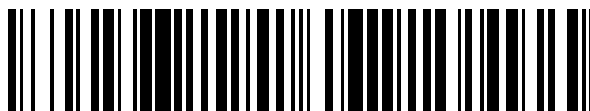


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 648**

51 Int. Cl.:

A61K 31/401 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.12.2008** **PCT/EP2008/011135**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2009** **WO09155962**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2008** **E 08874772 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019** **EP 2303263**

54 Título: **Combinaciones de agentes que agotan SAP y anticuerpos anti-SAP**

30 Prioridad:

27.06.2008 WO PCT/EP2008/058333

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.11.2019

73 Titular/es:

PENTRAXIN THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
Finance Division University College London
Gower Street
London WC1E 6BT, GB

72 Inventor/es:

PEPYS, MARK BRIAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 729 648 T3

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

DESCRIPCIÓN

Combinaciones de agentes que agotan SAP y anticuerpos anti-SAP

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

5 Antecedentes de la invención

La amiloidosis es una enfermedad grave y generalmente mortal causada por la acumulación en los tejidos de fibras de proteínas insolubles anormales conocidas como las fibrillas de amiloide¹. Estas derivan de diferentes proteínas en diferentes formas de la enfermedad, pero todas las fibrillas de amiloide comparten una estructura de núcleo B cruzado común y todas derivan por plegamiento incorrecto de proteínas precursoras normalmente solubles.¹ Además de las fibrillas de amiloide en sí mismas, los depósitos de amiloide son siempre ricos en proteoglicanos, algunos de los cuales están estrechamente unidos a las fibrillas². Una proteína plasmática no fibrilar normal, el componente P amiloide sérico (SAP), también está siempre presente en los depósitos de amiloide en virtud de su unión ávida dependiente de calcio específica a todos los tipos de fibrillas de amiloide^{3,4}.

El SAP humano es una proteína constitutiva en el plasma⁵, a una concentración de alrededor de 20-40 mg/l y con un total de aproximadamente 50-100 mg de SAP en los compartimentos extravasculares y del plasma combinados, tanto de individuos normales como de pacientes con enfermedades distintas de la amiloidosis⁶. En contraste, en pacientes con amiloide, el SAP también se concentra específicamente en los depósitos de amiloide y en un individuo con amiloidosis sistémica extensa puede haber hasta 20.000 mg de SAP en el amiloide⁷.

Los depósitos de amiloide son extracelulares y causan enfermedades por acumulación progresiva hasta que dañan la estructura y, por lo tanto, la función del tejido que ocupan¹. Muy raramente hay una respuesta inflamatoria o de "cuerpo extraño" al depósito de amiloide, ya sea observada localmente en los tejidos o sugerida por marcadores sistémicos de inflamación. En la llamada amiloidosis sistémica, los depósitos pueden estar presentes en cualquier tejido u órgano del organismo, pero los depósitos nunca se observan dentro de la sustancia cerebral en estas formas de la enfermedad. La amiloidosis sistémica es la causa de aproximadamente 1 por 1.000 de todas las muertes en los países desarrollados, y siempre es fatal a menos que la abundancia de la proteína que es la precursora de las fibrillas de amiloide se pueda reducir de manera suficiente y persistente. Esto es difícil de lograr en muchas formas de amiloidosis y puede ser imposible, y existe una importante necesidad médica no satisfecha^{1,8}. También se pueden producir formas locales de amiloidosis, en las cuales los depósitos se limitan a un solo sitio anatómico o un único sistema de tejidos u órganos, y pueden causar enfermedades graves^{1,8}.

En la amiloidosis, el daño a la estructura y la función de los tejidos y órganos que conduce a la enfermedad clínica está causado inequívocamente por la acumulación progresiva de los depósitos de amiloide en sí mismos. Sin embargo, existen otras afecciones en las que los depósitos de amiloide están siempre presentes, las más importantes la enfermedad de Alzheimer y la diabetes mellitus tipo 2, en la que no se conoce la contribución de el depósito de amiloide a la patogénesis de la enfermedad, específicamente la pérdida de la función cognitiva y de los islotes pancreáticos¹. Sin embargo, los depósitos de amiloide en cualquier otra parte del organismo son patógenos demostrables y es probable que los depósitos de amiloide cerebral de la enfermedad de Alzheimer y los depósitos de amiloide de los islotes en la diabetes tipo 2 también sean dañinos. Dado que el tratamiento que aclara los depósitos de amiloide en la amiloidosis local y sistémica, será ciertamente terapéutico¹ la eliminación de los depósitos de amiloide en la enfermedad de Alzheimer y la diabetes tipo 2 también debería ser clínicamente beneficiosa.

