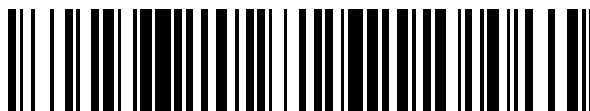


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 016**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/567 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.11.2008 PCT/US2008/083659**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2009 WO09065054**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2008 E 08849467 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2207568**

54 Título: **Anticuerpos específicos para la forma protofibrilar de proteína beta-amiloide**

30 Prioridad:

16.11.2007 US 988481 P

08.01.2008 US 19747 P

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

25.10.2017

73 Titular/es:

THE ROCKEFELLER UNIVERSITY (100.0%)

1230 YORK AVENUE

NEW YORK, NEW YORK 10021-6399, US

72 Inventor/es:

RAVETCH, JEFFREY y

FUKUYAMA, HIDEHIRO

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 639 016 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

Anticuerpos específicos para la forma protofibrilar de proteína beta-amiloide

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos aislados que interactúan específicamente con epítomos conformacionales de una forma protofibrilar de péptido beta-amiloide humano. Estos anticuerpos muestran una afinidad mínima o ninguna afinidad detectable por formas de menor peso molecular del péptido beta-amiloide. Los anticuerpos dados a conocer en el presente documento serán útiles en el diagnóstico, tratamiento y/o prevención de la deposición de placa beta-amiloide asociada con la aparición y progresión de la enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes de la invención

Se piensa que los péptidos beta-amiloides (A β) son un agente causante de la enfermedad de Alzheimer ("AD") mediante la formación de fibrillas de péptido A β insolubles y la deposición de estas fibrillas para formar placas de amiloide. Se piensa que la formación de tales placas dentro de la zona del cerebro crítica para la memoria y otras funciones cognitivas conduce a demencia asociada con esta enfermedad (véase Selkoe, 1994, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53:438-447). Los péptidos beta-amiloides comprenden un grupo de péptidos de 39-43 aminoácidos de longitud que se procesan proteolíticamente a partir de proteína precursora del amiloide (APP), tanto por β -secretasa como por γ -secretasa en el extremo amino y carboxi-terminal, respectivamente. Hay al menos cinco isoformas distintas de APP: de 563, 695, 714, 751 y 770 aminoácidos de longitud, respectivamente (véase Wirak *et al.*, 1991 Science 253:323). Estas isoformas de APP se generan mediante corte y empalme alternativo de transcritos primarios del gen de APP. Se han identificado numerosas mutaciones de cambio de sentido en APP en familias con enfermedad de Alzheimer autosómica dominante de aparición temprana. Algunas mutaciones se agrupan cerca de los sitios de escisión de secretasa y afectan al metabolismo de APP aumentando o bien la producción o bien la proporción de formas de A β (por ejemplo, A β ₄₂), que tiende a ser más fibrillogénica y a agregarse más rápidamente que otras formas. La toxicidad neuronal puede residir en las fibrillas de gran peso molecular que se forman por medio de la agregación de péptidos A β solubles para dar fibrillas insolubles y, posteriormente, incorporación de fibrillas para dar placas de amiloide. Una forma de fibrilla intermedia es la forma protofibrilar (PF), una forma oligomérica de gran peso molecular de péptidos A β que es soluble *in vitro* y puede aislarse como una entidad de aproximadamente ~670 kDa. Por tanto, la formación *in vitro* de fibrillas de péptidos A β insolubles es el resultado final de la oligomerización inicial del péptido A β para formar una forma protofibrilar estructuralmente distinta, soluble y de mayor peso molecular. Estas estructuras de protofibrillas transitorias son precursoras de las fibras de amiloide responsables de la disfunción celular y pérdida neuronal en la enfermedad de Alzheimer (AD) y otras enfermedades de agregación de proteínas.

Se han avanzado diversos tratamientos en intentos de prevenir la formación del péptido A β , por ejemplo, inhibidores para prevenir el procesamiento proteolítico de APP. Además, se han empleado estrategias de inmunoterapia tales como la administración de anticuerpos anti-A β (para inducir aclaramiento de depósitos de amiloide) o inmunización con antígenos de péptido A β (para fomentar una respuesta humoral) en un intento por reducir el tamaño y la densidad de las placas.

La patente estadounidense n.º 7.179.463, concedida a Lannfelt *et al.*, da a conocer un método de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer administrando un anticuerpo producido contra una protofibrilla que consiste en la mutación Arctic dentro de la región codificante del péptido A β . En la memoria descriptiva no se presenta ningún ejemplo de anticuerpos producidos y no se presenta ninguna comparación en cuanto a la afinidad por formas de bajo peso molecular del péptido A β .

Las patentes estadounidenses n.ºs 6.761.888 y 6.750.324, concedidas a Schenk *et al.*, dan a conocer una serie de anticuerpos que reconocen diversos epítomos a lo largo de la secuencia de aminoácidos de A β ₄₂. Los anticuerpos específicos para el extremo N-terminal y regiones centrales de A β ₄₂ mostraron eficacia en la reducción de placa tanto *ex vivo* como *in vivo*.

A pesar del conocimiento actual en el campo del tratamiento y la prevención de la enfermedad de Alzheimer, sigue existiendo la necesidad de composiciones mejoradas y métodos de tratamiento y/o prevención de esta enfermedad. Las composiciones y métodos de la presente invención abordan y cumplen estas necesidades dando a conocer anticuerpos específicos para formas protofibrilares del péptido A β al tiempo que muestran una afinidad detectable mínima frente a formas de bajo peso molecular del péptido A β . Las composiciones farmacéuticamente eficaces que comprenden un anticuerpo o anticuerpos de este tipo serán útiles en el tratamiento y/o la prevención de la deposición de placa de beta-amiloide que se sabe que está asociada con la aparición y progresión de la enfermedad de Alzheimer.

El documento WO 2008/156622 se refiere a un anticuerpo humanizado anti-A beta hC2 que se une a un epítopo específico de conformación de A beta.

El documento US 2006/280733 se refiere a un anticuerpo policlonal anti-A beta que se une a protofibrillas de A beta.

El documento WO 2005/011599 se refiere a anticuerpos que se unen a oligómeros de Abeta.

5

El documento WO 2007/064972 se refiere a anticuerpos que se unen a oligómeros de Abeta.

Lambert *et al*, Journal of Neurochemistry, vol. 100, n.º 1, 1 de enero de 2007, páginas 23-35, se refiere a anticuerpos monoclonales que seleccionan como diana conjuntos patológicos de A beta.

10

Englund *et al*, Journal of Neurochemistry, 1 de octubre de 2007, vol. 103, páginas 334-345, se refiere a la detección mediante ELISA sensible de protofibrillas de beta-amiloide en muestras biológicas.

Sumario de la invención

15

La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas. En el presente documento también se describe un anticuerpo aislado que muestra unión específica a un epítipo conformacional de una forma protofibrilar del péptido β -amiloide. El monómero del péptido beta-amiloide ($A\beta$) de tipo natural se conoce en la técnica y se muestra en el presente documento como SEQ ID NO: 1. Los anticuerpos aislados de la presente descripción tienen afinidad por un epítipo conformacional repetido de este tipo por la forma protofibrilar de mayor peso molecular del péptido $A\beta$ al tiempo que muestran una afinidad mínima o ninguna por otras formas del péptido $A\beta$, tales como formas de monómero o dímero del péptido $A\beta$.

20

La presente descripción también se refiere a un anticuerpo aislado que interacciona específicamente con y muestra una afinidad medible por un epítipo conformacional de una forma protofibrilar del péptido $A\beta$, mediante lo cual el epítipo protofibrilar se representa mediante una región que queda al descubierto de una forma protofibrilar de $A\beta$ que comprende la parte amino-terminal de una parte que queda al descubierto del péptido $A\beta$.

25

La presente descripción se refiere además a un anticuerpo aislado que interacciona específicamente con y muestra una afinidad medible por un epítipo conformacional de una forma protofibrilar del péptido $A\beta$, mediante lo cual el epítipo protofibrilar se representa mediante una región que queda al descubierto de una forma protofibrilar de $A\beta$ que comprende los aminoácidos 1-20 (SEQ ID NO: 2) de una parte que queda al descubierto del péptido $A\beta$.

30

La presente descripción también se refiere a un anticuerpo aislado que interacciona específicamente con y muestra una afinidad medible por un epítipo conformacional de una forma protofibrilar del péptido $A\beta$, mediante lo cual el epítipo protofibrilar se representa mediante una región que queda al descubierto de una forma protofibrilar de $A\beta$ que comprende los aminoácidos 4-12 y 9-20 (SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente) de una parte que queda al descubierto del péptido $A\beta$.

35

La presente descripción se refiere en parte a anticuerpos monoclonales 13C3, 1D1 y 19A6, y a cualquier forma madurada por afinidad de 13C3, 1D1 y 19A6. La presente descripción se refiere además a un anticuerpo que imita la especificidad funcional tal como se describe en el presente documento para 13C3, 1D1 y 19A6. Con este fin, la presente descripción también se refiere a fragmentos y/mutantes biológicamente activos de los anticuerpos 13C3, 1D1, 19A6 o a un anticuerpo de tipo 13C3, 1D1 ó 19A6, incluyendo, pero sin limitarse necesariamente a, sustituciones de aminoácido (por ejemplo, como una forma dirigida de maduración por afinidad de las regiones V_H o V_L), deleciones, adiciones, truncamientos amino-terminales y truncamientos carboxi-terminales de manera que estas mutaciones proporcionan una base para un anticuerpo o parte de unión de anticuerpo que da como resultado una versión similar o mejorada de una proteína de unión de anticuerpo 13C3, 1D1, 19A6 o de tipo 13C3. En una realización de esta parte de la descripción, la región V_H y V_L de 13C3 comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 7 (V_H) y/o SEQ ID NO: 5 (V_L), respectivamente.

40

45

50

La presente descripción se refiere además a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para las regiones V_H y/o V_L de un anticuerpo 13C3, 1D1 ó 19A6; y especialmente a una molécula de ácido nucleico aislada (polinucleótido) que codifica para una parte biológicamente relevante de 13C3, o versión madurada por afinidad o versión mutada de otro modo de un anticuerpo 13C3, 1D1 ó 19A6. Con este fin, una realización de la presente descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifican para la región V_H y V_L de 13C, tal como se expone en SEQ ID NO: 8 (13C3: región V_H) y SEQ ID NO: 6 (13C3: región V_L), respectivamente.

55

La presente descripción también se refiere a anticuerpos aislados 13C3, 1D1 ó 19A6 tal como se da a conocer en el presente documento, anticuerpos que interaccionan específicamente con y muestran una afinidad medible por un epítipo conformacional de una forma protofibrilar del péptido $A\beta$.

60

La presente descripción también se refiere a un hibridoma que puede producir un anticuerpo monoclonal de la presente descripción. Los hibridomas particulares de la presente descripción incluyen hibridomas que producen

65

anticuerpos monoclonales a modo de ejemplo 13C3, 19A6 y 1D1, respectivamente.

La presente descripción se refiere a composiciones farmacéuticamente eficaces que comprenden un anticuerpo aislado tal como se da a conocer y se define adicionalmente en el presente documento: un anticuerpo aislado que interacciona específicamente con y muestra una afinidad medida por y capacidad para unirse específicamente a un epítipo conformacional de repetición de una forma protofibrilar de A β al tiempo que muestra una afinidad mínima o ninguna afinidad medible por formas de bajo peso molecular de A β . Estas composiciones pueden comprender opcionalmente uno o más portadores, uno o más excipientes y/o uno o más derivados químicos.

La presente descripción también se refiere a métodos de tratamiento de un individuo que padece enfermedad de Alzheimer que comprenden administrar al individuo una composición farmacéuticamente eficaz que comprende un anticuerpo aislado dado a conocer en el presente documento, concretamente un anticuerpo que interacciona específicamente con y muestra una afinidad medida por un epítipo conformacional de repetición de una forma protofibrilar del péptido A β al tiempo que muestra una afinidad mínima o ninguna afinidad detectable por formas de menor peso molecular del péptido A β . Estos métodos proporcionarán una intervención terapéutica con el fin de reducir la cantidad de depósitos de amiloide en el cerebro de un individuo que padece enfermedad de Alzheimer. Las realizaciones particulares de esta parte de la presente descripción se refieren a métodos para el tratamiento de un individuo que padece enfermedad de Alzheimer que comprenden administrar una composición farmacéuticamente eficaz formulada con un anticuerpo que muestra afinidad específica (al menos en comparación con formas de bajo peso molecular del péptido A β) por un epítipo conformacional de una forma protofibrilar del péptido A β , especialmente mediante lo cual el epítipo protofibrilar se representa mediante una región que queda al descubierto de una forma protofibrilar de A β que comprende los aminoácidos 1-20 (SEQ ID NO: 2) de una parte que queda al descubierto del péptido A β . Las realizaciones específicas relacionadas con estos métodos terapéuticos y profilácticos dados a conocer en el presente documento pueden utilizar anticuerpos monoclonales de ratón a modo de ejemplo 13C3, 19A6, 1D1, así como versiones maduras por afinidad de cualquier anticuerpo de este tipo, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo monoclonal humano y/o cualquier otra forma de anticuerpo de este tipo conocida en la técnica, incluyendo pero sin limitarse al anticuerpo o miembros de unión específica revisados en el presente documento. Cualquier anticuerpo o miembro de unión específica de este tipo puede denominarse esta memoria descriptiva "anticuerpo de tipo 13C3". Por tanto, se pretende que un "anticuerpo de tipo 13C3" también abarque el anticuerpo monoclonal 13C3 dado a conocer en el presente documento.

La presente descripción también se refiere a métodos de examen para detectar y seleccionar compuestos que pueden actuar como inhibidor de la formación de fibrillas y/o placas seniles asociada con la enfermedad de Alzheimer. Tal metodología comprende usar un anticuerpo con características similares a 13C3 (por ejemplo, afinidad específica por las formas PF frente a LMW del péptido A β) en diversos ensayos de interacción de anticuerpo/péptido/compuesto de prueba con el fin de seleccionar un compuesto que modula el proceso de formación de fibrillas y/o placas.

La presente descripción se refiere además a métodos de ensayo de diagnóstico para determinar específicamente niveles de protofibrillas dentro de un sujeto o paciente. Tales ensayos pueden llevarse a cabo mediante cualquier técnica conocida y disponible para el experto, incluyendo, pero sin limitarse a, inmunotransferencias de tipo Western, ELISA, radioinmunoensayos, ensayos inmunohistoquímicos, inmunoprecipitaciones u otros ensayos inmunológicos conocidos en la técnica. Por tanto, una realización de esta parte de la descripción se refiere a tomar una muestra de tejido de un sujeto o paciente y determinar el nivel de A β PF en la muestra usando un kit de diagnóstico y el ensayo asociado; mediante lo cual el kit comprende un anticuerpo de tipo 13C3, permitiendo por tanto la determinación específica de niveles de A β PF en la muestra de tejido. La muestra de tejido para el análisis es normalmente sangre, plasma, suero, mucosidad o líquido cefalorraquídeo del sujeto o paciente.

Con este fin, los anticuerpos de la presente descripción pueden usarse al menos para los siguientes usos: (1) como agente profiláctico o terapéutico para prevenir o reducir los depósitos de placas asociados con la enfermedad de Alzheimer, o bien solos o bien junto con cualquier terapia de combinación disponible; (2) en el diseño de inmunógenos peptídicos que pueden usarse para provocar una respuesta de anticuerpos eficaz en estrategias de vacunación profilácticas o terapéuticas relacionadas con el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer; (3) para generar un anticuerpo anti-idiotípico profiláctico o terapéutico (Ab2) que imita el/los epítipo(s) crítico(s) que se une(n) a los anticuerpos de la presente descripción; y, (4) en el diseño de péptidos derivados de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los anticuerpos neutralizantes de la presente descripción para su uso en el examen de inhibidores de la formación de protofibrillas para su uso en regímenes profilácticos y/o terapéuticos y (4) como reactivo de diagnóstico para determinar el nivel de A β protofibrilar en suero o LCR de un paciente en riesgo de desarrollar EA.

Un objeto de la presente descripción es proporcionar anticuerpos que interaccionan específicamente y muestran afinidad por un epítipo conformacional que queda al descubierto de una forma protofibrilar del péptido A β que comprende los aminoácidos 1-20 (SEQ ID NO: 2) de una parte que queda al descubierto del péptido A β .

Un objeto adicional de la presente descripción es proporcionar anticuerpos que interaccionan y muestran afinidad

por un epítopo conformacional que queda al descubierto de una forma protofibrilar del péptido A β que comprende los aminoácidos 4-12 y 9-20 (SEQ ID NO: 3, 4) de una parte que queda al descubierto del péptido A β .

5 Otro objeto de la presente descripción es proporcionar anticuerpos de tipo 13C3 que previenen o reducen la formación de protofibrillas de péptido A β relacionada con la deposición de placas asociadas con la enfermedad de Alzheimer.

10 Otro objeto de la presente descripción es proporcionar ensayos que usan anticuerpos de tipo 13C3 en ensayos de interacción de anticuerpo/péptido/compuesto de prueba para seleccionar compuestos que serán útiles en el tratamiento de la deposición de placas asociada con la enfermedad de Alzheimer.

15 Tal como se usa en el presente documento, se pretende que "Ka" se refiera a la constante de asociación de una interacción antígeno-anticuerpo particular, se pretende que "Kd" se refiera a la constante de disociación de una interacción antígeno-anticuerpo particular.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "epítopo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno frente al que responden células B y/o T o un sitio en una molécula frente al cual se producirá un anticuerpo y/o al que se unirá un anticuerpo. Por ejemplo, un epítopo puede reconocerse por un anticuerpo que define el epítopo. Un epítopo puede ser o bien un "epítopo lineal" (en el que la secuencia primaria de aminoácidos primarios comprende el epítopo; normalmente al menos 3 residuos de aminoácido contiguos, y más habitualmente, al menos 5, y hasta de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 aminoácidos en una única secuencia) o bien un "epítopo conformacional" (un epítopo en el que la secuencia primaria de aminoácidos contiguos no es el único componente de definición del epítopo). Un epítopo conformacional puede comprender un número aumentado de aminoácidos con respecto a un epítopo lineal, ya que este epítopo conformacional reconoce una estructura tridimensional del péptido o la proteína. Por ejemplo, cuando una molécula de proteína se pliega para formar una estructura tridimensional, determinados aminoácidos y/o la estructura principal de polipéptido que forma el epítopo conformacional se yuxtaponen, permitiendo que el anticuerpo reconozca el epítopo. Los métodos de determinación de la conformación de epítopos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, cristalografía de rayos X, espectroscopía de resonancia magnética nuclear bidimensional y marcaje de espín dirigido al sitio y espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996), cuya divulgación se incorpora en su totalidad en el presente documento como referencia.

35 Tal como se usa en el presente documento, la "unión específica" entre dos entidades significa una afinidad de al menos $10^6 M^{-1}$, $10^7 M^{-1}$, $10^8 M^{-1}$, $10^9 M^{-1}$ o $10^{10} M^{-1}$.

40 Tal como se usa en el presente documento, las "protofibrillas" son agregados protofibrilares que incluyen estructuras esféricas que comprenden péptidos A β que parecen representar cadenas de las estructuras esféricas que forman estructuras curvilíneas.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "aislado" se usa en el presente documento tal como se usa en la técnica. Concretamente, el estado en el que se encuentran anticuerpos/miembros de unión específica, moléculas de ácido nucleico y similares. Los anticuerpos/miembros de unión específica y moléculas de ácido nucleico estarán libres o sustancialmente libres de material con el que están asociados de manera natural tal como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su entorno natural, o el entorno en el que se preparan (por ejemplo, cultivo celular) cuando tal preparación se realiza mediante tecnología de ADN recombinante (puesta en práctica *in vitro*) o *in vivo*. "Aislado" cubre cualquier forma que contiene el/los componente(s) identificado(s) y caracterizado(s) de la presente descripción tras la extracción de ese entorno inicial. Los ejemplos, pero ciertamente no limitaciones, incluyen formulaciones farmacéuticas, formulación con diluyentes, anticuerpos/miembros de unión específica, moléculas de ácido nucleico y partes de las mismas que se han modificado (por ejemplo, glicosilación de anticuerpos) o bien *in vitro* o bien *in vivo* y extraído de ese entorno.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo humano recombinante" representa un subconjunto viable de "anticuerpos" generados mediante diversos medios de tecnología de ADN recombinante y animales transgénicos no humanos que se conocen bien en la técnica. Tal metodología se usa para generar un anticuerpo a partir de uno de los siguientes orígenes: (i) un scFv o anticuerpo alternativo aislado a partir de una biblioteca combinatoria de anticuerpos humanos; (ii) un anticuerpo parcial o completo generado a partir de un vector de expresión respectivo transfectado de manera estable o transitoria en una célula huésped, preferiblemente una célula huésped de mamífero (por ejemplo, subclonando secuencias de nucleótidos que codifican para cadenas de V_H y V_L en un vector de expresión junto con secuencias de nucleótidos de C_H y C_L respectivas, para fomentar la expresión de una forma predeterminada de anticuerpo que muestra especificidad por la forma PF de A β); y/o (iii) un anticuerpo aislado a partir de un animal transgénico no humano que contiene genes de inmunoglobulina humana, o mediante cualquier otra metodología que se base en el "mezclado y emparejamiento" recombinante de secuencias de genes de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN con el fin de generar el anticuerpo recombinante humano de interés.

