, pero no se limitan a, amiloidosis secundaria y amiloidosis asociada con la edad como enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos como Enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo enfermedades o afecciones que se caracterizan por una pérdida de capacidad de memoria cognitiva como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia con cuerpos de Lewy (LBD), síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo parkinsonismo-demencia de Guam; así como otras enfermedades que están basadas o asociadas con proteínas tipo amiloide como parálisis supranuclear

progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia asociada con el VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (IBM), Diabetes de Inicio en Adultos, y amiloidosis cardíaca senil; y otras enfermedades, que incluyen enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociados con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como la corteza visual que da lugar a deficiencia visual cortical; la cámara anterior y el nervio óptico que dan lugar al glaucoma; el cristalino que da lugar a catarata debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo que da lugar a la amiloidosis ocular; la retina que da lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico que da lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea que da lugar a distrofia reticular.

Los términos “detectar” o “detectado” como se usa en esta memoria significan usar técnicas conocidas en la técnica para la detección de moléculas biológicas como métodos inmunoquímicos o histológicos y se refieren a determinar cualitativa y cuantitativamente la presencia o concentración de la biomolécula a investigar.

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

El término “Amiloide β , $A\beta$ o β -amiloide” es un término reconocido en la técnica y se refiere a proteínas y péptidos amiloide β , proteína precursora amiloide β (APP), así como modificaciones, fragmentos y cualquier equivalente de las mismas. En particular, por amiloide β como se usa en esta memoria se entiende cualquier fragmento producido por ruptura proteolítica de APP pero especialmente aquellos fragmentos que están implicados o asociados con las patologías amiloides que incluyen, pero no se limitan a, $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$, $A\beta_{1-42}$ y $A\beta_{1-43}$.

La estructura y secuencias de los péptidos de amiloide β como anteriormente se mencionan son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica y se describen métodos de producción de dichos péptidos o de extracción a partir de cerebro y otros tejidos, por ejemplo, en Glenner y Wong, Biochem Biophys Res Comm 129, 885-890 (1984). Además, los péptidos amiloide β también están comercialmente disponibles en varias formas.

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

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

Como se usa en esta memoria, la expresión “se une específicamente” en referencia al anticuerpo quiere decir que el anticuerpo se une a su antígeno objetivo con mayor afinidad que lo hace a un(os) antígeno(s) estructuralmente diferente(s).

Una típica unidad estructural de inmunoglobulina se sabe que comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos parejas idénticas de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena “ligera” (aproximadamente de 25 kDa) y una “pesada” (aproximadamente de 50-70 kDa). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refiere a estas cadenas ligera y pesada respectivamente.

Los anticuerpos existen como anticuerpos intactos de longitud completa o como un número de fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con varias peptidasas o productos químicos. Así, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los puentes disulfuro en la región bisagra para producir $F(ab')_2$, un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera unida a V_H-CH_1 por un enlace disulfuro. El $F(ab')_2$ se puede reducir en condiciones suaves para romper la unión disulfuro en la región bisagra convirtiendo de ese modo el dímero $F(ab')_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un fragmento Fab con parte de la región bisagra (véase,

Fundamental Immunology, W. E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpo). A pesar de que varios fragmentos de anticuerpo se definen en términos de digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que cualquiera de una variedad de fragmentos de anticuerpo se puede sintetizar de novo ya sea químicamente o utilizando metodologías de DNA recombinante.

5 Se pretende que los anticuerpos dentro del alcance de la presente invención incluyan anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos quiméricos, de cadena única, biespecíficos, simianizados, humanos y humanizados así como fragmentos activos de los mismos. Ejemplos de fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos incluyen cadenas separadas ligeras y pesadas, fragmentos Fab, Fab/c, Fv, Fab', y F(ab')₂, que incluyen los productos de una biblioteca de expresión de inmunoglobulina Fab y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anticuerpos y fragmentos mencionados anteriormente.

10 Estos fragmentos activos se pueden obtener de un anticuerpo de la presente invención por un número de técnicas. Por ejemplo, se pueden escindir anticuerpos monoclonales con una enzima, como pepsina, y someterse a filtración en gel en HPLC. La fracción adecuada que contiene fragmentos Fab se puede entonces recoger y concentrar mediante filtración en membrana y similares. Para descripción adicional de técnicas generales para el aislamiento de fragmentos activos de anticuerpos, véase por ejemplo, Khaw, B. A. et al. J. Nucl. Med. 23: 1011-1019 (1982); Rousseaux et al. Methods Enzymology, 121: 663-69, Academic Press, 1986.

15 Los anticuerpos producidos de forma recombinante pueden ser anticuerpos convencionales de longitud completa, fragmentos de anticuerpo activos como anticuerpos Fv o de cadena única Fv (scFv), de dominio suprimido, y similares. Un anticuerpo Fv tiene aproximadamente 50 kDa de tamaño y comprende las regiones variables de la cadena ligera y pesada. Un polipéptido de cadena única Fv ("scFv") es un dímero unido covalentemente VH::VL que se puede expresar a partir de un ácido nucleico que incluye secuencias que codifican VH- y VL- ya sea directamente unidas o unidas por un conector codificado por péptido. Véase Huston, et al. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883. Un número de estructuras para convertir las cadenas polipeptídicas ligera y pesada agregadas de manera natural, pero químicamente separadas de una región V de anticuerpo a una molécula scFv que se plegará en una estructura tridimensional substancialmente similar a la estructura de un sitio de unión a antígeno. Véase, p. ej. Patentes de E.E.U.U. Nos. 5.091.513, 5.132.405 y 4.956.778.

20 El sitio de combinación se refiere a la parte de una molécula de anticuerpo que participa en la unión del antígeno. El sitio de unión a antígeno está formado por residuos de aminoácidos de las regiones variables ("V") del N-terminal de las cadenas pesada ("H") y ligera ("L"). Las regiones variables del anticuerpo comprenden tres tramos altamente divergentes referidos como "regiones hipervariables" o "regiones determinantes de complementariedad" (CDRs) que están interpuestas entre tramos flanqueantes más conservados conocidos como "regiones estructurales" (FRs). En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera (LCDR1, LCDR2, y LCDR3) y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) están dispuestas en relación a cada una en un espacio tridimensional para formar una superficie o bolsillo de unión a antígeno. El sitio de combinación del anticuerpo representa por lo tanto los aminoácidos que componen las CDRs de un anticuerpo y cualquier residuo estructural que compone el bolsillo de unión.

30 Se puede determinar la identidad de los residuos de aminoácidos que componen el sitio de combinación en un anticuerpo particular usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden identificar las CDRs de anticuerpo como las regiones hipervariables definidas originalmente por Kabat et al. (véase, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", E. Kabat et al., US. Department of Health and Human Services; Johnson, G y Wu, TT (2001) Kabat Database and its applications: future directions. Nucleic Acids Research, 29: 205-206; <http://immuno.bme.nwa.edu>). Se pueden también identificar las posiciones de las CDRs como las estructuras de bucle estructural descritas originalmente por Chothia y otros, (véase Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901 (1987), Chothia et al., Nature 342, 877 (1989), y Tramontano et al., J. Mol. Biol. 215, 175 (1990)). Otros métodos incluyen la "definición AbM" que es un compromiso entre Kabat y Chothia y se obtiene usando programas de modelado de anticuerpo AbM de Oxford Molecular (ahora Accelerlys) o la "definición de contacto" de CDRs por Macallum et al., ("Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography", J. Mol. Biol. 1996 Oct 11; 262(5): 732-45). El siguiente cuadro identifica CDRs en base a varias definiciones conocidas.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
---- L1	L24 -- L34	L24 -- L34	L24 -- L34	L30 -- L36
L2	L50 -- L56	L50 -- L56	L50 -- L56	L46 -- L55
L3	L89 -- L97	L89 -- L97	L89 -- L97	L89 -- L96
H1 (Numeración Kabat)	H31 -- H35B	H26 -- H35B	H26 -- H32..34	H30 -- H35B

ES 2 612 788 T3

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
H1 (Numeración Chothia)	H31 -- H35	H26 -- H35	H26 -- H32	H30 -- H35
H2	H50 -- H65	H50 -- H58	H52 -- H56	H47 -- H58
H3	H95 -- H102	H95 -- H102	H95 -- H102	H93 -- H101

Directrices generales mediante las cuales uno puede identificar las CDRs en un anticuerpo a partir solamente de la secuencia como sigue:

LCDR1:

- 5 Comienzo - Aproximadamente residuo 24.

Residuo anterior es siempre una Cys.

Residuo posterior es siempre un Trp. Típicamente el TRP está seguido por TYR-GLN, pero también puede estar seguido por LEU-GLN, PHE-GLN, o TYR-LEU.

La longitud es de 10 a 17 residuos.

- 10 LCDR2:

Comienzo - 16 residuos después del final de L1.

La secuencia anterior es generalmente ILE-TYR, pero también puede ser VAL-TYR, ILE-LYS, o ILE-PHE.

La longitud es generalmente de 7 residuos.

LCDR3:

- 15 Comienzo – generalmente 33 residuos después del final de L2.

Residuo anterior es una Cys.

La secuencia posterior es PHE-GLY-X-GLY.

La longitud es de 7 a 11 residuos.

HCDR1:

- 20 Comienza aproximadamente en el residuo 26 (cuatro residuos después de una CYS) [definición Chothia/AbM] la definición de Kabat comienza 5 residuos después.

La secuencia anterior es CYS-X-X-X.

Residuo posterior es un TRP, seguido típicamente por VAL, pero también seguido por ILE, o ALA.

- 25 La longitud es de 10 a 12 residuos en la definición AbM mientras la definición de Chothia excluye los últimos 4 residuos.

HCDR2:

Comienza 15 residuos después del final de CDR-H1 de la definición Kabat/AbM.

La secuencia anterior es típicamente LEU-GLU-TRP-ILE-GLY (SEQ ID NO. 1), pero son posibles un número de variaciones.

- 30 La secuencia posterior es LYS/ARG-LEU/ILE/VAL/PHE/THR/ALA-THR/SER/ILE/ALA.

La longitud es de 16 a 19 residuos en la definición Kabat (la definición AbM termina 7 residuos antes).

HCDR3:

Comienza -33 residuos después del final de CDR-H2 (dos residuos después de una CYS).

La secuencia anterior es CYS-X-X (típicamente CYS-ALA-ARG).

La secuencia posterior es TRP-GLY-X-GLY.

La longitud es de 3 a 25 residuos.

5 La identidad de los residuos de aminoácidos en un anticuerpo particular que están fuera de las CDRs, pero, no obstante, forman parte del sitio de combinación teniendo una cadena lateral que es parte del revestimiento del sitio de combinación (esto es, está disponible para la unión a través del sitio de combinación), se puede determinar usando métodos bien conocidos en la técnica como modelaje molecular y cristalografía por rayos X. Véase p. ej., Riechmann et al., (1988) *Nature*, 332: 323-327.

10 Los anticuerpos quiméricos son aquellos en los que una o más regiones del anticuerpo son de una especie de individuo y una o más regiones del anticuerpo son de una especie diferente de individuos. Un anticuerpo quimérico preferido es uno que incluye regiones de una inmunoglobulina de primate. Un anticuerpo quimérico para uso clínico humano generalmente se entiende que tiene regiones variables de un individuo no humano, p. ej. un roedor, con las regiones constantes de un humano. Por el contrario, un anticuerpo humanizado usa CDRs del anticuerpo no humano con la mayoría de ellas de regiones estructurales variables de y todas las regiones constantes de una inmunoglobulina humana. Un anticuerpo quimérico humano se entiende generalmente que tiene las regiones variables de un roedor. Un anticuerpo quimérico humano típico tiene regiones constantes de cadena pesada humanas y regiones constantes de cadena ligera humanas con las regiones variables tanto de la pesada y de la ligera que provienen de un anticuerpo de roedor. Un anticuerpo quimérico puede incluir algunos cambios en la secuencia de aminoácidos nativa de las regiones constantes humanas y en la secuencia de la región variable de roedor nativa. Los anticuerpos quiméricos y humanizados se pueden preparar por métodos bien conocidos en la técnica que incluyen enfoques de inserción de CDRs (véase, p. ej., Patentes de E.E.U.U. Nos. 5.843.708; 6.180.370; 5.693.762; 5.585.089; 5.530.101), estrategias de estructuración de cadena (véase p. ej., Patente de E.E.U.U. No. 5.565.332; Rader et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 95:8910-8915), estrategias de modelado molecular (Patente de EE.UU. No. 5.639.641), y similares.

25 Un "anticuerpo humanizado" como se usa en esta memoria en el caso de un anticuerpo de doble cadena es uno donde una cadena al menos está humanizada. Una cadena de anticuerpo humanizado tiene una región variable donde una o más de las regiones estructurales son humanas. Un anticuerpo humanizado que tiene una única cadena es uno donde la cadena tiene una región variable donde una o más regiones estructurales son humanas. Las porciones no humanas de la región variable de la cadena del anticuerpo humanizado o fragmento del mismo se deriva de una fuente no humana, particularmente un anticuerpo no humano, típicamente de origen de roedor. La contribución no humana al anticuerpo humanizado se proporciona típicamente en forma al menos de una región CDR que está entremezclada entre regiones estructurales derivadas de una (o más) inmunoglobulina(s) humana(s). Además, se pueden alterar los residuos de apoyo estructurales para preservar la afinidad de unión.

35 El anticuerpo humanizado puede además comprender regiones constantes (p. ej., al menos una región constante o porción de la misma, en el caso de una cadena ligera, y preferiblemente tres regiones constantes en el caso de una cadena pesada). Las regiones constantes de un anticuerpo humanizado, si están presentes, son humanas.

Son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica los métodos para obtener "anticuerpos humanizados". (véase, p. ej., Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 10029-10032 (1989), Hodgson et al., *Bio/Technology*, 9: 421 (1991)).

40 Un "anticuerpo humanizado" también se puede obtener mediante un nuevo abordaje de ingeniería genética que facilita la producción de anticuerpos policlonales de tipo humano desarrollados por afinidad en sujetos mayores como, por ejemplo, conejos y ratones. Véase, p. ej. Patente de E.E.U.U. No. 6.632.976.

45 La expresión "región constante" (CR) como se usa en esta memoria se refiere a genes de regiones constantes de la inmunoglobulina. Los genes de regiones constantes codifican la porción de la molécula de anticuerpo que confiere funciones efectoras. Para anticuerpos humanos quiméricos y anticuerpos humanizados, normalmente no humanos (p. ej., murinos), las regiones constantes se sustituyen por regiones constantes humanas. Las regiones constantes de los anticuerpos quiméricos o humanizados del sujeto se derivan normalmente de inmunoglobulinas humanas. Se puede seleccionar la región constante de la cadena pesada a partir de cualquiera de los cinco isotipos: alfa, delta, épsilon, gamma o mu. Adicionalmente, las cadenas pesadas de varias subclases (como la subclases IgG de cadenas pesadas) son responsables de distintas funciones efectoras y de este modo, eligiendo la región constante deseada de la cadena pesada, se pueden producir anticuerpos con funciones efectoras deseadas. Las regiones constantes que se pueden usar dentro del alcance de esta invención son gamma 1 (IgG1), particularmente una región Fc del isotipo gamma 1 (IgG1), gamma 3 (IgG3) y especialmente gamma 4 (IgG4). La región constante de la cadena ligera puede ser de tipo kappa o lambda, preferiblemente del tipo kappa. En una realización la región constante de la cadena ligera es la cadena constante kappa humana (Heiter et al. (1980) *Cell* 22: 197-207) y la cadena constante de la cadena pesada es la cadena constante IgG4 humana.

55 La expresión "anticuerpo monoclonal" se reconoce también en la técnica y se refiere a un anticuerpo que es el producto de una célula clonada única productora de anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen

normalmente por fusión de una célula B productora de anticuerpo, generalmente de vida corta, con una célula de crecimiento rápido, como una célula cancerosa (algunas veces referida como célula "inmortal"). El híbrido celular resultante, o hibridoma, se multiplica rápidamente, creando un clon que produce el anticuerpo.

5 Para el propósito de la presente invención, también se entiende que el "anticuerpo monoclonal" comprende anticuerpos que son producidos por un clon madre que no ha alcanzado aún la monoclonalidad completa.

Se entiende que "anticuerpo funcionalmente equivalente" dentro del alcance de la presente invención se refiere a un anticuerpo que comparte sustancialmente al menos una propiedad funcional principal con un anticuerpo mencionado anteriormente y descrito en esta memoria que comprende: unirse específicamente a la proteína β -amiloides, particularmente a la proteína $A\beta_{1-42}$, y más particularmente a la región del epítipo 16-21 de la proteína $A\beta_{1-42}$, reactividad inmunológica *in vitro*, inhibición de la agregación de los monómeros $A\beta_{1-42}$ en fibrillas poliméricas de alto peso molecular y/o desagregación de fibrillas poliméricas $A\beta_{1-42}$ preformadas y/o propiedad de ruptura de una lámina β y alivio de los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placa amiloide que incluye amiloidosis secundaria y amiloidosis asociada con la edad como enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos como Enfermedad de Alzheimer (AD), demencia con cuerpos de Lewy (LBD), síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); el complejo parkinsonismo-demencia de Guam; así como otras enfermedades que están basadas o asociadas con proteínas tipo amiloide como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia asociada con el VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), Diabetes de Inicio en Adultos; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otras enfermedades, que incluyen enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociados con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta-amiloides en los tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como la corteza visual que da lugar a deficiencia visual cortical; la cámara anterior y el nervio óptico que dan lugar al glaucoma; el cristalino que da lugar a catarata debido a la deposición de beta-amiloides; el vítreo que da lugar a la amiloidosis ocular; la retina que da lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico que da lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea que da lugar a distrofia reticular, cuando se administra profiláctica y terapéuticamente. Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase como IgG, IgM, o IgA, etc., o cualquier subclase como IgG1, IgG2a, etc. y otras subclases mencionadas en esta memoria anteriormente o conocidas en la técnica, pero particularmente de la clase IgG4. Adicionalmente, los anticuerpos se pueden producir por cualquier método, como visualización de fagos, o producir en cualquier organismo o línea celular, incluyendo bacteria, insecto, mamífero u otro tipo de célula o línea celular que produce anticuerpos con características deseadas, como anticuerpos humanizados. Los anticuerpos se pueden también crear por combinación de una porción Fab y una región Fc de distintas especies.

35 El término "hibridar" como se usa se refiere a condiciones de hibridación convencional, preferiblemente a condiciones de hibridación en las que se usa SSPE 5x, SDS al 1%, solución de Denhardtts 1x como una solución y/o las temperaturas de hibridación están entre 35°C y 70°C, preferiblemente 65°C. Después de la hibridación, se lleva a cabo el lavado preferiblemente primero con SSC 2x, SDS al 1% y posteriormente con SSC 0,2x a temperaturas entre 35°C y 70°C, preferiblemente a 65°C (con respecto a la definición de SSPE, SSC y solución de Denhardtts véase Sambrook et al., loc. cit.). Particularmente se prefieren condiciones de hibridación astringentes como por ejemplo las descritas en Sambrook et al, supra. Particularmente condiciones de hibridación astringentes preferidas están por ejemplo presentes si la hibridación y el lavado tienen lugar a 65°C como se indica anteriormente. Son menos preferidas condiciones de hibridación no astringente, por ejemplo con hibridación y lavado llevados a cabo a 45°C y a 35°C incluso menos.

45 La "homología" entre dos secuencias se determina mediante identidad de secuencia. Si dos secuencias que se van a comparar una con otra difieren en longitud, la identidad de secuencia se refiere preferiblemente al porcentaje de los residuos de nucleótidos de la secuencia más corta que son idénticos con los residuos de nucleótidos de la secuencia más larga. La identidad de secuencia se puede determinar convencionalmente con el uso de programas informáticos como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711). Bestfit utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489, con el fin de encontrar el segmento que tiene la identidad de secuencia más alta entre dos secuencias. Cuando se usa Bestfit u otro programa de alineamiento de secuencia para determinar si una secuencia en particular tiene por ejemplo 95% de identidad con una secuencia de referencia de la presente invención, se ajustan los parámetros preferiblemente para que el porcentaje de identidad se calcule sobre toda la longitud de la secuencia de referencia y que se permitan saltos de homología de hasta un 5% del número total de los nucleótidos en la secuencia de referencia. Cuando se usa Bestfit, los así llamados parámetros opcionales se dejan preferiblemente en sus valores preseleccionados ("por defecto"). Las desviaciones que aparecen en la comparación entre una secuencia dada y las secuencias descritas anteriormente de la invención se pueden originar por ejemplo por adición, supresión, sustitución, inserción o recombinación. Tal comparación de secuencia se puede llevar a cabo preferiblemente con el programa "fasta20u66" (versión 2.0u66, Septiembre 1988 por William R. Pearson y la Universidad de Virginia; véase también W.R. Pearson (1990), Methods in Enzymology 183, 63-98, ejemplos adicionales y <http://workbench.sdsc.edu/>). Para este propósito,

se pueden usar los parámetros fijados “por defecto”.

El anticuerpo según la invención puede ser una inmunoglobulina o anticuerpo, que se entiende que tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos (si es multivalente) o, como alternativa, puede ser un anticuerpo “biespecífico” o “bifuncional”.

5 Un “anticuerpo biespecífico” o “bifuncional” es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante una variedad de métodos que incluyen fusión de hibridomas o enlazado de fragmentos Fab'. Véase, *p. ej.*, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990); Kosteleny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

10 El término “fragmento” se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende menos residuos de aminoácidos que el anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos se pueden obtener a través de tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos también se pueden obtener mediante medios recombinantes. Fragmentos ejemplo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc y/o Fv. El término “fragmento de unión a antígeno” se refiere a un
15 fragmento polipeptídico de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une al antígeno o compete con el anticuerpo intacto (esto es, con el anticuerpo intacto del que se derivan) por la unión del antígeno (esto es, unión específica).

Los fragmentos de unión se producen por técnicas de DNA recombinante, o por ruptura enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, cadenas individuales, y anticuerpos de cadena única.

20 El término “Fragmento” también se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 50 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 60 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 70 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 80 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 90 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 100
25 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 125 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 150 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 175 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 200 residuos de aminoácidos contiguos, o al menos 250 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido. En una realización específica, un fragmento de un polipéptido conserva al menos una función del polipéptido.

30 El término “antígeno” se refiere a una entidad o fragmento del mismo que puede unirse al anticuerpo. Un inmunógeno se refiere a un antígeno que puede provocar una respuesta inmune en un organismo, particularmente un sujeto, más particularmente un mamífero que incluye un humano. El término antígeno incluye regiones conocidas como determinantes antigénicos o epítomos que se refieren a una porción del antígeno (que están en contacto o que juegan un papel significativo en apoyar un residuo de contacto en el antígeno responsable de la antigenicidad o
35 determinantes antigénicos).

Como se usa en esta memoria, el término “soluble” significa disuelto parcialmente o completamente en una solución acuosa.

Como se usa también en esta memoria, el término “inmunogénico” se refiere a sustancias que provocan la producción de anticuerpos, células T y otras células inmunoreactivas contra el antígeno del inmunógeno.

40 Una respuesta inmune ocurre cuando un individuo produce suficientes anticuerpos, células T y otras células inmunoreactivas contra composiciones inmunogénicas administradas de la presente invención para moderar o aliviar el trastorno a tratar.

El término “inmunogenicidad” como se usa en esta memoria se refiere a una medida de la capacidad de un antígeno de provocar una respuesta inmune (humoral o celular) cuando se administra a un receptor. La presente invención se
45 ocupa de los enfoques que reducen la inmunogenicidad de los anticuerpos quiméricos o humanizados humanos del sujeto.

La expresión “Anticuerpo humanizado de inmunogenicidad reducida” se refiere a un anticuerpo humanizado que exhibe inmunogenicidad reducida en relación con el anticuerpo parental, *p. ej.*, el anticuerpo murino.