La amiloidosis sistémica por proteína A amiloide (AA) se induce fácilmente en ratones mediante inflamación crónica después de la inyección intravenosa de un extracto de tejido amiloidótico que contiene fibrillas de amiloide, y conocido como factor de potenciación amiloide⁹. Este modelo se parece mucho a la amiloidosis AA humana con un importante depósito de amiloide en el bazo y el hígado¹⁰. Con el período relativamente breve de la inducción de amiloide, por ejemplo, como se utiliza en los experimentos descritos en la presente memoria, hay muy poco depósito de amiloide en otros lugares. La proteína AA que forma las fibrillas de amiloide deriva de su precursor circulante, la proteína A de amiloide sérico (SAA), que es una proteína de fase aguda. La concentración plasmática de SAA aumenta considerablemente desde su valor vestigial normal de menos de 5 mg/l en respuesta a casi cualquier forma de inflamación y daño tisular y puede persistir en valores de hasta 1.000 mg/l, o incluso más, frente a una estimulación persistente. Este aumento en la producción de SAA es una condición previa necesaria para el desarrollo de la amiloidosis AA, y tanto en seres humanos como en ratones, cuando la concentración de SAA cae a la normalidad, el depósito de amiloide se detiene y los depósitos de amiloide existentes pueden revertir¹⁰⁻¹². En ausencia de una producción continua de SAA, la regresión espontánea de depósitos de amiloide AA es universal en el modelo de ratón¹¹ pero continúa a una tasa variable que debe ser adaptada apropiadamente en el diseño de experimentos terapéuticos.

La Solicitud de Patente Europea EP 0 915 088 describe compuestos que son inhibidores competitivos de la unión de SAP a las fibrillas de amiloide, así como métodos para su fabricación. Un compuesto preferido descrito en el

documento EP 0 915 088 es el ácido (R)-1-[6-[(R)-2-carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidino-2-carboxílico (CPHPC).

En ratones transgénicos para SAP humano, el SAP humano está presente tanto en la circulación como en los depósitos de amiloide. El fármaco ácido (R)-1-[6-[(R)-2-carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidino-2-carboxílico (CPHPC) está específicamente unido a SAP humano en un complejo compuesto por dos moléculas de SAP pentaméricas nativas y 5 moléculas de CPHPC¹⁶. Este complejo es reconocido como anormal por el hígado y es absorbido muy rápidamente por los hepatocitos y degradado, eliminando así SAP de la circulación de manera eficaz¹⁶. Las concentraciones de SAP en plasma permanecen muy bajas mientras se administre el fármaco¹⁶. El CPHPC es extremadamente bien tolerado y ni el fármaco como tal ni el agotamiento de SAP que produce han causado efectos adversos¹⁶. Existe evidencia del beneficio clínico del tratamiento con CPHPC en pacientes con amiloidosis sistémica humana, especialmente con respecto a la conservación de la función renal en individuos con amiloidosis predominantemente renal.

Sin embargo, a pesar de estas observaciones prometedoras con CPHPC, la eficacia terapéutica rápida y óptima capaz de conservar la función del órgano y prolongar la vida en pacientes con amiloidosis sistémica requerirá un aclaramiento sustancial o completo de los depósitos de amiloide.

La Solicitud de Patente Internacional WO04/059318 describe métodos que se afirma que mejoran la formación de fibrocitos que comprenden la provisión de composiciones que se unen a SAP. Tales composiciones incluyen anticuerpos anti-SAP y CPHPC. Sin embargo, el documento WO04/059318 no describe el tratamiento de enfermedades asociadas con el depósito de amiloide. Por otra parte, el documento WO04/059318 no describe la combinación específica de un anticuerpo anti-SAP y CPHPC. Además, los datos recientes indican que SAP no está asociado con la inhibición de los fibrocitos y, por lo tanto, que el agotamiento de SAP no aumenta la producción de fibrocitos²⁰

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

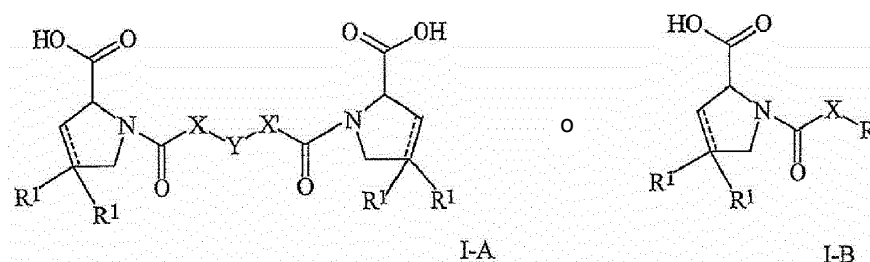
La cita o identificación de cualquier documento en esta solicitud no es una admisión de que tal documento esté disponible como técnica anterior a la presente invención.