Se pretende que los términos “sujeto” o “paciente” incluyan cualquier miembro del filo *Chordata*, incluyendo, sin limitación, seres humanos y otros primates, incluyendo primates no humanos tales como chimpancés y otros simios y especies de monos; animales de granja tales como ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratones, ratas y cobayas; aves, incluyendo aves domésticas, salvajes y de caza tales como pollos, pavos y otras aves gallináceas, patos, gansos y similares.

El término “tratar” o “tratamiento” de una enfermedad se refiere a implementar un protocolo que puede incluir administrar uno o más fármacos a un sujeto (humano o de otra especie), en un esfuerzo por aliviar signos o síntomas de la enfermedad. El alivio puede producirse antes de que aparezcan los signos o síntomas de la enfermedad, así como después de su aparición. Por tanto, “tratar” o “tratamiento” incluye “prevenir” o “prevención” de una enfermedad. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, “prevenir” o “prevención” también puede producirse en una situación en la que un ciclo de tratamiento se administra por adelantado con el fin de prevenir o retrasar la aparición de los síntomas asociados con la enfermedad de Alzheimer. Además, “tratar” o “tratamiento” no requiere un alivio completo de signos o síntomas, no requiere una cura, y específicamente incluye protocolos que sólo tienen un efecto positivo marginal sobre el sujeto.

Tal como se usa en el presente documento, el término “principio activo” se refiere a un anticuerpo de tipo 13C3 que muestra afinidad y especificidad (por ejemplo, unión específica) por la parte amino-terminal de la estructura de protofibrilla de beta-amiloide.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “cantidad eficaz” o “cantidad farmacéuticamente eficaz” de anticuerpo, tal como se proporcionan en el presente documento, se refieren a una cantidad no tóxica, pero suficiente, del principio activo con el fin de proporcionar el resultado biológico deseado. Una cantidad “eficaz” apropiada en cualquier caso individual puede determinarla un experto habitual en la técnica usando experimentación de rutina.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “farmacéuticamente aceptable” o “farmacológicamente aceptable” significan un material que puede administrarse a un individuo en un dispositivo de administración de fármacos junto con el agente biológico formulado sin provocar ningún efecto biológico no deseado o interactuar de una manera perjudicial con ninguno de los componentes de la composición en la que está contenido (por ejemplo, una “composición farmacéuticamente aceptable”).

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones “portador fisiológicamente aceptable” y “portador farmacéuticamente aceptable” que pueden usarse de manera intercambiable se refieren a un portador, diluyente y excipiente que no provoca irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Un adyuvante queda incluido en esas expresiones.

Tal como se usa en el presente documento, el término “excipiente” se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un principio activo.

El término “afinidad mínima”, tal como se usa en la comparación de la afinidad de los anticuerpos por la forma protofibrilar del péptido A β con la afinidad de los anticuerpos por otras formas del péptido A β , tales como fibrillas, estructuras de lámina y oligómeros y monómeros de bajo peso molecular, indica que la razón de la afinidad por la forma de A β protofibrilar con respecto a la afinidad por otras formas de A β es mayor de aproximadamente 2. Preferiblemente, la razón es mayor de aproximadamente 3 o aproximadamente 4 o aproximadamente 5.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra el proceso de fibrillogénesis de A β , incluyendo la formación de oligómeros de protofibrillas.

Las figuras 2A-B muestran el proceso de fibrillogénesis de A β y purificación de formas de A β a tiempo 0 (A) y a las 4 horas (B) tal como se indica mediante la absorbancia a mUA₂₁₅ (absorbancia a 215 nm) para volúmenes de elución. A las 4 horas (B), la forma de bajo peso molecular (LMW) eluye como dímero de ~15 kDa mientras que el tamaño de forma protofibrilar eluye a ~670 kDa.

Las figuras 3A-B muestran la especificidad de los anticuerpos monoclonales 13C3 (A) y 4G8 (B) por las formas protofibrilar (PF: -◆-) y de bajo peso molecular (LMW: -■-) de A β , tal como se indica mediante la densidad óptica (DO) leída a 450/650 nm para concentraciones crecientes de formas tanto PF como LMW de A β .

Las figuras 4A-C muestran datos de un ensayo de unión de Biacore[®] que muestran la afinidad de los anticuerpos monoclonales 4G8 (A), 13C3 (B) e IgG₁ de control (C) por concentraciones variables de forma de bajo peso molecular (LMW) de A β de desde 0,25 μ g/ml de A β LMW hasta 4,0 μ g/ml A β LMW.

Las figuras 5A-B muestran datos que identifican los epítomos reconocidos por los anticuerpos anti-A β descritos anteriormente. La figura 5A ilustra un análisis por inmunotransferencia de tipo Western por puntos con anticuerpos monoclonales 13C3 (panel superior), ID1 (panel central) y 4G8 (panel inferior) frente a una serie de péptidos de 13 aminoácidos solapantes tal como se describe en el ejemplo 5. La figura 5B ilustra la secuencia de aminoácidos de A β ₁₋₄₂ (SEQ ID NO: 1), así como los epítomos predichos de los anticuerpos monoclonales 13C3 y 1D1.

La figura 6 muestra la reactividad de los anticuerpos monoclonales 13C3 (-■-) y 4G8 (-◆-) con fracciones de SEC a partir de sobrenadante de 7PA2 que secreta oligómeros de A β . Las fracciones protofibrilar (PF) y de bajo peso molecular (LMW) se indican en el eje x tal como se mide mediante densidad óptica (DO) leída a 450/650.

Las figuras 7A-C muestran microfotografías de microscopía inmunoelectrónica de sección delgada que muestran la afinidad del anticuerpo monoclonal 13C3 por estructuras repetidas en las fibrillas de A β (B, C). El control de inmunoelectrónica es IgG₁ (A).

Las figuras 8A-B muestran datos de microfotografías electrónicas que muestran la reducción del número de placas en un ratón transgénico TgCRND8 representativo tras la administración del anticuerpo IgG₁ de control (A) en comparación con la administración de los anticuerpos monoclonales 13C3 (B).

Las figuras 9A-B muestran que el tratamiento de ratones transgénicos TgCRND8 con anticuerpos monoclonales 13C3 con un régimen de una vez a la semana (A) o dos veces a la semana (B) da como resultado una reducción de la formación de placas seniles.

La figura 10 muestra las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las regiones variables de cadenas ligera y pesada clonadas para AcM 13C3.

La figura 11 muestra que la administración periférica en dosis única de 13c3 en ratones transgénicos para APP no conduce a un aumento de A β en plasma al contrario que la administración del anticuerpo de referencia 3D6.

La figura 12 muestra que 13C3 reconoce placas neuríticas de amiloide humanas (agregadas) en cerebros con EA, pero no los depósitos de A β difusos al contrario que el anticuerpo anti-A β 3D6 de referencia.

Descripción detallada de la invención

La proteína precursora del amiloide (APP) desempeña un papel importante en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (EA). El procesamiento proteolítico de APP por β y γ -secretasas genera péptidos A β (A β) cuya longitud oscila normalmente entre 39 y 43 aminoácidos de longitud. La aparición de la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la acumulación de formas oligoméricas o agregadas de A β en el cerebro. Las composiciones inmunológicas de la presente descripción son útiles en el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer, para su uso como reactivos en ensayos de diagnóstico, así como para diseñar inhibidores de molécula pequeña de la deposición de amiloide. Los anticuerpos de tipo 13C3 de la presente descripción pueden administrarse de manera profiláctica a la población general de un mamífero, especialmente un ser humano, en una formulación farmacéuticamente aceptable contemplada en una cantidad y/o un régimen de dosificación suficiente para eliminar, reducir o retrasar la aparición de la enfermedad. Los métodos de tratamiento profiláctico están justificados especialmente con individuos que se sabe que corren un riesgo genético o familiar de desarrollar enfermedad de Alzheimer. Se han identificado numerosos marcadores genéticos de riesgo de enfermedad de Alzheimer, incluyendo, pero sin limitarse a, mutaciones de APP (por ejemplo, la mutación india (Val717Phe), las mutaciones suecas (Lys670Asn, Met671Leu), la mutación de Hendricks (Ala692Gly), la mutación holandesa (Glu693Gln), la mutación iraní (Thr714Ala), la mutación alemana (Val715A1a) y la mutación de Florida (Ile716Val), por mencionar unas pocas). Las mutaciones adicionales que pueden indicar un riesgo aumentado de enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones en los genes de presenilina (PS1 y PS2) y ApoE4. La presente descripción también se refiere a intervención terapéutica mediante composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden un anticuerpo de tipo 13C3 para individuos que parecen actualmente enfermedad de Alzheimer que puede reconocerse a partir de demencia característica, especialmente en presencia de los factores de riesgo descritos anteriormente o que ya padecen tal enfermedad en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas y complicaciones de la enfermedad de Alzheimer. Pueden usarse métodos de tratamiento o bien profilácticos o bien terapéuticos contemplados en el presente documento para abordar enfermedad de Alzheimer de aparición temprana o tardía. A la vista de la importancia de las formas oligoméricas de A β en la aparición de la enfermedad de Alzheimer, la presente descripción se refiere a un anticuerpo aislado que interacciona específicamente con, y muestra una afinidad medida por, un epítomo conformacional de repetición de una forma protofibrilar del péptido A β . El monómero de péptido A β de tipo natural (A β ₄₂; la forma de 42 aminoácidos) se conoce en la técnica y se muestra en el presente documento como SEQ ID NO: 1: Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala (SEQ ID NO: 1). Los anticuerpos aislados de la presente descripción mostrarán afinidad por un epítomo conformacional repetido de la forma protofibrilar oligomérica, de mayor peso molecular, del péptido A β mientras que mostrarán una afinidad mínima por otras formas del péptido A β , tales como monómeros y dímeros de bajo peso

molecular.

La presente descripción también se refiere a un anticuerpo aislado que interacciona con y muestra una afinidad medible por un epítipo conformacional de una forma protofibrilar del péptido A β , mediante lo cual el epítipo protofibrilar se representa mediante una región que queda al descubierto de una forma protofibrilar de A β que comprende la parte amino-terminal de una parte que queda al descubierto del péptido A β .

La presente descripción se refiere además a un anticuerpo aislado que interacciona específicamente con y muestra una afinidad medible por un epítipo conformacional de una forma protofibrilar del péptido A β , mediante lo cual el epítipo protofibrilar se representa mediante una región que queda al descubierto de una forma protofibrilar de A β que comprende los aminoácidos 1-20 (SEQ ID NO: 2) de una parte que queda al descubierto del péptido A β , de la siguiente manera: Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe (SEQ ID NO: 2).

Tal como se muestra a modo de ejemplo en el presente documento, se han identificado anticuerpos monoclonales de ratón que muestran específicamente afinidad específica por la forma protofibrilar (PF) del péptido A β , al tiempo que muestran una afinidad mínima por especies de bajo peso molecular del péptido A β . La forma dimérica de A β (~15 kDa) se polimeriza a lo largo del tiempo para formar una forma PF soluble de A β , con un peso molecular de aproximadamente 670 kDa. Se inmunizaron ratones con este A β PF de mayor peso molecular. Se examinaron anticuerpos monoclonales para determinar la especificidad por la forma PF de alto peso molecular del péptido A β al tiempo que muestran una capacidad mínima o ninguna capacidad de unirse a formas de menor peso molecular de A β . Esta parte de la presente descripción se muestra a modo de ejemplo mediante el examen, aislamiento y caracterización de la serie 13C3 de anticuerpos monoclonales producidos frente a la forma protofibrilar de alto peso molecular de ~670 kDa del péptido A β (es decir, 13C3, 1D1 y 19A6). Esta serie de anticuerpos monoclonales muestra la especificidad prevista *in vitro* al tiempo que también reduce la formación de placas asociada con la enfermedad de Alzheimer en un modelo de ratón transgénico de enfermedad de Alzheimer. Por tanto, en una realización particular de la descripción, el anticuerpo aislado interacciona específicamente con y muestra una afinidad medible por un epítipo conformacional de una forma protofibrilar del péptido A β , mediante lo cual el epítipo protofibrilar se representa mediante una región que queda al descubierto de una forma protofibrilar de A β que comprende los aminoácidos 4-12 (SEQ ID NO: 3) y 9-20 (SEQ ID NO: 4) de una parte que queda al descubierto del péptido A β : Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val (SEQ ID NO: 3); Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe (SEQ ID NO: 4).

Una realización de la presente descripción se refiere a un anticuerpo que comprende una región V_H (SEQ ID NO: 7) y/o V_L (SEQ ID NO: 5) tal como se da a conocer para 13C3, para conferir especificidad de tipo 13C3 por la forma PF frente a la LMW del péptido A β . Una realización adicional es un anticuerpo de tipo 13C3 o fragmento biológicamente relevante del mismo que muestra especificidad por la forma PF con respecto a la forma LMW del péptido A β . Por tanto, la presente descripción también se refiere a mutantes y/ fragmentos biológicamente activos de 13C3, 1D1, 19A6 o un anticuerpo de tipo 13C3, incluyendo, pero sin limitarse necesariamente a, sustituciones de aminoácido (por ejemplo, como una forma dirigida de maduración por afinidad de las regiones V_H o V_L), deleciones, adiciones, truncamientos amino-terminales y truncamientos carboxi-terminales de manera que estas mutaciones proporcionan una base para un anticuerpo o parte de unión de anticuerpo que da como resultado una versión similar o mejorada de una proteína de unión a 13C3, 1D1, 19A6 o anticuerpo de tipo 13C3. Tal como se indica en el presente documento, una realización de esta parte de la descripción se refiere a la región V_H y/o V_L de un anticuerpo de este tipo que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 7 y/o SEQ ID NO: 5, respectivamente. La presente descripción indica la existencia de redundancia de codones lo que puede dar como resultado que diferentes moléculas de ADN expresen un anticuerpo idéntico o una parte del mismo (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico alternativas que codifican para un scFv idéntico o una parte de V_H y/o V_L de una IgG). Para fines de esta memoria descriptiva, una secuencia que porta uno o más codones sustituidos se definirá como una variación degenerada. Otra fuente de variación de secuencia puede producirse mediante edición de ARN. Tal edición de ARN puede dar como resultado otra forma de redundancia de codones, en la que un cambio en el marco de lectura abierto no da como resultado un residuo de aminoácido alterado en la proteína expresada. También se incluyen dentro del alcance de esta descripción mutaciones o bien en la secuencia de ADN o bien en el anticuerpo traducido que mejoran las propiedades físicas finales del anticuerpo expresado. Con este fin, la presente descripción se refiere a (i) versiones maduras por afinidad de un 13C3, 1D1, 19A6 o cualquier otro de tales anticuerpos de tipo 13C3, y/o (ii) formas mutadas de 13C3, 1D1, 19A6 o cualquier otro de tales anticuerpos de tipo 13C3, incluyendo, pero sin limitarse a, una o más mutaciones en las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 tal como se generan mediante metodología de maduración por afinidad conocida y técnicas de ADN recombinante conocidas para introducir mutaciones específicas de sitio. Por tanto, los anticuerpos aislados de la presente descripción son anticuerpos que interaccionan específicamente con un epítipo conformacional de una forma protofibrilar del péptido A β . Los anticuerpos aislados de la presente descripción mostrarán afinidad por un epítipo conformacional de este tipo para la forma protofibrilar de mayor peso molecular del péptido A β mientras que mostrarán una afinidad mínima por otras formas del péptido A β , tales como fibrillas, estructuras de láminas y oligómeros y monómeros de bajo peso molecular.

La presente descripción también se refiere al anticuerpo monoclonal aislado, 13C3. Esta parte de la descripción también se refiere a un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal, 13C3. Un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 13C3 está disponible con el n.º de registro ATCC PTA-8830.

5 La presente descripción también se refiere al anticuerpo monoclonal aislado, 1D1. Esta parte de la descripción también se refiere a un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal, 1D1.

10 La presente descripción también se refiere al anticuerpo monoclonal aislado, 19A6. Esta parte de la descripción también se refiere a un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal, 19A6.

La presente descripción también se refiere a métodos de examen y selección de compuestos que pueden actuar como inhibidor de la formación de fibrillas y/o placas seniles asociada con la enfermedad de Alzheimer. Tal metodología comprende usar un anticuerpo con afinidad de tipo 13C3 por la forma PF del péptido A β en diversos ensayos de interacción de anticuerpo/péptido/compuesto de prueba con el fin de seleccionar un compuesto que modula el proceso de formación de fibrillas y/o placas. El compuesto puede ser una molécula orgánica no proteica o inorgánica, un péptido (por ejemplo, como posible vacuna peptídica profiláctica o terapéutica), una proteína, ADN (mono o bicatenario) o ARN (tal como ARNip o ARNhc). Resultará evidente tras revisar la divulgación y las enseñanzas de esta memoria descriptiva que cualquier péptido o molécula pequeña que compita eficazmente con un anticuerpo de tipo 13C3 por la unión a la forma PF del péptido A β representa un posible compuesto líder relacionado con el tratamiento profiláctico o terapéutico de la enfermedad de Alzheimer. Con este fin, pueden usarse ensayos de interacción con el fin de un examen de alto rendimiento para identificar compuestos que ocupan o interaccionan con los epítomos de 13C3 de la forma PF del péptido A β y desplazan al anticuerpo.

25 Pueden usarse diversos ensayos basados en antígeno/anticuerpo conocidos en la técnica que incorporan y se basan en un anticuerpo de tipo 13C3 de la presente descripción como reactivo esencial en el examen para detectar compuestos útiles en el tratamiento profiláctico o terapéutico de la enfermedad de Alzheimer (por ejemplo, una molécula inorgánica pequeña o una vacuna peptídica candidata), incluyendo, pero sin limitarse a, un ensayo ELISA, un radioinmunoensayo, un análisis por inmunotransferencia tipo Western, cualquier ensayo homogéneo que se base en una interacción biológica detectable que no requiere etapas de separación o lavado (por ejemplo, véase AlphaScreen de PerkinElmer) y/o tecnología basada en SPR (por ejemplo, véase BIACore). Los compuestos y/o candidatos de vacuna peptídica identificados mediante el uso de un anticuerpo de tipo 13C3 pueden detectarse mediante una variedad de ensayos. El ensayo puede ser un simple ensayo de tipo "sí/no" para determinar si hay un cambio en la capacidad de formar el complejo antígeno/anticuerpo conocido, o puede volverse de naturaleza cuantitativa usando un ensayo tal como un ensayo basado en ELISA, un ensayo homogéneo o un ensayo basado en SPR. Con este fin, la presente descripción se refiere a cualquier ensayo de este tipo, independientemente de la metodología conocida empleada, que mide la capacidad de un compuesto de prueba de competir con anticuerpo de tipo 13C3, por un compuesto mimético peptídico o proteico apropiado de la parte amino-terminal de un epítomo de 13C3 de la forma PF del péptido A β .

40 Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse como reactivos básicos en varios inmunoensayos diferentes para determinar la presencia de una forma protofibrilar de A β en una muestra de tejido. De manera general, los anticuerpos pueden emplearse en cualquier tipo de inmunoensayo, ya sea cualitativo o cuantitativo. Esto incluye tanto el ensayo de tipo sándwich de dos sitios como el inmunoensayo de un único sitio de tipo sin competencia, así como en ensayos de unión de competencia tradicionales. Una realización de interés, por su facilidad de detección y su naturaleza cuantitativa, es el ensayo de anticuerpos dobles o de tipo sándwich, del que existen varias variaciones, todas las cuales se pretende que queden abarcadas por esta parte de la presente descripción. Por ejemplo, en un ensayo de tipo sándwich directo típico, se inmoviliza anticuerpo sin marcar sobre un sustrato sólido, por ejemplo, pocillos de placa de microtitulación, y se pone en contacto la muestra que va a someterse a prueba con la molécula unida. Tras un periodo de incubación adecuado, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo binario antígeno-anticuerpo, entonces se añade un segundo anticuerpo, marcado con una molécula indicadora que puede inducir una señal detectable, y se continúa con la incubación permitiendo un tiempo suficiente para la unión con el antígeno en un sitio diferente y la formación de un complejo ternario antígeno-anticuerpo-anticuerpo marcado. Se elimina mediante lavado cualquier material sin reaccionar, y se determina la presencia del antígeno mediante la observación de una señal, que puede cuantificarse mediante la comparación con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de antígeno. Las variaciones en el ensayo de tipo sándwich directo incluyen el ensayo simultáneo, en el que tanto la muestra como el anticuerpo se añaden simultáneamente al anticuerpo unido, o un ensayo de tipo sándwich inverso en el que en primer lugar se combinan el anticuerpo marcado y la muestra que va a someterse a prueba, se incuban y se añaden al anticuerpo no marcado unido a la superficie. Estas técnicas las conocen bien los expertos en la técnica, y la posibilidad de variaciones menores resultará fácilmente evidente. Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el "ensayo de tipo sándwich" abarque todas las variaciones en la técnica básica de dos sitios.