50 Anticuerpo humanizado que conserva sustancialmente las propiedades de unión del anticuerpo parental se refiere a un anticuerpo humanizado que conserva la capacidad de unirse específicamente al antígeno reconocido por el anticuerpo parental usado para producir tal anticuerpo humanizado. Preferiblemente el anticuerpo humanizado exhibirá la misma o sustancialmente la misma afinidad y avidez de unión al antígeno que el anticuerpo parental. Idealmente, la afinidad del anticuerpo no será menos que el 10% de la afinidad del anticuerpo parental, más preferiblemente no menos que aproximadamente 30%, y lo más preferiblemente la afinidad no será menos que el
55 50% del anticuerpo parental. Son bien conocidos en la técnica métodos para ensayar la afinidad de unión al antígeno e incluyen ensayos de máxima unión media, ensayos de competición, y análisis de Scatchard. Se

describen en esta solicitud ensayos de unión a antígeno adecuados.

Una “mutación trasera” es una mutación introducida en una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo humanizado, la mutación da lugar a un aminoácido correspondiente a un aminoácido en el anticuerpo parental (p. ej., anticuerpo donante, por ejemplo, un anticuerpo murino). Se pueden mantener ciertos residuos estructurales del anticuerpo parental durante la humanización de los anticuerpos de la invención con el fin de retener sustancialmente las propiedades de unión del anticuerpo parental, mientras al mismo tiempo se minimiza el potencial de inmunogenicidad del anticuerpo resultante. En una realización de la invención, el anticuerpo parental es de origen de ratón. Por ejemplo, la mutación trasera cambia un residuo estructural humano a un residuo murino parental. Ejemplos de residuos estructurales que se pueden mutar de forma trasera incluyen, pero no se limitan a, residuos canónicos, residuos de empaquetamiento en la interfaz, residuos parentales inusuales que están cerca del sitio de unión, residuos en la “Zona Vernier” (que forma una plataforma sobre la que descansan las CDRs) (Foote & Winter, 1992, *J. Mol. Biol.* 224, 487-499), y aquellos cerca de la CDR H3.

Como se usa en esta memoria, la expresión “cambio conservativo” se refiere a alteraciones que son sustancialmente conformacionales o antigénicamente neutras, que producen cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o que producen cambios mínimos en los determinantes antigénicos de los polipéptidos mutantes, respectivamente, comparados con la proteína nativa. Cuando se refiere a los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, un cambio conservativo significa una sustitución de aminoácido que no deja el anticuerpo incapaz de unirse al receptor sujeto. Aquellos normalmente expertos en la técnica serán capaces de predecir que sustituciones de aminoácidos se pueden hacer mientras se mantiene una alta probabilidad de ser conformacional y antigénicamente neutras. Se proporciona esta guía, por ejemplo en Berzofsky, (1985) *Science* 229: 932-940 y Bowie et al (1990) *Science* 247: 1306-1310. Factores a considerar que afectan la probabilidad de mantener la neutralidad conformacional y antigénica incluyen, pero no se limitan a: (a) la sustitución de aminoácidos hidrofóbicos es menos probable que afecten a la antigenicidad porque los residuos hidrofóbicos tienen más probabilidades de estar localizados en el interior de la proteína, (b) la sustitución de aminoácidos fisicoquímicamente similares, es menos probable que afecte a la conformación porque el aminoácido sustituido imita estructuralmente al aminoácido nativo; y (c) la alteración de secuencias evolutivamente conservadas puede tener importancia funcional. Un experto en la técnica será capaz de evaluar alteraciones en la conformación de la proteína usando ensayos bien conocidos, como, pero no limitados a, métodos de fijación de micro-complemento (Wasserman et al (1961) *J. Immunol.* 87: 290-295; Levine et al. (1967) *Meth. Enzymol.* 11: 928-936) y a través de estudios de unión que usan anticuerpos monoclonales dependientes de conformación (Lewis et al. (1983) *Biochem.* 22: 948-954).

Además, la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad de anticuerpo que, cuando se administra a un humano o sujeto, que es suficiente para dar lugar a un efecto terapéutico en dicho humano o sujeto. La cantidad eficaz se determina fácilmente por un experto en la técnica siguiendo procedimientos rutinarios.

Como se usa en esta memoria, los términos “tratar”, “prevenir”, “previniendo” y “prevención” se refieren a la prevención de la recurrencia o establecimiento de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto a consecuencia de la administración de un agente profiláctico o terapéutico.

Construcción de anticuerpos humanizados.

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

La presente invención proporciona nuevos métodos y composiciones que comprenden anticuerpos altamente específicos y altamente eficaces que tienen la capacidad de reconocer y unirse específicamente a epítopos específicos de una gama de antígenos β -amiloide. Los anticuerpos permitidos por la enseñanza de la presente invención son particularmente útiles para el tratamiento de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placa amiloide que incluye amiloidosis secundaria y amiloidosis asociada con la edad que incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos como Enfermedad de Alzheimer (AD), demencia con cuerpos de Lewy (LBD), síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); el complejo parkinsonismo-demencia de Guam; así como otras enfermedades que están basadas o asociadas con proteínas tipo amiloide como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia asociada con el VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), Diabetes de Inicio en Adultos; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otras enfermedades, que incluyen enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden ocurrir, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, como la corteza visual que da lugar a deficiencia visual cortical; la cámara anterior y el nervio óptico que dan lugar al glaucoma; el cristalino que da lugar a catarata debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo que da lugar a la amiloidosis ocular; la retina que da lugar a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo degeneración macular asociada con la edad; el nervio óptico que da lugar a drusas del nervio óptico, neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea que da lugar a distrofia reticular.

Se puede crear una región variable totalmente humanizada o remodelada dentro del alcance de la invención diseñando primero una secuencia de aminoácidos de la región variable que contiene particularmente CDRs derivadas de roedor, no humano, pero especialmente CDRs derivadas del anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2 (llamado "mC2" a través de la solicitud y depositado el 01 de diciembre de 2.005 con la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest y se le dio el n° de acceso DSM ACC2750) incorporada en secuencias estructurales derivadas de humano. Particularmente las CDRs derivadas de roedor no humanos, que se pueden obtener a partir del anticuerpo, proporcionan la especificidad deseada. Por consiguiente, estos residuos tienen que ser incluidos en el diseño de la región variable remodelada esencialmente sin cambios. Así cualquiera de las modificaciones están restringidas a un mínimo y controlados de cerca los cambios en la especificidad y afinidad del anticuerpo. Por otra parte, en teoría los residuos estructurales se pueden derivar de cualquier región variable humana.

Con el fin de crear un anticuerpo remodelado que presenta una afinidad aceptable o incluso mejorada, se deben elegir unas secuencias estructurales humanas, que son igualmente adecuadas para crear una región variable remodelada y para retener la afinidad del anticuerpo.

Con el fin de lograr este objetivo, se desarrolló la estrategia que mejor se ajustaba. Como se sabe que las secuencias estructurales sirven para mantener las CDRs en su correcta orientación espacial para la interacción con el antígeno, y que los residuos estructurales a veces incluso pueden participar en la unión al antígeno, esta estrategia tiene por objeto minimizar los cambios que pueden afectar negativamente a la estructura tridimensional del anticuerpo derivando la secuencia estructural humana usada para remodelar el anticuerpo a partir de la región variable humana que es más homóloga o similar a la región variable no humana, particularmente la región variable derivada de roedor. Esto también maximizará la probabilidad de que se retenga la afinidad en el anticuerpo remodelado.

En su nivel más simple, la estrategia de "mejor ajuste" consiste en comparar la región V del roedor donante con todas las secuencias de aminoácidos conocidas de la región V humana y seleccionar después la más homóloga para proporcionar las regiones estructuralesceptoras para los ejercicios de humanización. En realidad hay otros varios factores que se deben considerar, y que pueden influenciar la selección final de regiones estructuralesceptoras. Pueden usarse predicciones de modelado molecular en este aspecto antes de cualquier trabajo experimental en un intento de maximizar la afinidad del anticuerpo remodelado resultante. Esencialmente, el objetivo del modelado es predecir qué residuos clave (si los hay) de la estructura humana más homóloga deben dejarse como en el roedor para obtener la mejor afinidad en el anticuerpo remodelado.

En una realización, las CDRs se pueden obtener a partir de anticuerpo monoclonal de ratón, particularmente del anticuerpo monoclonal de ratón ACI-01-Ab7C2 (llamado "mC2" a lo largo de la solicitud) descrito en la solicitud pendiente EP 05 02 7092.5 presentada el 12.12.2005.

Las células de hibridoma FP-12H3-C2, que producen anticuerpo monoclonal de ratón ACI-01-Ab7C2 (llamado "mC2" y hC2 para el anticuerpo C2 humanizado, a lo largo de la solicitud) se depositaron el 01 de Diciembre de 2005 en la solicitud co-pendiente n° EP05027092.5 con el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest y se le dio el n° de acceso DSM ACC2750.

Se puede crear el anticuerpo de ratón contra un constructo antigénico supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del péptido β -amiloides, particularmente del péptido β -amiloides $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-16}$ y $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$, modificado con una fracción hidrofóbica como, por ejemplo, ácido palmítico o fracción hidrofílica como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o una combinación de ambas, en donde la fracción hidrofóbica e hidrofílica, respectivamente, está unida covalentemente a cada uno de los terminales del péptido antigénico a través al menos uno, particularmente uno o dos aminoácidos como, por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisteína o cualquier otro aminoácido adecuado o análogo de aminoácido capaz de servir como un medio de conexión para acoplar la fracción hidrofóbica e hidrofílica a los fragmentos peptídicos. Cuando se usa un PEG como la fracción hidrofílica, el terminal de PEG libre se une covalentemente a fosfatidiletanolamina o cualquier otro compuesto adecuado para funcionar como el elemento de anclaje, por ejemplo, para integrar el constructo antigénico en la bicapa de un liposoma.

En particular, un anticuerpo de ratón se puede crear contra un constructo antigénico supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del péptido β -amiloides $A\beta_{1-16}$ modificado con una fracción hidrofílica como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG). La fracción hidrofílica está unida covalentemente a cada uno de los terminales del péptido antigénico a través de al menos uno, particularmente uno o dos aminoácidos como, por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisteína o cualquier otro aminoácido adecuado o análogo de aminoácido capaz de servir como un medio de conexión para acoplar la fracción hidrofóbica e hidrofílica a los fragmentos peptídicos. Cuando se usa un PEG como la fracción hidrofílica, el terminal de PEG libre se une covalentemente a fosfatidiletanolamina o cualquier otro compuesto adecuado para funcionar como el elemento de anclaje, por ejemplo, para integrar el constructo antigénico en la bicapa de un liposoma.

En una realización, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende en la región variable al menos una CDR de origen no humano incluido en una o más regiones estructurales derivadas de humano o de primate y combinadas con una región constante derivada de un anticuerpo fuente humano o de primate, cuyo anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo es capaz de reconocer y unirse específicamente al péptido monomérico de β -amiloide.

Las CDRs contienen los residuos más susceptibles de unirse al antígeno y deben mantenerse en el anticuerpo modelado. Las CDRs se definen por secuencia según Kabat et al., *Sequence of Proteins of Immunological Interest*, 5th Edition, The United States Department of Health and Human Services, The United States Government Printing Office, 1991. Las CDRs encajan en clases canónicas (Chothia et al., 1989 *Nature*, 342, 877-883) donde los residuos clave determinan en gran medida la conformación estructural del bucle CDR. Estos residuos se conservan casi siempre en el anticuerpo modelado.

En el proceso de preparación de un anticuerpo humanizado según la invención, las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera de C2 (V_H y V_K) se comparan con las secuencias V_H y V_K de anticuerpo de roedor en las bases de datos del NCBI y Kabat.

El gen de la línea germinal de ratón que se parece más a V_K de C2 es bbl, Locus MMU231201, (Schable, *et al*, 1999). Una comparación revela que difieren dos aminoácidos de esta secuencia de línea germinal, ambos localizados dentro de CDRL1. Se pueden encontrar anticuerpos murinos maduros con similares, pero no idénticas, secuencias. Varios tienen una CDRL2 idéntica y una CDRL3 idéntica, pero las CDRL1 de C2 parecen ser únicas. La comparación con secuencias V_K de línea germinal humana muestra que los genes del subgrupo V_{KII} son los que más se parecen a V_K de C2 (Cox *et al*, 1994). Así V_K de C2 se puede asignar a la secuencia Kabat del subgrupo MuV_{KII} .

Se pueden seleccionar DPK15 junto con la región J humana HuJ_{K1} para proporcionar las secuencias estructurales aceptoras para el V_K humanizado.

Se han definido los residuos en la interfase entre las cadenas variables ligera y pesada (Chothia et al, 1985 *J. Mol. Biol.*, 186, 651-663). Estos se mantienen normalmente en el anticuerpo remodelado. La Phe en la posición 87 de la V_K de C2 de ratón es inusual en la interfase, donde es más común una Tyr en el subgrupo V_{KII} , indicando que este residuo estructural puede ser importante para la actividad del anticuerpo. La Tyr 87 está presente en el C2VK de línea germinal humana y humanizado.

Así, las secuencias V_K humanizadas se pueden designar de tal manera que el C2HuVK1 consista en CDRs V_K C2 de ratón con estructuras de DPK 15 y J_{K1} humano. En una realización específica de la invención, se pueden sustituir residuos murinos en la región estructural humana en las posiciones 45, y/o 87. En la región CDR2 que se obtiene de un anticuerpo monoclonal de ratón, particularmente anticuerpo ACI-01-Ab7C2 murino, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos en las posiciones Kabat 50 y/o 53. El residuo 45 puede estar implicado en mantener la conformación de las CDRs. El residuo 87 está localizado en la interfase de los dominios V_H y V_K . Por lo tanto estos residuos pueden ser críticos para el mantenimiento de la unión del anticuerpo.

El gen de la línea germinal de ratón que se parece más a V_H AF de C2 es VH7183, Locus AF120466; (Langdon, *et al*, 2000). La comparación con secuencias V_H de línea germinal humana muestra que los genes del subgrupo V_{HIII} son los que más se parecen a V_H de C2. V_H AF de C2 se puede asignar al subgrupo Kabat MuV_{HIII} . Se puede seleccionar la secuencia DP54 junto con la región J humana HuJ_{H6} para proporcionar las secuencias estructurales aceptoras para el V_H humanizado.

La comparación muestra que hay nueve diferencias de aminoácidos entre las secuencias V_H de C2 y la secuencia DP54 y J_{H6} de la línea germinal de aceptor humano, estando la mayor parte localizadas dentro de CDRH2. Se encuentran anticuerpos murinos maduros con idénticas o similares CDRH1 (un residuo diferente) o con similares CDRH2 (un residuo diferente), pero ninguno con las tres CDRs idénticas a V_H AF de C2. La CDRH3 del anticuerpo C2 es inusualmente corta, consistente en sólo tres residuos. Sin embargo, se encuentran otros anticuerpos en la base de datos con CDRH3 de esta longitud. El residuo 47 de V_H de C2 es Leu más que el Trp más común y el residuo 94 es Ser más que la Arg normal, lo que indica que estos residuos estructurales pueden ser importantes para la actividad del anticuerpo.

Se pueden designar varias secuencias V_H humanizadas. C2HuVH1 consiste en CDRs V_H AF de C2 con estructuras de DP54 y HuJ_{H6} . En una realización específica de la invención, se pueden sustituir residuos murinos en la región estructural humana en las posiciones 47 o 94 o ambas. El residuo 47 en la estructura 2 hace contacto tanto con las CDRs como con el dominio V_K . El residuo 94 puede estar implicado en mantener la conformación de las CDRs. Por lo tanto, estos residuos pueden ser críticos para el mantenimiento de la unión del anticuerpo.

Se pueden diseñar diferentes regiones HCVR y LCVR que comprenden las CDRs no humanas que se obtienen del anticuerpo donante, por ejemplo, un anticuerpo murino, incluido dentro de las regiones estructurales nativas o modificadas derivada de humano o de primate. La modificación puede particularmente referirse a un intercambio de uno o más residuos de aminoácidos dentro de la región estructural por residuos no humanos, particularmente residuos murinos, encontrados más comúnmente en esta posición en los subgrupos respectivos o por residuos que

tienen propiedades similares a los más comúnmente encontrados en esta posición en los subgrupos respectivos.

La modificación de la región estructural de las secuencias estructurales sirve para mantener las CDRs en sus orientaciones espaciales correctas para la interacción con el antígeno, y esos residuos estructurales algunas veces pueden incluso participar en la unión con el antígeno. En una realización de la invención se toman medidas para adaptar además las secuencias estructurales humanas seleccionadas para hacerlas más similares a las secuencias de las estructuras de roedor con el fin de maximizar la probabilidad de que se retenga la afinidad en el anticuerpo remodelado.

Por consiguiente, se pueden sustituir los residuos murinos en la región estructural humana. En particular, los residuos murinos se pueden sustituir en la región estructural humana de la región Variable de la Cadena Pesada (HCVR) en las posiciones 47 o 94 o ambas y en la región estructural humana de la región Variable de la Cadena Ligera (LCVR) en las posiciones 45 y/o 87. En la región CDR2 que se obtiene de un anticuerpo monoclonal de ratón, particularmente el anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2, se pueden hacer las sustituciones en las posiciones Kabat 50 y/o 53.

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

La Arg en la posición Kabat 94 en la región estructural derivada de humano o de primate de la Región Variable de la Cadena Pesada como se muestra en SEQ ID NO: 15 se puede reemplazar por Ser o por un residuo de aminoácido que tiene propiedades similares y la sustitución de la cual da lugar a alteraciones que son sustancialmente conformacional y antigénicamente neutras, que producen cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o que producen cambios mínimos en los determinantes antigénicos. En particular, la Arg en la posición Kabat 94 en la región estructural derivada de humano o de primate de la Región Variable de la Cadena Pesada como se muestra en SEQ ID NO: 15 se puede reemplazar alternativamente por Thr.

En otra realización, se pueden reemplazar ambos residuos en el anticuerpo humanizado.

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

La Leu en la posición Kabat 50 en la región estructural derivada de humano o de primate de la Región Variable de la Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID NO: 12 se puede reemplazar por Lys o por un residuo de aminoácido que tiene propiedades similares y la sustitución de la cual da lugar a alteraciones que son sustancialmente conformacional y antigénicamente neutras, que producen cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o que producen cambios mínimos en los determinantes antigénicos. En particular, la Leu en la posición Kabat 50 en la región estructural derivada de humano o de primate de la Región Variable de la Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID NO: 12 se puede reemplazar por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gln, y Asn, particularmente por Arg.

La Asn en la posición Kabat 53 en la región estructural derivada de humano o de primate de la Región Variable de la Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID NO: 12 se puede reemplazar por His y Gln o por un residuo de aminoácido que tiene propiedades similares y la sustitución de la cual da lugar a alteraciones que son sustancialmente conformacional y antigénicamente neutras, que producen cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o que producen cambios mínimos en los determinantes antigénicos. En particular, la Asn en la posición Kabat 53 en la región estructural derivada de humano o de primate de la Región Variable de la Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID NO: 12 se puede reemplazar por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gln, His, Lys, y Arg.

La Thr en la posición Kabat 87 en la región estructural derivada de humano o de primate de la Región Variable de la Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID NO: 12 se puede reemplazar por Phe o por un residuo de aminoácido

que tiene propiedades similares y la sustitución de la cual da lugar a alteraciones que son sustancialmente conformacional y antigénicamente neutras, que producen cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o que producen cambios mínimos en los determinantes antigénicos. En particular, la Tyr en la posición Kabat 87 en la región estructural derivada de humano o de primate de la Región Variable de la Cadena Ligera como se muestra en SEQ ID NO: 12 se puede reemplazar por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Val, Ile, y Ala, particularmente por Leu.

La región variable así obtenida que comprende al menos una CDR de origen no humano incluida en una o más regiones estructurales derivadas de humano o de primate puede combinarse entonces con una región constante derivada de un anticuerpo de origen humano o de primate, particularmente con regiones constantes de IgG4 humana o κ , respectivamente. La región constante de IgG4 se puede modificar por, por ejemplo, cambiando Serina en la posición 228 de la región bisagra por Prolina (HuIgG4 Ser-Pro). Esta mutación estabiliza el enlace disulfuro intracatenario y previene la formación de moléculas medias que pueden ocurrir en las preparaciones de IgG4 posición 439 como se muestra en SEQ ID NO: 16.

Las regiones variables modificadas se pueden construir mediante un método conocido en la técnica como, por ejemplo, recombinación por PCR de superposición. Los casetes de expresión para los anticuerpos quiméricos, C2 ChV_H y C2 ChV_K, se pueden usar como moldes para mutagénesis de las regiones estructurales a las secuencias requeridas. Los conjuntos de parejas de cebadores mutagénicos se sintetizan abarcando las regiones a ser alteradas. Los casetes de expresión V_H y V_K humanizados producidos se pueden clonar en vectores apropiados de clonaje conocidos en la técnica como, por ejemplo, pUC19. Después de confirmarse que la secuencia de DNA completa es correcta para cada V_H y V_K, los genes de la región V de la cadena pesada y ligera modificados se pueden escindir del vector de clonaje como casetes de expresión. Estos se pueden transferir a vectores apropiados de expresión como pSVgpt y pSVhyg que incluyen regiones constantes IgG4 Ser-Pro humana o κ , respectivamente.

Vectores de expresión

El vector de expresión pSVgpt está basado en pSV₂gpt (Mulligan y Berg, 1980) e incluye el gen de resistencia a ampicilina para la selección en células bacterianas, el gen gpt para la selección en células de mamífero, la región amplificadora de la cadena pesada de la inmunoglobulina murina, secuencia genómica que codifica el gen de la región constante y secuencias poliA de SV40. Se inserta la región variable de la cadena pesada para expresión como un fragmento HindIII a BamHI.

El vector de expresión pSVhyg incluye el gen de resistencia a ampicilina para la selección en células bacterianas, el gen hyg para la selección en células de mamífero, la región amplificadora de la cadena pesada de la inmunoglobulina murina, secuencia genómica que codifica el gen de la región constante de kappa y que incluye el amplificador de kappa y secuencias poliA de SV40. Se inserta la región variable de la cadena ligera para expresión como un fragmento HindIII a BamHI.

La secuencia de DNA se confirma entonces que es correcta para la V_H y V_K humanizadas en los vectores de expresión.

Para la producción de anticuerpo se pueden introducir los vectores de expresión de la cadena pesada y la cadena ligera humanizadas en líneas celulares apropiadas conocidas en la técnica como, por ejemplo, células NS0. La introducción de los vectores de expresión se pueden lograr mediante co-transfección a través de electroporación o cualquier otra tecnología de transformación adecuada disponible en la técnica. La líneas productoras de anticuerpo se pueden entonces seleccionar y expandir y purificar los anticuerpos humanizados. Los anticuerpos purificados se pueden después analizar mediante técnicas estándar como PAGE-SDS.

Anticuerpo con afinidad, especificidad, estabilidad mejoradas

Se puede modificar ligeramente la secuencia CDRL2 ("KVSNRFS") del anticuerpo de ratón sin afectar adversamente a la actividad del anticuerpo. Se pueden hacer sustituciones conservativas a través del intercambio de R por K en la posición 50 y de S por N en la posición 53. Las dos secuencias alternativas CDRL2 son por lo tanto "RVSNRFS" y "KVSSRFS", respectivamente. Estas se incorporan en la secuencia V_K murina sin ningún otro cambio, como C2 VK-R y C2 VK-S, respectivamente.

La afinidad, especificidad y estabilidad de un anticuerpo como se describe anteriormente en esta memoria o un fragmento del mismo se puede modificar por cambio de su perfil o patrón de glicosilación que da como resultado valores terapéuticos mejorados.

Para lograr este cambio en el patrón de glicosilación, se pueden diseñar genéticamente las células huésped de tal manera que sean capaces de expresar un intervalo preferido de una actividad glicosiltransferasa modificadora de glicoproteína que aumenta los oligosacáridos complejos ligados a N que llevan GlcNAc entrecruzados. Además, se pueden obtener glicofomas modificadas de glicoproteínas, por ejemplo anticuerpos, que incluyen moléculas de anticuerpo completas, fragmentos de anticuerpo, o proteínas de fusión que incluyen una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, que tiene una citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada.