Compendio de la invención

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

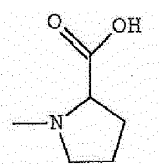
Por lo tanto, en un primer aspecto, se proporciona un compuesto que agota el componente P de amiloide del suero (SAP) de la circulación en un sujeto y un anticuerpo anti-SAP, en donde dicho anticuerpo se une a los residuos 140-159 de SAP humano como se expone en la figura 9 o se une a un epítipo sobre SAP humano que es el mismo epítipo que el epítipo unido a Abp1, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionados con el amiloide en un paciente, en donde

el compuesto que agota el SAP de la circulación es una D-prolina de la Fórmula:



en donde

Res



y el grupo

R¹ es hidrógeno o halógeno;

X-Y-X' es un conector que tiene al menos 4, ventajosamente al menos 5, ventajosamente al menos 6, hasta 20 átomos de carbono de cadena lineal o recta, en donde

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

Y es -S-S-; -(CH₂)_n-; -O-; -NH-; -N(R²)-; -CH=CH-; -NHC(O)NH-; -N(R²)C(O)N(R²)-;

10 -N[CH₂C₆H₃(OCH₃)₂]-; -N(CH₂C₆H₅)-; -N(CH₂C₆H₅)C(O)N(CH₂C₆H₅)-; -N(alcoxilalquil)-; N(cicloalquilmetil)-; 2,6-piridilo; 2,5-furanilo; 2,5-tienilo; 1,2-ciclohexilo; 1,3-ciclohexilo; 1,4-ciclohexilo; 1,2-naftilo; 1,4-naftilo; 1,5-naftilo; 1,6-naftilo; bifenileno; o 1,2-fenileno, 1,3-fenileno y 1,4-fenileno, en donde los grupos fenileno están opcionalmente sustituidos con 1-4 sustituyentes, seleccionados entre halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, hidroxilo, carboxi, -COO-alquilo inferior, nitrilo, 5-tetrazol, (ácido pirrolidin-1-il 2-carboxílico)-2-oxo-etoxi, N-hidroxicarbamimidilo, 5-oxo[1,2,4]-oxadiazolilo, 2-oxo[1,2,3,5]oxatiadiazolilo, 5-tioxo [1,2,4]oxadiazolilo y 5-terc-butilsulfanil-[1,2,4]oxadiazolilo;

15 X' es -(CH₂)_n-; -(CH₂)_nCH(R²)-; -(CH₂)_nOCH₂-; -NHCH₂-; bencilo, -CH=C(R²)-; CH(OH)CH₂; o tiazol-2,5-diilo;

R² es alquilo inferior, alcoxi inferior o bencilo y

n es 0-3,

20 o una sal o un mono- o di-éster farmacéuticamente aceptables del mismo. El compuesto que agota el SAP de la circulación, incluidas las realizaciones preferidas mencionadas anteriormente, se denomina en lo sucesivo compuesto que agota el SAP.

25 En una realización, la D-prolina de fórmula I-A anterior se puede escribir como Ligando - conector - Ligando, en donde el radical X-Y-X' de la fórmula I-A forma el conector. Está dentro del alcance de la presente invención que el conector (X-Y-X') puede tener una longitud de 4 a 20 átomos de carbono lineales, incluyendo de 4 a 15 átomos de carbono lineales, de 5 a 10 átomos de carbono lineales y de 6 a 8 átomos de carbono lineales de longitud. El conector puede ser una cadena lineal o ramificada, o puede formar opcionalmente una o más estructuras anulares, con la condición de que al menos 4 átomos de carbono de cadena lineal o recta estén presentes en el conector. En una realización, al menos uno de los átomos de C de cadena lineal o recta puede estar opcionalmente sustituido con al menos un heteroátomo seleccionado entre N, O o S, ventajosamente O o S, preferiblemente O.

30 En una realización, la D-prolina es ácido (R)-1-[6-[(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidino-2-carboxílico (CPHPC).

Preferiblemente, la composición no comprende etanolaminas y/o fosfoetanolaminas y/o 4,6-piruvatoacetil-β-D galactopiranosas y/o calcio y/o IL-4 y/o IL-3.

35 Preferiblemente, la composición no está indicada para potenciar la formación de fibrocitos. Ventajosamente, la composición no mejora la formación de fibrocitos. Preferiblemente, dicho anticuerpo específico para SAP no elige como diana una porción de SAP que se afirma que es funcional en la inhibición de la formación de fibrocitos a partir de monocitos.