65 Para los ensayos de tipo sándwich de la presente descripción, el único factor limitante es que ambos anticuerpos tengan especificidades de unión diferentes por la forma protofibrilar de A β . Por tanto, son posibles varias

combinaciones posibles. Como ejemplo más específico, en un ensayo de tipo sándwich directo, se une o bien de manera covalente o bien de manera pasiva un anticuerpo primario a un soporte sólido. La superficie sólida es habitualmente vidrio o un polímero, siendo los polímeros usados más habitualmente celulosa, poli(acrilamida), nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tubos, perlas, 5 discos o microplacas, o cualquier otra superficie adecuada para llevar a cabo un inmunoensayo. Los procedimientos de unión se conocen bien en la técnica. Tras la unión, se lava el complejo fase sólida-anticuerpo para prepararlo para la muestra de prueba. Después se añade una alícuota del líquido corporal que contiene una forma protofibrilar de A β que va a someterse a prueba al complejo de fase sólida y se incuba a 25°C durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la unión de cualquier proteína de forma protofibrilar de A β presente al anticuerpo específico 10 para la forma protofibrilar de A β . Entonces se añade el segundo anticuerpo al complejo de fase sólida y se incuba a 25°C durante un periodo de tiempo adicional suficiente para permitir que el segundo anticuerpo se una al complejo fase sólida con antígeno-anticuerpo primario. El segundo anticuerpo se une a una molécula indicadora, cuya señal visible se usa para indicar la unión del segundo anticuerpo a cualquier antígeno en la muestra. Por "molécula indicadora", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, quiere decirse una molécula que, por su naturaleza 15 química, proporciona una señal detectable de manera analítica que permite la detección de anticuerpo unido a antígeno. La detección debe ser al menos relativamente cuantificable, para permitir la determinación de la cantidad de antígeno en la muestra, esto puede calcularse en términos absolutos o puede realizarse mediante la comparación con un patrón (o serie de patrones) que contienen un nivel normal conocido de antígeno.

Las moléculas indicadoras usadas más comúnmente en este tipo de ensayo son o bien enzimas o bien fluoróforos. En el caso de un inmunoensayo enzimático, se conjuga una enzima con el segundo anticuerpo, con frecuencia por medio de glutaraldehído o peryodato. Sin embargo, tal como se reconocerá fácilmente, existe una amplia variedad de diferentes técnicas de conjugación, que conoce bien el experto en la técnica. Las enzimas usadas comúnmente 20 incluyen peroxidasa del rábano, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa y fosfatasa alcalina, entre otras. Los sustratos que van a usarse con las enzimas específicas se eligen generalmente para la producción, tras hidrólisis por la enzima correspondiente, de un cambio de color detectable. Por ejemplo, el fosfato de p-nitrofenilo es adecuado para su uso con conjugados de fosfatasa alcalina; para conjugados de peroxidasa, habitualmente se usan 1,2-fenilendiamina o toluidina. También es posible emplear sustratos fluorogénicos, que proporcionan un producto fluorescente en vez de los sustratos cromogénicos indicados anteriormente. En todos los casos, se añade el 25 anticuerpo marcado con enzima al complejo primer anticuerpo-proteína protofibrilar de A β y se deja que se una al complejo, y después se elimina el reactivo en exceso mediante lavado. Después se añade una disolución que contiene el sustrato apropiado al complejo ternario antígeno-anticuerpo-anticuerpo marcado. El sustrato reacciona con la enzima unida al segundo anticuerpo, produciendo una señal visual cualitativa, que puede cuantificarse adicionalmente, de manera espectrofotométrica habitualmente, para proporcionar una evaluación de la cantidad de 30 antígeno que está presente en la muestra de suero.

Adicionalmente, pueden acoplarse químicamente compuestos fluorescentes, tales como fluoresceína o rodamina, a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa mediante iluminación con luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo absorbe la energía luminosa, induciendo un estado de 35 excitabilidad en la molécula, seguido por emisión de la luz a una longitud de onda característica más larga. La emisión aparece como un color característico detectable visualmente con un microscopio óptico. Como en el inmunoensayo enzimático (EIA), se deja que el anticuerpo marcado con compuesto fluorescente se una al complejo primer anticuerpo-proteína de forma protofibrilar de A β . Tras lavar el reactivo no unido, después se expone el complejo ternario restante a luz de la longitud de onda apropiada, y la fluorescencia observada indica la presencia 40 del antígeno. Tanto las técnicas de inmunofluorescencia como de EIA están muy bien establecidas en la técnica y se prefieren particularmente para el presente método. Sin embargo, también pueden emplearse otras moléculas indicadoras, tales como radioisótopos, moléculas quimioluminiscentes o bioluminiscentes. Resultará fácilmente evidente para el experto en la técnica cómo variar el procedimiento para adaptarse al uso requerido.

En otra realización, la muestra que va a someterse a prueba (por ejemplo, sangre o líquido cefalorraquídeo humano que contiene una forma protofibrilar de A β) puede usarse en un inmunoensayo de un único sitio en el que se adhiere a un sustrato sólido de manera o bien covalente o bien no covalente. Se pone en contacto un anticuerpo anti-proteína protofibrilar de A β sin marcar con la muestra unida al sustrato sólido. Tras un periodo de incubación adecuado, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo binario antígeno-anticuerpo, entonces se añade un segundo anticuerpo, marcado con una molécula indicadora que puede inducir una 45 señal detectable, y se continúa con la incubación permitiendo un tiempo suficiente para la formación de un complejo ternario antígeno-anticuerpo-anticuerpo marcado. Para el inmunoensayo de un único sitio, el segundo anticuerpo puede ser un anticuerpo general (es decir, anticuerpo xenogénico frente a inmunoglobulina, particularmente anti-(IgM e IgG) unido a una molécula indicadora) que puede unirse a un anticuerpo que es específico para la forma de 50 proteína protofibrilar de A β de interés.

Un anticuerpo de tipo 13C3 puede adoptar una de numerosas formas conocidas en la técnica. Los anticuerpos pueden adoptar la forma de cualquier tipo de fragmento de anticuerpo relevante, parte de unión de anticuerpo, miembro de unión específica, un compuesto mimético sintético no proteico, o cualquier otra terminología relevante 55 conocida en la técnica que se refiere a cualquier entidad que conserva al menos sustancialmente la actividad de

neutralización/especificidad de unión. Por tanto, se pretende que el término “anticuerpo” tal como se usa en cualquier contexto dentro de esta memoria descriptiva incluya, pero no se limite a, cualquier miembro de unión específica, clase y/o isotipo de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgM, IgA, IgD, IgE e IgM); y fragmento biológicamente relevante o miembro de unión específica del mismo, incluyendo, pero sin limitarse a, Fab, F(ab')₂, Fv y scFv (cadena sencilla o entidad relacionada). Por tanto, en la técnica se conoce bien, y sólo se incluye como revisión, que un “anticuerpo” se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro, o una parte de unión a antígeno de las mismas. Una cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (V_H) y una región constante de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Una cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (V_L) y una región constante de cadena ligera (C_L). Las regiones variables de cadenas tanto pesada como ligera comprenden regiones de entramado (FWR) y regiones determinantes de complementariedad (CDR). Las cuatro regiones FWR están relativamente conservadas mientras que las regiones CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) representan regiones hipervariables y están dispuestas desde el extremo NH₂-terminal hasta el extremo COOH-terminal de la siguiente manera: FWR1, CDR1, FWR2, CDR2, FWR3, CDR3, FWR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno mientras que, dependiendo del isotipo, la(s) región/es constante(s) puede(n) mediar en la unión de la inmunoglobulina a factores o tejidos del huésped. Dicho esto, en la definición básica de “anticuerpo” también se incluyen anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, un anticuerpo recombinante, tal como anticuerpos humanos generados a partir de un animal transgénico no humano, así como anticuerpos seleccionados de bibliotecas usando tecnologías de enriquecimiento disponibles para el experto. Se obtienen fragmentos de anticuerpo usando técnicas fácilmente conocidas por y disponibles para los expertos habituales en la técnica, tal como se revisa a continuación. Por tanto, un “anticuerpo” es cualquier entidad o miembro de unión específica de este tipo que se une específicamente al epítipo conformacional de la forma protofibrilar de Aβ tal como se describe en el presente documento. Por tanto, el término “anticuerpo” describe una inmunoglobulina, ya sea natural o producida de manera total o parcialmente sintética; cualquier polipéptido o proteína que tiene un dominio de unión que es, o es sustancialmente homólogo a, un dominio de unión a anticuerpo. Estos pueden derivarse de fuentes naturales, o pueden producirse de manera parcial o totalmente sintética. Ejemplos de anticuerpos son los isotipos de inmunoglobulina y sus subclases de isotipo; fragmentos que comprenden un dominio de unión a antígeno tales como Fab, scFv, Fv, dAb, Fd y diacuerpos, tal como se comenta sin limitación a continuación. En la técnica se conoce que es posible manipular anticuerpos monoclonales y otros y usar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que conservan la especificidad del anticuerpo original. Tales técnicas pueden evolucionar introduciendo ADN que codifica para la región variable de inmunoglobulina, o las regiones determinantes de complementariedad (CDR), de un anticuerpo frente a las regiones constantes, o regiones constantes más regiones de entramado, de una inmunoglobulina diferente. Puede someterse un hibridoma u otra célula que produce un anticuerpo a mutación genética o a otros cambios, lo que puede alterar o no la especificidad de unión de los anticuerpos producidos. Pueden modificarse anticuerpos de varias maneras, y debe interpretarse que el término “anticuerpo” cubre cualquier miembro de unión específica o sustancia que tiene un dominio de unión con la especificidad requerida. Por tanto, este término cubre fragmentos de anticuerpo, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de “anticuerpo” incluyendo cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión a inmunoglobulina, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Una entidad de este tipo puede ser un fragmento de unión abarcado dentro del término “parte de unión a antígeno” o “miembro de unión específica” de un anticuerpo incluyendo, pero sin limitarse a, (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y C_H; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_H; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb, que comprende un dominio V_H; (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada; (vii) un “scAb”, un fragmento de anticuerpo que contiene V_H y V_L así como o bien C_L o bien C_H; y (viii) anticuerpos artificiales basados en armazones de proteína, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos de polipéptidos de fibronectina tipo III (por ejemplo, véanse la patente estadounidense n.º 6.703.199, concedida a Koide el 9 de marzo de 2004 y la publicación de solicitud internacional PCT n.º WO 02/32925). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, están codificados por genes independientes, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un ligador sintético que permite que se produzcan como una única cadena proteica en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocido como Fv de cadena sencilla (scFv)).

En una realización, la región variable ligera (V_L) para los anticuerpos 13C3 o de tipo 13C3 aislados de la presente descripción puede comprender una secuencia peptídica de 113 aminoácidos (SEQ ID NO: 5) que está codificada por una secuencia de nucleótidos de 339 pares de bases (SEQ ID NO: 6):

ES 2 639 016 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Gly Gln Ser Leu Val
His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
Tyr Phe Cys Ser Gln Asn Thr Phe Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg (SEQ ID NO: 5)

GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCC
ATCTCTTGCAGATCTGGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTATTTACATTGG
TACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTATACAGTTTCCAACCGATTT
TCTGGGGTCCCGGACAGGTTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGTCAGATTTCACTCAAGATC
AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAATACATTTGTTCTCT
TGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG (SEQ ID NO: 6)

- 5 En una realización adicional, la región variable pesada (V_H) para los anticuerpos 13C3 o de tipo 13C3 aislados de la presente descripción puede comprender una secuencia peptídica de 115 aminoácidos (SEQ ID NO: 7) codificada por una secuencia de nucleótidos de 345 pares de bases (SEQ ID NO: 8):

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly
Val Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
Asp Tyr Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu
Glu Trp Ile Gly Val Ile Ser Thr Lys Tyr Gly Lys Thr Asn Tyr
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp
Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Asp Gly Tyr Ser Trp
Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO: 7);

- 10 CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGCCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGTCTCAGTGAAGATT
TCCTGCAAGGGTTCCGGCTACACATTCCTGATTATGCTATGCACTGGGTGAAGCAGAGT
CATGCAAAGAGTCTAGAGTGGATTGGAGTTATTAGTACTAAGTATGGTAAGACAACTAC
AACCAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCACAATGACTGTTGACAAATCCTCCAGCACAGCCTAT
ATGGAGCTTGCCAGATTGACATCTGAGGATTCTGCCATCTATTACTGTGCAAGAGGGGAC
GATGGTTATTCTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:
8) .

- 15 En una realización adicional, las regiones de entramado, FWR1, FWR2, FWR3 y FWR4, de la cadena de V_L pueden estar compuestas por los aminoácidos expuestos en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, respectivamente, de la siguiente manera:

ES 2 639 016 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Gly (SEQ ID NO: 9);
Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu
Ile Tyr (SEQ ID NO: 10);
Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
Gly Ser Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp
Leu Gly Val Tyr Phe Cys (SEQ ID NO: 11);
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg (SEQ ID NO: 12).

5 En una realización adicional, las regiones determinantes de complementariedad, CDR1, CDR2 y CDR3, de la cadena de V_L pueden estar compuestas por los aminoácidos expuestos en SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, respectivamente, de la siguiente manera:

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr (SEQ ID NO: 13);

Thr Val Ser (SEQ ID NO: 14);

Ser Gln Asn Thr Phe Val Pro Trp Thr (SEQ ID NO: 15).

10 En una realización adicional, las regiones de entramado, FWR1, FWR2, FWR3 y FWR4, de la cadena de V_H pueden estar compuestas por los aminoácidos expuestos en SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19, respectivamente, de la siguiente manera:

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly
Val Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys (SEQ ID NO: 16);

15 Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
Gly Val (SEQ ID NO: 17);

Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu
Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
Arg (SEQ ID NO: 18);

20 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO: 19).

En una realización adicional, las regiones determinantes de complementariedad, CDR1, CDR2 y CDR3, de la cadena de V_H pueden estar compuestas por los aminoácidos expuestos en SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, respectivamente, de la siguiente manera:

Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala (SEQ ID NO: 20);

Ile Ser Thr Lys Tyr Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
Gly Lys (SEQ ID NO: 21);

25 Gly Asp Asp Gly Tyr Ser (SEQ ID NO: 22).

30 Pueden producirse anticuerpos policlonales o monoclonales para su uso en los métodos de tratamiento dados a conocer mediante técnicas conocidas. Pueden purificarse anticuerpos murinos (de ratón) monoespecíficos que muestran especificidad por un epítipo conformacional de una diana de elección a partir de antisueros de mamífero que contienen anticuerpos reactivos contra esta región, o pueden prepararse como anticuerpos monoclonales usando la técnica de Kohler y Milstein (1975, Nature 256: 495-497). Un anticuerpo monoespecífico tal como se usa en el presente documento se define como una única especie de anticuerpo o múltiples especies de anticuerpo con

características de unión homogéneas, tales como los anticuerpos monoclonales de ratón mostrados a modo de ejemplo en el presente documento con la serie 13C3 de anticuerpos monoclonales. Se producen células de hibridoma mezclando los linfocitos esplénicos con una pareja de fusión apropiada, preferiblemente células de mieloma, en condiciones que permitirán la formación de hibridomas estables. Las células esplénicas productoras de anticuerpos y células de mieloma se fusionan, seleccionan y examinan para determinar la producción de anticuerpos. Se clonan células de hibridoma a partir de pocillos positivos para anticuerpo mediante una técnica tal como la técnica de agar blando de MacPherson (1973, *Soft Agar Techniques*, en *Tissue Culture Methods and Applications*, Kruse and Paterson, Eds, Academic Press). Se producen anticuerpos monoclonales *in vivo* inyectando células de hibridoma respectivas en ratones sensibilizados inmaculados, recogiendo el líquido ascítico tras un intervalo de tiempo y se preparan mediante técnicas bien conocidas en la técnica.

Además de los anticuerpos monoclonales específicos de especie descritos anteriormente, los anticuerpos de la presente descripción también pueden estar en forma de un "anticuerpo quimérico", un anticuerpo monoclonal construido a partir de las regiones variable derivadas, por ejemplo, de la fuente murina, y regiones constantes derivadas de la fuente de huésped previsto (por ejemplo, ser humano; para una revisión, véase Morrison y Oi, 1989, *Advances in Immunology*, 44: 65-92). Por ejemplo, las secuencias de ADN de cadena ligera y pesada variables (por ejemplo SEQ ID NO: 6 y 8, respectivamente) del anticuerpo de roedor (por ejemplo, de ratón) pueden clonarse en un vector de expresión de mamífero. Estos vectores de expresión "quiméricos" de cadena ligera y pesada se transfectan conjuntamente en una línea celular receptora y se seleccionan y expanden mediante técnicas conocidas. Después puede someterse esta línea celular a técnicas de cultivo celular conocidas, dando como resultado la producción tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada de un anticuerpo quimérico. Históricamente se ha mostrado que tales anticuerpos quiméricos tienen la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal de roedor original al tiempo que se reducen significativamente los problemas de inmunogenicidad tras la administración al huésped.

Una mejora lógica en el anticuerpo quimérico es el "anticuerpo humanizado", que reduce supuestamente la probabilidad de que el paciente produzca una respuesta inmunitaria frente a un anticuerpo terapéutico en comparación con el uso de un anticuerpo monoclonal murino al completo o quimérico. La estrategia de "humanizar" un AcM murino se basa en reemplazar residuos de aminoácido que difieren de los de las secuencias humanas mediante mutagénesis dirigida al sitio de residuos individuales o mediante injerto de regiones determinantes de complementariedad completas (Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321: 522-526). De nuevo, esta tecnología se conoce ahora bien en la técnica y se representa mediante numerosas estrategias para mejorar esta tecnología; en concreto implementando estrategias incluyendo, pero sin limitarse a, "remodelado" (véase Verhoeyen, *et al.*, 1988, *Science* 239: 1534-1536), "hiperquimerización" (véase Queen, *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:2869-2873) o "revestimiento" (Mark, *et al.*, 1994, *Derivation of Therapeutically Active Humanized and Veneered anti-CD18 Antibodies*, Metcalf and Dalton, eds. *Cellular Adhesion: Molecular Definition to Therapeutic Potential*. Nueva York: Plenum Press, 291-312). Todas estas estrategias implican en cierto grado una comparación de secuencias entre secuencias de roedor y humana para determinar si resultan apropiadas sustituciones de aminoácido específicas de una secuencia consenso de roedor por humana. Independientemente de las variaciones, el concepto fundamental implicado en la generación de un anticuerpo humanizado se basa en el injerto de CDR, en el que estos tres sitios de unión a antígeno de cadena tanto ligera como pesada se retiran eficazmente del clon de anticuerpo de expresión de roedor y se subclonan (o "injertan") en un vector de expresión que codifica para la región de entramado del anticuerpo humano. Por ejemplo, usando las técnicas anteriores puede expresarse un anticuerpo humanizado en el que las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera variable se exponen en SEQ ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente, y las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada variable se exponen en SEQ ID NO: 20, 21 y 22, respectivamente. Por tanto, un "anticuerpo humanizado" es eficazmente un anticuerpo construido sólo con CDR murinas (menos cualquier mejora adicional generada mediante la incorporación de una o más de las estrategias mencionadas anteriormente), derivándose el resto de la región variable y la totalidad de la región constante de una fuente humana.