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

Preparación farmacéutica y administración

5 Los anticuerpos, pero particularmente un anticuerpo monoclonal según la invención, se pueden preparar en una formulación fisiológicamente aceptable y puede comprender un soporte farmacéuticamente aceptable, diluyente y/o excipiente usando técnicas conocidas. Por ejemplo, el anticuerpo descrito anteriormente en esta memoria que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, en particular, el anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo se combina con un soporte farmacéuticamente aceptable, diluyente y/o excipiente para formar una composición terapéutica. Son bien conocidos en la técnica soportes farmacéuticos adecuados, diluyentes y/o excipientes e incluyen, por ejemplo, soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones como emulsiones aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc.

15 Se puede conseguir la formulación de la composición farmacéutica según la metodología estándar conocida por aquellos expertos en la técnica.

20 Se pueden administrar las composiciones a un sujeto en forma de un sólido, líquido o aerosol a una dosis farmacéuticamente efectiva adecuada. Ejemplos de composiciones sólidas incluyen cápsulas, cremas, y unidades de dosificación implantables. Las cápsulas se pueden administrar oralmente. Las cremas terapéuticas se pueden administrar de manera tópica. Las unidades de dosificación implantables se pueden administrar de manera local, por ejemplo, en un sitio de tumor, o se puede implantar para liberación sistemática de la composición terapéutica, por ejemplo, de manera subcutánea. Ejemplos de composiciones líquidas incluyen formulaciones adaptadas para inyección intramuscular, subcutánea, intravenosa, intra-arterial, y formulaciones para administración tópica e intraocular. Ejemplos de formulaciones en aerosol incluyen formulaciones en inhalador para administración a los pulmones.

25 Las composiciones se pueden administrar mediante rutas de administración estándar. En general, las composiciones se pueden administrar por rutas tópica, oral, rectal, nasal, intradérmica, intraperitoneal, o parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, o intramuscular). Además, la composición se puede incorporar en matrices de liberación sostenida como polímeros biodegradables, siendo implantados los polímeros en la proximidad de donde se desea el suministro, por ejemplo, en el sitio del tumor. El método incluye la administración de una única dosis, la administración de dosis repetidas a intervalos de tiempo predeterminados y la administración sostenida durante un periodo de tiempo predeterminado.

30 Una matriz de liberación sostenida, como se usa en esta memoria, es una matriz hecha de materiales, normalmente polímeros que son degradables por hidrólisis enzimática y/o ácida/básica o por disolución. Una vez insertado en el cuerpo, la matriz está sometida a la acción de enzimas y fluidos corporales. La matriz de liberación sostenida se selecciona de manera deseable a partir de materiales biocompatibles como liposomas, poliáctidos (ácido poliáctido), poliglicólido (polímero de ácido glicólico), poliáctido co-glicólido (co-polímeros de ácido láctico y ácido glicólico), polianhidridos, poli(orto)ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, condroitín sulfato, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, poliaminoácidos, aminoácidos como fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, polivinil propileno, polivinilpirrolidona y silicona. Una matriz biodegradable preferida es una matriz de uno cualquiera de poliáctido, poliglicólido, o poliáctido co-glicólido (co-polímeros de ácido láctico y ácido glicólico).

35 Es bien sabido por los expertos en la técnica pertinente que la dosificación de la composición dependerá de diversos factores como, por ejemplo, el trastorno a ser tratado, la composición particular utilizada y otros factores clínicos como peso, tamaño, sexo, y el estado general de salud del paciente, área superficial corporal, el compuesto particular o composición a administrar, otros fármacos administrados simultáneamente y la ruta de administración.

40 La composición se puede administrar en combinación con otras composiciones que comprenden una sustancia o compuesto biológicamente activo, particularmente al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos contra el estrés oxidativo, compuestos anti-apoptóticos, quelantes de metales, inhibidores de la reparación de DNA como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de α -secretasa, inhibidores de β - y γ -secretasa, proteínas tau, neurotransmisor, disyuntores de láminas β , atrayentes de componentes celulares que limpian/disminuyen la beta amiloide, inhibidores de amiloide beta truncada N-terminal que incluyen amiloide beta 3-42 prirroglutamada, moléculas anti-inflamatorias, "psicóticos atípicos" como, por ejemplo clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol o olanzapina o inhibidores de colinesterasa (ChEIs) como tacrina, rivastigmina, donepezilo, y/o galantamina, agonistas M1 y otros fármacos que incluyen cualquier fármaco que modifica tau y suplementos nutritivos como, por ejemplo, vitamina B12, cisteína, un precursor de acetilcolina, lecitina, colina, Ginkgo biloba, acetil-L-carnitina, idebenona, propentofilina, o un derivado de xantina, junto con un anticuerpo y, opcionalmente, un soporte farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente y/o un excipiente y procedimientos para el tratamiento de enfermedades.

La sustancia proteínica farmacéuticamente activa puede estar presente en cantidades entre 1 ng y 10 mg por dosis. Generalmente, el régimen de administración debería estar en el intervalo entre 0,1 µg y 10 mg del anticuerpo, particularmente en un intervalo de 1,0 µg a 1,0 mg, y más particularmente en un intervalo entre 1,0 µg y 100 µg, con todos los números individuales que caen dentro de estos intervalos que también forman parte de la invención. Si la administración se produce mediante infusión continua, una dosificación más apropiada puede estar en el intervalo entre 0,01 µg y 10 mg unidades por kilogramo de peso corporal por hora con todos los números individuales que caen dentro de estos intervalos que también forman parte de la invención.

La administración normalmente será parenteral, p. ej., intravenosamente. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones acuosas estériles o no estériles, suspensiones y emulsiones. Los solventes no acuosos incluyen, sin limitarse a ello, propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables como oleato de etilo. Los solventes acuosos se pueden elegir entre el grupo que consiste en agua, soluciones de alcohol/agua, emulsiones o suspensiones incluyendo solución salina y medio tamponado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, lactato de Ringer, o aceites determinados. Los vehículos intravenosos incluyen reponedor de líquidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (como aquellos basados en la dextrosa de Ringer) y otros. También pueden estar presentes conservantes como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, gases inertes, etc.

La composición farmacéutica puede además comprender soportes proteínicos como, por ejemplo, albúmina sérica o inmunoglobulina, particularmente de origen humano. Pueden estar presentes agentes biológicamente activos adicionales en la composición farmacéutica dependiendo de su uso previsto.

Cuando el objetivo de unión se localiza en el cerebro, ciertas realizaciones de la invención proporcionan que el anticuerpo o fragmento activo del mismo atraviese la barrera hematoencefálica. Ciertas enfermedades neurodegenerativas están asociadas con un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, de manera que anticuerpo o su fragmento activo pueda introducirse fácilmente en el cerebro. Cuando la barrera hematoencefálica permanece intacta, existen varios enfoques conocidos en la técnica para transportar moléculas a través de ella, que incluyen, pero no se limitan a, métodos físicos, métodos basados en lípidos y métodos basados en receptores y canales.

Métodos físicos para transportar el anticuerpo o fragmentos activos del mismo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a, eludir completamente la barrera hematoencefálica o crear aberturas en la barrera hematoencefálica. Los métodos de elusión incluyen, pero no se limitan a, inyección directa dentro del cerebro (véase, p.ej., Papanastassiou et al., *Gene Therapy* 9: 398-406 (2002)) e implantar un dispositivo de administración en el cerebro (véase, p. ej., Gill et al., *Nature Med.* 9: 589-595 (2003); y Gliadel Wafers™, Guilford Pharmaceutical). Métodos para crear aberturas en la barrera incluyen, pero no se limitan a, ultrasonidos (véase, p. ej., Publicación de Patente de E.E.U.U. No. 2002/0038096), presión osmótica (p. ej., mediante administración de manitol hipertónico (Neuwelt, E. A., *Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation*, Vols. 1 & 2, Plenum Press, N. Y. (1989)), permeabilización mediante, p. ej., bradiquinina o permeabilizador A-7 (véase, p. ej., Patentes de E.E.U.U. Nos. 5.112.596, 5.268.164, 5.506.206, y 5.686.416), y transfección de neuronas que cubren la barrera hematoencefálica con vectores que contienen genes que codifican el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno (véase, p. ej., Publicación de Patente de E.E.U.U. No. 2003/0083299).

Los métodos basados en lípidos para transportar el anticuerpo o fragmento activo del mismo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a, encapsular el anticuerpo o fragmento activo del mismo en liposomas que están acoplados a fragmentos que unen anticuerpo que se unen a receptores en el endotelio vascular de la barrera hematoencefálica (véase, p. ej., Publicación de la Solicitud de Patente de E.E.U.U. No. 20020025313), y recubrir el anticuerpo o fragmento activo del mismo en partículas de lipoproteínas de baja densidad (véase, p. ej., Publicación de la Solicitud de Patente de E.E.U.U. No. 20040204354) o apolipoproteína E (véase, p. ej., Publicación de la Solicitud de Patente de E.E.U.U. No. 20040131692).

Los métodos basados en receptor y canal para transportar el anticuerpo o fragmento activo del mismo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a, usar bloqueantes de glucocorticoides para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (véase, p. ej., Publicación de la Solicitud de Patente de E.E.U.U. Nos. 2002/0065259, 2003/0162695, y 2005/0124533); activar los canales de potasio (véase, p. ej., Publicación de la Solicitud de Patente de E.E.U.U. No. 2005/0089473), inhibir los transportadores de fármacos ABC (véase, p. ej., Publicación de la Solicitud de Patente de E.E.U.U. No. 2003/0073713); recubrir los anticuerpos con una transferrina y modular la actividad de uno o más receptores de transferrina (véase, p. ej., Publicación de la Solicitud de Patente de E.E.U.U. No. 2003/0129186), y cationizar los anticuerpos (véase, p. ej., Patente de E.E.U.U. No. 5.004.697).

Detección/diagnóstico

En una realización adicional se proporcionan métodos y kits para la detección y diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas con amiloide. Estos métodos incluyen métodos inmunológicos conocidos usados normalmente para detectar o cuantificar sustancias en muestras biológicas o en una afección *in situ*.

Se puede realizar el diagnóstico de una enfermedad o afección asociada con amiloide en un paciente detectando la

unión inespecífica de un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo del mismo a un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ*, que incluye poner en contacto la muestra o una parte corporal o área corporal específica sospechosa de contener la proteína amiloide con un anticuerpo que se une a un epítipo de la proteína amiloide, permitir que el anticuerpo se una a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico, detectar la formación del complejo inmunológico y correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína amiloide en la muestra o parte o área corporal específica.

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

Para el diagnóstico *in situ*, se puede administrar el anticuerpo o cualquier parte activa y funcional del mismo al organismo a ser diagnosticado mediante métodos conocidos en la técnica como, por ejemplo, inyección intravenosa, intranasal, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial de manera que pueda ocurrir una unión específica entre el anticuerpo según la invención con una región epitópica en la proteína amiloide. El complejo anticuerpo/antígeno se puede detectar a través de un marcador unido al anticuerpo o un fragmento funcional del mismo.

Los inmunoensayos usados en aplicaciones de diagnóstico se basan usualmente en antígenos marcados, anticuerpos, o reactivos secundarios para la detección. Estas proteínas o reactivos pueden marcarse con compuestos generalmente conocidos por los expertos en la técnica que incluyen enzimas, radioisótopos, sustancias fluorescentes, luminiscentes y cromogénicas que incluyen partículas coloreadas, como oro coloidal y perlas de látex. De estos, el marcaje radioactivo se puede utilizar para casi todos los tipos de ensayos y con la mayoría de las variaciones. Los marcadores conjugados con enzimas son particularmente útiles cuando se debe evitar la radioactividad o cuando se necesitan resultados rápidos. Los fluorocromos, aunque requieren equipo costoso para su uso, proporcionan un método de detección muy sensible. Anticuerpos útiles en estos ensayos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y anticuerpos policlonales purificados por afinidad.

Alternativamente, el anticuerpo puede marcarse indirectamente por reacción con sustancias marcadas que tienen una afinidad por la inmunoglobulina, como proteína A o G o segundos anticuerpos. El anticuerpo puede conjugarse con una segunda sustancia y detectarse con una tercera sustancia marcada que tiene una afinidad por la segunda sustancia conjugada al anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y el conjugado anticuerpo-biotina se detecta usando avidina o estreptavidina marcada. De forma similar, el anticuerpo puede conjugarse con un hapteno y el conjugado anticuerpo-hapteno se detecta usando anticuerpo anti-hapteno marcado.

Los expertos en la técnica conocerán estos y otros marcadores adecuados que se pueden emplear de acuerdo con la presente invención. La unión de estos marcadores a anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden llevar a cabo usando técnicas estándar comúnmente conocidas por los expertos en la técnica. Las técnicas típicas están descritas por Kennedy, J. H., et al., 1976 (*Clin. Chim. Acta* 70: 1-31), y Schurs, A. H. W. M., et al., 1977 (*Clin. Chim. Acta* 81: 1-40). Las técnicas de acoplamiento mencionadas en estas últimas son el método del glutaraldehído, el método de peryodato, el método de dimaleimida, y otros, todos los cuales se incorporan como referencia en esta memoria.

Los inmunoensayos actuales utilizan un método de doble anticuerpo para detectar la presencia de un analito, en donde el anticuerpo está marcado indirectamente por reactividad con un segundo anticuerpo que se ha marcado con un marcador detectable. El segundo anticuerpo es preferiblemente uno que se une a los anticuerpos del sujeto del que se deriva el anticuerpo monoclonal. En otras palabras, si el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo de ratón, entonces el segundo anticuerpo marcado es un anticuerpo anti-ratón. Para que el anticuerpo monoclonal sea usado en el ensayo descrito más adelante, este marcador es preferiblemente una perla recubierta con anticuerpo, particularmente una perla magnética. Para que el anticuerpo policlonal sea empleado en el inmunoensayo descrito en esta memoria, el marcador es preferiblemente una molécula detectable como una sustancia radioactiva, fluorescente o electroquimioluminiscente.

También se puede emplear dentro del alcance de la presente invención un sistema de doble anticuerpo alternativo a menudo denominados sistemas de formato rápido porque están adaptados a determinaciones rápidas de la presencia de un analito. El sistema requiere alta afinidad entre el anticuerpo y el analito. De acuerdo con una realización, la presencia de la proteína amiloide se determina usando un par de anticuerpos, cada uno específico para la proteína amiloide. Uno de dichos pares de anticuerpos se denomina en esta memoria como un "anticuerpo detector" y el otro dicho par de anticuerpos se denomina en esta memoria como un "anticuerpo de captura". El anticuerpo monoclonal se puede usar como un anticuerpo de captura o como un anticuerpo detector. El anticuerpo monoclonal también puede usarse como anticuerpo de captura y detector, juntos en un solo ensayo. Una realización usa de este modo el método de doble sándwich de anticuerpo para detectar la proteína amiloide en una muestra de

fluido biológico. En este método, el analito (proteína amiloide) se intercala entre el anticuerpo detector y el anticuerpo de captura, estando el anticuerpo de captura irreversiblemente inmovilizado sobre un soporte sólido. El anticuerpo detector contendría un marcador detectable, con el fin de identificar la presencia del sándwich de anticuerpo-analito y, por tanto, la presencia del analito.

5 Ejemplos de sustancias de fase sólida incluyen, pero no se limitan a, placas de microtitulación, tubos de ensayo de poliestireno, perlas magnéticas, de plástico o de vidrio y portaobjetos que son bien conocidos en el campo del radioinmunoensayo y el inmunoensayo enzimático. Los métodos para acoplar anticuerpos a fases sólidas son también bien conocidos por los expertos en la técnica. Más recientemente, se han empleado como soportes sólidos una serie de materiales porosos como nilón, nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio y otros polímeros porosos.

10 También se proporciona un kit de diagnóstico para detectar proteína amiloide en una muestra biológica que comprende una composición como se define anteriormente. Además, se proporciona en esta memoria el último kit de diagnóstico que, además de una composición como se define anteriormente, también comprende un reactivo de detección como se define anteriormente. El término "kit de diagnóstico" se refiere en general a cualquier kit de diagnóstico conocido en la técnica. Más específicamente, este último término se refiere a un kit como se describe en Zrein *et al.* (1998).

15 Es aún otro objeto de la descripción proporcionar nuevas inmuno-sondas y kits de prueba para la detección y diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas con amiloide que comprenden anticuerpos. Para inmuno-sondas, los anticuerpos están unidos directa o indirectamente a una molécula reportera adecuada, p. ej., una enzima o un radionúclido. El kit de ensayo incluye un recipiente que contiene uno o más anticuerpos e instrucciones para usar los anticuerpos con el propósito de unirse a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico y detectar la formación del complejo inmunológico de tal manera que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlaciona con la presencia o ausencia de proteína amiloide.

Ejemplos

25 Materiales

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

30 Se depositaron células de hibridoma FP-12H3-C2, que producen anticuerpo monoclonal de ratón ACI-01-Ab7C2 (llamado "mC2" y "hC2" para el anticuerpo C2 humanizado, a lo largo de la solicitud) el 01 de diciembre de 2005 en la solicitud en tramitación con la presente EP05027092.5 con la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest con el nº de acceso DSM ACC2750.

35 Las células de hibridoma se cultivaron en Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero de ternera fetal al 10% y antibióticos (penicilina/estreptomycin). Se comprobó el isotipo del anticuerpo producido y se encontró que era IgG2b/kappa de ratón, como se esperaba.

Ensayo

40 Un ELISA para la unión a Amiloide Beta proporcionó una medida fiable de la potencia de los anticuerpos C2. Anticuerpo de control positivo, anticuerpo FP-12H3-C2 murino (Genovac Lote nº: AK379/01) y anticuerpo estándar Chemicon 1560 (lote nº: 0508008791).

Elección de regiones constantes humanas

45 Dado que no es deseable el reclutamiento del sistema inmune por el anticuerpo clínico candidato, la región constante humana seleccionada para la cadena pesada fue la IgG4 humana, modificada para cambiar Serina en la posición 228 de la región bisagra a Prolina (HulgG4 Ser-Pro). Esta mutación estabiliza el enlace disulfuro intracatenario y previene la formación de medias moléculas que pueden ocurrir en preparaciones nativas de IgG4 humana. El anticuerpo expresado a partir de las líneas celulares de producción tendrá también la lisina terminal eliminada. Las secuencias de las regiones constantes humanas HulgG4 Ser-Pro y Kappa humana se dan en SEQ ID NO: 17 y 14, respectivamente.

Ejemplo 1. Clonaje y secuenciación de regiones variables del anticuerpo

50 El RNA total se preparó a partir de 3×10^6 células de hibridoma (un matraz T175) usando el mini kit Qiagen RNeasy (nº Cat.: 74104). El RNA se eluyó en 50 µl de agua y se comprobó en un gel de agarosa al 1,2%. El medio condicionado de las células se conservó y se usó una muestra para analizar en el ensayo de actividad de anticuerpos.

Los cDNAs de V_H y V_K se prepararon usando transcriptasa inversa con cebadores de IgG de ratón y región

constante κ . Los cDNAs de primera cadena se amplificaron mediante PCR usando un gran conjunto de cebadores de secuencia señal. Los DNAs amplificados se purificaron en gel y se clonaron en el vector pGem® T Easy (Promega). Los clones V_H y V_K obtenidos se rastrearon para detectar insertos del tamaño esperado mediante PCR y se determinó la secuencia de DNA de los clones seleccionados mediante secuenciación automatizada de DNA. Se determinaron las localizaciones de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) en las secuencias con referencia a otras secuencias de anticuerpos (Kabat EA et al., 1991). Se usa la convención de numeración de Kabat para regiones variables de anticuerpo a lo largo de esta solicitud; por lo tanto, los números de los residuos pueden diferir del número lineal estricto.

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

Se aislaron para mC2 V_H dos secuencias productivas diferentes. Se encontró la secuencia mC2 AF V_H (véase SEQ ID NO: 30) en un total de 29 clones, con 14 cambios de un único par de bases en clones individuales. La secuencia de mC2 V_H B se encontró en un total de 8 clones. Cinco de éstos representaban la secuencia mayoritaria, con los otros 3 clones que eran variaciones de esto. Es posible que estas secuencias V_H B similares se presentaran como un artefacto de la amplificación por PCR. También se obtuvo una V_H aberrante no productiva del hibridoma C2 y se atribuye a la unión defectuosa V-D-J.

Con el fin de determinar cuál es mC2 V_H activo correcto, se prepararon dos anticuerpos quiméricos con las dos secuencias V_H diferentes, AF y B, combinadas con mC2 V_K , para ensayar la actividad de anticuerpo correcta.

Ejemplo 2. Construcción de genes de anticuerpo quiméricos

Un anticuerpo quimérico humano en su forma más común consiste en regiones constantes humanas enlazadas a regiones variables murinas (u otras regiones no humanas). Un anticuerpo quimérico proporciona una herramienta muy útil, en primer lugar para confirmar que se han identificado las regiones variables correctas, en segundo lugar para usar como un anticuerpo de control en ensayos de unión a antígeno con las mismas funciones efectoras y utilizando los mismos reactivos secundarios de detección como un anticuerpo humanizado o diseñado por ingeniería genética, y también se puede usar para investigar las propiedades farmacocinéticas y otras de las regiones constantes humanas con referencia al objetivo para el anticuerpo.

Se construyeron dos vectores de expresión de cadena pesada quimérica que consisten en regiones variables de mC2 V_H AF o mC2 V_H B ligadas a la región constante de HulgG4 (Ser-Pro) en el vector de expresión pSVgpt. Este se basa en pSV₂gpt (Mulligan y Berg, 1980) e incluye el gen de resistencia a la ampicilina para la selección en células bacterianas, el gen gpt para la selección en células de mamífero, la región amplificadora de la cadena pesada de la inmunoglobulina murina, la secuencia genómica que codifica el gen de región constante y secuencias poli A de SV40. La región variable de la cadena pesada. Se inserta para expresión la región variable de la cadena pesada como un fragmento HindIII a BamHI.

Se construyó un vector de cadena ligera quimérica que consiste en C2 V_K ligado a la región constante C de Kappa humana en el vector de expresión pSVhyg (Hieter PA et al, 1980). pSVhyg incluye el gen de resistencia a ampicilina para la selección en células bacterianas, el gen hyg para la selección en células de mamífero, la región amplificadora de la cadena pesada de la inmunoglobulina murina, la secuencia genómica que codifica el gen de la región constante kappa y que incluye el amplificador de kappa y secuencias poli A de SV40. Se inserta para expresión la región variable de la cadena ligera como un fragmento HindIII a BamHI.

Se construyeron casetes de expresión para las secuencias murinas C2 V_H y V_K mediante la adición de la secuencia flanqueante 5' que incluye el péptido señal líder, el intrón líder y el promotor de inmunoglobulina murina, y la secuencia flanqueante 3' que incluye el sitio de empalme y la secuencia intrónica, usando los vectores V_H -PCR1 y V_K -PCR1 como moldes (Riechmann et al., 1988). Se confirmó que la secuencia de DNA era correcta para el V_H y V_K en los vectores de expresión quiméricos. Las secuencias de DNA y aminoácidos en los casetes de expresión se muestran en las Figuras 1 y 2.

Ejemplo 3. Expresión de anticuerpos quiméricos

3.1. Expresión en líneas celulares estables

La línea de células huésped para la expresión de anticuerpos fue NS0, un mieloma múltiple de ratón no productor de inmunoglobulina, obtenido de la Colección Europea de Cultivos de Células Animales, Porton UK (ECACC nº. 85110503). Los vectores de expresión de la cadena pesada y ligera se co-transfectaron en células NS0 por electroporación. Se seleccionaron las colonias que expresan el gen gpt en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS), ácido micofenólico a 0,8 $\mu\text{g/ml}$ y xantina a 250 $\mu\text{g/ml}$. Se rastrearon los clones de células transfectadas para producción de anticuerpo humano mediante ELISA para IgG humana. Se expandieron las líneas que secretaban el anticuerpo y las mayores productoras se seleccionaron y se congelaron en nitrógeno líquido. Se expandieron las mejores líneas celulares productoras para cada anticuerpo en medio como anteriormente, pero solo con FBS al 5%. Los anticuerpos quiméricos se purificaron usando Prosep®-A

(Bioprocessing Ltd). La concentración se determinó mediante ELISA para el anticuerpo IgG_K humano. Los anticuerpos también se analizaron mediante SDS-PAGE.