La presente descripción también se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas y secuencias de aminoácidos asociadas que están relacionadas con las regiones V_H y/o V_L del anticuerpo 13C3, y más específicamente, a una molécula de ácido nucleico aislada (polinucleótido) que codifica para una parte biológicamente relevante de 13C3, o versión madurada por afinidad o versión mutada de otro modo de 13C3, 1D1, 19A6 u otro anticuerpo de tipo 13C3. Estos ácidos nucleicos están sustancialmente libres de otros ácidos nucleicos. Para la mayoría de los fines de clonación, el ADN es un ácido nucleico preferido. Estas moléculas de ADN pueden subclonarse en un vector de expresión y transfectarse posteriormente en una célula huésped de elección en la que la célula huésped recombinante proporciona una fuente para niveles sustanciales de una parte relevante de 13C3, 1D1, 19A6 o anticuerpo de tipo 13C3, 1D1 ó 19A6, o versión madurada por afinidad del mismo. Tales procedimientos pueden usarse para una variedad de usos, tales como generar scFv o para coexpresar estas cadenas de V_H y V_L en un sistema de vector de expresión de mamífero que codifica para regiones C_H y C_L humanas de, por ejemplo, un anticuerpo de IgG. La degeneración del código genético es tal que, para todos salvo dos aminoácidos, hay más de un único codón que codifican para un aminoácido particular. Esto permite la construcción de ADN sintético que codifica para un anticuerpo de la presente descripción en el que la secuencia de nucleótidos del ADN sintético difiere significativamente de las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en el presente documento, pero todavía codifica para tal anticuerpo. Se pretende que tales ADN sintéticos estén dentro del alcance de la presente

descripción. Si se desea expresar tales ADN sintéticos en una célula u organismo huésped particular, el uso de codones de tales ADN sintéticos puede ajustarse para reflejar el uso de codones de ese huésped particular, conduciendo por tanto a mayores niveles de expresión de un anticuerpo de la presente descripción. Dicho de otro modo, esta redundancia en los diversos codones que codifican para aminoácidos específicos se encuentra dentro del alcance de la presente descripción. Por tanto, esta descripción también se refiere a aquellas secuencias de ADN que codifican para ARN que comprenden codones alternativos que codifican para la eventual traducción del aminoácido idéntico, tal como se muestra a continuación: A = Ala = alanina: codones GCA, GCC, GCG, GCU; C = Cys = cisteína: codones UGC, UGU; D = Asp = ácido aspártico: codones GAC, GAU E = Glu = ácido glutámico: codones GAA, GAG; F = Phe = fenilalanina: codones UUC, UUU; G = Gly = glicina: codones GGA, GGC, GGG, GGU; H = His = histidina: codones CAC, CAU; I = Ile = isoleucina: codones AUA, AUC; AUU; K = Lys = lisina: codones AAA, AAG; L = Leu = leucina: codones UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU; M = Met = metionina: codón AUG; N = Asp = asparagina: codones GAU, GAC; P = Pro = prolina: codones CCA, CCC, CCG, CCU; Q = Gln = glutamina: codones CAA, CAG; R = Arg = arginina: codones AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU; S = Ser = serina: codones AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU; T = Thr = treonina: codones ACA, ACC, ACG, ACU; V = Val = valina: codones GUA, GUC, GUG, GUU; W = Trp = triptófano: codón UGG; Y = Tyr = tirosina: codones UAC, UAU. Tales vectores de expresión recombinantes pueden transfectarse entonces de manera estable o transitoria en una línea celular apropiada para la generación de una forma de anticuerpo alternativa.

La presente descripción constata la existencia de la redundancia de codones que puede dar como resultado diferentes moléculas de ADN que expresan un anticuerpo idéntico o una parte del mismo (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico alternativas que codifican para una parte de scFv o de V_H y/o V_L idéntica de una IgG). Para los fines de esta memoria descriptiva, una secuencia que porta uno o más codones sustituidos se definirá como una variación degenerada. Otra fuente de variación de secuencia puede producirse mediante edición de ARN. Tal edición de ARN puede dar como resultado otra forma de redundancia de codones, en la que un cambio en el marco de lectura abierto no da como resultado un residuo de aminoácido alterado en la proteína expresada. También se incluyen dentro del alcance de esta descripción mutaciones o bien en la secuencia de ADN o bien en el anticuerpo traducido que mejoran las propiedades físicas finales del anticuerpo expresado. Con este fin, la presente descripción se refiere a (i) versiones maduras por afinidad de un anticuerpo de tipo 13C3, incluyendo, pero sin limitarse a, 13C3, 19A6 y 1D1, y/o (ii) formas maduras de un anticuerpo de tipo 13C3, incluyendo, pero sin limitarse a, 13C3, 19A6 y/o 1D1, incluyendo, pero sin limitarse a, una o más mutaciones en las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 tal como se generan mediante metodología de maduración por afinidad conocida y técnicas de ADN recombinante conocidas para introducir mutación específica de sitio. Tales moléculas de ácido nucleico aisladas o purificadas representarán las partes de V_H y/o V_L de un anticuerpo de tipo 13C3. Estos ácidos nucleicos están sustancialmente libres de otros ácidos nucleicos. Para la mayoría de los fines de clonación, el ADN es un ácido nucleico preferido. Estas moléculas de ADN pueden subclonarse en un vector de expresión y posteriormente transfectarse en una célula huésped de elección en la que la célula huésped recombinante proporciona una fuente para niveles sustanciales de una parte relevante de un anticuerpo de tipo 13C3, o versión madurada por afinidad del mismo. Tales procedimientos pueden usarse para una variedad de usos, tales como generar scFv o para coexpresar estas cadenas de V_H y V_L en un sistema de vector de expresión de mamífero que codifica para regiones C_H y C_L humanas de, por ejemplo, un anticuerpo de IgG.

La presente descripción también se refiere a vectores recombinantes y huéspedes recombinantes, tanto procariontes como eucariotas, que contienen moléculas de ácido nucleico que codifican para las regiones pesada y/o ligera respectivas de un anticuerpo de tipo 13C3. Estas moléculas de ácido nucleico, en su totalidad o en parte, pueden estar unidas a otras moléculas de ADN (es decir, moléculas de ADN que abarcan genes de inmunoglobulina usados para la generación de un anticuerpo humano recombinante) que no están unidas de manera natural, para formar "moléculas de ADN recombinante" que codifican para un anticuerpo recombinante humano respectivo. Estos vectores pueden estar compuestos por ADN o ARN. Para la mayoría de los fines de clonación se prefieren vectores de ADN. Los vectores típicos incluyen plásmidos, virus modificados, bacteriófago, cósmidos, cromosomas artificiales de levadura y otras formas de ADN episómico o integrado. Se encuentra dentro del alcance del experto en la técnica determinar un vector apropiado para una transferencia génica, generación de un anticuerpo humano recombinante u otro uso particular. Se conocen bien métodos de subclonar moléculas de ácido nucleico de interés en vectores de expresión, transformar o transfectar células huésped que contienen los vectores, y métodos de producir proteína sustancialmente pura que comprenden las etapas de introducir el vector de expresión respectivo en una célula huésped, y cultivar la célula huésped en condiciones apropiadas. El anticuerpo (tal como un anticuerpo humano recombinante de IgG) así producido puede recogerse de las células huésped de maneras convencionales. Puede usarse cualquier vector de expresión conocido para poner en práctica esta parte de la descripción, incluyendo cualquier vector que contiene un promotor adecuado y otros elementos reguladores de la transcripción apropiados. El constructo de expresión resultante se transfiere a una célula huésped procarionte o eucariota para producir proteína recombinante. En el presente documento se definen vectores de expresión como secuencias de ADN que se requieren para la transcripción de ADN clonado y la traducción de sus ARNm en un huésped apropiado. Tales vectores pueden usarse para expresar ADN eucariota en una variedad de huéspedes tales como bacterias, cianobacterias, células vegetales, células de insectos y células animales. Vectores diseñados específicamente permiten el transporte de ADN entre huéspedes tales como células bacterianas-de levadura o bacterianas-de animales. Un vector de expresión construido de manera apropiada debe contener: un origen de replicación para la replicación autónoma en células huésped, marcadores seleccionables, un número limitado de sitios de enzimas de

- restricción útiles, una posibilidad de un alto número de copias y promotores activos. Un promotor se define como una secuencia de ADN que dirige la ARN polimerasa para que se una a ADN e inicie la síntesis de ARN. Un promotor fuerte es uno que provoca que se inicien ARNm a alta frecuencia. Pueden encontrarse técnicas para tales manipulaciones descritas en Sambrook, *et al.* (1989, Molecular Cloning. A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York), se conocen bien y están disponibles para el experto habitual en la técnica. Los vectores de expresión pueden incluir, pero no se limitan a, vectores de clonación, vectores de clonación modificados, virus o plásmidos diseñados específicamente. Los vectores de expresión de mamíferos disponibles comercialmente que pueden ser adecuados incluyen, pero no se limitan a, pcDNA3.neo (Invitrogen), pcDNA3.1 (Invitrogen), pCI-neo (Promega), pLITMUS28, pLITMUS29, pLITMUS38 y pLITMUS39 (New England Biolabs), pcDNA1, pcDNA1anp (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pMClneo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO pSV2-neo (ATCC 37593), pBPV-1(8-2) (ATCC 37110), pdBPV-MMTneo(342-12) (ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC 37199), pRSVneo (ATCC 37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUCTag (ATCC 37460) y 1ZD35 (ATCC 37565). Además, está disponible una variedad de vectores de expresión bacterianos, incluyendo, pero sin limitarse a, pCR2.1 (Invitrogen), pET1 la (Novagen), lambda gtl 1 (Invitrogen) y pKK223-3 (Pharmacia). Además, puede usarse una variedad de vectores de expresión de células fúngicas, incluyendo, pero sin limitarse a, pYES2 (Invitrogen) y vector de expresión Pichie (Invitrogen). Además, puede usarse una variedad de vectores de expresión de células de insectos, incluyendo, pero sin limitarse a, pBlueBacIII y pBlueBacHis2 (Invitrogen) y pAcG2T (Pharmingen).
- Las células huésped recombinantes pueden ser procariotas o eucariotas, incluyendo, pero sin limitarse a, bacterias tales como *E. coli*, células fúngicas tales como levaduras, células de mamíferos incluyendo, pero sin limitarse a, líneas celulares de origen bovino, porcino, de mono y de roedor; y células de insectos. Las especies de mamíferos que pueden ser adecuadas, incluyen, pero no se limitan a, células L L-M(TK-) (ATCC CCL 1.3), células L L-M (ATCC CCL 1.2), Saos-2 (ATCC HTB-85), 293 (ATCC CRL1573), Raji (ATCC CCL 86), CV-1 (ATCC CCL 70), COS-I (ATCC CRL 1650), COS-7(ATCC CRL 1651), CHO-K1 (ATCC CCL 61), 3T3 (ATCC CCL 92), NIH/3T3 (ATCC CRL 1658), HeLa (ATCC CCL 2), C1271 (ATCC CRL 1616), BS-C-1 (ATCC CCL 26), MRC-5 (ATCC CCL 171) y CPAE (ATCC CCL 209).
- Aún otra mejora con respecto a anticuerpos vueltos a modificar por ingeniería genética tal como se revisó anteriormente es la generación de anticuerpos monoclonales totalmente humanos. Lo primero implica el uso de cepas de ratón modificadas por ingeniería genética que presentan un sistema inmunitario mediante el cual se han inactivado los genes de anticuerpos de ratón y se han reemplazado a su vez por un repertorio de genes de anticuerpos humanos funcionales, mientras que se dejan inalterados otros componentes del sistema inmunitario de ratón. Tales ratones modificados por ingeniería genética permiten los procesos naturales de respuesta inmunitaria *in vivo* y maduración por afinidad lo que da como resultado anticuerpos monoclonales totalmente humanos de alta afinidad. De nuevo, ahora se conoce bien esta tecnología en la técnica y se detalla completamente en diversas publicaciones, incluyendo, pero sin limitarse a, las patentes estadounidenses n.ºs 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y miembros de la familia relacionados (cedidas a Abgenix, que dan a conocer su tecnología de XenoMouse); así como las patentes estadounidenses n.ºs 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429 (cedidas a GenPharm International y disponibles a través de Medarex, dentro del título global de "UltraMab Human Antibody Development System"). Véase también una revisión de Kellerman y Green (2002, Curr. Opinion in Biotechnology 13: 593-597).
- Finalmente, hay técnicas disponibles para el experto para la selección de fragmentos de anticuerpo a partir de bibliotecas usando tecnologías de enriquecimiento, incluyendo, pero sin limitarse a, presentación en fagos, presentación en ribosoma (Hanes y Pluckthun, 1997, Proc. Nat. Acad. Sci. 94: 4937-4942), presentación bacteriana (Georgiou, *et al.*, 1997, Nature Biotechnology 15: 29-34) y/o presentación en levaduras (Kieke, *et al.*, 1997, Protein Engineering 10: 1303-1310) que pueden usarse como alternativas a tecnologías comentadas anteriormente para seleccionar anticuerpos de cadena sencilla que se unen específicamente a una citocina diana. Se seleccionan anticuerpos de cadena sencilla a partir de una biblioteca de anticuerpos de cadena sencilla producidos directamente usando tecnología de fagos filamentosos. En la técnica se conoce la tecnología de presentación en fagos (por ejemplo, véase la tecnología de Cambridge Antibody Technology (CAT)) tal como se da a conocer en las patentes estadounidenses n.ºs 5.565.332; 5.733.743; 5.871.907; 5.872.215; 5.885.793; 5.962.255; 6.140.471; 6.225.447; 6.291.650; 6.492.160; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915; 6.593.081, así como otros miembros de la familia estadounidenses, o solicitudes que se basan en la presentación de prioridad GB 9206318, presentada el 24 de mayo de 1992; véase también Vaughn, *et al.* 1996, Nature Biotechnology 14: 309-314. También pueden diseñarse y construirse anticuerpos de cadena sencilla usando tecnología de ADN recombinante disponible, tal como un método de amplificación de ADN (por ejemplo, PCR), o posiblemente usando un ADNc de hibridoma respectivo como molde. Los anticuerpos de cadena sencilla pueden ser mono o biespecíficos; bivalentes o tetravalentes. Puede construirse una secuencia de nucleótidos que codifica para un anticuerpo de cadena sencilla usando síntesis de nucleótidos manual o automatizada, clonarse en un constructo de expresión usando métodos de ADN recombinante convencionales, e introducirse en una célula para expresar la secuencia codificante, tal como se describe a continuación.
- La presente descripción se refiere además a una composición farmacéutica basada en anticuerpo que comprende una cantidad eficaz un anticuerpo de tipo 13C3, o una versión madurada por afinidad, que proporciona una opción

de tratamiento profiláctico o terapéutico para inhibir la formación de fibrilla y/o placas seniles asociada con la enfermedad de Alzheimer. La composición farmacéutica basada en anticuerpo de la presente descripción puede formularse mediante cualquiera de varias estrategias conocidas en la técnica (por ejemplo, véase McGoff y Scher, 2000, *Solution Formulation of Proteins/Peptides*: En McNally, E.J., ed. *Protein Formulation and Delivery*. Nueva York, NY: Marcel Dekker; págs. 139-158; Akers y Defilippis, 2000, *Peptides and Proteins as Parenteral Solutions*. En: *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*. Filadelfia, PA: Talyor y Francis; págs. 145-177; Akers, *et al.*, 2002, *Pharm. Biotechnol.* 14:47-127). Una composición farmacéuticamente aceptable adecuada para la administración a pacientes contendrá una cantidad eficaz del anticuerpo en una formulación que conserva la actividad biológica al tiempo que también fomenta una estabilidad máxima durante el almacenamiento dentro de un intervalo de temperatura aceptable. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, diluyentes farmacéuticamente aceptables, portadores farmacéuticamente aceptables y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, o cualquier vehículo de este tipo usado comúnmente para formular composiciones farmacéuticas para la administración a animales o seres humanos. El diluyente se selecciona de modo que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, soluciones de Ringer, disolución de dextrosa y solución de Hank. La cantidad de un excipiente que es útil en la formulación o composición farmacéutica de esta descripción es una cantidad que sirve para distribuir uniformemente el anticuerpo a lo largo de la composición de modo que puede dispersarse uniformemente cuando va a administrarse a un sujeto que lo necesita. Puede servir para diluir el anticuerpo hasta una concentración que proporciona los resultados paliativos o curativos beneficiosos deseados mientras que al mismo tiempo minimiza cualquier efecto secundario adverso que puede producirse debido a una concentración demasiado alta. También puede tener un efecto conservante. Por tanto, para el anticuerpo que tiene una alta actividad fisiológica, se empleará más cantidad del excipiente. Por otro lado, para cualquier principio activo que muestra una menor actividad fisiológica, se empleará una cantidad menor del excipiente. En general, la cantidad de excipiente en la composición será de entre aproximadamente el 50% en peso (p) y el 99,9% p de la composición total. Si el anticuerpo muestra una actividad fisiológica particularmente baja, la cantidad de excipiente puede ser de tan sólo el 1% p. Por otro lado, para un anticuerpo que tiene una actividad fisiológica particularmente alta, la cantidad de excipiente puede ser de entre aproximadamente el 98,0% y aproximadamente el 99,9% p. Además, el anticuerpo o los anticuerpos pueden administrarse en forma de un "derivado químico" (una molécula que contiene restos químicos adicionales que no forman parte normalmente de la molécula de base). Tales restos pueden mejorar la solubilidad, semivida, absorción, etc. del agente biológico. Alternativamente, estos restos pueden atenuar los efectos secundarios no deseados del anticuerpo. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir grandes macromoléculas metabolizadas lentamente, tales como proteínas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos) y copolímeros (tales como Sepharose, agarosa, celulosa y similares funcionalizadas con látex), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados lipídicos (tales como liposomas o gotitas de aceite). Adicionalmente, estos portadores pueden funcionar como agentes inmunoestimulantes (es decir, adyuvantes). Para la administración parenteral, pueden administrarse agentes de la descripción como dosificaciones inyectables de una disolución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un portador farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua, aceites, solución salina, glicerol o etanol. Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensoactivos, sustancias de tamponamiento del pH y similares en las composiciones. Otros componentes de las composiciones farmacéuticas son los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite mineral. En general, glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol son portadores líquidos preferidos, particularmente para disoluciones inyectables.

La formulación de anticuerpo puede estar en forma líquida o forma sólida. Generalmente, una formulación sólida está liofilizada y se pone en disolución antes de la administración para dosificación o bien individual o bien múltiple. Las formulaciones no deben exponerse a temperatura o pH extremos para evitar la desnaturalización térmica. Por tanto, resulta esencial formular una composición de anticuerpo de la presente descripción dentro de un intervalo de pH biológicamente relevante. Se recomienda una disolución tamponada para mantener un intervalo de pH apropiado durante el almacenamiento, especialmente para formulaciones líquidas almacenadas durante periodos de tiempo más prolongados entre la formulación y la administración. Hasta la fecha, tanto las formulaciones líquidas como las sólidas requieren almacenamiento a menores temperaturas (habitualmente de 2-8°C) con el fin de conservar la estabilidad durante periodos más prolongados. Las composiciones de anticuerpo formuladas, especialmente formulaciones líquidas, pueden contener un agente bacteriostático para prevenir o minimizar la proteólisis durante el almacenamiento, incluyendo, pero sin limitarse a, concentraciones eficaces (habitualmente <1% p/v) de alcohol bencílico, fenol, m-cresol, clorobutanol, metilparabeno y/o propilparabeno. Un agente bacteriostático puede estar contraindicado para algunos pacientes. Por tanto, puede reconstituirse una formulación liofilizada para dar una disolución que o bien contiene o bien no contiene un componente de este tipo. Pueden añadirse componentes adicionales a una formulación de anticuerpo o bien sólida o bien líquida tamponada, incluyendo, pero sin limitarse a, azúcares como crioprotector (incluyendo, pero sin limitarse necesariamente a, polihidroxihidrocarburos tales como sorbitol, manitol, glicerol y dulcitol y/o disacáridos tales como sacarosa, lactosa, maltosa o trehalosa) y, en algunos casos, una sal relevante (incluyendo, pero sin limitarse a, NaCl, KCl o LiCl). Tales formulaciones de anticuerpo, especialmente formulaciones líquidas destinadas al almacenamiento a largo plazo, se basarán en un intervalo útil de osmolaridad total para fomentar la estabilidad a largo plazo a una temperatura de 2-8°C o mayor, al tiempo que también se hace que la formulación sea útil para la inyección parenteral. Un intervalo eficaz de osmolaridad total (el número total de moléculas en disolución) es de desde aproximadamente 200 mOs/l hasta aproximadamente

800 mOs/l. Resultará evidente que la cantidad de un crioprotector, tal como sacarosa o sorbitol, dependerá de la cantidad de sal en la formulación con el fin de que la osmolaridad total de la disolución permanezca dentro de un intervalo apropiado. Por tanto, una formulación libre de sal puede contener desde aproximadamente el 5% hasta aproximadamente el 25% de sacarosa, con un intervalo preferido de sacarosa de desde aproximadamente el 7% hasta aproximadamente el 15%, siendo una concentración especialmente preferida de sacarosa en una formulación libre de sal de desde el 10% hasta el 12%. Alternativamente, una formulación a base de sorbitol libre de sal puede contener sorbitol dentro de un intervalo de desde aproximadamente el 3% hasta aproximadamente el 12%, con un intervalo preferido de desde aproximadamente el 4% hasta el 7%, y un intervalo especialmente preferido es de desde aproximadamente el 5% hasta aproximadamente el 6% de sorbitol en una formulación libre de sal. Evidentemente, las formulaciones libres de sal justificarán intervalos aumentados del crioprotector respectivo con el fin de mantener niveles de osmolaridad eficaces. Estas formulaciones también pueden contener un catión divalente (incluyendo, pero sin limitarse necesariamente a, $MgCl_2$, $CaCl_2$ y $MnCl_2$); y un tensioactivo no iónico (incluyendo, pero sin limitarse necesariamente a, polisorbato-80 (Tween 80[®]), polisorbato-60 (Tween 60[®]), polisorbato-40 (Tween 40[®]) y polisorbato-20 (Tween 20[®]), alquil éteres de polioxietileno, incluyendo, pero sin limitarse a, Brij 58[®], Brij 35[®], así como otros tales como Triton X-100[®], Triton X 114[®], NP40[®], Span 85 y la serie Pluronic de tensioactivos no iónicos (por ejemplo, Pluronic 121)). Cualquier combinación de tales componentes, incluyendo la probable inclusión de un agente bacteriostático, puede ser útil para cumplir con las formulaciones que contienen anticuerpo de la presente descripción. La composición de anticuerpo de la presente descripción también puede ser un "derivado químico", que describe un anticuerpo que contiene restos químicos adicionales que no forman parte normalmente de la molécula de inmunoglobulina (por ejemplo, pegilación). Tales restos pueden mejorar la solubilidad, semivida, absorción, etc. de la molécula de base. Alternativamente, los restos pueden atenuar efectos secundarios no deseados de la molécula de base o reducir la toxicidad de la molécula de base.

En la técnica se conocen numerosos ejemplos de diversos portadores, diluyentes, excipientes y similares y se dan a conocer en referencias citadas en el presente documento, así como Remington's Pharmaceutical Sciences (18^a ed.; Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990), cuyo contenido se incorpora en el presente documento como referencia. En resumen, se apreciará que pueden incorporarse portadores, excipientes y otros agentes adecuados para formular las composiciones farmacéuticas para proporcionar una transferencia, administración, tolerancia y similares mejoradas. Los métodos de incorporar el agente biológico y/o principio(s) activo(s) adicional(es) en el portador los conoce un experto habitual en la técnica y dependen de la naturaleza del agente biológico y la naturaleza del portador seleccionado por una persona que pone en práctica la presente descripción. La unión iónica, encapsulación en gel o atrapamiento físico dentro del portador, iontoforesis y empapamiento del portador en una disolución del agente biológico, son ejemplos adecuados contemplados en la formulación de una composición farmacéutica que va a usarse para poner en práctica los métodos de tratamiento dados a conocer. Alternativamente, el portador puede ser poco más que un diluyente para el agente biológico. Estas formulaciones pueden incluir, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, gelatina, ceras, aceites, lípidos, bases de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite, emulsiones de Carbowax (polietilenglicoles de una variedad de pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen Carbowax. El régimen de dosificación usando los compuestos de la presente descripción se selecciona según una variedad de factores incluyendo tipo, especie, edad, peso, sexo y estado médico del paciente; la gravedad del estado que va a tratarse; la vía de administración; la función renal, hepática y cardiovascular del paciente; y el agente biológico particular del mismo empleado. Un médico o veterinario con experiencia habitual puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz del fármaco requerida para prevenir, contrarrestar o detener la progresión del estado. La precisión óptima en alcanzar concentraciones de fármaco dentro del intervalo que proporciona eficacia sin toxicidad requiere un régimen basado en la cinética de la disponibilidad del fármaco en sitios diana. Esto implica tener en cuenta la distribución, el equilibrio y la eliminación de un fármaco. Cualquiera de las formulaciones anteriores puede ser apropiada en tratamientos y terapias según la presente descripción, siempre que el principio activo en la formulación no se inactive por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden administrarse al huésped mediante cualquier manera, estrategia y/o combinación disponible en la técnica en cantidades suficientes para ofrecer un tratamiento terapéutico frente a la enfermedad de Alzheimer. Estas composiciones pueden proporcionarse al individuo por una variedad de vías conocidas en la técnica, especialmente vías parenterales, incluyendo, pero sin limitarse de ningún modo a, las vías parenterales tales como administración intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.); o subcutánea (s.c.), siendo la administración i.v. la norma dentro de la técnica de la administración de anticuerpos terapéuticos. Estas composiciones pueden administrarse como dosis independientes o múltiples (es decir, administración del anticuerpo en momentos escalonados manteniendo las condiciones estériles de la formulación a lo largo del régimen de tratamiento). El régimen de dosificación usando los compuestos de la presente descripción se selecciona según una variedad de factores incluyendo tipo, especie, edad, peso, sexo y estado médico del paciente (tal como un paciente humano); la gravedad del estado que va a tratarse; la vía de administración; la función renal, hepática y cardiovascular del paciente; y el anticuerpo particular del mismo empleado. Un médico o veterinario con experiencia habitual puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad terapéutica eficaz del anticuerpo. La precisión óptima en alcanzar concentraciones de anticuerpo dentro del intervalo que proporciona eficacia sin toxicidad requiere un régimen basado en la cinética de la disponibilidad del fármaco en sitios diana. Esto implica tener en cuenta la distribución, el equilibrio y la eliminación de un fármaco. Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse solos a dosificaciones apropiadas. Alternativamente, puede ser deseable la administración conjunta o la

administración secuencial de otros agentes. Será posible presentar un régimen de dosificación terapéutico para los anticuerpos de la presente descripción junto con la administración de regímenes profilácticos o terapéuticos alternativos. Un régimen de dosificación eficaz variará dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Para la administración de un anticuerpo de tipo 13C3, la dosificación oscila entre aproximadamente 0,0001 y 100 mg/kg, y más habitualmente entre 0,01 y 5 mg/kg del peso corporal del huésped. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, se producen depósitos de amiloide en el cerebro, también pueden administrarse agentes de la descripción junto con otros agentes que aumentan el paso de los agentes de la descripción a través de la barrera hematoencefálica.

Otro aspecto referente a regímenes de dosificación y administración para una composición de anticuerpo de tipo 13C3 de la presente descripción se refiere a la administración de fármaco a través de vías parenterales, que pueden incluir dispositivos no inyectables e inyectables. Normalmente, las composiciones inyectables se preparan como disoluciones o suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para su disolución, o suspensión, en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas o micropartículas tales como polilactida, poliglicolida, o copolímero para un efecto adyuvante potenciado, tal como se comentó anteriormente (véase Langer, 1990, *Science* 249: 1527-1523; y Hanes, 1997, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28: 97-119). Los agentes de esta descripción pueden administrarse en forma de una preparación de implante o inyección de depósito que puede formularse de tal manera que se permite una liberación sostenida o pulsátil del principio activo.

Las realizaciones específicas incluyen microesferas de PLGA, tal como se comenta en el presente documento y tal como se conoce adicionalmente en la técnica, así como vehículos no degradables a base de polímero que comprenden poli(etileno-co-acetato de vinilo) (PEVAc). Adicionalmente, se revisa la liberación controlada y administración localizada de productos terapéuticos basados en anticuerpo en Grainger, *et al.*, 2004, *Expert Opin. Biol. Ther.* 4(7): 1029-1044, incorporado en el presente documento como referencia en su totalidad. Las microcápsulas adecuadas que pueden encapsular el anticuerpo también pueden incluir microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo) preparadas mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial. Véase la publicación PCT WO 99/24061 titulada "Method for Producing IGF-1 Sustained-Release Formulations", en la que se encapsula una proteína en microesferas de PLGA, incorporándose esta referencia en el presente documento como referencia en su totalidad. Además, también pueden usarse microemulsiones o sistemas de administración de fármacos coloidales tales como liposomas y microesferas de albúmina. Otras composiciones de liberación sostenida preferidas emplean un bioadhesivo para retener el anticuerpo en el sitio de administración. Tal como se indicó anteriormente, la formulación de liberación sostenida puede comprender un polímero biodegradable en el que se dispone el anticuerpo, lo que puede proporcionar una liberación no inmediata. Pueden describirse dispositivos no inyectables en el presente documento como "implante", "implante de depósito farmacéutico", "implante de depósito", "depósito no inyectable" o algún término similar de este tipo. Los implantes de depósito comunes pueden incluir, pero no se limitan a, dispositivos de polímeros sólidos biodegradables y no biodegradables (tales como un dispositivo de polímero extendido o en forma de vástago coaxial), así como numerosos sistemas de bombeo también conocidos en la técnica. Los dispositivos inyectables se dividen en inyecciones en bolo (liberación y disipación del fármaco tras la inyección), e inyecciones de repositorio o depósito, que proporcionan un depósito de almacenamiento en el sitio de inyección, permitiendo la liberación sostenida del agente biológico a lo largo del tiempo. Un implante de depósito puede anclarse quirúrgicamente al punto de administración para proporcionar un depósito adecuado para la liberación prolongada del anticuerpo a lo largo del tiempo. Un dispositivo de este tipo podrá portar la formulación de fármaco en cantidades tales como se requieran de manera terapéutica o profiláctica para el tratamiento a lo largo del periodo preseleccionado. El implante de depósito también puede proporcionar protección a la formulación frente a la degradación mediante procesos corporales (tales como proteasas) en la duración del tratamiento. Tal como se conoce en la técnica, el término "liberación sostenida" se refiere a la liberación gradual (continua o discontinua) de un agente de este tipo a partir de la matriz de polímero en bloque a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. Independientemente del dispositivo específico, la liberación sostenida de la composición de anticuerpo de tipo 13C3 dará como resultado concentraciones locales, biológicamente eficaces del anticuerpo. Una liberación sostenida del/de los agente(s) biológico(s) se producirá durante un periodo de un único día, varios días, una semana o más; pero lo más probablemente durante un mes o más, o hasta aproximadamente seis meses, dependiendo de la formulación. Los polímeros naturales o sintéticos conocidos en la técnica serán útiles como implante de depósito debido a características tales como cinética de degradación versátil, seguridad y biocompatibilidad. Estos copolímeros pueden manipularse para modificar la farmacocinética del principio activo, proteger al agente frente al ataque enzimático, así como a degradarse a lo largo del tiempo en el sitio de unión o inyección. El experto entenderá que existen extensas enseñanzas en la técnica para manipular las propiedades de estos copolímeros, incluyendo los procedimientos de producción respectivos, catalizadores usados y peso molecular final de la inyección de depósito o el implante de depósito de liberación sostenida. Los polímeros naturales incluyen, pero no se limitan a, proteínas (por ejemplo, colágeno, albúmina o gelatina); polisacáridos (celulosa, almidón, alginatos, quitina, quitosano, ciclodextrina, dextrano, ácido hialurónico) y lípidos. Los polímeros sintéticos biodegradables pueden incluir, pero no se limitan a, diversos poliésteres, copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de gamma-etilo (Sidman *et al.*, 1983, *Biopolymers* 22:547-556), polilactidas (PLA); patente estadounidense n.º 3.773.919 y documento EP 058.481), polilactato-poliglicolato (PLGA) tal como polilactida-co-glicolida (véanse, por ejemplo, las patentes

estadounidenses n.^{os} 4.767.628 y 5.654.008), poliglicolida (PG), conjugados de polietilenglicol (PEG) de poli(α -hidroxiácidos), polioroésteres, poliaspirinas, polifosfágenos, vinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico) (PVA), PVA-g-PLGA, copolímero de PEGT-PBT (Polyactive), metacrilatos, poli(N-isopropilacrilamida), PEO-PPO-PEO (Pluronic), copolímeros de PEO-PPO-PAA, PLGA-PEO-PLGA, polioroésteres (POE), o cualquier combinación de los mismos, tal como se describió anteriormente (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.^o 6.991.654 y la solicitud de patente estadounidense n.^o 20050187631, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad), hidrogeles (véase, por ejemplo, Langer *et al.*, 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277; Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), etileno-acetato de vinilo no degradable (por ejemplo, discos de etileno-acetato de vinilo y poli(etileno-co-acetato de vinilo)), copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como Lupron DepotTM, poli(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico) (documento EP 133.988), geles de ácido hialurónico (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.^o 4.636.524), suspensiones de ácido alginico, polioroésteres (POE), y similares. La polilactida (PLA) y sus copolímeros con glicolida (PLGA) se conocen bien en la técnica desde la comercialización de Lupron DepotTM, aprobado en 1989 como primera formulación parenteral de liberación sostenida que usa polímeros de PLA. Los ejemplos adicionales de productos que usan PLA y PLGA como excipientes para lograr la liberación sostenida del principio activo incluyen Atridox (PLA; enfermedad periodontal), Nutropin Depot (PLGA; con hGH) y Trelstar Depot (PLGA; cáncer de próstata). Otros polímeros sintéticos incluyen, pero no se limitan a, poli(ϵ -caprolactona), poli-3-hidroxibutirato, poli(ácido β -málico) y polidioxanona]; polianhídridos, poliuretano (véase el documento WO 2005/013936), poliamidas, ciclodextranos, polioroésteres, alcohol n-vinílico, poli(óxido de etileno)/poli(tereftalato de etileno), polifosfaceno, polifosfato, polifosfonato, polioroéster, policianoacrilato, polietilenglicol, polidihidropirano y poliactal. Los dispositivos no biodegradables incluyen, pero no se limitan a, diversos derivados de celulosa (carboximetilcelulosa, acetato de celulosa, acetato-propionato de celulosa, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa), implantes a base de silicio (polidimetilsiloxano), polímeros acrílicos (polimetacrilato, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de hidroxietilo), así como polietileno-co-(acetato de vinilo), poloxámero, polivinilpirrolidona, poloxamina, polipropileno, poliamida, poliactal, poliéster, poli(etileno-clorotrifluoroetileno), politetrafluoroetileno (PTFE o "TeflonTM"), caucho de estireno-butadieno, polietileno, polipropileno, poli(óxido de fenileno)-poliestireno, poli- α -cloro-p-xileno, polimetilpenteno, polisulfona y otros polímeros bioestables relacionados. Los portadores adecuados para formulaciones de depósito de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, microesferas, películas, cápsulas, partículas, geles, recubrimientos, matrices, obleas, pastillas u otras composiciones de administración farmacéutica. Anteriormente se describieron ejemplos de tales formulaciones de liberación sostenida. Véanse también las patentes estadounidenses n.^{os} 6.953.593; 6.946.146; 6.656.508; 6.541.033; y 6.451.346, cuyo contenido se incorpora en el presente documento como referencia. La forma de dosificación debe poder transportar la formulación de fármaco en cantidades y concentración tales como se requieran terapéuticamente para el tratamiento a lo largo del periodo preseleccionado, y deben proporcionar protección suficiente a la formulación frente a la degradación mediante procesos corporales en la duración del tratamiento. Por ejemplo, la forma de dosificación puede estar rodeada por una parte exterior compuesta por un material que tiene propiedades para proteger frente a la degradación mediante procesos metabólicos y el riesgo, por ejemplo, de fuga, agrietamiento, rotura o deformación. Esto puede impedir la expulsión del contenido de la forma de dosificación de una manera no controlada con tensiones a las que se someterá durante el uso, por ejemplo, debido a fuerzas físicas ejercidas sobre el dispositivo de liberación de fármaco como resultado del movimiento normal de la articulación y otros movimientos del sujeto o, por ejemplo, en dispositivos de administración de fármaco por convección, fuerzas físicas asociadas con presión generada dentro del depósito. El depósito de fármaco u otros medios para sostener y contener el fármaco también deben fabricarse de un material tal como para evitar reacciones no deseadas con la formulación de agente activo, y preferiblemente es biocompatible (por ejemplo, cuando la forma de dosificación se implanta, es sustancialmente no reactiva con respecto a los líquidos corporales o al organismo de un sujeto). Generalmente, el/los agente(s) biológico(s) respectivo(s) se administra(n) a un individuo durante de al menos 12 horas a al menos una semana, y lo más probablemente mediante un implante diseñado para administrar un fármaco durante al menos 10, 20, 30, 100 días o al menos 4 meses, o al menos 6 meses o más, según se requiera. El anticuerpo de tipo 13C3 puede administrarse a velocidades en volumen relativamente bajas tales como, por ejemplo, desde aproximadamente 0,001 ml/día hasta 1 ml/día para minimizar la alteración tisular o el traumatismo cerca del sitio en el que se libera la formulación. La formulación puede liberarse a una velocidad, dependiendo del/de los agente(s) biológico(s) específico(s), a una dosis baja, de, por ejemplo, desde aproximadamente 0,01 μ g/h o 0,1 μ g/h, 0,25 μ g/h, 1 μ g/h, generalmente hasta aproximadamente 200 μ g/h, o la formulación se administra a una velocidad en volumen baja, por ejemplo, una velocidad en volumen de desde aproximadamente 0,001 ml/día hasta aproximadamente 1 ml/día, por ejemplo, de 0,01 microgramos al día a aproximadamente 20 miligramos al día. La dosificación depende de varios factores tales como potencia, biodisponibilidad y toxicidad del principio activo (por ejemplo, anticuerpo de IgG) usado y los requisitos del sujeto.

Estos y otros objetos, ventajas y características de la presente descripción resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras leer los detalles de la metodología y las composiciones tal como se exponen de manera más completa a continuación.

Ejemplos

65 Ejemplo 1: preparación de la forma protofibrilar de beta-amiloide (A β ₄₂)

Se prepararon péptidos sintéticos de A β ₄₂ (American Peptide Company, Inc., CA) según el método descrito por Fezoui *et al.* (Fezoui, *et al.* Amyloid 7(3): 166-178. (2000)). En resumen, se disolvió A β ₄₂ liofilizado en NaOH 2 mM a una concentración de 1 mg/ml (pH~10,5) seguido por sonicación y liofilización. Se disolvió A β tratado con NaOH en agua a una concentración de 1 mg/ml y se filtró con un filtro ULTRAFREE-MC de 0,22 μ m (Millipore, MA). Se tamponó una disolución de péptido a 0,5 mg/ml a la concentración final de fosfato 50 mM; cloruro de sodio 100 mM y se incubó durante 4 h a temperatura ambiente. Para separar la forma protofibrilar de las proteínas de bajo peso molecular, se fraccionó el sobrenadante usando cromatografía de exclusión molecular. Después se almacenaron fracciones de SEC purificadas a 4°C.

Se representa que diversas formas de la proteína A β ₄₂ muestran su capacidad como monómero o dímero para asociarse entre sí para formar un oligómero de alto peso molecular (protofibrilla) (figura 1). Una agregación adicional de las protofibrillas solubles crea una forma insoluble de la proteína, mientras que las protofibrillas pueden disociarse de nuevo para dar una forma de menor peso molecular.

Para purificar la forma protofibrilar de A β a partir de las proteínas de bajo peso molecular, se fraccionaron muestras con un sistema de cromatografía AKTA usando una columna de exclusión molecular Superdex 75. La figura 2A muestra que, sin incubar los péptidos sintéticos de AD 42 a temperatura ambiente, no hay agregación de oligómeros para formar las protofibrillas. La figura 2B ilustra que tras una incubación de 4 h de los péptidos sintéticos de A β ₄₂, una purificación por SEC posterior muestra una fracción de protofibrilla definitiva.

Ejemplo 2: generación de anticuerpos monoclonales con especificidad por A β protofibrilar

Se crearon los anticuerpos 13C3, 19A6 y 1D1 inmunizando ratones Balb/c con la proteína A β fibrilar usando un protocolo conocido en la técnica. (Harlow, *et al.* Cold Spring Harbor Laboratory (1988)). Se extirparon los bazos y se fusionaron con células de mieloma SP2 en varias placas de 96 pocillos. Se monitorizaron los cultivos de fusión para determinar el crecimiento y se examinaron los sobrenadantes para determinar su capacidad para unirse a la fracción protofibrilar mediante inmunoensayos de captura de anticuerpos.

Ejemplo 3: caracterización de anticuerpos monoclonales con especificidad por A β protofibrilar

Se usaron ensayos de captura de anticuerpos para caracterizar adicionalmente los anticuerpos monoclonales producidos a partir de los hibridomas (13C3, 19A6 y 1D1). A placas de microtitulación se les añadieron 50 μ l de una disolución de proteína A β ₄₂ protofibrilar a 2 μ g/ml a cada pocillo y se incubaron las placas a 4°C durante la noche. Tras la incubación, se retiró la disolución de antígeno residual y se lavaron con disolución PBS. Se añadieron diluciones en serie de los sobrenadantes de hibridoma a las placas que contenían el antígeno unido y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se retiró esta disolución de anticuerpo primario y se lavaron de nuevo los pocillos con disolución PBS. A continuación se añadió un anticuerpo secundario marcado con enzima y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras retirar la disolución de anticuerpo secundario, se añadió a la reacción un sustrato cromogénico específico para la enzima conjugada, y la detección del anticuerpo capturado proporcionó resultados cuantitativos.