3.2. Expresión transitoria de anticuerpos quiméricos

5 Para acelerar la prueba de los diferentes anticuerpos quiméricos, se usó la expresión transitoria para producir rápidamente pequeñas cantidades de sobrenadante celular que contenía anticuerpo recombinante para ensayo. Los casetes de expresión mC2 V_H y V_K se transfirieron a vectores basados en pcDNA3.1 (Invitrogen) para la expresión transitoria. El vector de la cadena pesada incluía una región constante de IgG humana. El vector de la cadena ligera incluía una región constante kappa humana. Tanto mC2 V_H AF como mC2 V_H B se transfectaron con mC2 V_K en células de riñón embrionarias humanas (HEK 298) con el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen Cat. N°: 11668) según el protocolo suministrado por el fabricante. Se recogió el medio condicionado de las células 3 días después de la transfección. Se determinó la cantidad de anticuerpo producido por ELISA para el anticuerpo IgG_K humano.

Ejemplo 4. Actividad de anticuerpos C2 quiméricos

4.1. Actividad de anticuerpos C2 quiméricos producidos por transfección transitoria

15 Se ensayaron las muestras de medio condicionado de la transfección transitoria para los dos anticuerpos quiméricos diferentes en el ELISA para la unión a Amiloide Beta. Los resultados indican claramente que el C2 V_H AF es la secuencia correcta. El anticuerpo quimérico C2 V_H AF/C2 V_K se une bien en el ensayo, pero el C2 V_H B/C2 V_K no muestra ninguna unión en absoluto. El anticuerpo control murino 1560 de Chemicon mostró una buena unión, pero la unión por el anticuerpo C2 murino purificado suministrado era baja. Debe observarse que se empleó un anticuerpo secundario diferente para los anticuerpos murinos con las regiones constantes de ratón en comparación con los anticuerpos quiméricos con regiones constantes humanas, de modo que los resultados no son directamente comparables. Posteriormente se encontró que el medio condicionado del hibridoma C2 daba un buen resultado en el ensayo.

4.2. Actividad de anticuerpos C2 quiméricos purificados

25 Los dos anticuerpos quiméricos C2 diferentes se purificaron a partir de líneas celulares NS0 estables como se describe y se ensayaron usando el ELISA Beta Amiloide. Los resultados obtenidos están de acuerdo con los resultados obtenidos con el anticuerpo expresado transitoriamente. El anticuerpo C2 ChVH AF/ChVK se une bien en el ELISA y el anticuerpo C2 ChVH B/ChVK no se une en absoluto.

Ejemplo 5. Diseño de genes de anticuerpos C2 humanizados

30 Las secuencias de aminoácidos del mC2 V_H y V_K se compararon con las secuencias V_H y V_K de anticuerpo de roedor en las bases de datos NCBI y Kabat.

5.1. Región variable de la cadena ligera

35 El gen de línea germinal de ratón más cercano a mC2 V_K es bbl, locus MMU231201, (Schable *et al*, 1999). Solo difieren dos aminoácidos de esta secuencia de línea germinal, ambos localizados dentro de CDRL1. Se encuentran anticuerpos murinos maduros con una secuencia similar, pero no idéntica. Varios tienen una CDRL2 idéntica y una CDRL3 idéntica, pero la CDRL1 de mC2 parece ser única. El mC2 V_K se puede asignar al subgrupo Kabat MuV_KII. La posición 87 de mC2 V_K es F en lugar de la Y que es más común en el subgrupo, lo que indica que este residuo estructural puede ser importante para la actividad de anticuerpos. La comparación con las secuencias V_K de línea germinal humana muestra que los genes del subgrupo V_KII son la mejor combinación para mC2 V_K (Cox *et al*, 1994). Se seleccionó la secuencia DPK15 junto con la región J humana HuJ_K1 para proporcionar las secuencias estructuralesceptoras para la V_K humanizada.

40 Se diseñaron cuatro secuencias V_K humanizadas. C2HuVK1 consiste en mC2 V_K CDRs con estructuras de DPK 15 y J_K1 humano. En las versiones 2, 3 y 4 se han sustituido los residuos murinos en la estructura en las posiciones 45 o 87 o ambas. El residuo 45 puede estar implicado en el apoyo de la conformación de las CDRs. El residuo 87 está situado en la interfaz de los dominios V_H y V_K. Por lo tanto, estos residuos pueden ser críticos para el mantenimiento de la unión al anticuerpo.

Las posiciones y cambios que se han hecho en las regiones estructurales de la cadena ligera se muestran en la Tabla 6. Una comparación de las secuencias humanizadas con la secuencia mC2 V_K, y con DPK15 y J_K1 humana.

5.2. Región variable de la cadena pesada

50 El gen de la línea germinal de ratón más cercano a mC2 V_H AF es VH7183, Locus AF120466, (Langdon *et al*, 2000). La comparación se muestra en la Figura 3. Nueve aminoácidos difieren de esta secuencia de línea germinal, la mayoría de los cuales se encuentra dentro de CDR2. Se encuentran anticuerpos murinos maduros con CDR1 idéntica o similar (un residuo diferente) o con CDR2 similar (un residuo diferente), pero ninguno con las tres CDRs idénticas a mC2 V_H AF. La CDR3 del anticuerpo mC2 es inusualmente corta, que consiste en solamente tres residuos. Sin embargo, se encuentran otros anticuerpos en la base de datos con CDR3 de esta longitud. El mC2 V_H

AF se puede asignar al subgrupo Kabat MuV_HIIID. El residuo 47 de mC2 V_H es L en lugar de la W más común, y el residuo 94 es S en lugar de la normal R, que indica que estos residuos estructurales pueden ser importantes para la actividad del anticuerpo. La comparación con las secuencias V_H de la línea germinal humana muestra que los genes del subgrupo V_HIII son la mejor combinación para mC2 V_H. Se seleccionó la secuencia DP54 junto con la región J humana HuJH6 para proporcionar las secuencias estructurales aceptoras para la V_H humanizada.

Se diseñaron cuatro secuencias V_H humanizadas. El C2HuVH1 consiste en mC2 VHAF CDRs con estructuras de DP54 y HuJH6. En las versiones 2, 3 y 4, los residuos murinos se han sustituido en la estructura en las posiciones 47 o 94 o ambas. El residuo 47 en la estructura 2 hace contacto tanto con las CDRs como con el dominio V_K. El residuo 94 puede estar implicado en mantener la conformación de las CDRs. Por lo tanto, estos residuos pueden ser críticos para el mantenimiento de la unión del anticuerpo.

Las posiciones y los cambios que se han hecho en las regiones estructurales de la cadena pesada se muestran en la Tabla 7.

Ejemplo 6. Construcción de genes de anticuerpos humanizados

Las regiones variables modificadas se construyeron mediante el método de recombinación por PCR de superposición. Los casetes de expresión para el anticuerpo quimérico, C2 ChV_H AF y C2 ChV_K se usaron como moldes para la mutagénesis de las regiones estructurales a las secuencias requeridas. Se sintetizaron los conjuntos de pares de cebadores mutagénicos abarcando las regiones a ser alteradas. Los casetes de expresión V_H y V_K humanizados producidos se clonaron en pUC19 y se confirmó que la secuencia de DNA completa era correcta para cada V_H y V_K. Los genes de la región V de la cadena pesada y la cadena ligera modificados se escindieron de pUC19 como casetes de expresión *Hind*III a *Bam*HI. Estos se transfirieron a los vectores de expresión pSVgpt y pSVhyg que incluyen regiones de IgG4 Ser-Pro o κ constantes, respectivamente, como para los vectores de anticuerpo quimérico. Se confirmó que la secuencia de DNA era correcta para la V_H y V_K humanizadas en los vectores de expresión.

Ejemplo 7. Expresión de anticuerpos humanizados

7.1. Expresión en líneas celulares estables

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

7.2. Expresión transitoria de anticuerpos humanizados

Para acelerar la prueba de los diferentes constructos V_H y V_K humanizados, también se transfirieron los casetes de expresión V_H y V_K humanizados de C2 a los vectores para la expresión transitoria descritos en la sección 7.2. Los cuatro constructos C2 V_K humanizados se co-transfectaron con el constructo C2 V_H quimérico en células HEK293. De manera similar, se co-transfectaron los cuatro constructos C2 V_H humanizados con el constructo C2 V_K quimérico en células HEK293. Se recogió el medio condicionado de las células tres días después de la transfección. Se determinó la cantidad de anticuerpo producido por ELISA para el anticuerpo IgG κ humano.

Ejemplo 8. Actividad de anticuerpos C2 humanizados

8.1. Actividad de anticuerpos C2 humanizados producidos por transfección transitoria

Se ensayaron las muestras de medio condicionado de la transfección transitoria en el ELISA Beta Amiloide. Los resultados obtenidos indican claramente que los constructos V_H humanizados C2 HuVH AF versiones 2 y 4 son funcionales cuando se combinan con la cadena kappa C2 quimérica y son comparables al anticuerpo C2 quimérico en el ensayo. Por el contrario, los anticuerpos que contienen las versiones 1 y 3 de C2 HuVH AF combinadas con la cadena kappa C2 quimérica no muestran ninguna unión en absoluto en el ensayo. Esto indica que la sustitución del residuo murino en la posición 94 es esencial para la actividad del anticuerpo. Los anticuerpos que contienen la cadena pesada de C2 quimérica combinados con las cuatro cadenas kappa C2 humanizadas mostraron todos una buena unión, comparable al anticuerpo quimérico, en el ELISA.

8.2. Actividad de anticuerpos C2 humanizados purificados

Se purificaron ocho anticuerpos C2 humanizados diferentes que comprenden todas las combinaciones de dos cadenas pesadas humanizadas y cuatro cadenas ligeras humanizadas a partir de líneas celulares NS0 estables como se describe y se ensayaron usando el ELISA Beta Amiloide (Figura 4).

Los resultados obtenidos indican claramente que los anticuerpos C2 HuVH4 tienen un mejor comportamiento en el ensayo que los anticuerpos C2 HuVH2. De los anticuerpos C2 Hu2H2, C2 HuVH2/HuVK3 muestra la mejor actividad de unión, pero esto se reduce aproximadamente 2 veces en comparación con el anticuerpo de control quimérico C2 ChVHAF/ChVK. La actividad de C2 HuVH2/HuVK2 se reduce de cuatro a cinco veces en comparación con el

control. Las actividades de los anticuerpos que comprenden C2HuVH4 con las cuatro cadenas ligeras humanizadas diferentes son similares. La mayor actividad se observa para C2HuVH4/HuVK1 y los cuatro anticuerpos están cercanos del anticuerpo quimérico de control en el ensayo.

Ejemplo 9. Modificaciones de CDRL2

5 9.1. Diseño de la cadena ligera con CDR 2 modificado

Como se indicó anteriormente, muchos anticuerpos comparten la misma secuencia CDRL2 ("KVSNRFS") como el anticuerpo C2. Se decidió probar si CDRL2 podría modificarse ligeramente sin afectar adversamente a la actividad del anticuerpo. Se seleccionaron dos sustituciones conservadoras. R por K en la posición 50 y S por N en la posición 53. Las dos secuencias CDRL2 alternativas son por lo tanto "RVSNRFS" y "KVSSRFS". Estas se incorporaron en la secuencia V_K murina sin otros cambio, como mC2 VK-R y mC2 VK-S, respectivamente.

9.2. Expresión transitoria de anticuerpo CDRL2 modificado

Los dos constructos de cadena ligera C2 con CDRL2 modificada descritos en la Sección 11.2.1 se clonaron en el vector de cadena ligera para la expresión transitoria. Cada una se co-transfectó con el vector C2 V_H quimérico en células HEK293. Se recogió el medio condicionado de las células tres días después de la transfección. Se determinó la cantidad de anticuerpo producido por ELISA para anticuerpo IgG_K humano.

9.3. Actividad del anticuerpo C2 con CDRL2 modificada

Las muestras de medio condicionado de la transfección transitoria de mC2 V_KS con CDRL2 modificada combinado con mC2 V_H se ensayaron en el ELISA Beta Amiloide (Figura 5). Tanto el anticuerpo VK-R como el anticuerpo VK-S son comparables al anticuerpo C2 quimérico, indicando que las modificaciones individuales elegidas para CDRL2 no afectan notablemente a la actividad del anticuerpo en el ensayo.

Ejemplo 10. Determinación de la afinidad

Se realizó un análisis para evaluar la especificidad de unión y la afinidad de anticuerpos quiméricos (AF) (ACI-Ab-7-C2) y humanizados (H4K1; H4K4) de ratón, BIACORE® usando monómeros amiloide beta 1-42 y fibras como antígeno inmovilizado en un chip CM5. La tecnología BIACORE® utiliza cambios en el índice de refracción en la capa superficial tras la unión del anticuerpo al antígeno inmovilizado sobre la capa. La unión se detecta por resonancia plasmónica superficial (SPR) de luz láser que se refracta de la superficie. El análisis de la cinética de señal de velocidad y velocidad de desconexión permite la discriminación entre la interacción no específica y específica. La concentración de anticuerpo usada estaba en el intervalo de 0,05 μM a 1,0 μM.

Tabla 1: Especificidad de unión y afinidad de anticuerpos quiméricos (AF) y humanizados (ACI-01-Ab-7-C2) (H4K1; H4K4) de ratón para los monómeros de amiloide beta 1-42 y fibras.

	Monómeros			Fibras		
	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	KD (M)	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	KD (M)
ACI-01-Ab-7-C2 de ratón	1,8E+04	2,7E-03	1,5E-07	2,4E+04	9,9E-04	4,1E-08
AF quimérico	4,7E+04	9,5E-04	2E-08	5,1E+04	3,3E-04	6,5E-09
H4K1 humanizado	5,0E+04	9,5E-04	1,9E-08	4,9E+04	2,3E-04	4,7E-09
H4K4 humanizado	2,5E+04	4,4E-04	1,8E-08	1,3E+05	3,0E-04	2,3E-09

Ejemplo 11. Ensayo de unión inmunohistoquímico

11.1. Secciones de cerebro humano

Se obtuvieron cerebros de personas sanas, pacientes pre-AD y AD no demenciados de la Universitätsklinik en Bonn después de aprobación ética. Los cerebros se fijaron en formaldehído y se deshidrató la región del hipocampo, se embebieron en parafina y se cortaron secciones de 5 μm con un micrótopo. Las secciones de parafina se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso. Para material fresco, se cortaron criosecciones de 5 μm con un criostato y se almacenaron a -80°C las secciones hasta su uso.

11.2. Inmunohistoquímica

- Las secciones de parafina se desparafinaron y se rehidrataron bañando los portaobjetos en xileno seguido de etanol al 100%, etanol al 90% y etanol al 70%. Se disminuyó el fondo con 30 minutos de incubación en H₂O₂ al 10%, metanol al 10% en agua. La recuperación de antígeno se obtuvo incubando los portaobjetos en ácido fórmico al 100% durante 3 minutos. Después de 3 lavados en solución salina tamponada con Tris (TBS, pH 7,5), se bloqueó el marcaje no específico mediante una incubación de 2 horas de los portaobjetos en BSA al 10%, Triton X-100 al 0,25% en TBS. Después del lavado (3 lavados en TBS) se realizó el bloqueo de anticuerpos endógenos añadiendo una IgG anti-humana no marcada (Biomeda) e incubando los portaobjetos en cámaras húmedas durante la noche a temperatura ambiente. Después de otros 3 lavados, se añadió el anticuerpo anti-amiloide humano primario a los portaobjetos y se incubaron otras 24 horas a temperatura ambiente. Después del lavado, se añadió una IgG anti-humana secundaria marcada con fosfatasa alcalina (Sigma) a los portaobjetos y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado, se revelaron los portaobjetos con Líquido Rojo permanente (Dakocytomation), se lavaron con agua y se secaron al aire antes del montaje con medio de fijación permanente (corbitbalsam).
- La criosección se fijó en metanol durante 30 minutos a -80°C y se redujo el fondo añadiendo H₂O₂ al metanol frío hasta una concentración final del 10% e incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de 3 lavados en solución salina tamponada con Tris (TBS, pH 7,5), se bloqueó el marcaje no específico mediante 2 horas de incubación de los portaobjetos en BSA al 10%, Triton X-100 al 0,25% en TBS como anteriormente y se llevó a cabo el mismo procedimiento de tinción como anteriormente.
- Las secciones se examinaron con un microscopio Leica DMLB y se fotografiaron usando una cámara Leica DC500 y el programa informático Leica FireCam1.2.0.

Ambos anticuerpos humanos A y C marcaron las placas de cerebros de pacientes con enfermedad de AD (Figura 6). Se marcaron placas tanto de núcleo difuso como denso. Además, se pueden también detectar las placas difusas en pacientes con pre-AD no demenciados por los anticuerpos A y C. Se identificó amiloide en la angiopatía amiloide cerebral (CAA) con ambos anticuerpos y también se detectó alguna tinción de neuronas que pudiera corresponder a amiloide intracelular. No se observó marcaje en los cerebros de control de pacientes sanos. Se pudieron detectar placas en secciones de parafina pretratadas con ácido fórmico pero no se marcaron placas en secciones de parafina sin tratamiento previo con ácido fórmico y en criosecciones fijadas en metanol. El anticuerpo B humano no detectó placas en secciones de parafina y el anticuerpo de ratón no tiñó ni parafina ni criosecciones de cerebros humanos.

30 Abreviaturas:

A = anticuerpo quimérico de unión AF (IgG4) (mC2ChVHAF)

B = anticuerpo quimérico de no unión B (IgG4) (mC2VHB)

C = anticuerpo humanizado de unión H4K1 (IgG4) (HuVH4/HuVK1)

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

35 Ejemplo 12. Funcionalidad de mC2 en fibrillas de amiloide

12.1. Modificación de la conformación de fibrillas A β 1-42 e iniciación de la desagregación después de la unión del anticuerpo mC2

Con el fin de evaluar el mecanismo mediante el cual el anticuerpo es capaz de desagregar las fibras de beta-amiloide preformadas (A β ₁₋₄₂), se realizó una comparación directa del ensayo de fluorescencia de Tioflavina-T (Th-T) midiendo la desagregación y resonancia magnética nuclear (RMN) en estado sólido del péptido A β 1-42 marcado con Tirosina 10 y Valina 12 U-¹³C, analizando la conformación secundaria (Figura 7A). El anticuerpo mC2 solubilizó el 35,4% de las fibras A β 1-42 preformadas e indujo simultáneamente un cambio en la conformación secundaria de lámina beta a aleatoria en espiral. La disminución en la población de conformación de lámina beta con respecto a la aleatoria en espiral es del orden del 35% y está, por tanto, en estrecha concordancia con la medida usando el ensayo Th-T de fluorescencia (Figura 7B). Estos datos indican que la unión del anticuerpo mC2 inicia una transición de la estructura secundaria que potencialmente provoca una desestabilización de la disposición intermolecular paralela de las láminas beta que influye a una rotura de fibras alargadas en fragmentos más pequeños.

12.2. Afinidad de unión dependiente de la conformación del anticuerpo mC2

Dado que es bien conocido en la literatura científica que se puede usar una proporción de la energía de unión anticuerpo-antígeno para la modificación dependiente de energía de la conformación de un antígeno (Blond y Goldberg, 1987), se llevó a cabo un experimento de comparación de la afinidad de unión del anticuerpo C2 a la proteína A β ₁₋₄₂ completa y a un péptido más pequeño de nueve aminoácidos de longitud que comprende el epítipo del anticuerpo (Figura 8). Para esta comparación se analizaron las afinidades del anticuerpo humanizado C2 mediante ELISA usando péptidos biotinados que cubren la secuencia de aminoácidos completa del epítipo de C2

(producido por Mimotopes y adquirido a ANAWA Trading S.A.) y un péptido A β 1-42 completo biotinado (Bachem). El análisis se realizó según las instrucciones del fabricante (Mimotopes). Como se demuestra en la Figura 8 y la Tabla 2, el anticuerpo se une con una afinidad 36,0% mayor al péptido que comprende su epítipo específico (aminoácidos 13-21 de la secuencia A β ₁₋₄₂) que a la proteína A β 1-42 completa. Por lo tanto, se sugiere que la diferencia en la energía de afinidad de unión se usó para la transición con consumo de energía de la conformación secundaria de la proteína amiloide para presentar el antígeno en una posición más aceptable para la interacción con el anticuerpo. Esto explica por qué la afinidad del anticuerpo es menor para la nativa (la proteína amiloide entera) que para la subunidad aislada.

Tabla 2

	D.O	
	Amiloide beta 13-21	Amiloide beta1-42
hC2	1,225	0,9005
IgG control	0,171	0,196

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

Para evaluar la capacidad del anticuerpo monoclonal beta amiloide anti-humano humanizado hC2 para mediar los efectos antiagregantes y desagregantes sobre beta amiloide (A β), se realizó un ensayo de espectrofluorescencia de tioflavina T.

13.1. Ensayo de inhibición de agregación

Se reconstituyó el polvo liofilizado A β 1-42 en hexafluoroisopropanol (HFIP) hasta 1 mM. Se sonicó la solución del péptido durante 15 minutos a temperatura ambiente, se agitó durante toda la noche, y se hicieron alícuotas en tubos de microcentrífuga no-siliconados. El HFIP se evaporó entonces en una corriente de argón. La película de péptido resultante se secó al vacío durante 10 minutos y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Para ensayar la inhibición de la agregación de A β 1-42 mediada por anticuerpo, se pre-diluyó el anticuerpo hC2 en PBS y se preparó una solución de ensayo que contenía los siguientes componentes en un tubo de incubación no siliconado: anticuerpo pre-diluido 3,3 o 0,3 μ M, tioflavina T a 10 μ M, A β 1-42 a 33 μ M y DMSO al 8,2%. Por lo tanto, las relaciones molares finales de anticuerpo frente a A β 1-42 fueron de 1:10 y 1:100. También se prepararon soluciones de control apropiadas. Las soluciones se incubaron a continuación durante 24 horas a 37°C y se leyó la espectrofluorescencia (unidades de fluorescencia relativa; RFU) en seis repeticiones en placas de 384 pocillos negras (Perkin-Elmer) en un espectrofluorímetro FluoroCount Perkin-Elmer. Se midió entonces la espectrofluorescencia y se calculó el % de desagregación como se describe a continuación.

13.2. Ensayo de desagregación

Para ensayar la desagregación de A β 1-42 pre-agregado mediada por anticuerpo, se preparó un A β 1-42 de bajo peso molecular, preparado como se describió anteriormente, como una solución 110 μ M en DMSO al 27% y PBS 1x. Se dejó entonces agregar la solución a 37°C durante 24 horas, después de lo cual se añadieron los siguientes: anticuerpo pre-diluido 3,3 o 0,33 μ M, y tioflavina T 10 μ M. Esto dio como resultado una relación molar de anticuerpo a A β 1-42 de 1:10 y 1:100. Esta solución se incubó después durante 24 horas adicionales a 37°C. Se midió entonces la espectrofluorescencia y se calculó el % de desagregación como se describe a continuación.

13.3. Cálculo

La inhibición de la agregación o desagregación se expresa como % medio de inhibición o desagregación, respectivamente, \pm error estándar de la media (SEM) según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(\text{RFU de contrl pos} - \text{RFU de contrl neg}) - (\text{RFU de muestra con A}\beta\text{1-42} - \text{RFU de muestra sin A}\beta\text{1-42})}{100\% (\text{RFU de contrl pos} - \text{RFU de contrl neg})} \times$$

13.4. Resultado

13.4.1. Inhibición de la agregación Aβ1-42

5 La inhibición de la agregación de Aβ1-42 usando el anticuerpo hC2 se muestra en la Tabla 3 y en la Figura 11. A una relación molar de anticuerpo a Aβ1-42 de 1:100, la inhibición promedió el 30% (2 experimentos independientes), mientras que a una relación molar de 1:10 la inhibición fue del 80% (2 experimentos independientes; véase la Tabla 3).

Tabla 3. Inhibición de la agregación de Aβ1-42 mediada por hC2 a unas relaciones molares de anticuerpo a Ab1-42 de 1:100 y 1:10.