Adicionalmente, cambiando el reactivo secundario por anticuerpos anti-inmunoglobulina específicos de isotipo, se identificó el isotipo de inmunoglobulina particular de cada anticuerpo monoclonal. En estos experimentos, se usaron anticuerpos anti-A β ₄₂ disponibles comercialmente para comparar la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales 13C3, 19A6 y 1D1.

Las figuras 3A y B ilustran las formas protofibrilar (PF) y de bajo peso molecular (LMW) del péptido A β ₄₂ usado para someter a prueba la especificidad del anticuerpo 13C3 en inmunoensayos de captura de anticuerpos. Específicamente, la figura 3A ilustra el gráfico generado a partir de ELISA que muestran que el anticuerpo 13C3 es específico para la forma protofibrilar (PF) de A β ₄₂ y no reconoce las formas de bajo peso molecular (LMW) de la proteína. La figura 3B ilustra los datos de ELISA con el anticuerpo 4G8 disponible comercialmente, que muestran que reconoce las formas tanto de bajo peso molecular como protofibrilar de la proteína A β ₄₂.

Ejemplo 4: especificidad de anticuerpos monoclonales por la forma protofibrilar de A β ₄₂ usando resonancia de plasmón superficial (BIACORE).

Se inmovilizaron los anticuerpos monoclonales purificados indicados en la tabla 1 (a continuación) en un chip sensor de BIAcore según protocolos publicados. (Nice, *et al.* BioEssays 21: 339-352 (1999)). La alta sensibilidad de la respuesta óptica de BIAcore cuantifica un cambio en la reflectividad y se genera una respuesta de línea base para el ligando solo. Se realiza el análisis de interacción a medida que se inyectan los analitos, la forma LMW o la forma PF de A β ₄₂, en disolución sobre el chip sensor y el cambio en la resonancia de plasmón superficial genera una respuesta que identifica la especificidad de la capacidad de cada anticuerpo para unirse a A β ₄₂ LMW y PF. Tanto los anticuerpos 13C3 como 19A6 se unieron a la forma PF de A β ₄₂ con mayor especificidad que a la forma LMW. De todos los anticuerpos usados en este experimento, los anticuerpos disponibles comercialmente mostraron mayor

especificidad por Aβ₄₂ LMW con respecto a la forma PF de Aβ₄₂, tal como indicó la razón de unión a PF/unión a LMW.

Tabla 1

Nombre	Epítipo	Isotipo	Fuente	Análisis de unión mediante BIACORE		
				LMW	PF	Razón (PF/LMW)
1D1	estructura	IgG ₁	Ravetech	23,2	122,3	5,3
13C3	estructura	IgG ₁	Ravetech	25	124,8	5,0
19A6	estructura	IgG ₃	Ravetech			
3D6	Aβ 1-5	IgG _{2b}	Elan Pharmaceuticals	424,6	402,7	0,9
4G8	Aβ 17-22	IgG _{2b}	Senetek Inc.	228,6	340,3	1,5
6E10	Aβ 3-8	IgG _{2b}	Senetek Inc.	400,1	541,1	1,4
82E1	Aβ 1-17	IgG ₁	IBL	69,9	68,4	1,0

5 El análisis por resonancia de plasmón superficial mostró mediante sensograma que 13C3 (figura 4B) no se une a las formas LMW de la proteína Aβ₄₂. Sin embargo, 4G8 (figura 4A) muestra una curva de asociación/disociación convencional para la proteína Aβ₄₂ LMW. El control de isotipo de anticuerpo, IgG₁ (figura C), no se une a Aβ LMW igual de bien. En estos experimentos se usaron sistemas de BIACore automatizados, que usan el principio de
10 detección de resonancia de plasmón superficial. Los datos de especificidad de unión para el anticuerpo 19A6 mostraron que 19A6 tenía una razón de unión de 5,8, lo cual es similar a la de 13C3 a una razón de 5,3.

Ejemplo 5: mapeo de epítipos del anticuerpo 13C3

15 Se llevó a cabo el mapeo de los epítipos de 13C3, 1D1 y 19A6 usando el sistema RepliTope Microarrays (JPT Peptide Technologies GmbH) según un protocolo publicado. (Korth, *et al.* 390: 74 (1997)). Cada punto en el microalineamiento contiene un péptido de 13 aminoácido Aβ₄₂ en el que cada desplazamiento de posición en el microalineamiento representa un desplazamiento de aminoácido (del extremo N-terminal al extremo C-terminal), es decir SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 51; y SEQ ID NO: 52. A continuación se indican los péptidos y su
20 secuencia de aminoácidos exacta, correspondiente a su posición el alineamiento de portaobjetos. Una vez fijados los péptidos al sistema RepliTope Microarray, se incuban las muestras con el anticuerpo 13C3 y después se marcan posteriormente con un anticuerpo secundario que está conjugado con una etiqueta de quimioluminiscencia de elección. Los puntos que producen una señal representan los sitios de unión a epítipo en la proteína por el anticuerpo.

- Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His (SEQ ID NO: 23)
- Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His (SEQ ID NO: 24)
- Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln (SEQ ID NO: 25)
- Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys (SEQ ID NO: 26)
- Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu (SEQ ID NO: 27)
- His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val (SEQ ID NO: 28)
- Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe (SEQ ID NO: 29)
- Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe (SEQ ID NO: 30)
- Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala (SEQ ID NO: 31)
- Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu (SEQ ID NO: 32)
- Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp (SEQ ID NO: 33)
- Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val (SEQ ID NO: 34)
- His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly (SEQ ID NO: 35)
- His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser (SEQ ID NO: 36)
- Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn (SEQ ID NO: 37)
- Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys (SEQ ID NO: 38)
- Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly (SEQ ID NO: 39)
- Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala (SEQ ID NO: 40)
- Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile (SEQ ID NO: 41)
- Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile (SEQ ID NO: 42)
- Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly (SEQ ID NO: 43)
- Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu (SEQ ID NO: 44)
- Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met (SEQ ID NO: 45)
- Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val (SEQ ID NO: 46)
- Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly (SEQ ID NO: 47)
- Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly (SEQ ID NO: 48)
- Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val (SEQ ID NO: 49)
- Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val (SEQ ID NO: 50)
- Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile (SEQ ID NO: 51)
- Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala (SEQ ID NO: 52)

25 La figura 5A ilustra una transferencia por puntos a partir de un experimento de RepliTope Microarray que identifica los epítipos de los anticuerpos, 13C3, 1D1 y 4G8, en el péptido Aβ₁₋₄₂. El anticuerpo unido se representa mediante

una señal quimioluminiscente. La figura 5B ilustra la secuencia de aminoácidos de A β ₁₋₄₂ que muestra los segmentos de polipéptido de los epítomos de 13C3 a medida que se producen en la secuencia. El anticuerpo 1D1 muestra los mismos epítomos que 13C3, mientras que el anticuerpo 4G8 comercial identifica un epítomo diferente.

5 Ejemplo 6: caracterización de la especificidad de 13C3

La figura 6 ilustra fracciones procedentes de cromatografía de exclusión molecular de los sobrenadantes de la línea celular 7PA2, una línea celular que secreta oligómero de A β . Se usaron ensayos de captura de anticuerpos para caracterizar adicionalmente la unión del anticuerpo 13C3 con las fracciones protofibrilar y de bajo peso molecular de 7PA2 purificado mediante SEC. A placas de microtitulación, se les añadieron 100 μ l de una dilución 1:200 de cada fracción a cada pocillo y se incubaron las placas a 4°C durante la noche. Tras la incubación, se retiró la disolución de antígeno residual y se lavaron con disolución PBS. Se añadieron diluciones en serie de los sobrenadantes de 13C3 a las placas que contenían el antígeno unido y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se retiró esta disolución de anticuerpo primario y se lavaron de nuevo los pocillos con disolución PBS. A continuación se añadió un anticuerpo secundario marcado con enzima y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras retirar la disolución de anticuerpo secundario, se añadió a la reacción un sustrato cromogénico específico para la enzima conjugada, y la detección del anticuerpo capturado proporcionó resultados cuantitativos. Este ensayo identificó que el anticuerpo 13C3 sólo reconoce específicamente la fracción protofibrilar mientras que el anticuerpo 4G8 reconoce todas las fracciones. La línea celular 7PA2 la proporcionó Dennis J. Selkoe, M.D. en Harvard Medical School.

20 Ejemplo 7: caracterización de la reactividad de 13C3 mediante EM

Se realizó el método de tinción usando un protocolo convencional. (Brenner, *et al.* Biochim. Biophys. Acta 34, 103-110 (1959)). Se aplicó un pequeño volumen (10 microlitros) de una disolución protofibrilar a 0,2 mg/ml a rejillas de formvar recubiertas con carbono (400 de malla) durante 2 min. Después se bloquearon las rejillas en BSA al 1% y se incubaron con el anticuerpo 13C3 seguido por una incubación posterior con un anticuerpo secundario conjugado con oro coloidal. Se sometieron las muestras a tinción negativa colocando 2 gotas sucesivas de ácido fosfotúngstico al 2% durante 30 s cada una. Se eliminó la tinción en exceso con papel de filtro, se secaron las rejillas al aire y se observaron con un microscopio electrónico de transmisión JEOL 100CX a 80 kV. Se grabaron imágenes en negativos Kodak 4489 de gran formato y se digitalizaron en un escáner de lecho plano.

Las imágenes de IEM (microscopía inmunoeléctronica) muestran la especificidad de unión del clon 13C3 de anticuerpo anti-A β a fibras de A β ₄₂ (figuras 7B y 7C), mientras que el anticuerpo de control de isotipo, IgG₁, no muestra unión (figura 7A). El anticuerpo secundario está conjugado con una partícula de oro coloidal.

35 Ejemplo 8: tratamiento con 13C3 de un modelo de ratón de EA humana

Se usó el anticuerpo monoclonal 13C3 para tratar placas de A β en un modelo de ratón de enfermedad de Alzheimer, TgCRND8. El ratón contiene el transgén de ADNc APP695 humano, que acelera la deposición de placas de amiloide A β en el cerebro de ratón, que aparecen en el plazo de 1 mes de edad. A un grupo de muestra de 5 ratones TgCRND8 de cinco semanas de edad se les administraron inmunizaciones con el anticuerpo monoclonal 13C3 a una concentración de 10 mg/kg de ratón una vez a la semana en una duración de siete semanas. A un segundo grupo de 5 ratones TgCRND8 se les administró el ciclo de tratamiento, sin embargo se administró un anticuerpo IgG₁ de control de isotipo. Se repitieron los experimentos con tratamientos dos veces a la semana en lugar de una vez a la semana.

Tanto los animales de control como los de experimentación se sacrificaron a las 12 semanas de edad. Preparaciones histológicas de los cerebros revelaron reducciones de las placas de A β en los ratones tratados con 13C3.

Se trataron secciones en serie de cerebros crioconservados de ratones TgCRND8 con los anticuerpos monoclonales 13C3 o IgG₁.

Las figuras 8A y 8B ilustran las diferencias en el número de placas de amiloide A β entre cada anticuerpo respectivo.

Pruebas de la T estadísticas muestran que el tratamiento con el anticuerpo 13C3 una vez a la semana reduce las placas de amiloide A β en el modelo de enfermedad de Alzheimer (figura 9A). Sin embargo, los tratamientos dos veces a la semana (figura 9B) muestran el mismo nivel de reducción de placas.

60 Todos los ratones TgCRND8 anteriores se obtuvieron del Dr. David Westaway de la Universidad de Toronto.

Ejemplo 9: caracterización molecular de las regiones variables de AcM 13C3

Se clonaron la región variable de cadena pesada de IgG y la región de cadena ligera Kappa de IgG a partir del hibridoma 13C3. Se analizaron las secuencias de cadena tanto pesada como ligera (figura 10) usando VBASE2

(<http://www.vbase2.org>), una base de datos de genes variables de línea germinal a partir de los loci de inmunoglobulina de ser humano y de ratón extraídos de las bibliotecas de datos EMBL-Bank y Ensembl. (Retter *et al.* Nucleic Acids Res. 33:D671-4 (2005)). Los resultados del análisis identificaron que las regiones variables de cadena tanto pesada como ligera eran de una inmunoglobulina recién identificada pero tenían una identidad del 73% y el 81%, respectivamente, con respecto a otras regiones variables de inmunoglobulina en la base de datos. También se identificaron en estas secuencias, con respecto a estas bases de datos, las regiones de entramado (FWR) y las regiones determinantes de complementariedad (CDR). Los resultados sólo variaron ligeramente cuando se analizaron las secuencias con respecto a bases de datos VBASE, KABAT e IMGT/IGM.

10 Ejemplo 10: la administración periférica en dosis única de 13C3 en ratones transgénicos para APP no conduce a un aumento de A β en plasma al contrario que la administración del anticuerpo 3D6 de referencia

15 A ratones transgénicos para APP (Thy APPSL, 10-14 semanas de edad) se les inyectó por vía intraperitoneal una dosis de 10 mg/kg (es decir, 300 μ g/ratón) de los anticuerpos 13C3, una IgG₁ de control (DM4, que no reconoce A β) y un anticuerpo anti-A β de referencia, 3D6, que reconoce todos los conformeros de A β . Se cuantificó el A β en plasma a tiempo cero antes de la inyección, a las 6 h, 24 h y 7 días tras la inyección en los mismos ratones. Se realizó la cuantificación de A β en plasma con un inmunoensayo usando pares de anticuerpos anti-A β que no interferían en la unión de 13C3 ó 3D6 a A β .

20 La administración de 3D6, un anticuerpo frente a todos los conformeros de A β , conduce a un gran aumento de A β en plasma, probablemente protegiendo las moléculas de A β frente a la degradación. Este efecto se usó para sugerir la hipótesis de posible "sumidero periférico" como mecanismo de acción de la inmunoterapia anti-A β (Demattos *et al.*, 2001, PNAS 17:8850). Al contrario que 3D6, la administración de 13C3 no conduce a ningún aumento de los niveles de A β en plasma. Esto concuerda con las propiedades de 13C3, un anticuerpo que es específico para las formas protofibrilares de A β y no reconoce las formas solubles mono u oligoméricas del péptido A β . Estas formas son las que están probablemente presentes en plasma.

25 Ejemplo 11: 13C3 reconoce placas neuríticas de amiloide humanas (agregadas) en cerebros con EA, pero no los depósitos de A β difusos al contrario que el anticuerpo anti-a β 3D6 de referencia

30 Se realizaron estudios de inmunohistoquímica con los anticuerpos 13C3 y 3D6 con secciones de cerebro humano en donde se diagnosticó enfermedad de Alzheimer usando técnicas convencionales. Se detectó inmunotinción de anticuerpo con un cromógeno DAB (figura 12). 13C3 marca los depósitos de amiloide con una morfología típica de placas neuríticas de amiloide maduras (también denominadas placas densas) con un núcleo muy denso rodeado por un halo más ligero o para las placas más grandes una tinción muy intensa. En secciones de cerebro adyacentes, 35 3D6 tiñe muchos más objetos que 13C3 tal como se observa a un aumento menor (figura 12, paneles de la izquierda). Una caracterización adicional a un aumento mayor (figura 12, paneles de la derecha) indicó que 3D6 marca las mismas placas neuríticas de amiloide maduras que 13C3 y, además, numerosos depósitos de amiloide difusos que se han descrito de manera clásica usando inmunomarcaje anti-A β . Las placas difusas no son de naturaleza fibrilar tal como se describe en la bibliografía ya que no pueden detectarse mediante tioflavina S y otros marcadores histológicos de fibrillas (Mann, 1989, Ann. Med. 21:133). Para descartar diferencias en la sensibilidad de los dos anticuerpos, se llevaron a cabo experimentos similares con una concentración superior (20 μ g/ml) de 13C3 y de nuevo no pudieron detectarse depósitos difusos. Estos datos concuerdan con las propiedades de 13C3, un anticuerpo que es específico para las formas protofibrilares de A β y no reconoce las formas solubles mono u oligoméricas del péptido A β , al contrario que 3D6.

Lista de secuencias

50 <110> La Universidad Rockefeller

<120> Anticuerpos específicos para la forma protofibrilar de proteína beta-amiloide

<130> 70413.00057/RU812

55 <140> N/A

<141> 14-11-2008

<150> Documento 60/988.481

<151> 16-11-2007

60

<150> Documento 61/019.747

<151> 08-01-2008

<160> 52

65

ES 2 639 016 T3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 42

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

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

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

10 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

Leu Val Phe Phe
20

20

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 3

Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val
1 5

30

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35

<400> 4

Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe
1 5 10

40

<210> 5

<211> 113

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

45

<400> 5

ES 2 639 016 T3

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 Gly Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser 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 Asn
85 90 95

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

Arg

<210> 6
<211> 339
5 <212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 6

gatgttgatga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctggatca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta ttacattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct atacagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cggacagggt cagtggcagt ggatcagggt cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaaatac atttgttcct 300
10 tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgg 339

<210> 7
<211> 115
15 <212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 7

ES 2 639 016 T3

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Val Ile Ser Thr Lys Tyr Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Val Ser Ser
 115

<210> 8
 <211> 345
 5 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 8

10 caggtccagc tgcagcagtc tgggcctgag ctggtgagggc ctgggggtctc agtgaagatt 60
 tcttgcaagg gttccggcta cacattcact gattatgcta tgcactgggt gaagcagagt 120
 catgcaaaga gtctagagtg gattggagtt attagtacta agtatggtaa gacaaactac 180
 aaccagaagt ttaagggcaa ggccacaatg actggtgaca aatcctccag cacagcctat 240
 atggagcttg ccagattgac atctgaggat tctgccatct attactgtgc aagaggggac 300
 gatggttatt cctgggggtca aggaacctca gtcaccgtct cctca 345

<210> 9
 <211> 26
 15 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 9

ES 2 639 016 T3

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 Gly
 20 25

<210> 10

<211> 17

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 10

Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 1 5 10 15

10 Tyr

<210> 11

<211> 36

<212> PRT

15 <213> *Mus musculus*

<400> 11

Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Ser Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly
 20 25 30

Val Tyr Phe Cys
 35

20 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 12

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

30 <210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

35 <400> 13

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10

40 <210> 14
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

ES 2 639 016 T3

<400> 14

Thr Val Ser
1

5 <210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10 <400> 15

Ser Gln Asn Thr Phe Val Pro Trp Thr
1 5

15 <210> 16
<211> 23
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20 <400> 16

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys
20

25 <210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 17

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

30 Val

<210> 18
<211> 31
<212> PRT
35 <213> Artificial

<220>

<223> una región pesada variable para los anticuerpos 13C3 o de tipo 13C3 aislados

40 <400> 18

Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
1 5 10 15

Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

45 <210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

ES 2 639 016 T3

<400> 19

5 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
10 <213> *Mus musculus*

<400> 20

15 Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala
1 5 10

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20 <400> 21

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

Lys

25 <210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

30 <400> 22

Gly Asp Asp Gly Tyr Ser
1 5

35 <210> 23
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 23

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

<210> 24
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 24

50 Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His
1 5 10

<210> 25
<211> 13
<212> PRT
55 <213> *Homo sapiens*

ES 2 639 016 T3

<400> 25

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

5 <210> 26
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 26

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

15 <210> 27
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 27

Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
1 5 10

25 <210> 28
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 28

30 His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val
1 5 10

35 <210> 29
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 29

40 Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe
1 5 10

45 <210> 30
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 30

50 Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe
1 5 10

55 <210> 31
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 31

Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala
1 5 10

ES 2 639 016 T3

<400> 38

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

5 <210> 39
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 39

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

15 <210> 40
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 40

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala
 1 5 10

25 <210> 41
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 41

30 Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile
 1 5 10

35 <210> 42
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 42

40 Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 1 5 10

45 <210> 43
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 43

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

50 <210> 44
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

55 <400> 44

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

ES 2 639 016 T3

<400> 51

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

5 <210> 52
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 52

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

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal aislado que interacciona específicamente con y muestra una afinidad de al menos 10^6 M^{-1} tal como se mide mediante resonancia de plasmón superficial por un epítipo conformacional de una forma protofibrilar del péptido A β , mediante lo cual el epítipo protofibrilar se representa mediante una región que queda al descubierto de una forma protofibrilar de A β que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 3, que comprende además una cadena ligera variable que comprende una región CDR1 tal como se expone en SEQ ID NO: 13, una región CDR2 tal como se expone en SEQ ID NO: 14 y una CDR3 tal como se expone en SEQ ID NO: 15, y una cadena pesada variable compuesta por una región CDR1 tal como se expone en SEQ ID NO: 20, una región CDR2 tal como se expone en SEQ ID NO: 21 y una CDR3 tal como se expone en SEQ ID NO: 22.
2. Anticuerpo monoclonal aislado según la reivindicación 1, en el que la región que queda al descubierto comprende además la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 4.
3. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 ó 2, que se produce mediante un hibridoma disponible con el n.º de registro ATCC PTA-8830.
4. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además una cadena ligera variable compuesta por la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 5 y una cadena pesada variable compuesta por la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 7.
5. Anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado.
6. Anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano.
7. Método de producción de un anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende:
 - (a) inmunizar un mamífero no humano con la forma protofibrilar del péptido β -amiloide;
 - (b) recoger células B de dicho mamífero;
 - (c) crear hibridomas a partir de las células B recogidas, en el que dichos hibridomas producen anticuerpos; y,
 - (d) seleccionar hibridomas que producen anticuerpos que se unen específicamente a la forma protofibrilar del péptido β -amiloide al tiempo que muestran una afinidad mínima por las formas de monómero o dímero del péptido β -amiloide.
8. Método para cuantificar la cantidad de una forma protofibrilar del péptido β -amiloide en una muestra de tejido o líquido, que comprende:
 - (a) obtener la muestra de tejido o líquido de un sujeto;
 - (b) poner en contacto la muestra de tejido o líquido con un anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o fragmento del mismo que se une específicamente a la forma protofibrilar del péptido β -amiloide al tiempo que muestra una afinidad mínima por formas de bajo peso molecular del péptido β -amiloide; y,
 - (c) cuantificar la cantidad de forma protofibrilar del péptido β -amiloide en la muestra.
9. Kit para detectar la forma protofibrilar del péptido β -amiloide al tiempo que muestra una mayor afinidad por una forma protofibrilar del péptido β -amiloide que por una forma de bajo peso molecular del péptido β -amiloide, que comprende:
 - (a) un anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o un fragmento del mismo, que puede unirse específicamente *in vitro* a un epítipo conformacional de repetición de una forma protofibrilar del péptido β -amiloide al tiempo que muestra una afinidad mínima por formas de bajo peso molecular del péptido β -amiloide; y,
 - (b) un reactivo que se une, directa o indirectamente, a dicho anticuerpo o al fragmento del mismo.

- 5 10. Composición farmacéutica que comprende (i) un anticuerpo monoclonal de un fragmento de región variable del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que interacciona específicamente con la forma protofibrilar de A β -amiloide, y (ii) un portador farmacéuticamente aceptable, en la que dicha interacción específica se caracteriza por una razón de la afinidad de un fragmento de región variable de dicho anticuerpo por la forma protofibrilar de A β con respecto a la afinidad por otras formas de A β mayor de aproximadamente 2.
11. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, en la que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 10 12. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, método según la reivindicación 7 o kit según la reivindicación 9, en los que el anticuerpo se produce mediante un hibridoma disponible con el n.º de registro ATCC PTA-8830.
- 15 13. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, en la que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal humanizado o un anticuerpo monoclonal humano.
14. Hibridoma disponible con el n.º de registro ATCC PTA-8830.
- 20 15. Molécula de ácido nucleico aislada que codifica para el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el fragmento de cadena pesada variable comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 7.
- 25 16. Molécula de ácido nucleico aislada que codifica para el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos tal como se expone en SEQ ID NO: 8.
- 30 17. Vector de expresión para la expresión del anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en una célula huésped recombinante en el que dicho vector de expresión contiene la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 15 ó 16.
- 35 18. Célula huésped cultivada que expresa el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dicha célula huésped contiene el vector de expresión según la reivindicación 17.
- 40 19. Molécula de ácido nucleico aislada que codifica para el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el fragmento de cadena ligera variable comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 5.
- 45 20. Molécula de ácido nucleico aislada que codifica para el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos tal como se expone en SEQ ID NO: 6.
- 50 21. Vector de expresión para la expresión del anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en una célula huésped recombinante en el que dicho vector de expresión contiene la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 19 ó 20.
- 55 22. Célula huésped cultivada que expresa el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dicha célula huésped contiene el vector de expresión según la reivindicación 21.
- 60 23. Anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o fragmento de región variable del mismo, para su uso en un tratamiento de un estado caracterizado por la formación y deposición de placas de fibras de β -amiloide.
24. Cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la deposición de placa de beta-amiloide asociada con la aparición y progresión de la enfermedad de Alzheimer.
25. Anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o fragmento de unión a antígeno del mismo, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
26. Anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o fragmento de unión a antígeno del mismo, para su uso en la inhibición de la formación y deposición de placas de fibras de β -amiloide.

Fibrillogénesis de A β

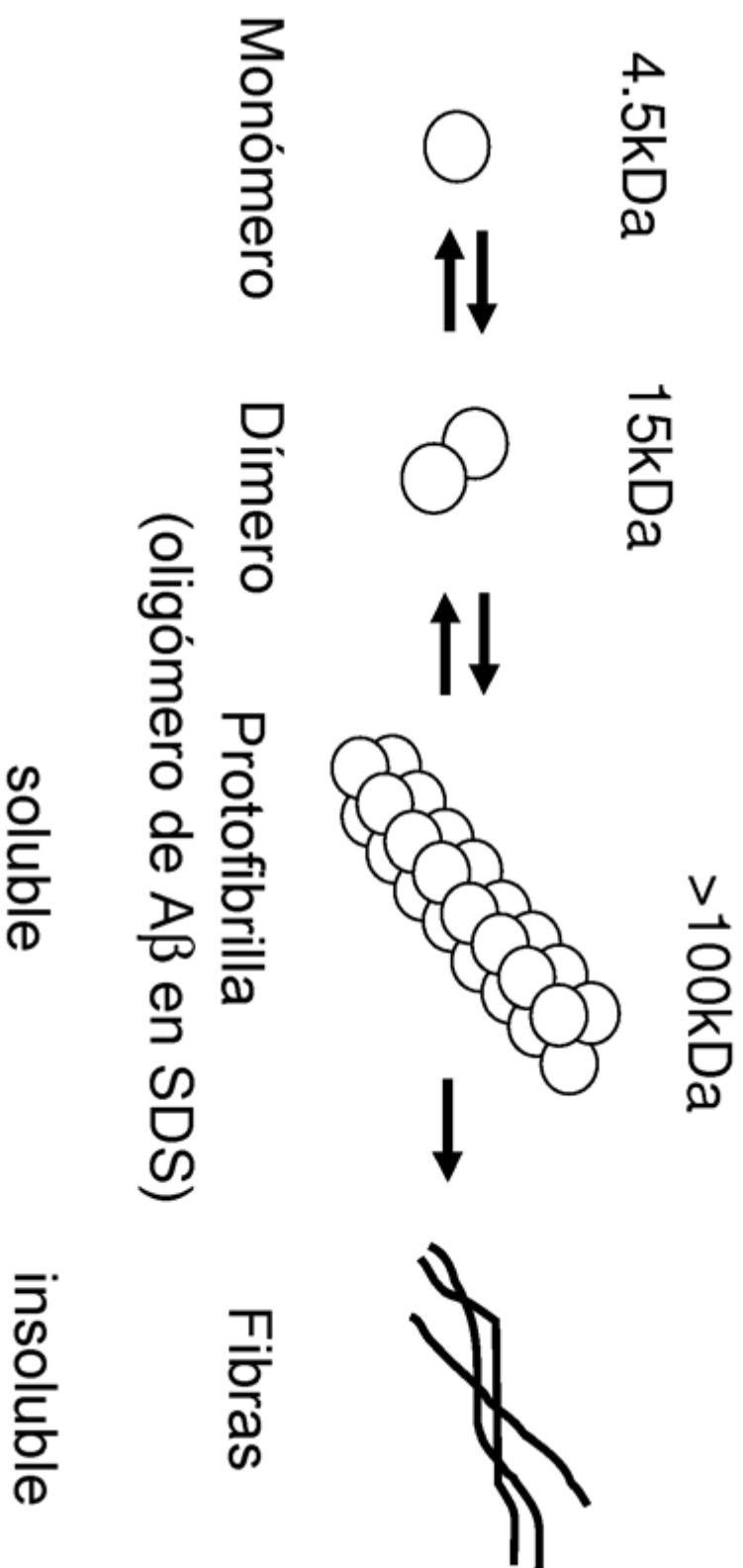


FIG. 1

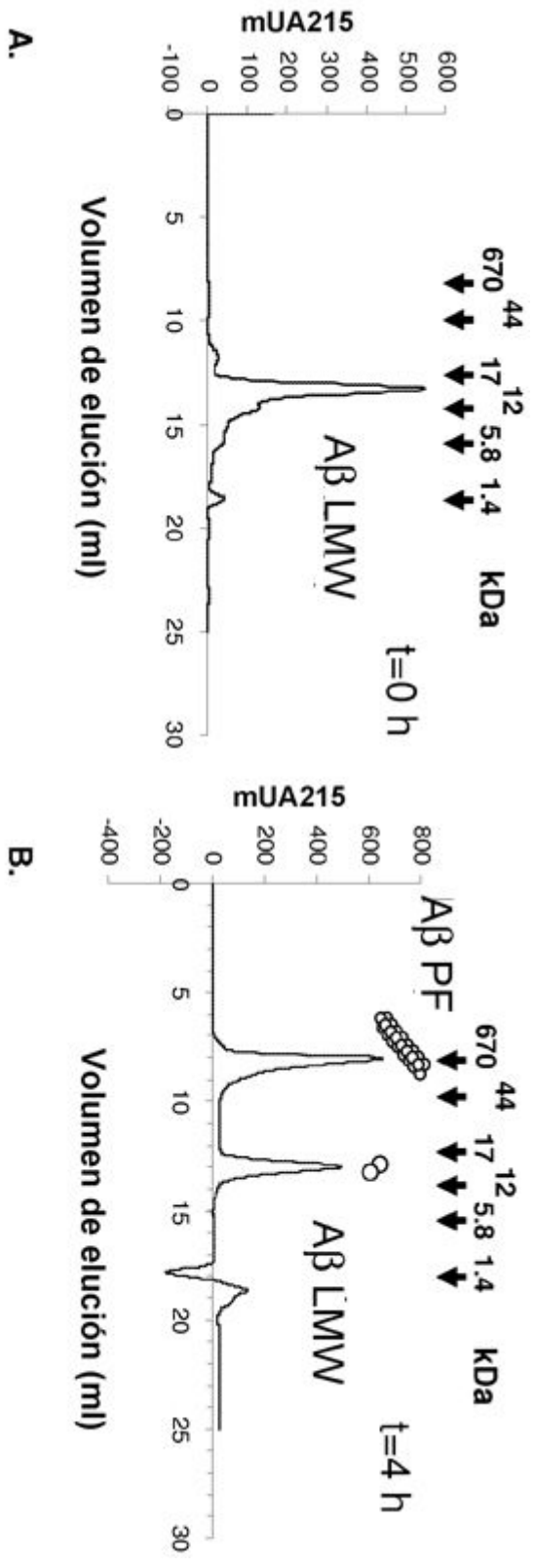


FIG. 2

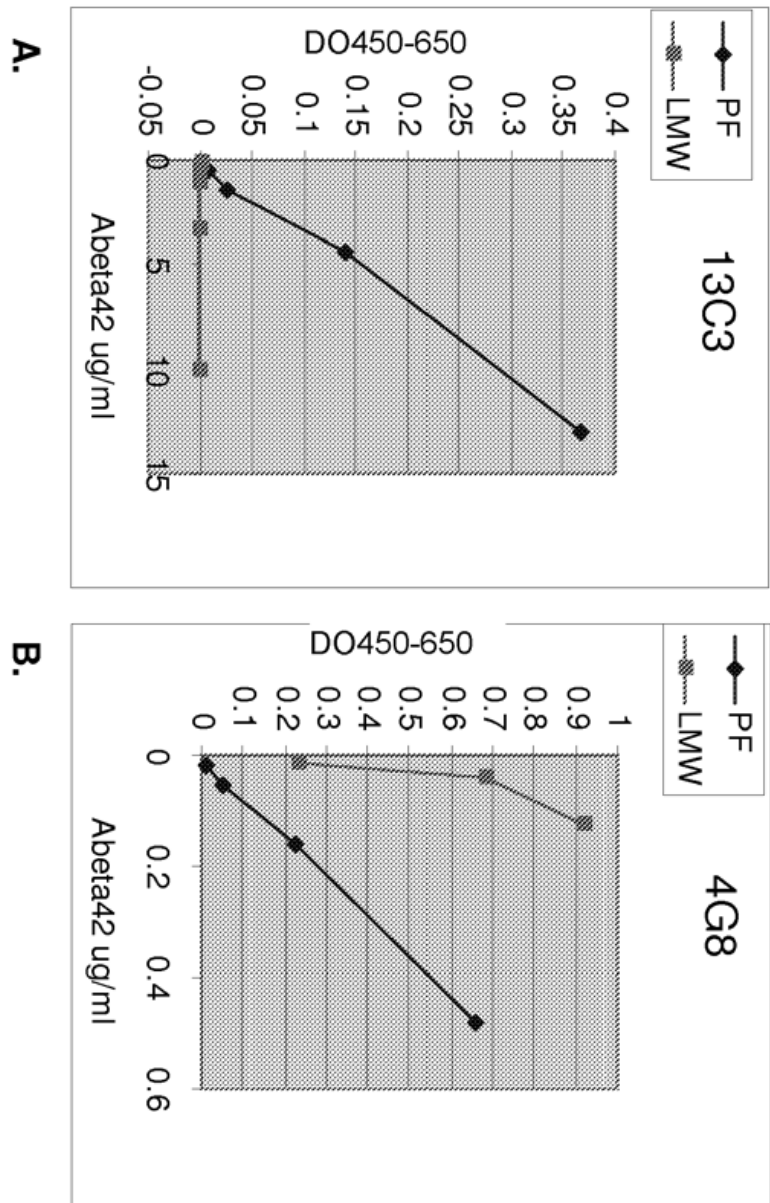


FIG. 3

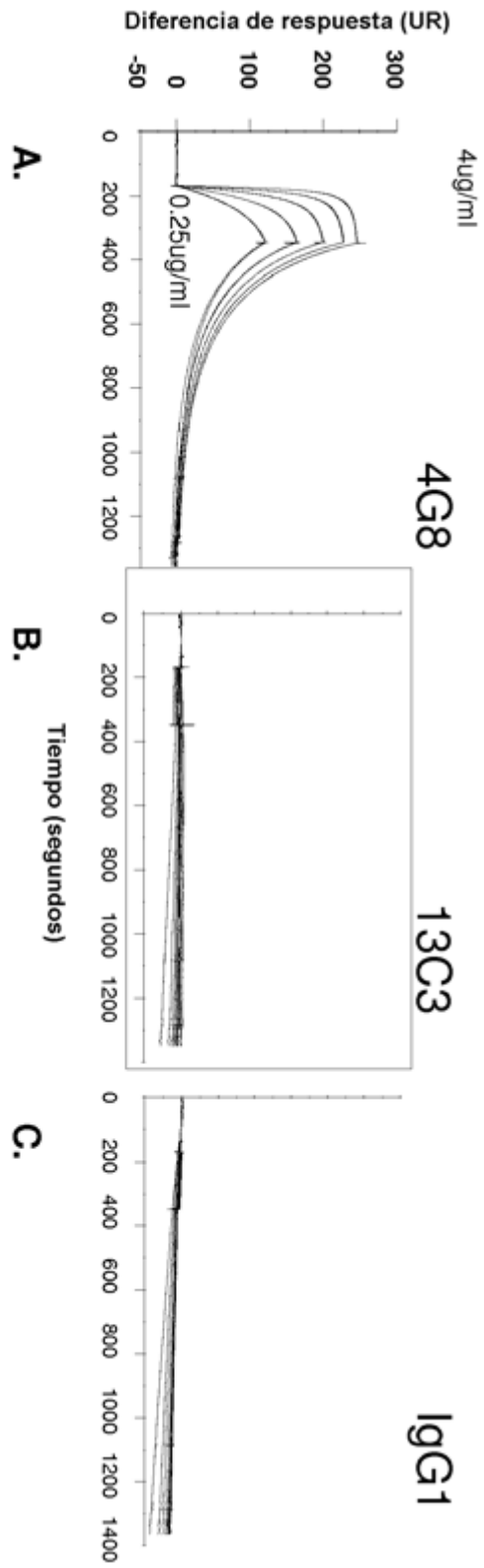
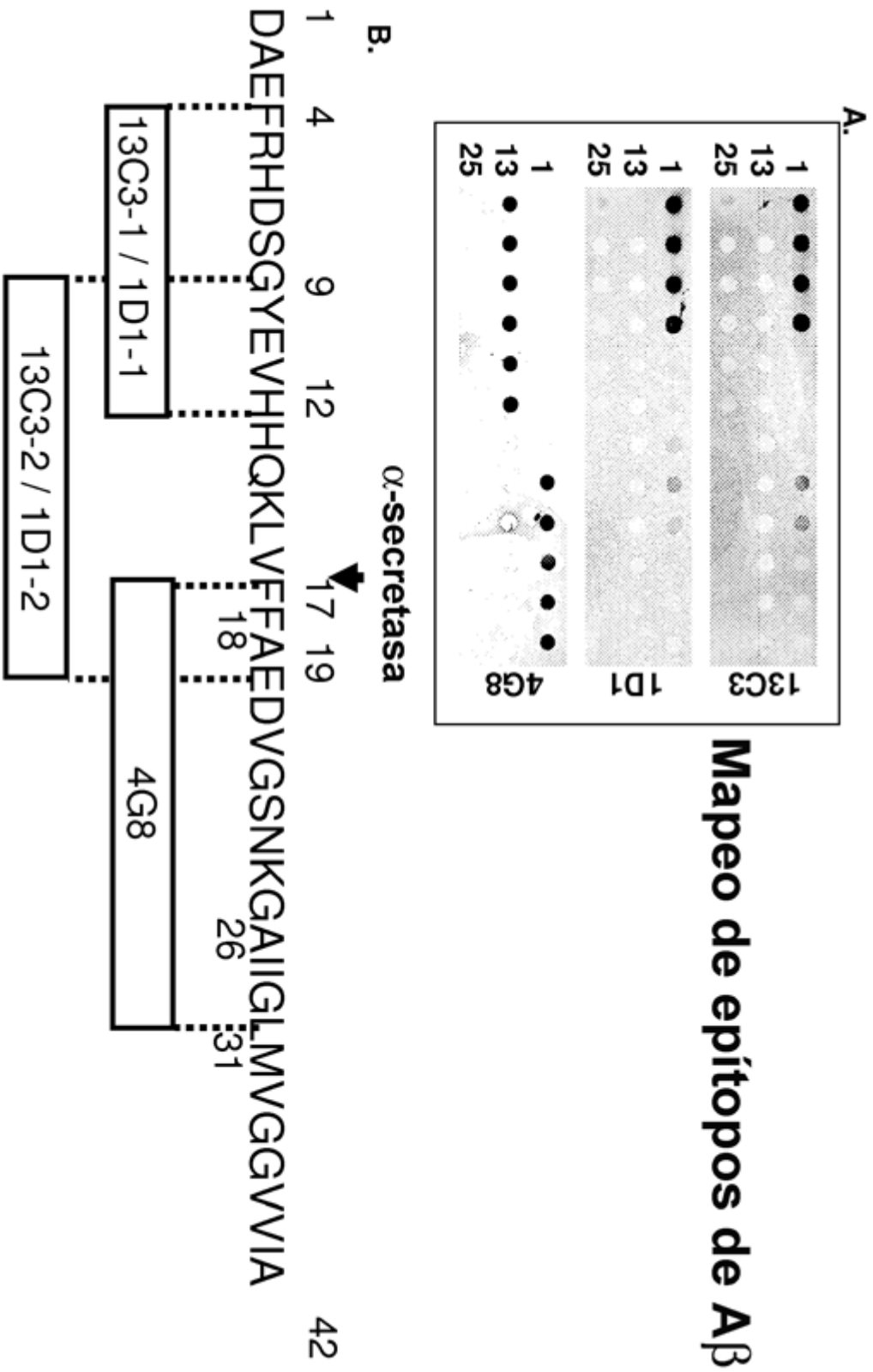