Anticuerpo	Relación molar (anticuerpo a Aβ1-42)	
	1:100	1:10
hC2	30,0 ± 4,1%	80,4 ± 6,9%

10 13.4.2. Desagregación de Aβ1-42 pre-agregada

La desagregación de Aβ1-42 pre-agregada usando el anticuerpo hC2 se muestra en la Tabla 4 y en la Figura 12. A una relación molar de anticuerpo a Aβ1-42 de 1:100 la desagregación promedió un 24%, mientras que a una relación molar 1:10 la desagregación fue del 32% (3 experimentos independientes; véase la Tabla 4).

15 Tabla 4. Desagregación de Aβ1-42 pre-agregada mediada por hC2 a unas relaciones molares de anticuerpo a Aβ1-42 de 1:100 y 1:10.

Anticuerpo	Relación molar (anticuerpo a Aβ1-42)	
	1:100	1:10
hC2	23,9 ± 4,4%	31,9 ± 3,5%

20 Usando el ensayo de tioflavina T, se pueden demostrar las propiedades bifuncionales del anticuerpo humanizado anti-Aβ hC2, a saber, inhibir la agregación de Aβ1-42 en conformación protofibrilar patogénica y además desagregar las protofibrillas Aβ1-42 preformadas. El hC2 inhibió la agregación de Aβ1-42 en un 80% a una relación molar de anticuerpo a Aβ1-42 de 1:10. Se demostró que la capacidad de hC2 para desagregar las protofibrillas preagregadas de Aβ1-42 a una relación molar 1:10 era del 32%.

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

25 Con el fin de evaluar la especificidad de mC2 a diferentes etapas de proteína amiloide polimerizada, amiloide monomérica, soluble polimérica y fibrilar, se realizó un ELISA recubierto con estas diferentes etapas de beta-amiloide polimérica (Figura 9). Se prepararon los monómeros según un método publicado por Klein (2002), el amiloide polimérico soluble, según Barghorn et al. (2005), mientras que las fibras se realizaron mediante incubación de amiloide (Bachem, Suiza) con una concentración final de 1 µg/µl en Tris/HCl pH 7,4 a 37°C durante 5 días seguido de una etapa de centrifugación (10.000 rpm durante 5 minutos). Los polímeros amiloides se recubrieron entonces sobre una placa de ELISA a una concentración final de 55 µg/ml. El ELISA de afinidad de unión se realizó 30 usando un anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón (Jackson) marcado con fosfatasa alcalina. Como se demuestra en la Tabla 5, el anticuerpo mC2 se une con mayor afinidad a amiloide beta polimérico soluble que a fibras y con la menor a monómeros. Estos datos indican que la unión del anticuerpo está influenciada por el epítipo amiloide y por la conformación de los diferentes agregados amiloides.

Tabla 5. Unión específica de conformación de mC2 a Monómeros, Oligómeros y Fibras de Amiloide

mC2	D.O.		
Ac Conc ($\mu\text{g/ml}$)	Oligómero	Fibras	Monómeros
0,625	2,806	1,620	1,155
0,312	1,724	0,989	0,649
0,156	1,036	0,631	0,397
0,078	0,652	0,499	0,333

Ejemplo 15. Mapeo de epítipo del anticuerpo monoclonal hC2 de AC inmune

El mapeo de epítipos del anticuerpo monoclonal humanizado hC2 se realizó por ELISA usando tres bibliotecas de péptidos diferentes. Una biblioteca comprendía un total de 33 péptidos biotinados que cubrían la secuencia de aminoácidos (aa) completa de A β 1-42 (producida por Mimotopes y adquirida a ANAWA Trading SA), la segunda biblioteca contiene péptidos biotinados usando el péptido 12 (aa12-20 de A β) de la biblioteca del primer péptido y sustituyendo cada aa en la secuencia por una alanina (véase la Tabla 8 más adelante), y la tercera biblioteca contiene péptidos biotinados 13, 14 o 15 (aa 13-21, 14-22 o 15-23 de A β) y sustituyendo en cada caso los últimos aminoácidos por una alanina o una glicina por el a 21 que es ya una alanina (véase Tabla 9 a continuación). Se usó un péptido A β 1-42 completo biotinado como control positivo (Bachem). El mapeo de epítipos se realizó según las instrucciones del fabricante (Mimotopes). Brevemente, las placas recubiertas con estreptavidina (NUNC) se bloquearon con BSA al 0,1% en PBS durante una noche a 4°C. Después de lavar con PBS-Tween 20 al 0,05%, las placas se recubrieron durante 1 hora a temperatura ambiente con diferentes péptidos de la biblioteca, se diluyeron en BSA al 0,1%, Azida sódica al 0,1% en PBS hasta una concentración final de 10 μM . Después del lavado, las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo hC2 o un anticuerpo IgG4 quimérico de no unión a A β diluido a 200 ng/ml en BSA al 2%, Azida sódica al 0,1% en PBS. Las placas se lavaron de nuevo y se incubaron con IgG anti-humana de cabra conjugada con fosfatasa alcalina durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado final, se incubaron las placas con sustrato de fosfatasa alcalina (pNPP) y se leyeron a 405 nm usando un lector de placas de ELISA.

El anticuerpo monoclonal humanizado hC2 se unió específicamente a los péptidos 12, 13, 14, 15 y 16 de la primera biblioteca de péptidos (Figura 17A). Estos péptidos comprenden aa 12-20, 13-21, 14-22, 15-23 y 16-24 respectivamente de A β 1-42, lo que sugiere que el epítipo se encuentra en la región 12-24 de A β . Se usó una segunda biblioteca con sustituciones de alanina para determinar el aa crítico para la unión a A β 12-20 (VHHQKLFFF). La unión del anticuerpo hC2 se pierde completamente cuando los aminoácidos 16, 17, 19 o 20 están sustituidos por una alanina, lo que indica que estos aa son absolutamente críticos para la unión del anticuerpo a A β . La unión del anticuerpo hC2 se pierde parcialmente cuando el aa 15 y 18 están sustituidos.

La unión también se perdió casi completamente cuando el aa 14 se sustituyó por una alanina, lo que indica que el aa 14 es también muy importante para la unión (Figura 17B).

Finalmente, se usó una tercera biblioteca para determinar si el aa 21, 22 o 23 son críticos para la unión al epítipo. La unión del anticuerpo a los aa 15-23 se redujo cuando el aa 23 se sustituyó por una alanina, lo que indica que el aa 23 es también importante para la unión. La unión se perdió parcialmente cuando el aa 21 se sustituyó por una glicina y se perdió ligeramente cuando el aminoácido 22 se sustituyó por una alanina (Figura 17C).

Ejemplo 16. Neuroprotección por el anticuerpo hC2

Se evaluó la capacidad del anticuerpo hC2 para proteger las neuronas de la degeneración inducida por el oligómero Abeta en un ensayo in vitro. Se aislaron, disociaron y cultivaron in vitro neuronas corticales de ratón de día embrionario 16,5-17,5 en medio N3-F12. Las células se cultivaron durante nueve días en total, y se alimentaron el día 3 y el día en que se añadió oligómero Abeta, u oligómero Abeta más anticuerpo anti-Abeta hC2. En el día 5 ("4 días Abeta") o día seis ("3 días Abeta") se trataron ciertos pocillos de células o con oligómero de Abeta a 2 μM solo, o bien con una combinación de oligómero Abeta 2 μM y anticuerpo anti-Abeta a 50 $\mu\text{g/ml}$.

Se preparó el oligómero Abeta disolviendo Abeta 1-42 (rPéptido) en HFIP, a partir de la cual se alicuotaron los péptidos de Abeta en alícuotas de 10 μl a 1 mg/ml y luego se evaporaron en una campana extractora durante 30 minutos y las películas de péptido se almacenaron a -80°C hasta su uso. En su uso, se disolvió la película peptídica

en 10 μ l de DMSO, después 78,6 μ l de HAMS F12 y la solución de péptido Abeta se incubó a 4°C durante 24-48 horas (concentración final de Abeta de 25 μ M).

5 Para células control, se añadió DMSO-F12 sólo al mismo volumen que Abeta-DMSO en el día 5, y se cultivaron las células durante 4 días adicionales sin ningún tratamiento adicional. El día 9, las neuronas de todas las condiciones de cultivo se fijaron y tiñeron con Tuj 1 (un anticuerpo anti-beta-tubulina), seguido de tinción con anticuerpos secundarios marcados con FITC para visualizar los microtúbulos y, por lo tanto, los procesos neuronales en general. Los resultados se muestran en la Figura 18.

10 Las neuronas corticales embrionarias de ratón no tratadas mostraron morfología normal después de nueve días de cultivo (Figura 18, panel más a la izquierda). El tratamiento de las células con oligómero Abeta durante tres días indujo degeneración axonal y causó una disminución en el número total de axones (Figura 18, panel central inferior), y este efecto fue aún más pronunciado a los cuatro días de tratamiento (Figura 18, panel central superior). Por el contrario, las células tratadas con la combinación de oligómero Abeta y anticuerpo anti-Abeta hC2 se parecían a las células control (Figura 18, paneles superior e inferior derecho). Estos resultados indican que el anticuerpo anti-Abeta hC2 era capaz de proteger las neuronas corticales de ratón embrionarias de la degeneración inducida por el oligómero Abeta.

Tabla 6. Posiciones y cambios realizados en las regiones estructurales de la cadena ligera del C2 humanizado

Posición cadena ligera	45	87	50	53
C2VK de ratón	K	F	K	N
C2HUV _K 1 humanizado	Q	Y	K	N
C2HUV _K 2 humanizado	Q	F	K	N
C2HUV _K 3 humanizado	K	Y	K	N
C2HUV _K 4 humanizado	K	F	K	N
Dpk15 de línea germinal humana	Q	Y	L	N
C2V _K -R de ratón			R	

Tabla 7. Posiciones y cambios realizados en las regiones estructurales de la cadena pesada del C2 humanizado

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

20 Se construyeron un total de 8 anticuerpos diferentes con cadenas ligeras C2HuVK1, C2HuVK2, C2HuVK4 y cadenas pesadas C2HuVHAF4 y C2HuVHAF2 humanizadas.

Tabla 8. Resumen de los péptidos usados en la segunda biblioteca.

Los aa que son importantes para la unión están marcados en cursiva y subrayado y los aa absolutamente críticos para la unión están marcados en cursiva y negrita.

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

5 Tabla 9. Resumen de los péptidos usados en la tercera biblioteca.

Los aa que son importantes para la unión están marcados en cursiva y subrayado y los aa absolutamente críticos para la unión están marcados en cursiva y negrita.

p13-21		H	H	Q	K	L	V	F	F	A		
p13-21	G21	H	H	Q	K	L	V	F	F	G		
p14-22			H	Q	K	L	V	F	F	A	E	
p14-22	A22		H	Q	K	L	V	F	F	A	A	
p15-23				Q	K	L	V	F	F	A	E	D
p15-23				Q	K	L	V	F	F	A	E	A
nº aa		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	

Ejemplo 17. Efecto del anticuerpo hC2 en la apoptosis de la célula ganglionar de retina (RGC) cultivada

- 10 Para evaluar la capacidad in vitro del anticuerpo hC2 para reducir la muerte de células ganglionares de la retina (RGC) asociada con enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con amiloide-beta en los tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, degradación neuronal, se usan RGCs cultivadas de ratas y ratones.
- 15 Para aislar las células, en los sacrificios se anestesian los sujetos, se retiran los ojos y se disecciona la retina y se incuban en solución de papaína a 2 mg/ml durante 25 minutos a 37°C para descomponer la matriz extracelular. Al final del tratamiento, se lavan las células tres veces con medio RCG en presencia de un inhibidor de proteasa para detener la acción de la papaína. Se tritura el tejido pasándolo después rápidamente arriba y abajo a través de una pipeta Pasteur hasta que se dispersan las células. Se usa un contador Coulter comercialmente disponible para determinar la densidad celular en la suspensión de células, antes de cultivar las células en aire al 95% CO₂ al 5% a 37°C.
- 20 Con el fin de imitar el daño causado por enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con amiloide-beta en los tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, degradación neuronal, y evaluar el efecto preventivo del anticuerpo hC2, se incuban las células con L-glutamato durante tres días en presencia o ausencia del anticuerpo hC2. Las células cultivadas sólo con tampón sirven como control.

Para determinar la supervivencia de RGC, se fijan las células al final del periodo de incubación, con formaldehído al 3,7% en fosfato tamponado salino (PBS) a temperatura ambiente durante 30 minutos, se lavan tres veces en PBS y se incuban durante 1 hora en PBS que contiene marcadores específicos de RGC Thy 1.1 o anticuerpo NF-L. Se elimina entonces el anticuerpo por lavado y se incuban las células durante 30 minutos con los anticuerpos secundarios marcados con fluoresceína, anti-IgG de ratón de cabra, anti-IgG de conejo de cabra o anti IgG de cabra de conejo. Al final de la incubación, las células se lavan, se tiñen durante 5 minutos con solución DAPI y se aclaran. Las RGCs supervivientes se cuentan por microscopía de fluorescencia y se compara el número de células presentes después de la incubación con el anticuerpo hC2 con el control.

Ejemplo 18. Efecto del anticuerpo hC2 en la apoptosis de la célula ganglionar de retina (RGC) in vivo

Para evaluar la capacidad in vivo del anticuerpo hC2 para reducir la muerte de células ganglionares de la retina (RGC) en individuos afectados por enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con amiloide-beta en los tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, degradación neuronal, se usan ratas y ratones para un estudio de presión intraocular inducida (OIP) de 2 a 16 semanas de duración. La muerte de las células ganglionares de retina se mide al final del estudio tanto por imágenes in vivo como por análisis histológico de punto final.

Con el fin de imitar el aumento en la presión intraocular asociado con ciertas enfermedades oculares asociadas con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías/cambios patológicos relacionados con amiloide-beta en los tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, degradación neuronal, glaucoma en particular, los sujetos se anestesiaron primero con ketamina intraperitoneal (75 mg/kg) y xylazina (5 mg/kg) y gotas oculares de proparacaína tópica al 1%. A continuación se usan dos métodos alternativos para elevar artificialmente la IOP en un ojo (unilateralmente) en ratas y ratones. En el primer método, los sujetos anestesiados reciben una inyección de tinta china en la cámara anterior seguida de fotocoagulación del colorante inducida por láser en la malla trabecular con un láser de diodo de 532 nm en la lámpara de hendidura perpendicular a las trabéculas y paralela al iris. Los sujetos reciben un tratamiento inicial de 40 o 50 puntos de 50 μm de tamaño, 0,4 W y 0,6 segundos de duración. En el segundo método, para aumentar artificialmente la IOP, los sujetos anestesiados reciben una inyección de 50 μl de solución salina hipertónica en las venas episclerales en un ojo usando una microaguja con una fuerza suficiente para blanquear la vena.

Para medir la IOP se usa un tonómetro de mano comercial (TonoLab). Las mediciones se toman mientras los sujetos están bajo anestesia como el promedio de 12 lecturas inmediatamente antes del tratamiento con láser, 1, 4 y 7 días después del tratamiento, y después semanalmente durante la duración del experimento. No se incluyen los sujetos en el estudio si, en un intervalo de una semana, la diferencia en la IOP entre los dos ojos de los sujetos es inferior a 6 mm Hg.

Con el fin de evaluar el efecto preventivo del anticuerpo hC2 sobre la apoptosis de RGC, la mitad de los sujetos que reciben el tratamiento inductor de IOP reciben una inyección intravítrea o intravenosa del anticuerpo hC2 en el momento de la elevación de la IOP. La mitad de los sujetos sirven como control. Las RGCs funcionales en la retina total de los ojos con elevación de IOP se fotografían y se cuentan, y luego se compara con el número presente en los ojos contralaterales en los mismos sujetos. La diferencia en el número de RGC entre los dos ojos representa las células que se han perdido como resultado de la elevación de la IOP en el ojo quirúrgico. El análisis de los cambios en este valor diferencial ayuda a la identificación de los efectos protectores provocados por el anticuerpo hC2.

Se mide el número de RGC mediante análisis histológico de punto final a las 2, 4, 8 y 16 semanas después de la elevación inducida de IOP. Las retinas de los sujetos se fijan en paraformaldehído al 4% y se tiñen en secciones o montaje completo usando el marcador específico de RGC Brn3b. Múltiples estudios han demostrado que la pérdida de tinción de Brn3b se correlaciona con la pérdida de función de RGCs. Para confirmar la exactitud del marcaje histológico de RGC se puede usar este método junto con marcaje negro del nervio óptico del SNC con DiASP o Fluorogold en un subconjunto de sujetos para identificar RGCs que mantienen un axón funcional intacto que no ha perdido conectividad con objetivos en el cerebro.

También se mide la apoptosis en un subconjunto de ojos como punto final secundario. La anexina V marcada con fluoresceína se usa para marcar células apoptóticas por inyección intravítrea de la proteína una hora antes del sacrificio del sujeto. Se preparan las retinas como anteriormente y se lleva a cabo la toma de imágenes en conjunto con la toma de imágenes de puntos finales histológicos.

Listado de referencias

- Barghorn S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, Keller P, Janson B, Bahr M, Schmidt M, Bitner RS, Harlan J, Barlow E, Ebert U, Hillen H (2005) Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 95:834-847.
- 5 Blond and Goldberg, 1987, PNAS March 1, 1987 Vol. 84 |no. 5 | 1147-1151
- Cox JPL, Tomlinson IM and Winter G. *Eur. J. Immunol.* 1994; 24: 827-836. A directory of human germ-line V_K segments reveals a strong bias in their usage.
- Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, 1991.
- 10 Klein WL (2002) Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular soluble polymeric amyloid beta (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41(5):345-352.
- Langdon SD, Inaioki M, Kelsoe G. and Tedder TF. *Immunogenetics* 2000; 51: 241-245. Germline sequences of V(H)7183 gene family members in C57BL/6 mice demonstrate natural selection of particular sequences during recent evolution
- 15 Mulligan RC and Berg P. *Science* 1980; 209: 1422-1427. Expression of a bacterial gene in mammalian cells.
- Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G, *Nature* 1988; 332: 323-327. Reshaping human antibodies for therapy.
- Schable KF, Thiebe R, Bensch A, Brensing-Kueppers J, Heim V, Kirschbaum T, Lamm R, Ohnrich M, Pourrajabi S, Roschenthaler F, Schwendinger J, Wichelhaus D, Zocher I and Zachau HG. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29: 2082-2086.
- 20 Characteristics of the immunoglobulin V kappa genes, pseudogenes, relics and orphans in the mouse genome.
- Tomlinson IM, Walter G, Marks JD, Llewelyn MB and Winter G. *J. Mol. Biol.* 1992; 227: 776-798. The repertoire of human germline V_H sequences reveals about 50 groups of V_H segments with different hypervariable loops

Listado de secuencias

- <110> AC Immune S.A.
 <120> Anticuerpo humanizado
 <130> 089667-0155
- 5 <141> 2008-10-03
 <150> US 60/960,616
 <151> 2007-10-05
 <160> 32
 <170> PatentIn version 3.3
- 10 <210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
- <220>
 15 <223> C2 HuVH AF 4 región variable de cadena pesada humanizada (CDR1)
- <400> 1
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
 1 5 10
- <210> 2
 <211> 17
 20 <212> PRT
 <213> Mus musculus
- <220>
 <223> C2 HuVH AF 4 región variable de cadena pesada humanizada (CDR2)
- <400> 2
 Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
- 25 Gly
- <210> 3
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
- 30 <220>
 <223> C2 HuVH AF 4 región variable de cadena pesada humanizada (CDR3)
- <400> 3
 Gly Asp Tyr
 1
- <210> 4
 35 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
- <220>
 <223> C2 HuVK 1 región variable de cadena ligera humanizada (CDR1)
- 40 <400> 4
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15
- <210> 5
 <211> 7

<212> PRT
 <213> Mus musculus

 <220>
 <223> C2 HuVK 1 región variable de cadena ligera humanizada (CDR2)

5 <400> 5
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <223> C2 HuVK 1 región variable de cadena ligera humanizada (CDR3)

<400> 6
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
 1 5

15 <210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Aβ epitopo, región 2

<400> 7
 Val Phe Phe Ala Glu Asp
 1 5

<210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Aβ epitopo, región 1

<400> 8
 His Gln Lys Leu Val
 1 5

30 <210> 9
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> caract_misclánea
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, o Ile

35 <220>

<221> caract_misclánea
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, Ser o Ile

40 <220>

<221> caract_misclánea
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser Glu o Asp

45 <220>

<221> caract_misclánea
 <222> (6)..(6)

<223> Xaa puede ser Glu o Asp

<400> 9
Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
1 5

5 <210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> caract_misclánea
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser His, Asn, Gln Lys, o Arg

15 <220>
 <221> caract_misclánea
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser Asn o Gin

20 <220>
 <221> caract_misclánea
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, o Ile

25 <400> 10
Xaa Xaa Lys Leu Xaa
1 5

30 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <220>
 <221> caract_misclánea
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser His, Asn, Gln Lys, o Arg

40 <220>
 <221> caract_misclánea
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser Asn o Gln

45 <220>
 <221> caract_misclánea
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, o Ile

50 <220>
 <221> caract_misclánea
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, Ser o Ile

55 <220>
 <221> caract_misclánea
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser Glu o Asp

60 <220>
 <221> caract_misclánea
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser Glu o Asp

65 <400> 11
Xaa Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
1 5 10

ES 2 612 788 T3

<210> 12
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> C2 HuVK 1 cadena ligera variable humanizada artificial

<400> 12
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

10 <210> 13
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> C2 cadena ligera humanizada artificial

15 <400> 13

ES 2 612 788 T3

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

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

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

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

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

- <210> 14
- 5 <211> 107
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> C2 región constante de cadena ligera humanizada artificial
- 10 <400> 14

ES 2 612 788 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 15

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

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

10

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

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

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

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

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

<210> 16

<211> 439

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> C2 cadena pesada humanizada artificial

ES 2 612 788 T3

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 612 788 T3

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

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 355 360 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 370 375 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 385 390 395 400

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 405 410 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 420 425 430

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435

<210> 17

<211> 326

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<223> REGIÓN C CADENA 4 IG GAMMA- MODIFICADA

<400> 17

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

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

10

ES 2 612 788 T3

65
80

70

75

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
325

<210> 18
<211> 51

5

ES 2 612 788 T3

<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<223> C2 HuVH AF 4 región variable de cadena pesada humanizada (CDR2)

5 <400> 18
agcatcaata gtaatggtgg tagcacctat tatccagaca gtgtgaaggg c
51

<210> 19
<211> 9
<212> DNA
10 <213> Mus musculus

<220>
<223> C2 HuVH AF 4 región variable de cadena pesada humanizada (CDR3)

<400> 19
ggtgactac
9

15 <210> 20
<211> 49
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
20 <223> C2 HuVK 1 región variable de cadena ligera humanizada (CDR1)

<400> 20
agatctagtc agagccttgt atatagtaat ggagacacct atttacatt
49

<210> 21
<211> 635
25 <212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> C2 Hu VK 1 cadena ligera variable artificial humanizada

<400> 21
gatattgtga tgacceaatc tccactctcc ctgcctgtca ctctctgtga gcctgcctcc
60

atctcttgca gatctagtc gagccttgta tatagtaatg gagacaccta tttacattgg
120

tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctctgatct acaaagtttc caaccgattt
180

tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc
240

agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttctc
300

tggacgttcg gccaaggcac caaggtggaa atcaaa
30 336

<210> 22
<211> 657
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> C2 cadena ligera humanizada artificial

<400> 22

ES 2 612 788 T3

gatattgtga tgacceaatc tccactctcc ctgcctgtca ctctgtgtga gctgcctcc
60

atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta tttacattgg
120

tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt
180

tctgggggtcc cagacagggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc
240

agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttctc
300

tggacgttcg gccaaaggcac caaggtggaa atcaaaagga ctgtggctgc accatctgtc
360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg
420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgcctccaa
480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc
540

agcagcacc cagcgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa
600

gtcaccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt
657

- 5 <210> 23
- <211> 321
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens

<220>
<223> C2 región constante de cadena ligera humanizada artificial

- 10 <400> 23
- aggactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct
60

ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag
120

tggaaggtgg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac
180

agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag
240

aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaag
300

agcttcaaca ggggagagtg t
321

- 15 <210> 24
- <211> 798
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial

<220>
<223> C2 HuVH AF cadena pesada variable humanizada artificial

<400> 24

ES 2 612 788 T3

gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccaggct
120

ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggttag cacctattat
180

ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctccctgtac
240

ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtggtagc
300

tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctca
336

- 5 <210> 25
- <211> 1317
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial

<220>
<223> C2 cadena pesada humanizada artificial

- 10 <400> 25
- gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccaggct
120

ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggttag cacctattat
180

ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctccctgtac
240

ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtggtagc
300

tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctcagctt ccaccaaggg cccatccgtc
360

ttccccctgg cgcctgctc cagatcgacc tccgagagca cagccgccct gggctgcctg
420

gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc
480

ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg
540

gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag
600

cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gaggccaaat atgggtcccc gtgtccccca
660

tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag
720

ES 2 612 788 T3

gacactctca tgatctcccg gacccctgag gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag
780

gaagaccccc aggtccagtt caactggtac gtggatggcg tggaggtgca taatgccaaag
840

acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacccgtc
900

ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc
960

ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg
1020

tacacctgac ccccatccca ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg
1080

gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag
1140

aacaactaca agaccacgcc tcccgtcctc gattccgacg gctccttctt cctctacagc
1200

aggctaaccg tggacaagag caggtggcag gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg
1260

catgaggctc tgcaacaacca ctacacacag aagagcctct ccctgtctct gggtaaa
1317

<210> 26

<211> 981

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<220>

<223> C2 región constante de cadena pesada humanizada artificial

<400> 26

gcttccacca agggcccac cgtcttcccc ctggcgcctt gctccagatc gacctccgag
60

agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacggtgtcg
120

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtccctca
180

ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc
240

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagctc
300

aaatatggtc ccccggtgcc cccatgccca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc
360

10

ES 2 612 788 T3

ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg
420

tgcgtgggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat
480

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac
540

cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag
600

tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaacctctc caagccaaa
660

gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag
720

aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag
780

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt cctcgattcc
840

gacggctcct tcttctctta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg
900

aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc
960

ctctccctgt ctctgggtaa a
981

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

10 <210> 28

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 612 788 T3

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

<210> 29

<211> 336

5 <212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 29

gatgttgga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc
60

atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta tttacattgg
120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt
180

tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc
240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttctc
300

10 tggacgttcg gtggaggcac caagctagaa atcaaa
336

<210> 30

<211> 417

<212> DNA

<213> Mus musculus

15 <400> 30

ES 2 612 788 T3

atgaagttgc ctgtaggct gttggtgctg atgttctgga ttctgcttc cagcagtgat
60

gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc
120

tcttgcagat ctagtccagag ccttgtatat agtaatggag acacctatctt acattggtac
180

ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct
240

ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc
300

agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccttgg
360

acgttcggtg gaggcaccaa gctagaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgta
417

<210> 31

<211> 336

<212> DNA

5 <213> Mus musculus

<400> 31

gagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc
60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact
120

ccagacaaga ggctggaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat
180

ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac
240

ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagtgggtgac
300

tactggggcc aaggctccac tctcacagtc tectca
336

10 <210> 32

<211> 408

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 32

ES 2 612 788 T3

atgrasttsg ggytcagmtt grttttcctt gcccttattt taaaagggtg ccaatgtgag
60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtcctt gaaactctcc
120

tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tatggcatgt cttgggttcg ccagactcca
180

gacaagaggc tgggaattggt cgcaagcatc aatagtaatg gtggtagcac ctattatcca
240

gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg
300

caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag tggtgactac
360

tggggccaag gctccactct cacagtctcc tcagcaaaa caacaccc
408

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo, que reconoce y se une al menos a un sitio de unión distinto en la proteína beta amiloide, para usar en la prevención, tratamiento o alivio de los efectos de una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos relacionados con amiloide-beta en los tejidos del sistema visual seleccionada entre deficiencias visuales corticales, glaucoma, neuritis óptica, amiloidosis ocular, y distrofia reticular en un sujeto, en donde el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprende:
- (a) una región variable de la cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y
- 10 (b) una región variable de la cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.
- 2.** El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo para usar según la reivindicación 1, en donde la prevención, tratamiento o alivio de dicha enfermedad ocular
- (i) reduce la carga de placa en la capa celular ganglionar retiniana de dicho sujeto;
- (ii) reduce la cantidad de placas en la capa celular ganglionar retiniana de dicho sujeto;
- 15 (iii) disminuye la cantidad total de amiloide-beta soluble en la capa celular ganglionar retiniana de dicho sujeto; o
- (iv) conserva o disminuye la presión ocular en los ojos de dicho sujeto.
- 3.** El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo para usar según la reivindicación 1 o 2, en donde el sujeto es un mamífero.
- 4.** El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo para usar según la reivindicación 1 o 2, en donde el sujeto es un humano.
- 20 **5.** El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la enfermedad ocular es glaucoma.
- 6.** El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo para usar según la reivindicación 5, en donde el glaucoma se selecciona del grupo que consiste en glaucoma crónico de ángulo abierto (COAG), glaucoma agudo de ángulo cerrado (AACG), glaucoma de mecanismo mixto o combinado, glaucoma de tensión normal, glaucoma congénito, glaucoma secundario, glaucoma pigmentario, y glaucoma exfoliativo.
- 25 **7.** El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la enfermedad ocular es deficiencia visual cortical, neuritis óptica o distrofia reticular.
- 8.** El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo es de un isotipo IgG4.
- 30 **9.** El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo humanizado comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.
- 10.** El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo humanizado comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.
- 35 **11.** El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo humanizado comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.
- 12.** El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo para usar según la reivindicación 8, en donde el anticuerpo humanizado comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 que carece de la Lys C-terminal en la posición 439.
- 40 **13.** El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo para usar según la reivindicación 8, en donde el anticuerpo humanizado comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 que carece de la Lys C-terminal en la posición 439.
- 45 **14.** El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el fragmento del mismo es un fragmento Fab, Fab/c, Fab' o F(ab')₂.

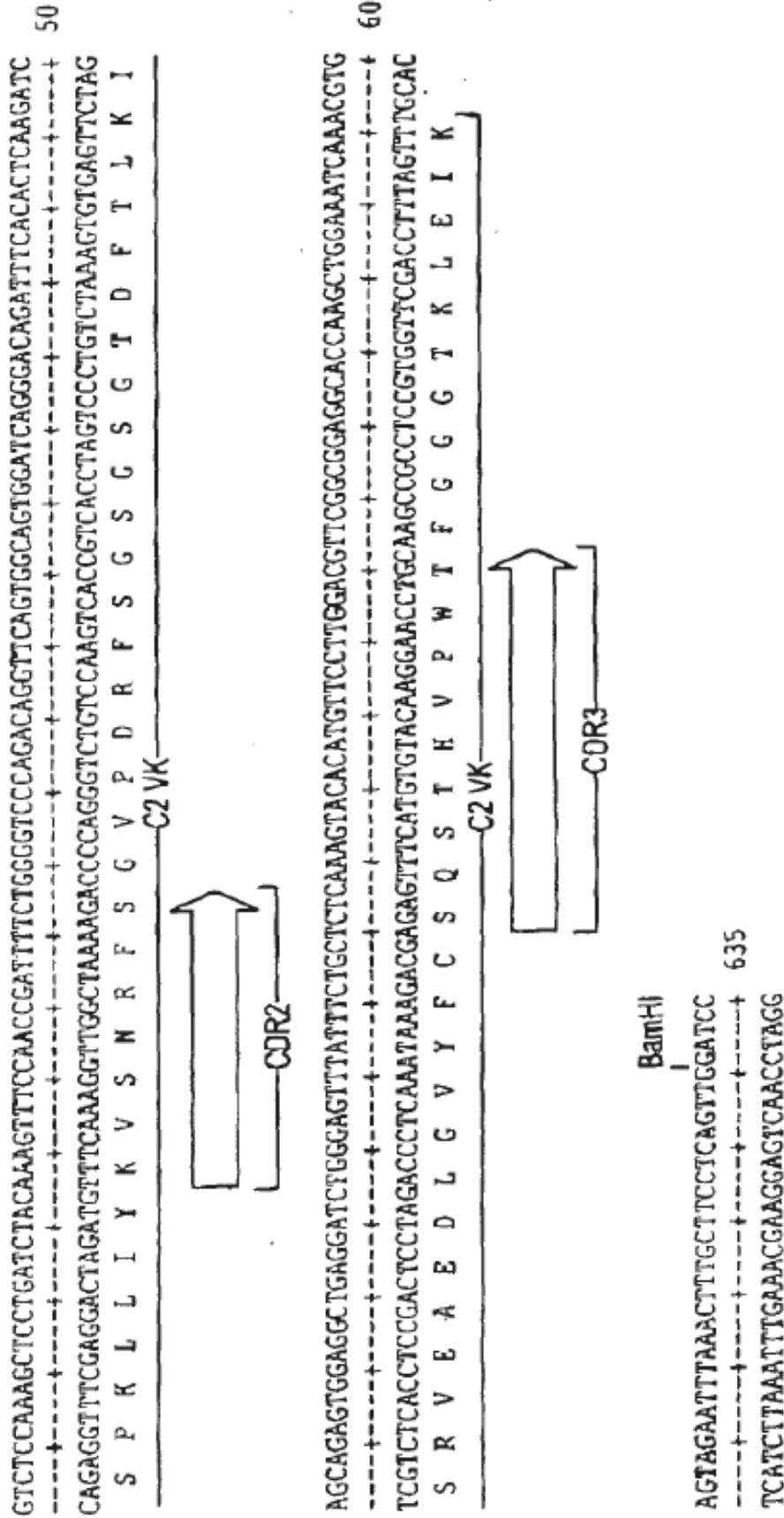


FIG. 1-2

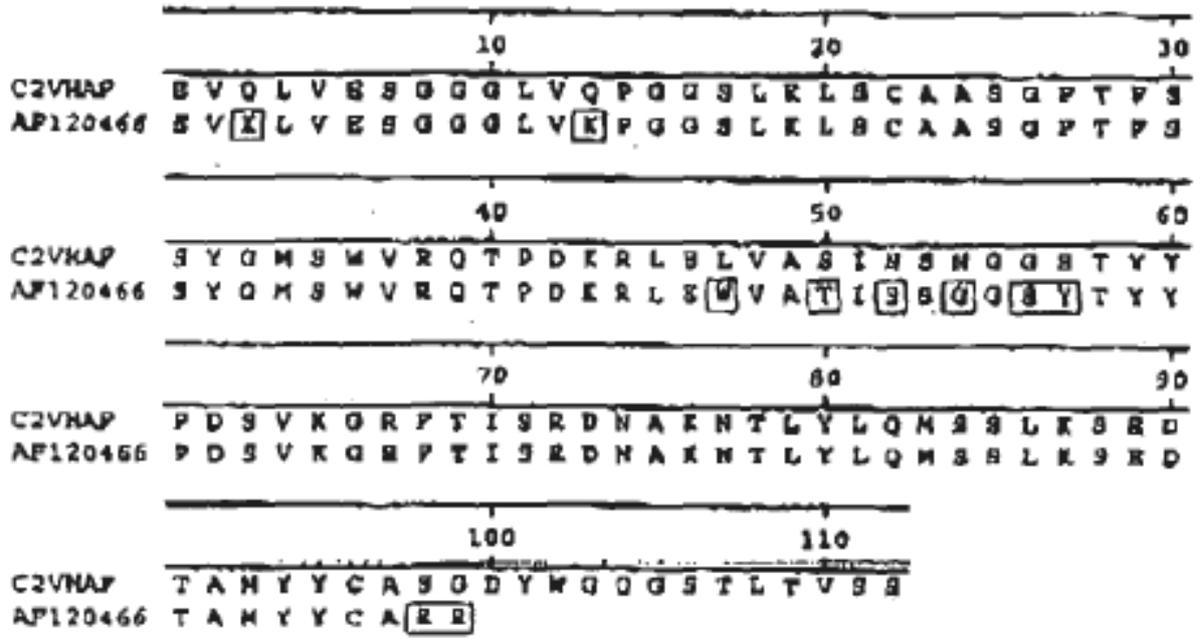


FIG. 3
(Ejemplo 5.2)

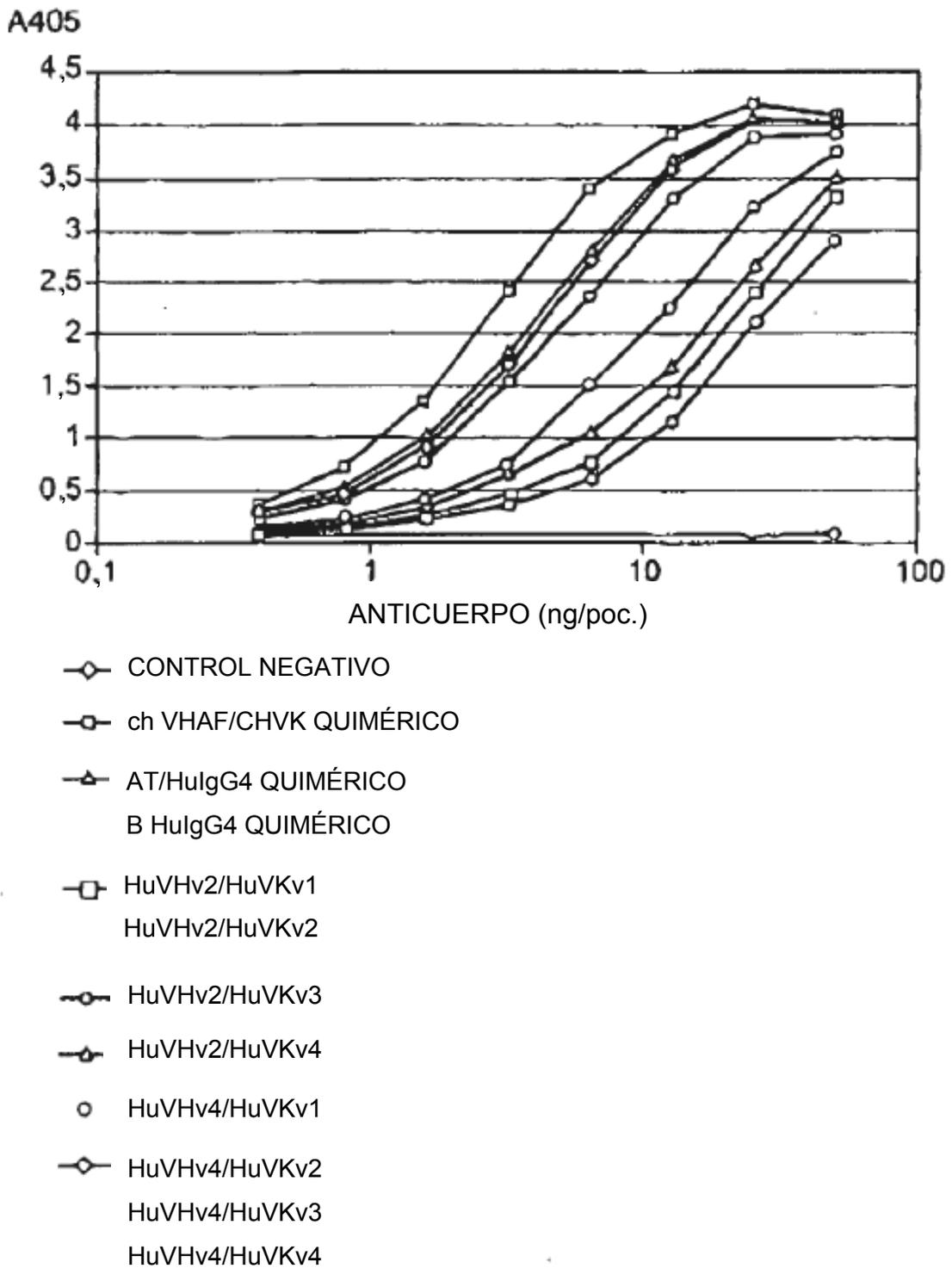


FIG. 4

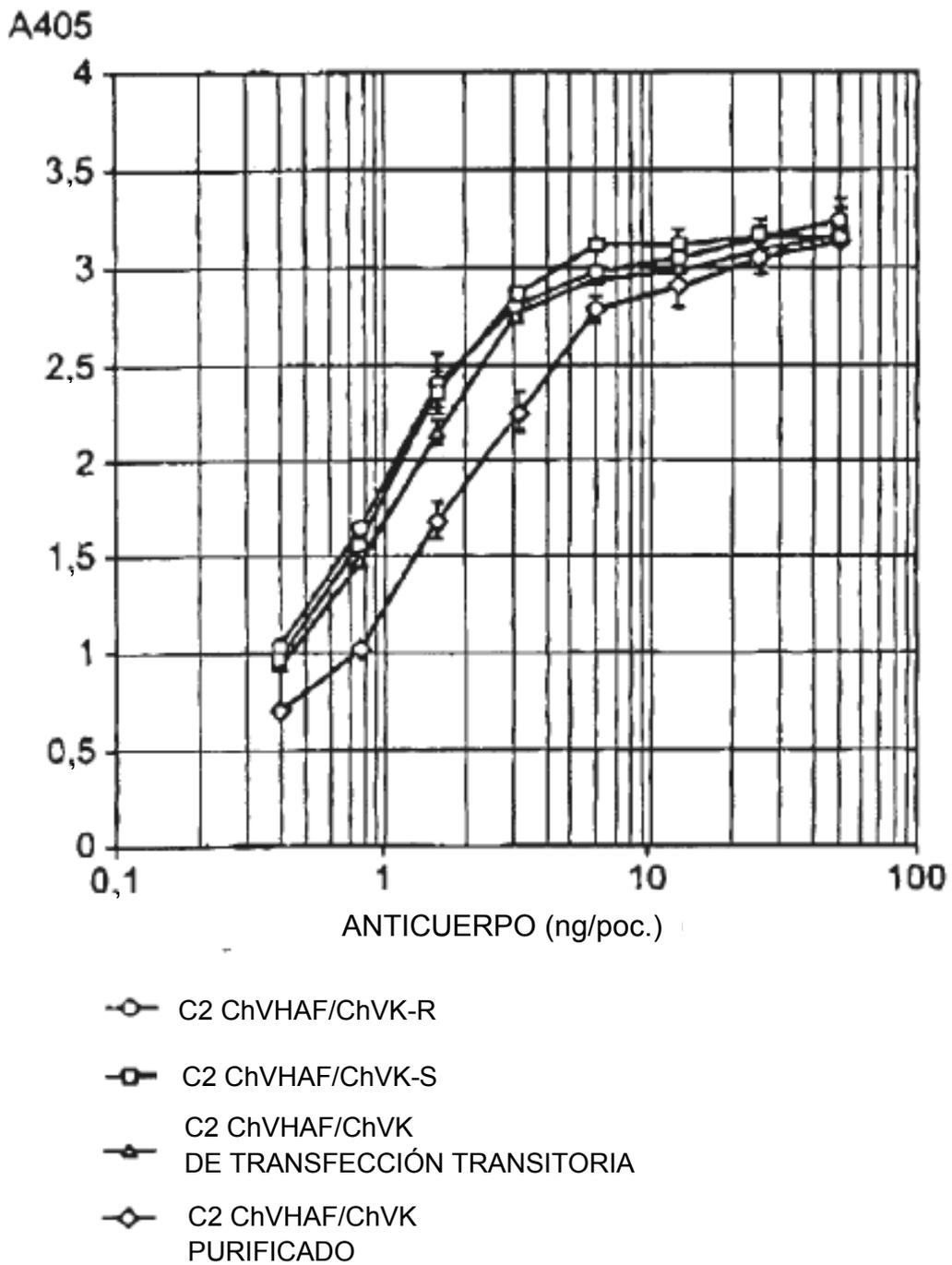


FIG. 5

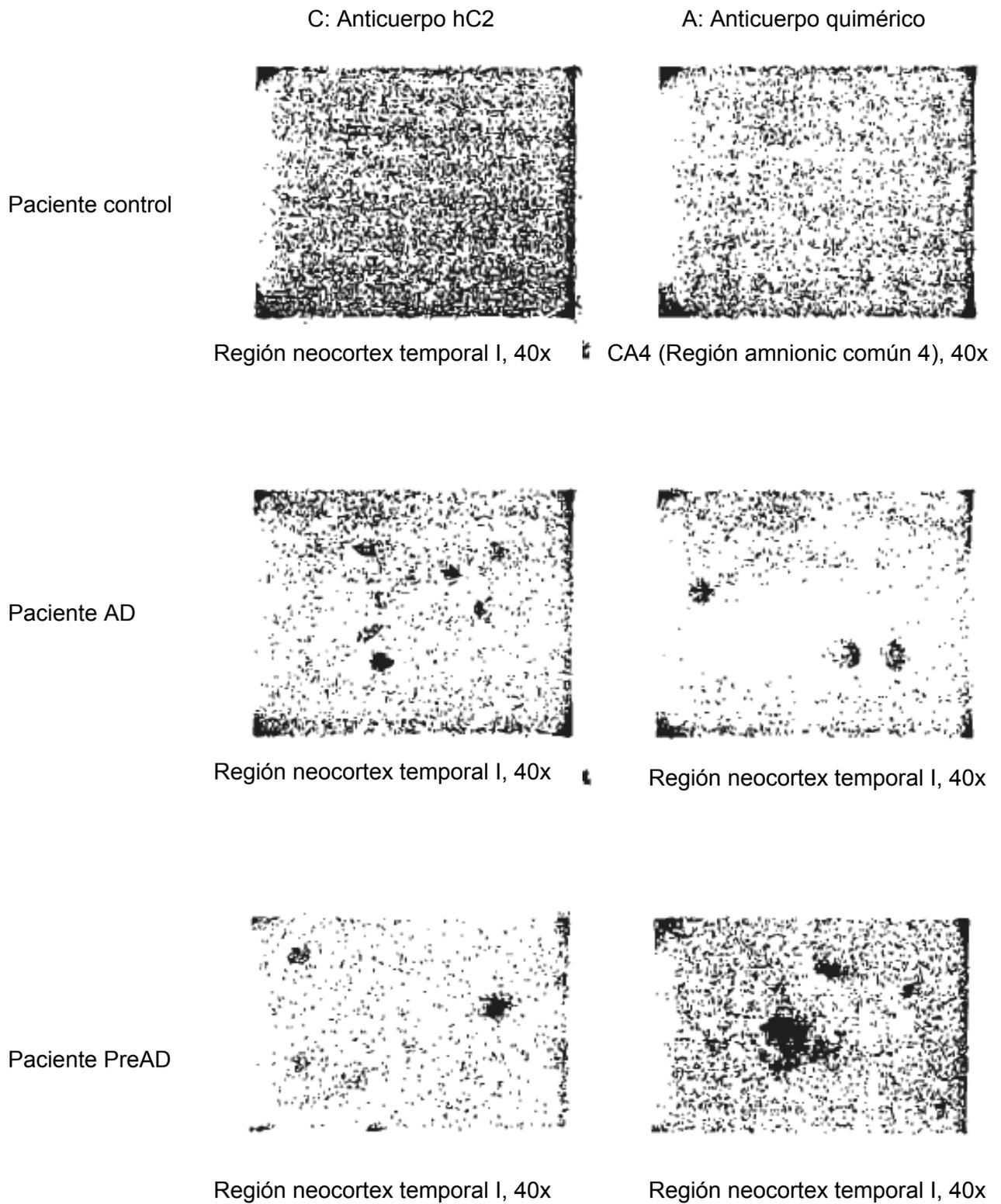


FIG. 6

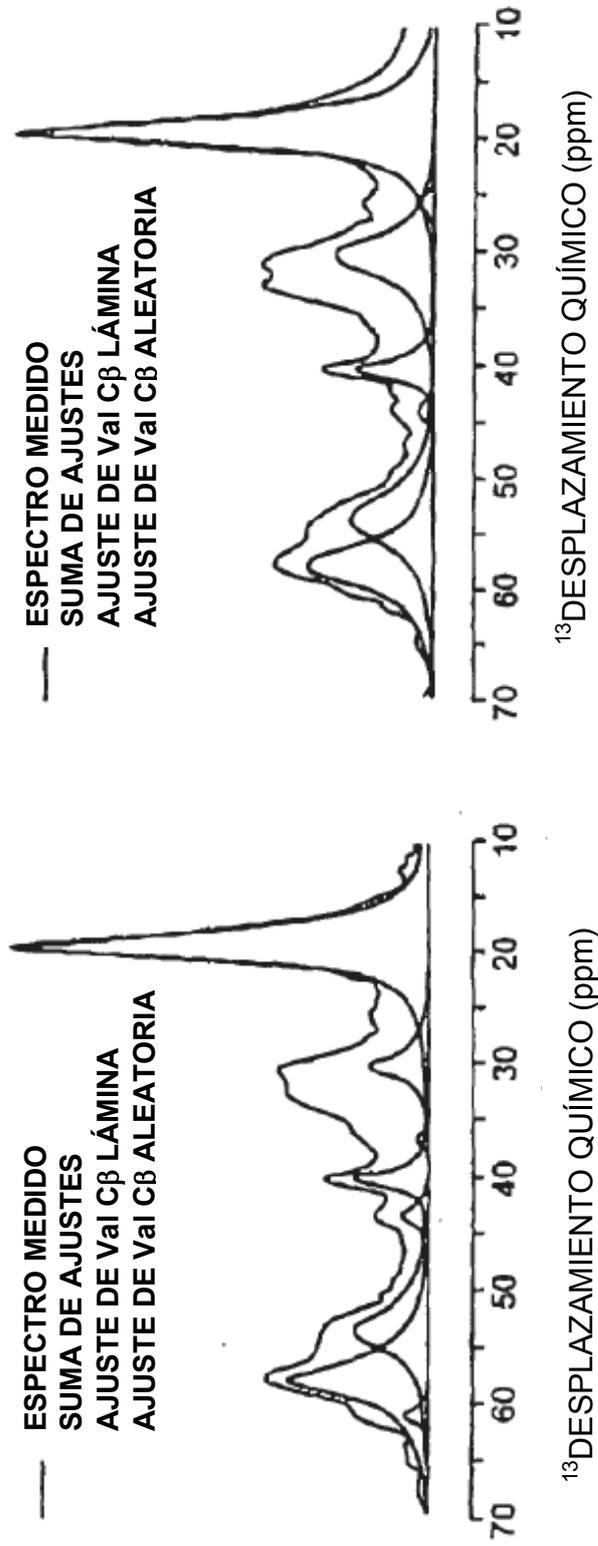


FIG. 7A

RESONANCIA	PBS		C2 DE RATÓN			
	δ ISO (ppm)	FWH (Hz)	% INTENSIDAD INTEGRAL	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	% INTENSIDAD INTEGRAL
Val Cβ-LÁMINA	32,60	479	81,7	33,09	366	53,5
Val Cβ-ALEATORIA	30,27	200	18,3	30,27	340	46,5