FIG. 4



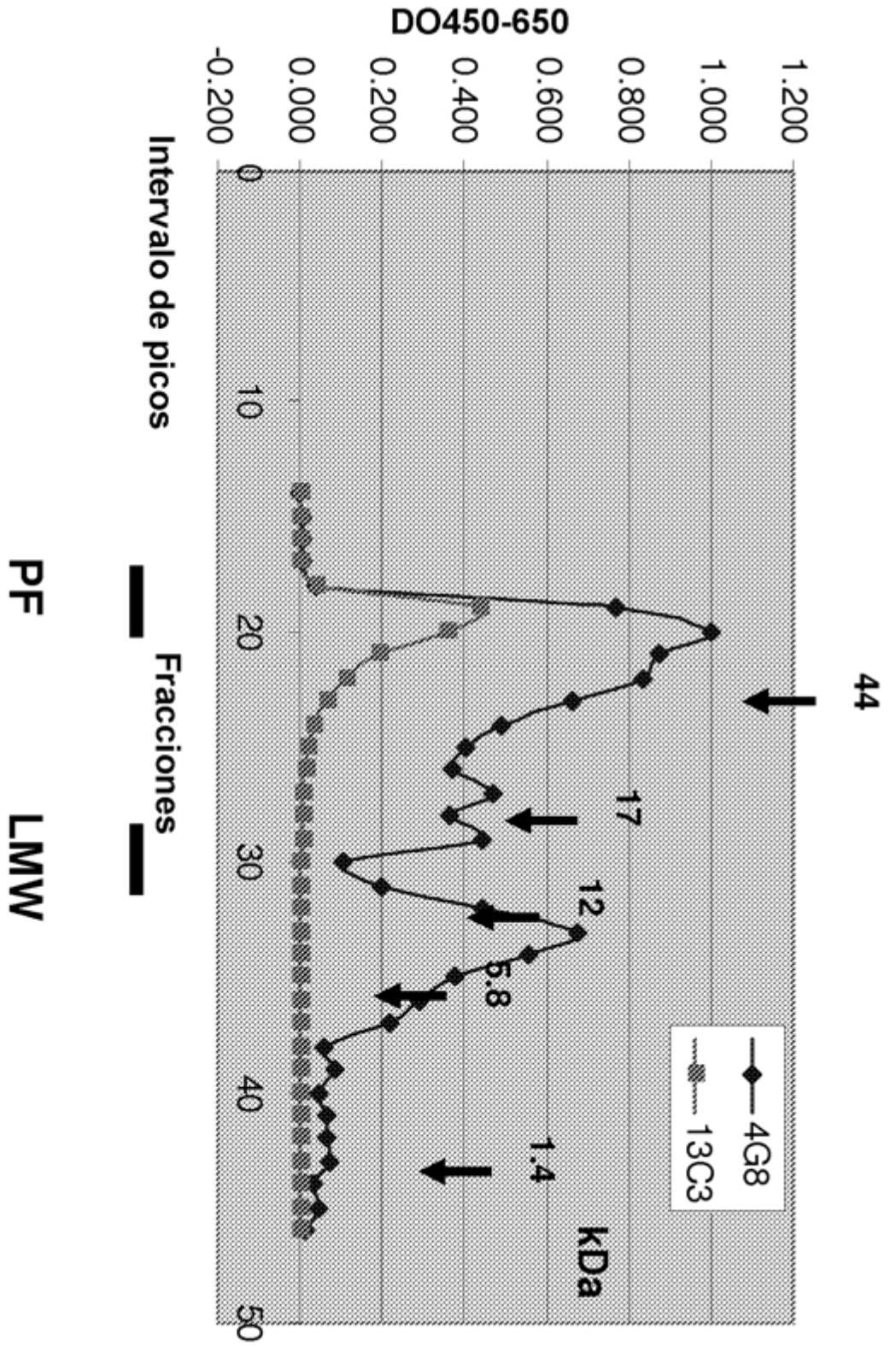


FIG. 6

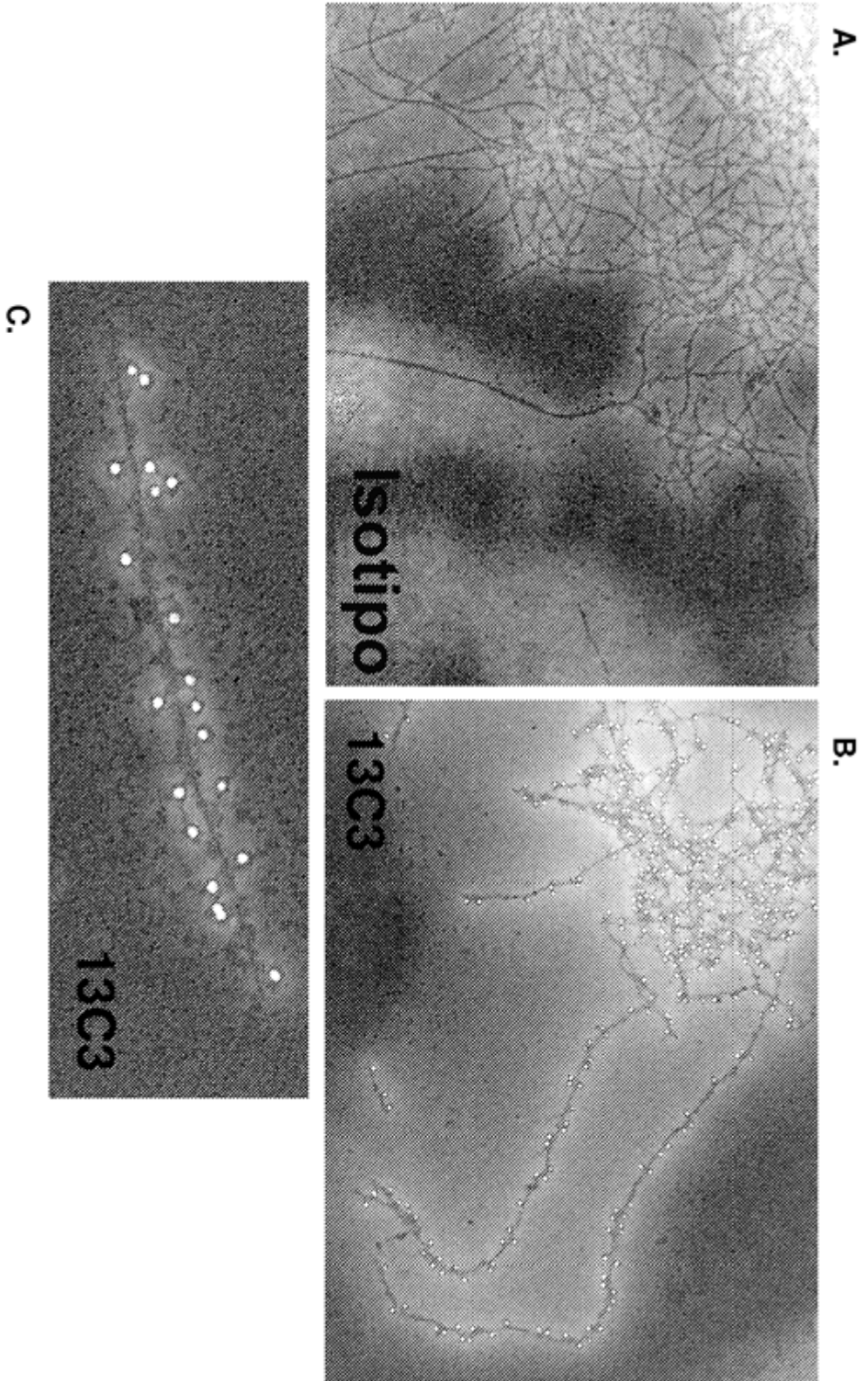


FIG. 7

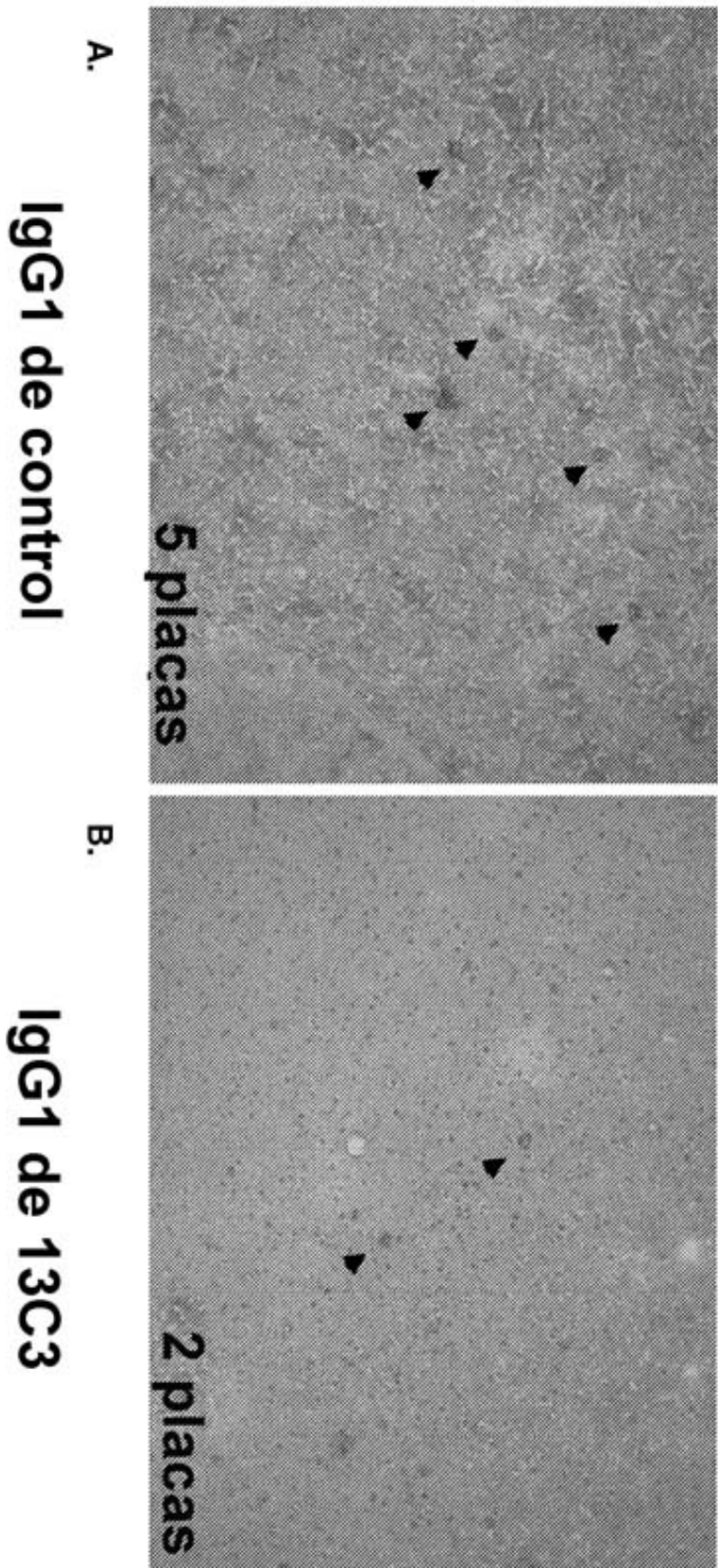


FIG. 8

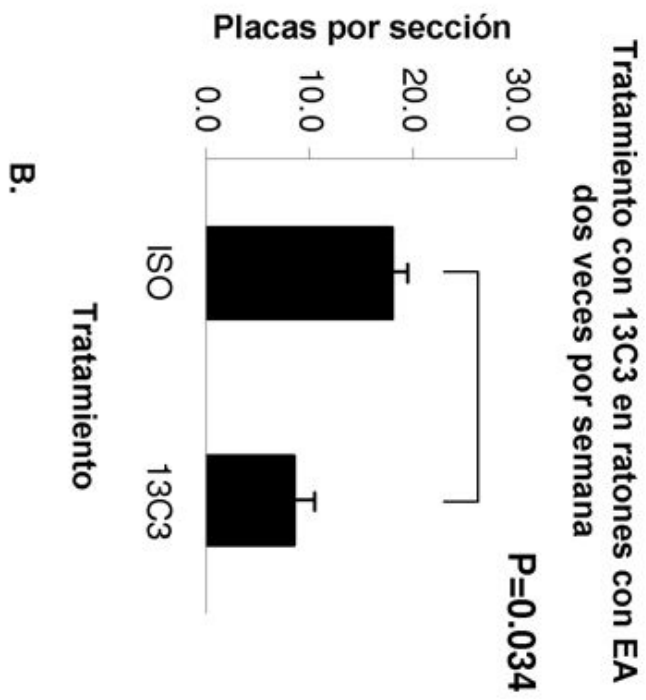
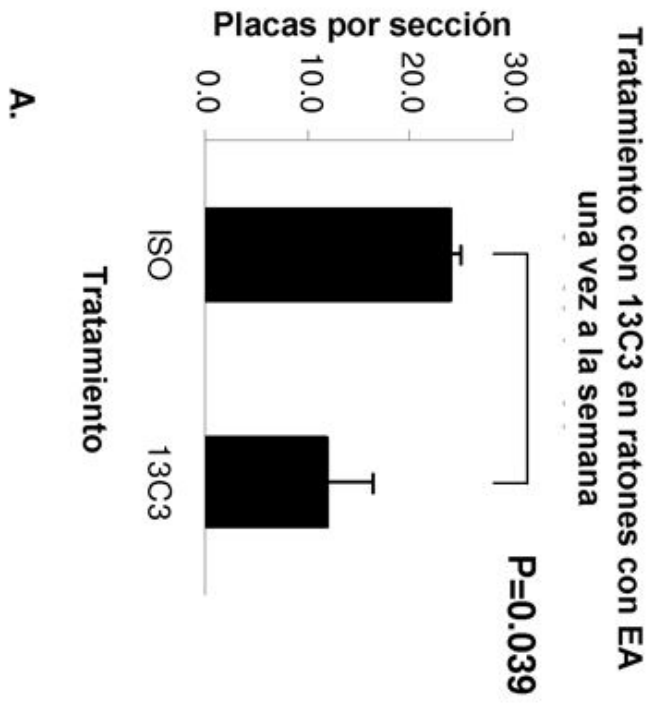


FIG. 9

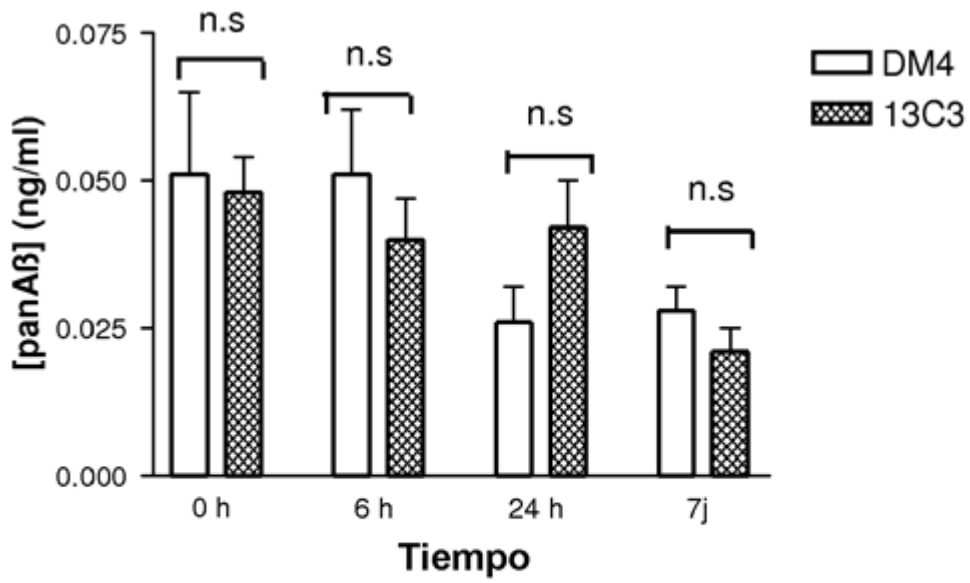


FIG. 11A

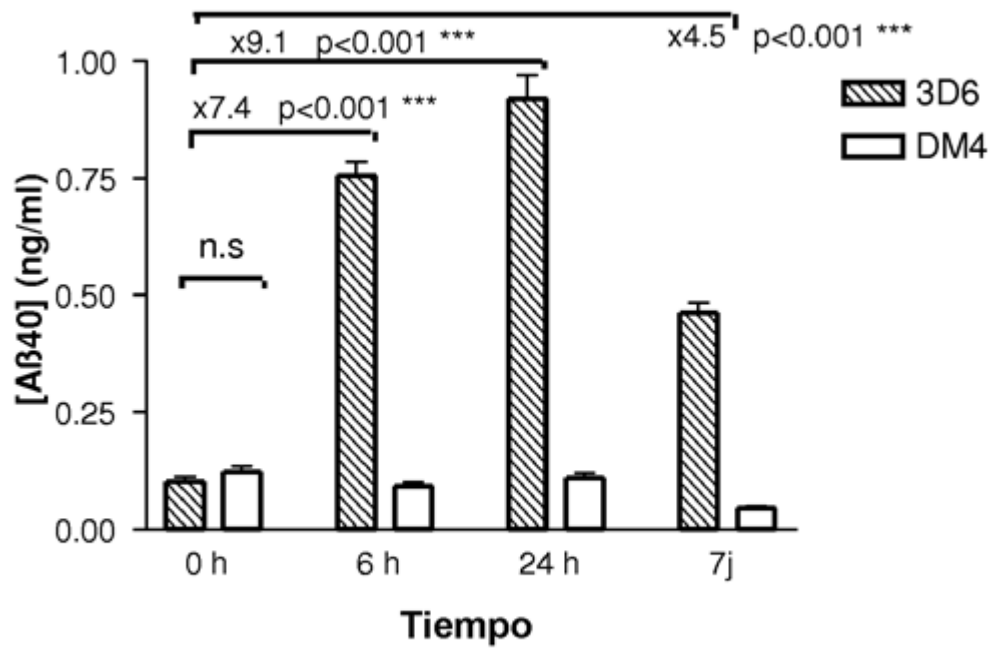


FIG.11B

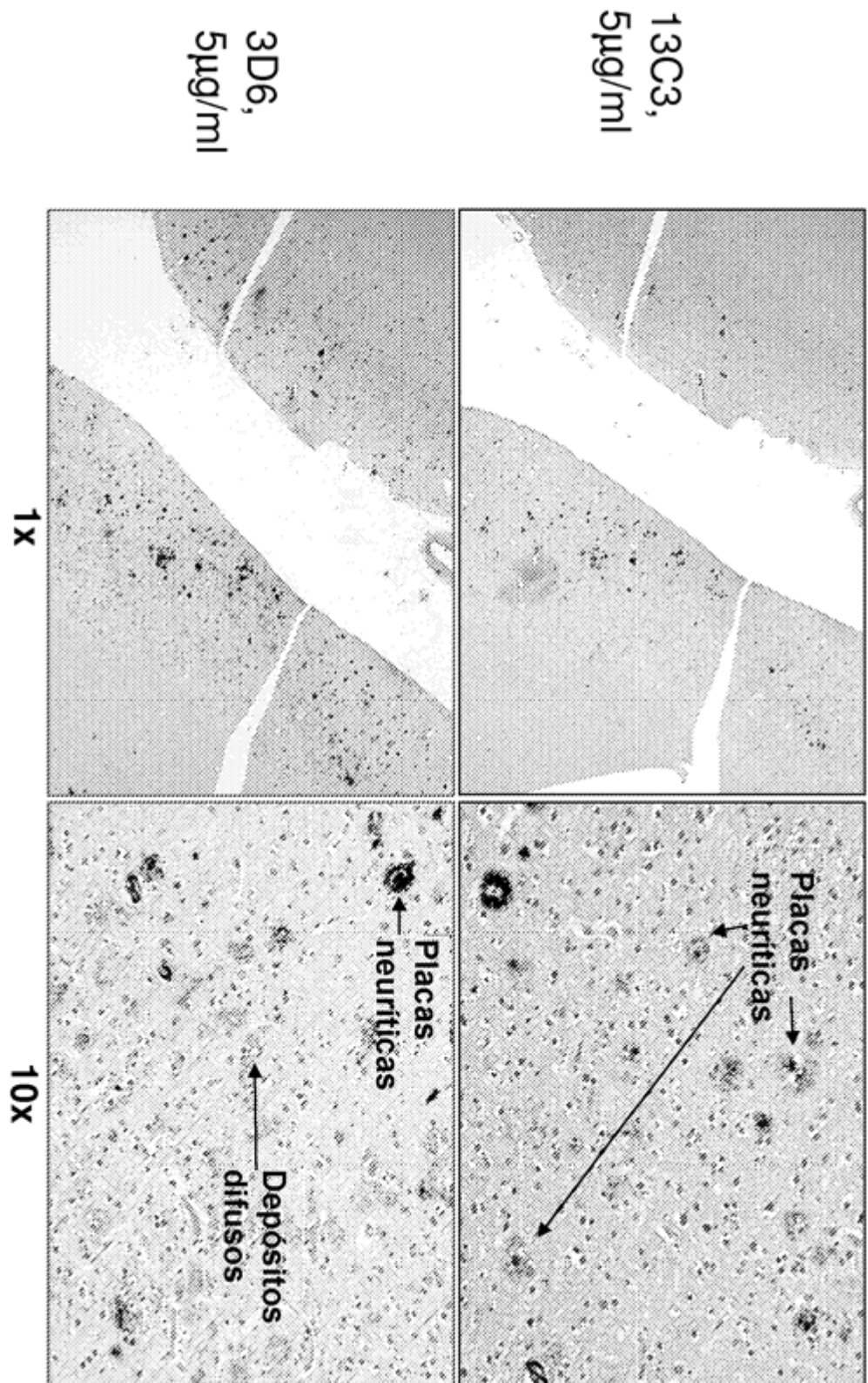


FIG. 12