FIG. 7B

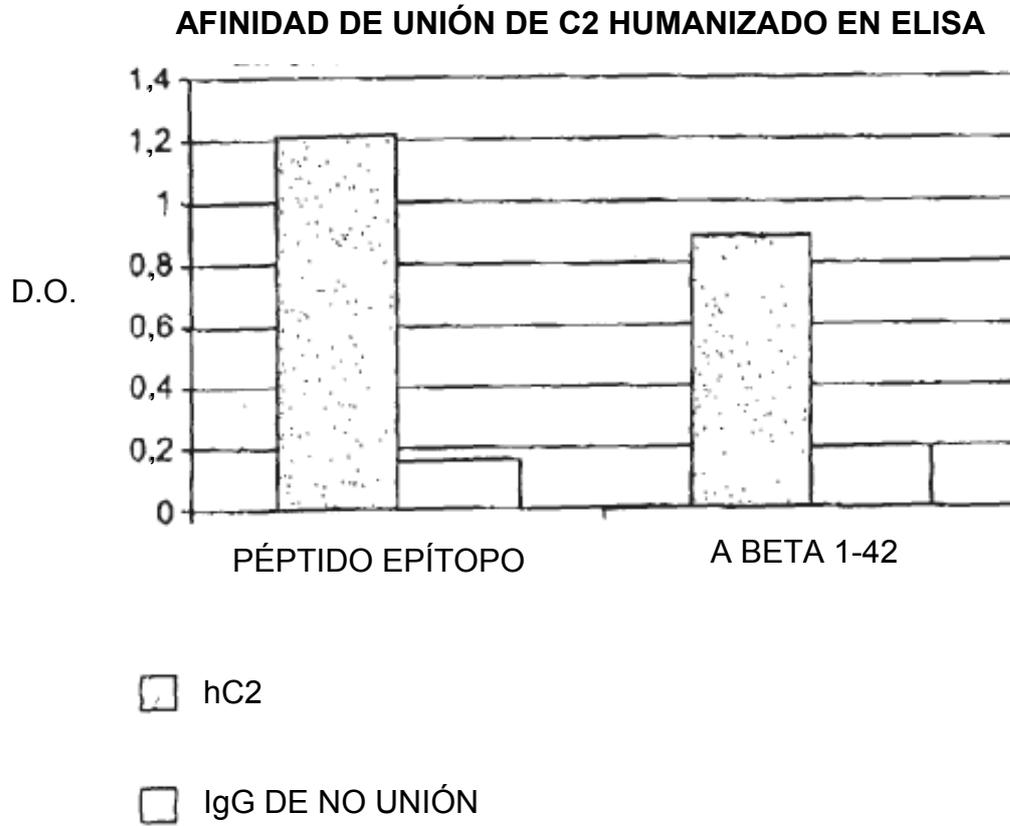


FIG. 8

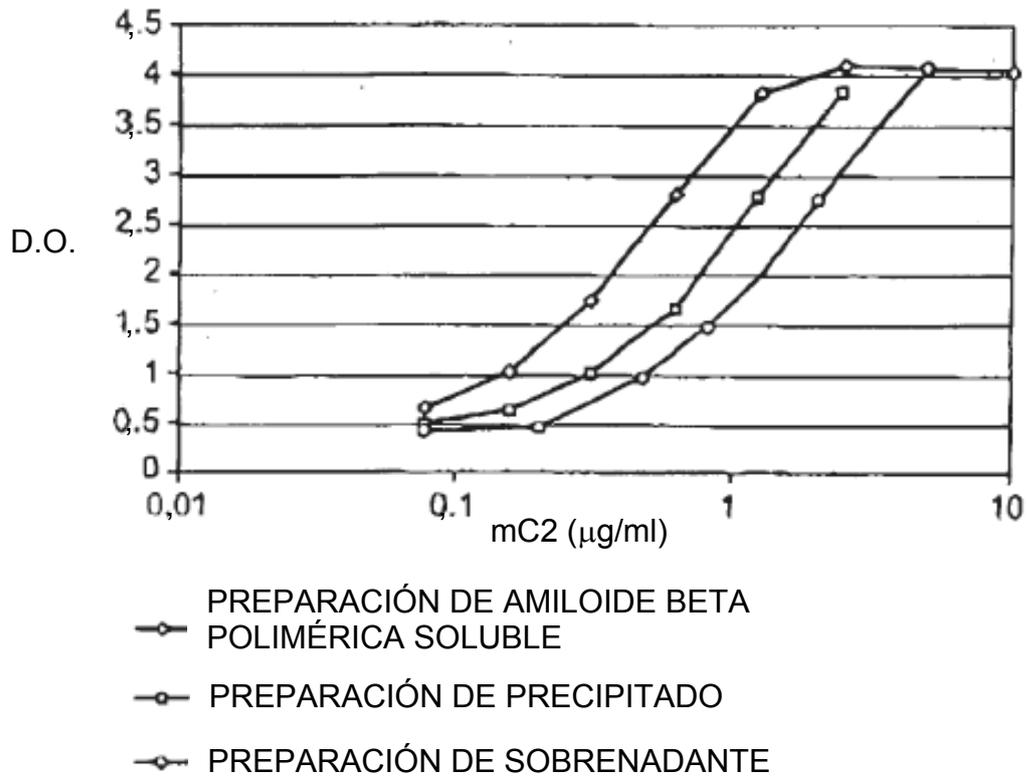


FIG. 9

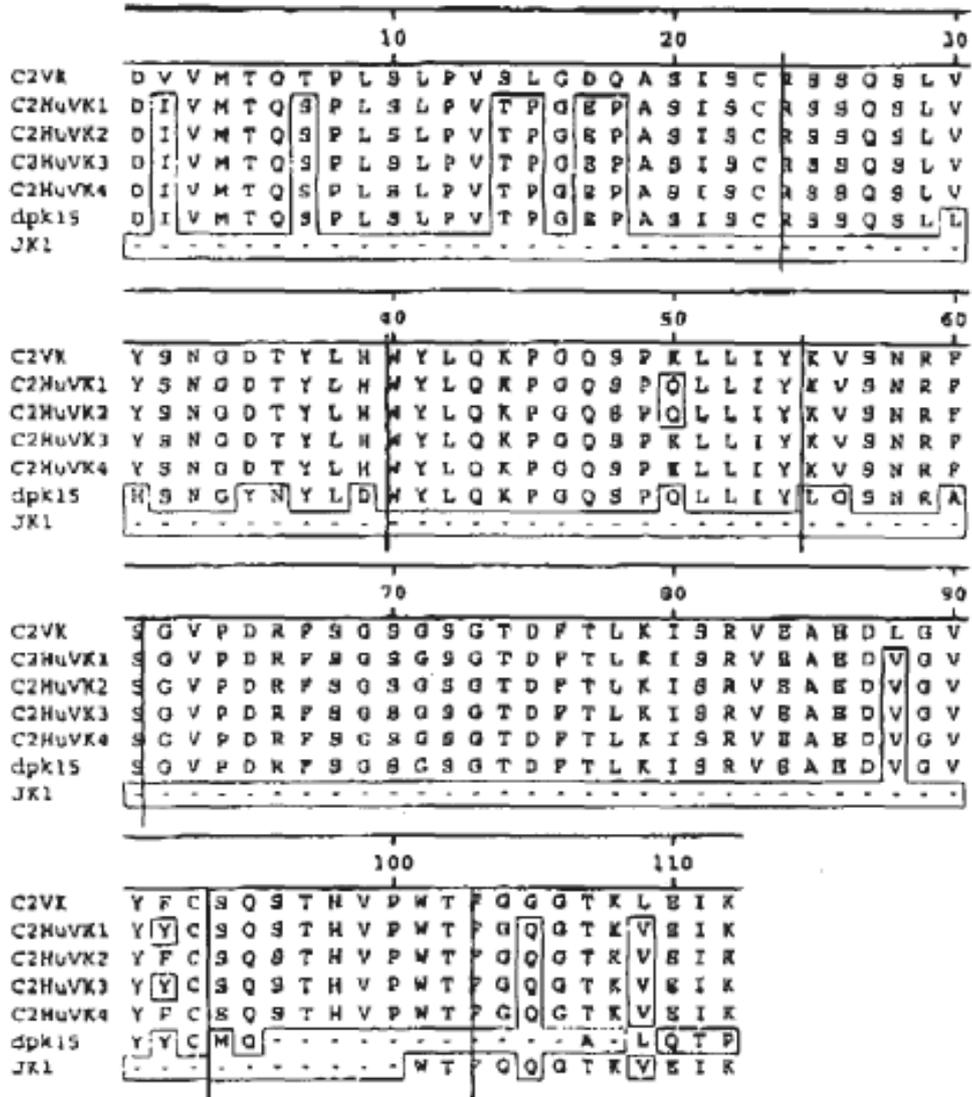


FIG.10

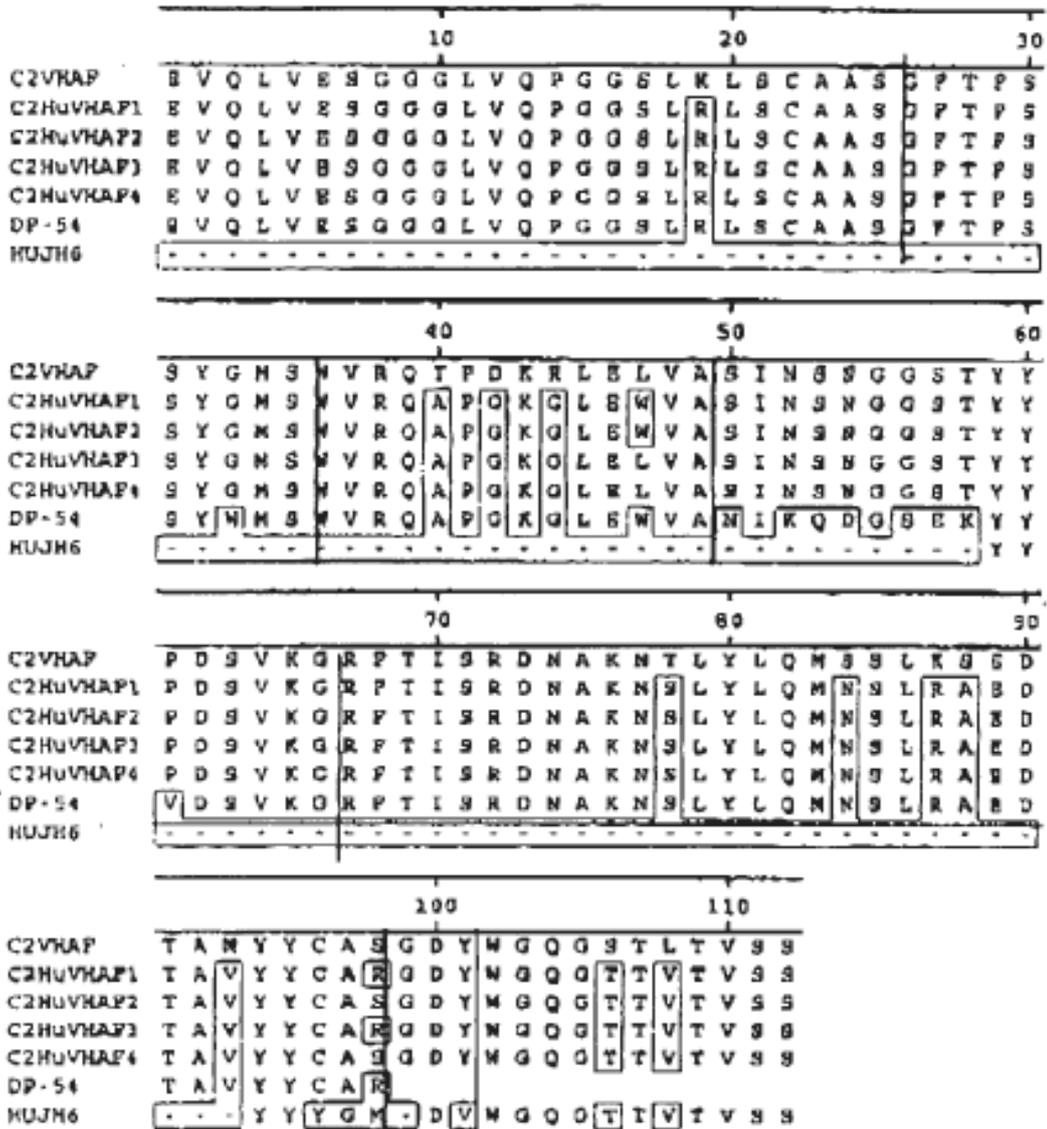
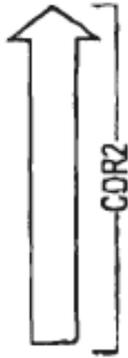
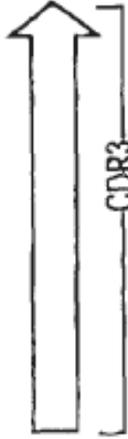


FIG. 11

GTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAACCGATTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCCACACTCAAGATC
 CAGAGGCTCGAGGACTAGATGTTTCAAGGTTGGCTAAAGACCCAGGGTCTGTCCAAAGTCAACCGTCCCTNGTCCCTGTCTAAAGTGTGAGTTCCTAG
 S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R E S G S G F D F T L K I
 C2HuVkv1



AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGCTCTCAAGTACACATGTTCCFTGGACGTTCCGCCAAGGCCAACAGGTGGAAATCAAACGTTG
 TCGTCTCACCTCGGACTCCYACACCCCTCAATAATGACGAGAGTTTCATGTGTACAGGAACCTGCAAGCCGGTTCGGTGGTCCACCTTTAGTTTGCAC
 S R V E A E D V G V Y Y C S Q S T H V P W T F G G T K V E I K I
 C2HuVkv1



BamHI
 AGTAGAATTTERRAATTTGCTTCCATCAGTTGGATCC
 TCAATCTTAATTTGAAACCGAAGGAGTCAACCTTAGG

FIG. 12-2

CTAAACATAATTTCCAGTACCTTAATTTCTGGATAGGAAATTTTAAATCTGAGTATTTTAAATTCATAAATCTCTAAATAAGTTTAAATGATTTGTCATTTG
 800
 GAATTTGTATAAAGGTCATGGAAATTAAGACACTATCCFTTTAAATTAAGACTCATAAATTAAGTATTAAGAGATTTTATCAAAATTAACACAGTAAAC
 PvuII
 TGTGCTGTCGTTACCCAGCTGATCTCAAAAGTGATATTTAAGGAGATTAATTTGGTCTGCAACAACCTTGAAGACTATTTTAGGGCCTTTTAAAG
 900
 ACAACGACAGCAAAATGGGGTCGACTAGAGTTTCACTATAAATTCCTCTAATAAACCCAGACGGTTGTTGAACATACTCTGATAAATAATCCCGGAAATAATTC
 CTCTATTAATAACTTAACCGATTCANAACTGTTTTAAACTATTTCCAAATGATTTTAGAGCCFTTTGAAAACTCTTTTAAACACTTTTAAACICT
 1000
 GAGATAATTTGATTGAAATGTTGCTAAGTTTGCANAAATTTGATRAAGTTTACTAAATTCICGGAAACTTTTGGAGAAAATTTGTGMAAAATTTGAGAA
 EcorI
 ATTAATACTAATAAGATAACTTGAAATAATTTTCATGTCAAATACATTAACCTGTTAATGTTTAAATGCCAGATGAAATAATGTAAGCTATCAAGAATTC
 1100
 TAAATTTGATTAATCTAATGAACTTTATTAAGAATACAGTTAAGTAAATGACAAATTTACAAATTTACGGTCTACITTTTACATTTTCGATAGTTCTTAAG
 NcoI
 ACCAGATAGGAGTATCTTCAATAGCATGTTTTCCCTGCTTATTTCCAGTGATCACATTAATTTGCTACCAATGGTATTTTATACAAATTAATCTGMAAAA
 1200
 TGGGCTATCCTCATAGAAATGCTACAAAAGGACGAATAAAGGTCACTAGTGTAATAAACCATGGTACCAATATAAATATGTTAATAGACTTTTT
 AATTAGTTATGAAATTAAGAGAGAAATAATTAACATAAGAGATTCAGTCTTTTCATGTTGAACCTGGTTACAGTGAAGTTAGTTTAAATAAAA
 1300
 TTAATCAATACTTCTAATTTCTCTTTTATAATTTGATTTCTTAAAGTCAAGAAATCAACTTGACGAACCAATTTGTCACCTTCAATCAAAAATTTTT
 PvuII
 AAAAAAACTATTTTCIGTTATCAGCTTCTCCCTATCTGTTGACTTCCAGCAAAAGATCTTATTTACATTTTAACTACTGCTCTCCCACCCA
 1400
 TTTTTTTGATAAAGCAATAGTCGACTGAAGAGGGATAGACAACTGAAGAGGGTCTTTTCTAAGAATAAATGTAATAATTTGATGACGAGAGGGTGGGT

FIG. 13-2

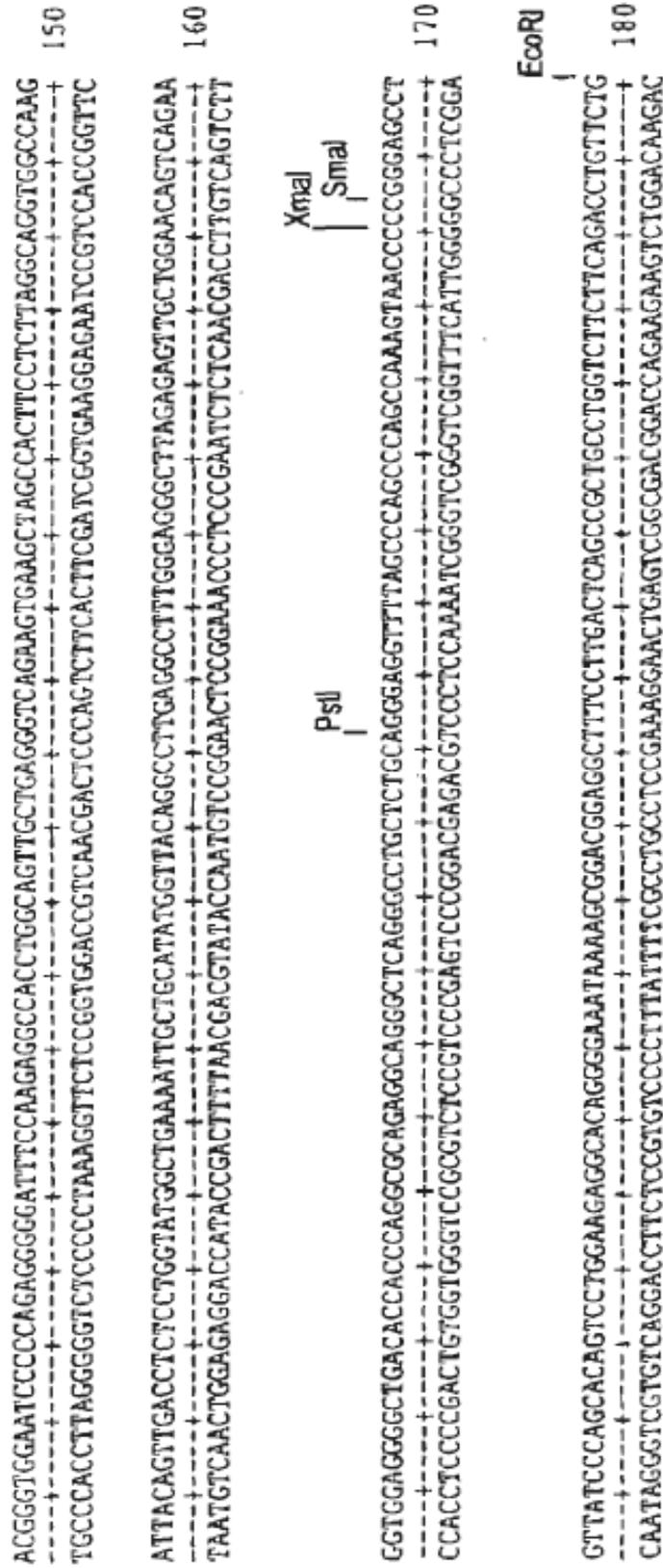


FIG. 13-3

XbaI
 ↓
 TCAGCAATCCCACTTCTAGATGACTGAGTGTCCACCACCACCAAAAACATATGCAAGAATGTTCAAGCAGCTTATTTACAAAGCCAAAATTTGGAAA
 340
 AGTCGTTAGGGTGAAGATCTACTGACTCACAGGGGTGGTGGTTTTTGGATACGTTCTTACAAGTTTCGTGGAATAAATGTTTTCCGGTTTTTAACCTTT
 TAGCCCGATTGTCCAAACAATAGAAATGAGTTATTAAACTGTGGTATGTTTATACATTAGAATACCCAAATGAGGAGAAATTAACAAGCTACAACCTATACCTAC
 350
 ATCGGGCTAACAGGTTGTTATCTTAC TCAATAATTTGACACCACATAACAATAATGTAATCTTATGGGTACTCCTCTTAATTTGTTGATGTTGATGGATG
 TCACACAGATGAATCTCATAAAAATAATGTTTCAATAGAGAAACTCAATGCAAAAAGATATGTTCTGTATGTTTTTCATCCATATAAAGTTCMAAACCAGGT
 360
 AGTGTCTACTTAGAGTATTTTTATACAAATGATTTCTCTTTGAGTTACGTTTTCTATACAAGACATACAAAAGTAGGTATATTTCAAGTTTTTGGTCCA
 AAAAATAAGTTAGAAATTTGGATGGAAATTTACTCTTAGCTGGGGTGGCGAGTTAGTGCCTGGGAGAAACAAGMGGGGCTTCTGGGGTCTTGGTAA
 370
 TTTTATTTCAATCTTTAAACCTACCCTTTAATGAGAAATCGACCCCAACCCCGCTCAANTCAGGGACCTCTTCTGTCTTCCCGAAGACCCCAAGAACCAATT
 BspI
 ↓
 TGTTCTGTCTCGTGTGGGGTTGTCAGTTATGATCTGTGACACTGTTCTGTATACACATTTATGCTTCAAAAATAACTTCACATAAAGAACATCTTATATACC
 380
 ACMAGCAAGGAGCACACCCCAACACCGTCAANTACTAGACACGTTGACAAAGACATATGTGTAAATACGAAGTTTTTATTTGAACTGTATTTCTTGTAGNATATGG
 PvuII
 ↓
 CAGTTAATAGATAGAAAGAGGAAATAGTAATAGGTC AAGACCATG CAGCTGGTAACTGGGGGGCTGGGATCAAAATAGCTACCTGCCTAATCCTGCCCTC
 390
 GTCAAATATCTATCTTCTCTTATTCATTATCCAGTTCTGGTAGGTCGACCATTCACCCCCCGGACCCCTAGTTTATCGATGGACGGATTAGGACGGGAG

FIG. 13-7



FIG. 13-8

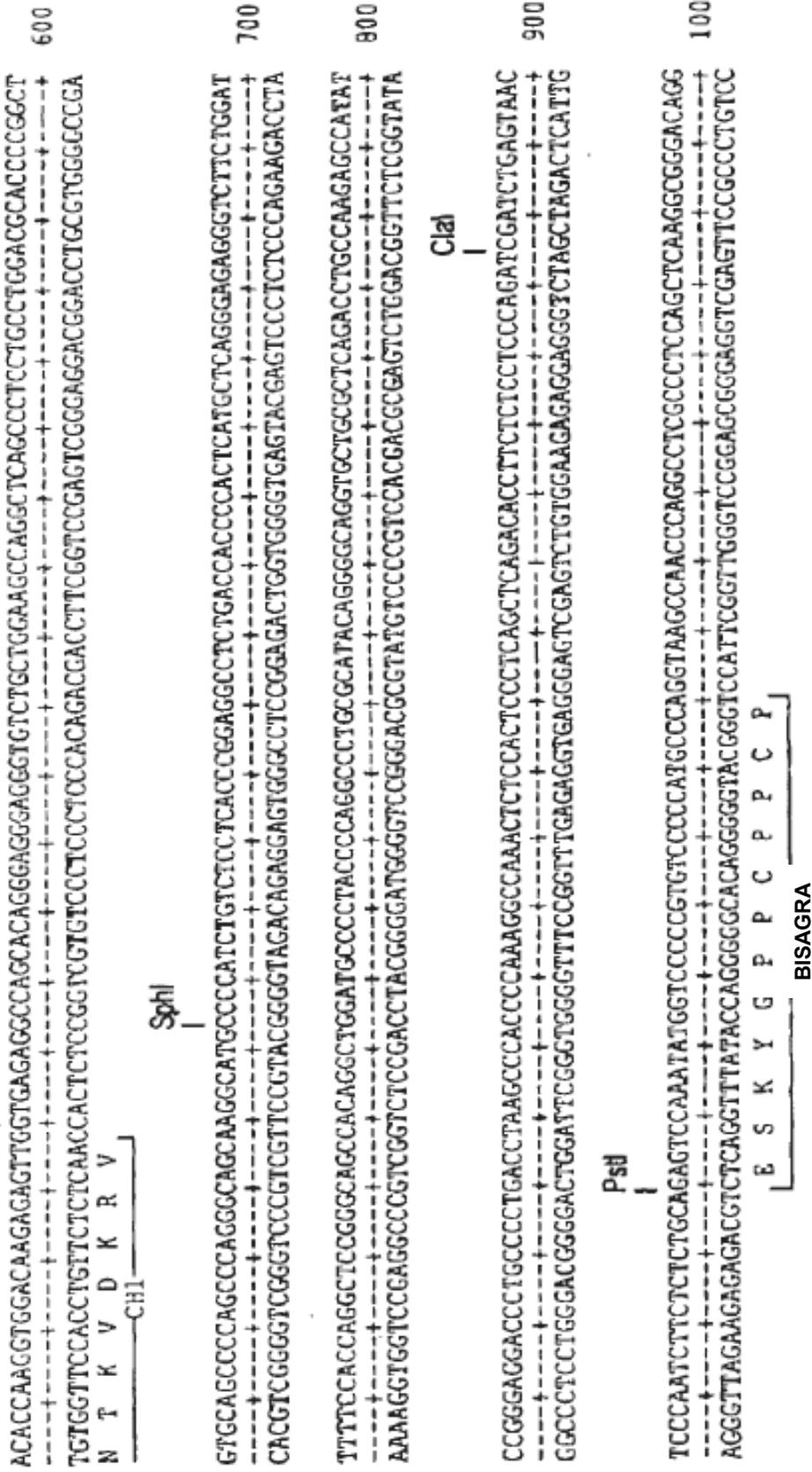


FIG. 14-2

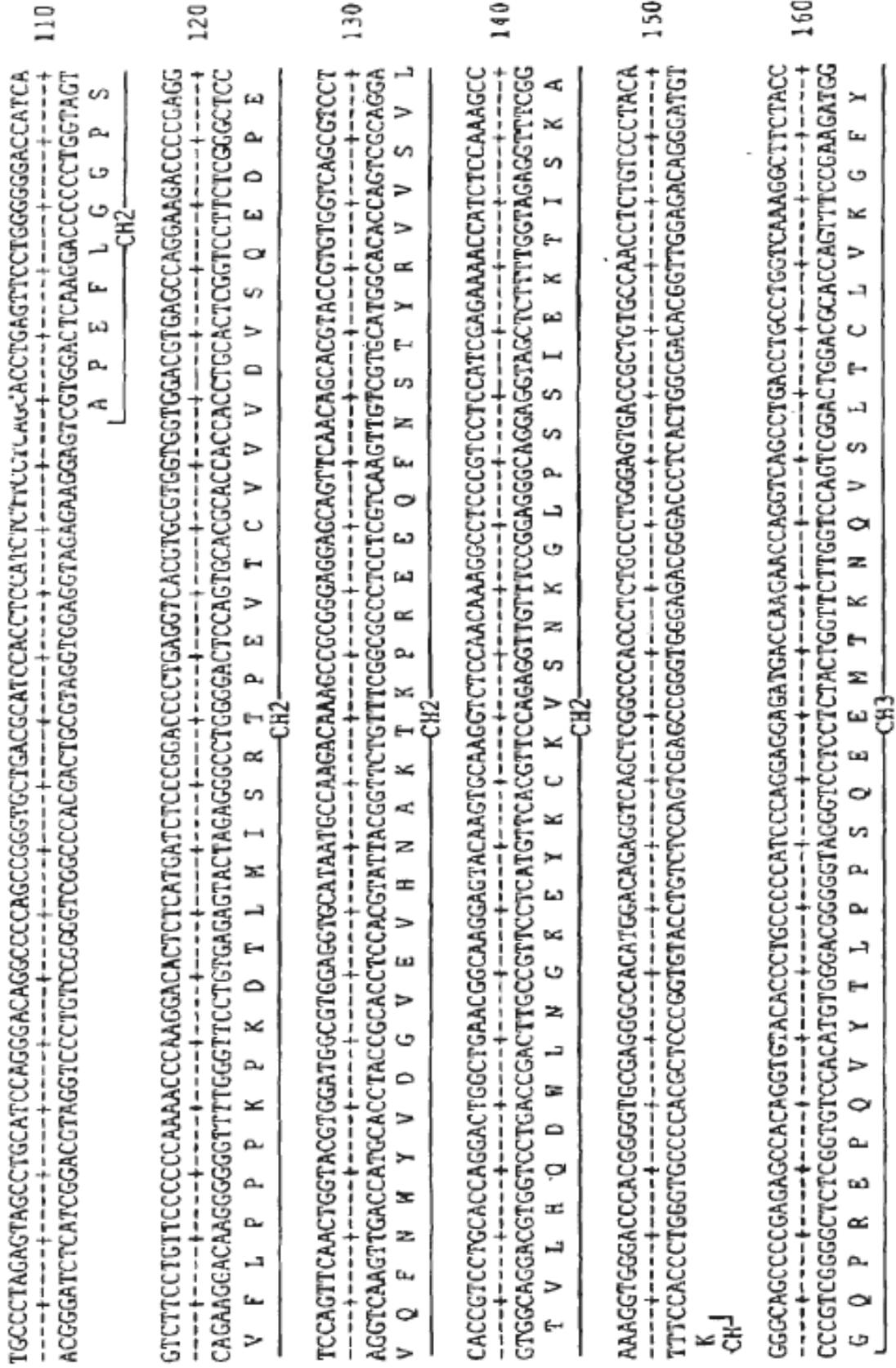


FIG. 14-3

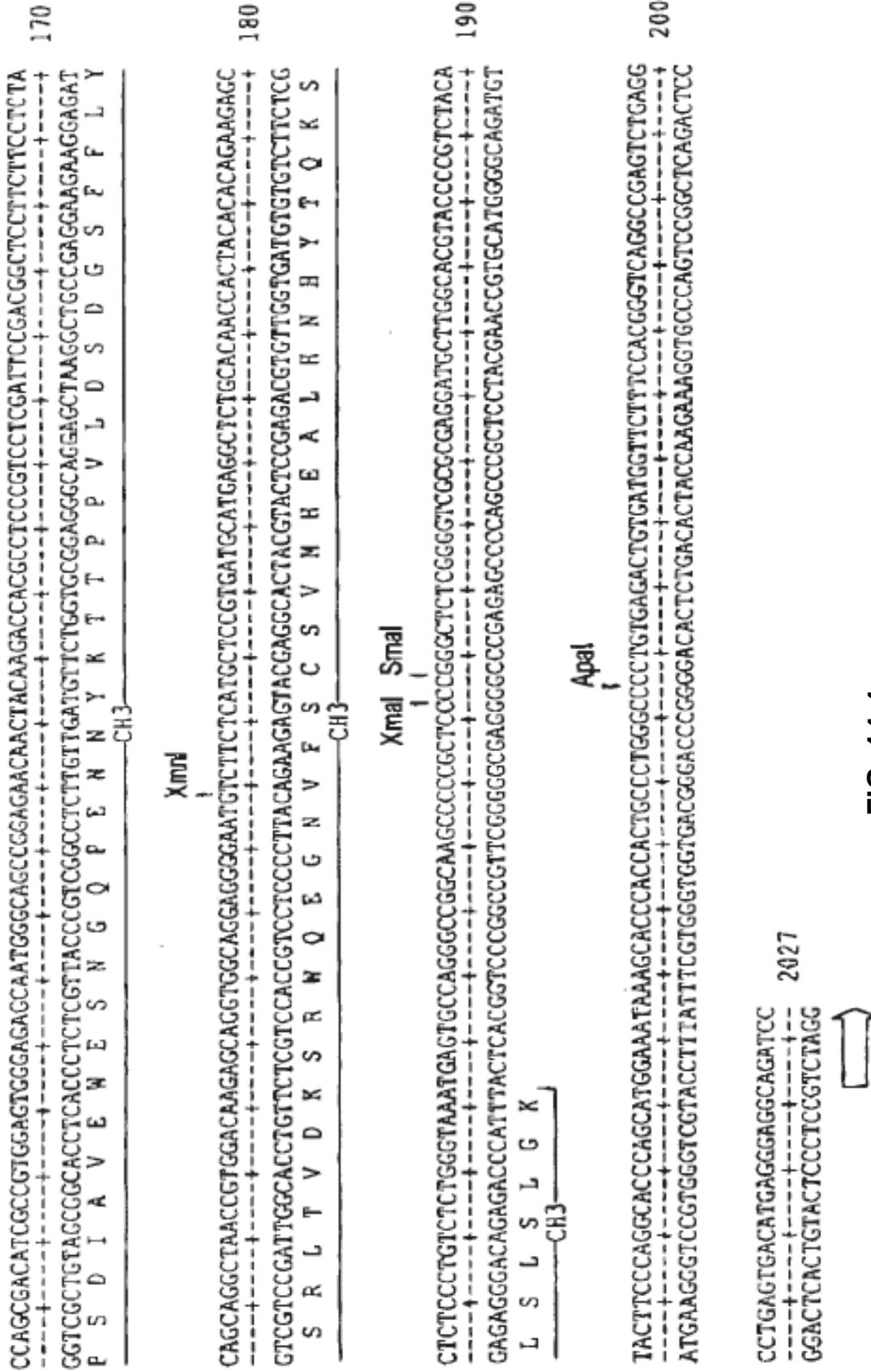


FIG. 14-4

MAPEO EPÍTOPO hc2_NC_20060505

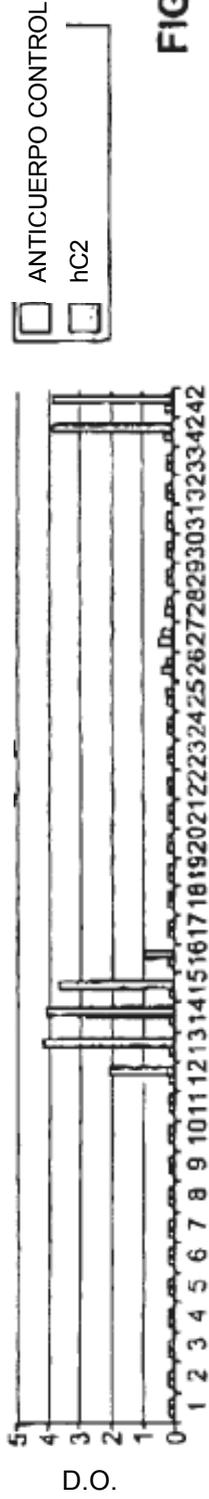


FIG. 15A

MAPEO EPÍTOPO hc2_NC_20060519

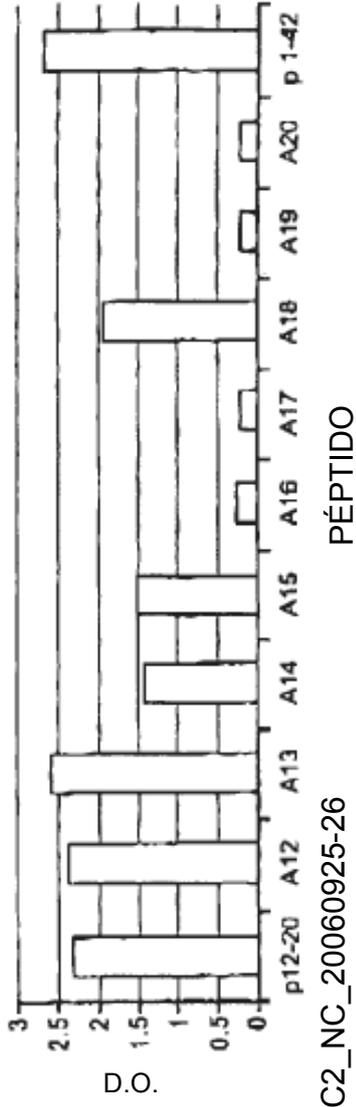


FIG. 15B

MAPEO EPÍTOPO hc2_NC_20060925-26

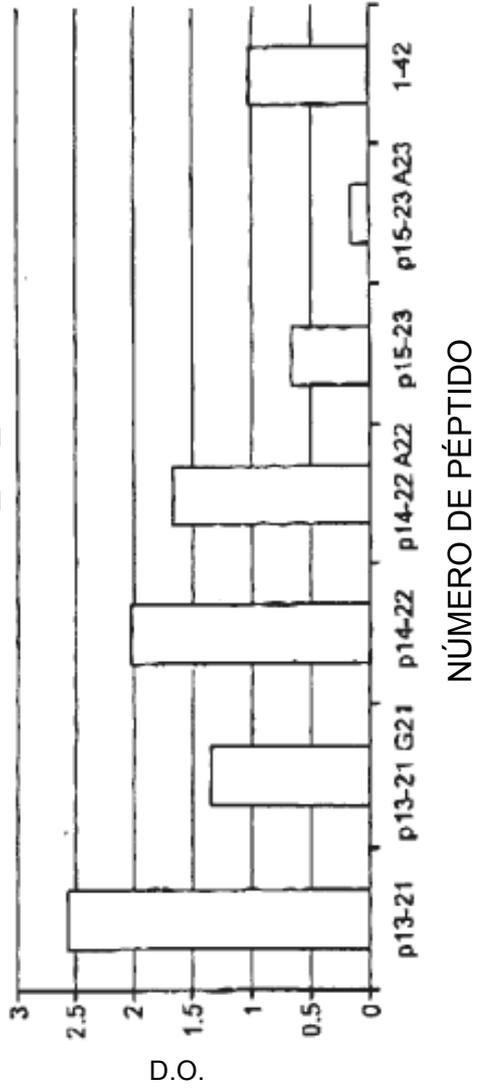


FIG. 15C

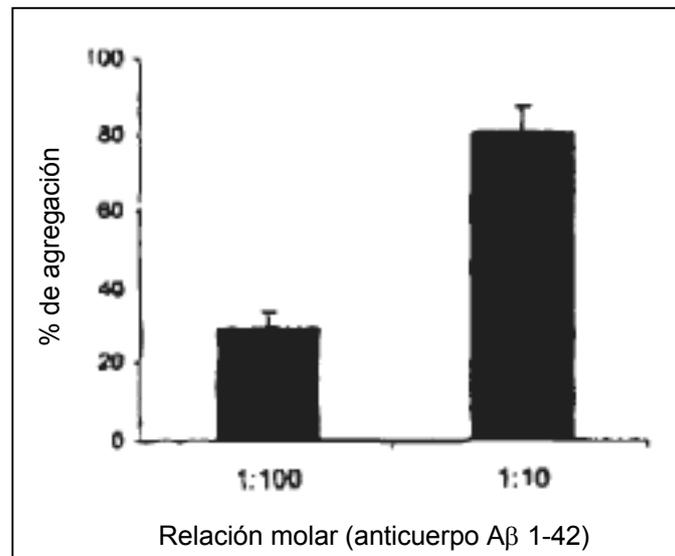


FIG. 16

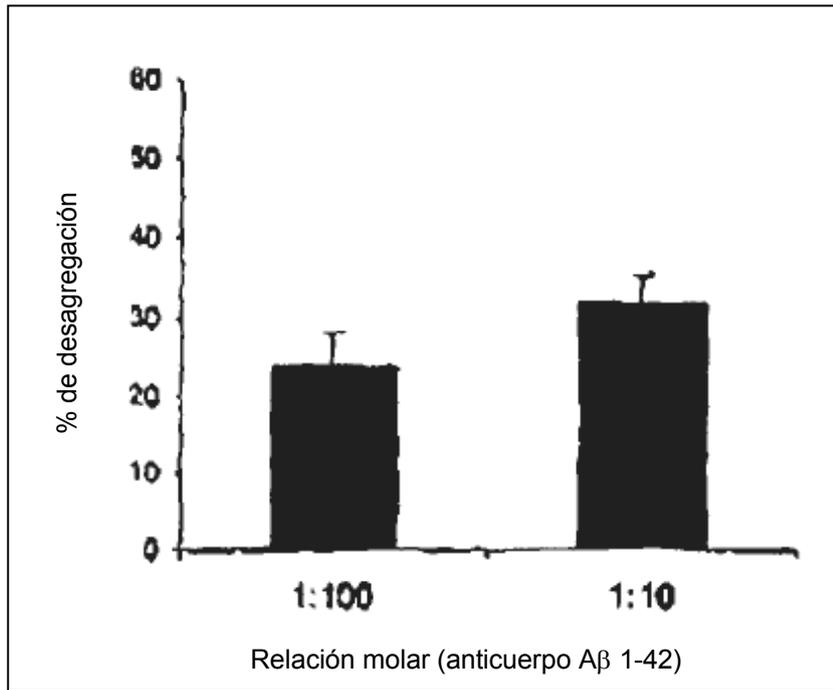


FIG. 17

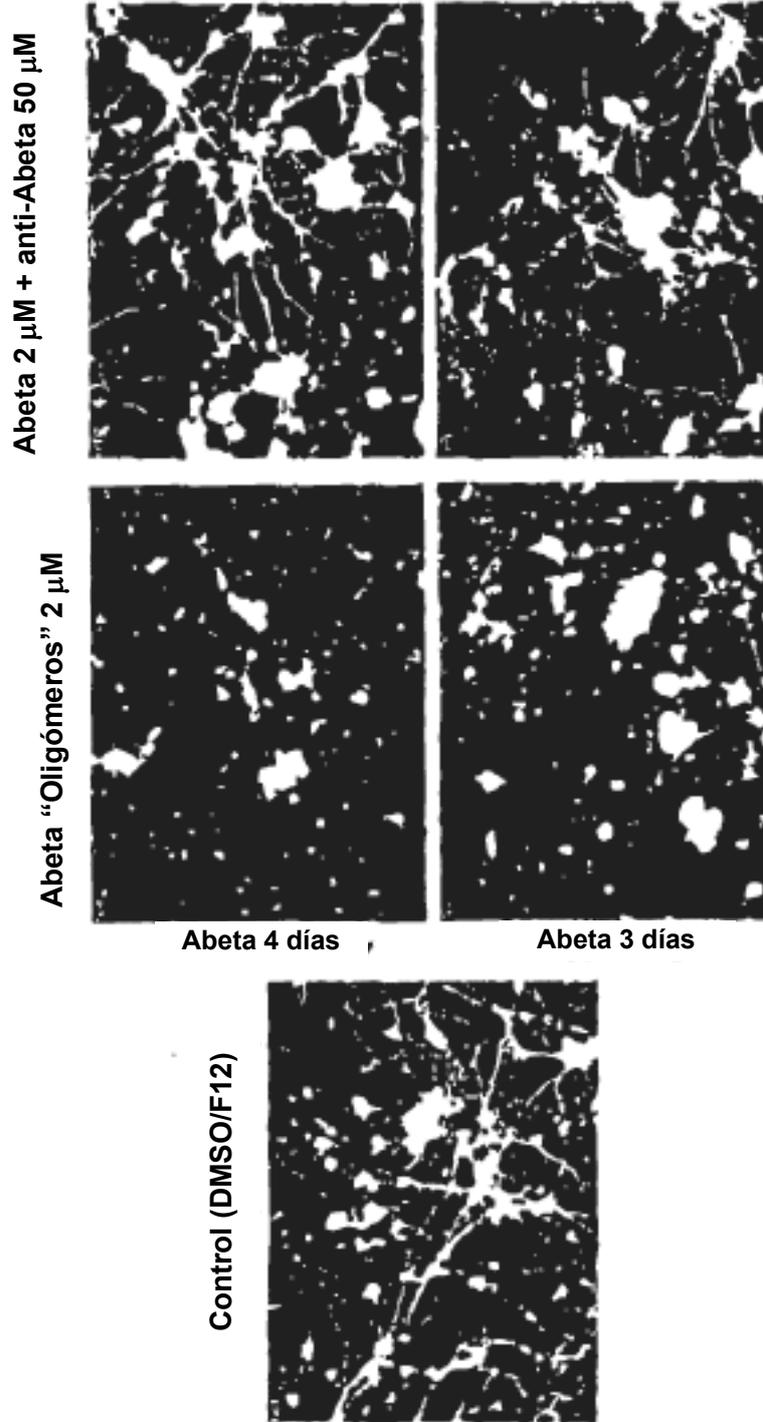


FIG. 18