40 En una realización adicional, la composición está indicada para su uso en el tratamiento de la enfermedad asociada con amiloide, y en consecuencia se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto que agota el SAP y un anticuerpo específico para SAP para su uso en el tratamiento de la enfermedad asociada con amiloide.

La enfermedad asociada con amiloide, como se menciona en la presente memoria, puede ser cualquier enfermedad que esté asociada con el depósito extracelular de fibrillas de amiloide en los tejidos. Por ejemplo, la enfermedad asociada con amiloide es una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cualquier forma de amiloidosis sistémica (visceral) o local, diabetes tipo 2 y enfermedad de Alzheimer.

45 En una realización preferida, SAP es SAP humano, y las referencias a anticuerpos anti-SAP y compuestos que agotan SAP son preferiblemente referencias a compuestos que eligen como diana y/o agotan SAP humano.

50 El tratamiento con un compuesto que agota SAP como se define en la presente memoria elimina casi todo el SAP humano circulante, pero deja cantidades sustanciales de SAP asociado con los depósitos de amiloide en los tejidos. El mayor agotamiento de SAP de los depósitos de amiloide que se ha observado en pacientes humanos es de aproximadamente 90% después de meses de administración continua de CPHPC. La infusión intravenosa de anticuerpos contra SAP humano en pacientes cuyo SAP circulante se ha agotado, permite a los anticuerpos localizar y unirse específicamente a los depósitos de amiloide y promover su rápida y extensa regresión, con el correspondiente beneficio clínico.

El tratamiento combinado de individuos con depósitos de amiloide sistémicos establecidos utilizando el compuesto que agota SAP y los anticuerpos anti-SAP causa de manera segura y eficaz el aclaramiento rápido y esencialmente completo de los depósitos. Por lo que saben los autores de la presente invención, nunca se ha logrado tal aclaramiento deliberado, rápido y dirigido de los depósitos de amiloide establecidos en ningún paciente o modelo animal ni por ningún otro método.

Ventajosamente, dado que el SAP está presente en todos los depósitos de amiloide de todos los tipos en enfermedades humanas asociadas con el depósito de amiloide, incluida la amiloidosis, la enfermedad de Alzheimer y la diabetes tipo 2, este enfoque de tratamiento es aplicable en todas estas afecciones. Preferiblemente, la invención está destinada al tratamiento de la amiloidosis.

El compuesto que agota SAP y el anticuerpo se pueden administrar simultáneamente, por ejemplo por separado o mezclado, o de manera secuencial. En una realización, el régimen de tratamiento comprende la administración del compuesto que agota SAP solo, seguido de la administración del anticuerpo. Opcionalmente, la administración de compuestos que agotan SAP se puede continuar durante la administración del anticuerpo.

En una realización preferida, el compuesto que agota SAP y el anticuerpo anti-SAP se administran secuencialmente, de manera que el compuesto que agota SAP se administra antes del anticuerpo. La administración se puede realizar durante un período de tiempo prolongado, mediante infusión, dosis repetidas en embolada o de cualquier otra forma; o se puede emplear una administración de dosis única, en la que el compuesto que agota SAP y/o el anticuerpo se administran solo una vez.

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

Se observa que en esta descripción y particularmente en las reivindicaciones y/o párrafos, los términos tales como "comprende", "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la Ley de Patentes de Estados Unidos; p. ej., pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye" y similares; y que términos tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado que se les atribuye en la Ley de Patentes de Estados Unidos, p. ej., permiten elementos no citados explícitamente, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan a una característica básica o novedosa de la invención.

Estas y otras realizaciones se describen o son evidentes a partir de, y e incluidas en, la siguiente Descripción Detallada.

Breve descripción de las figuras.

La siguiente descripción detallada, proporcionada a modo de ejemplo, pero no destinada a limitar la invención, únicamente las realizaciones específicas descritas, se puede comprender mejor junto con los dibujos adjuntos, en los cuales:

Figura 1. Depósitos de amiloide en los bazos de ratones después del tratamiento.

Tres grupos de ratones de línea pura transgénicos para SAP humano con una modificación genética para inactivar el gen SAP de ratón "knockout" C57BL/6 estrechamente emparejados con amiloidosis AA sistémica establecida, con la misma carga de amiloide inicial que la mostrada por la retención de ¹²⁵I-SAP en todo el organismo, se trataron respectivamente con CPHPC y una sola dosis de anti-anticuerpo anti-SAP humano de oveja, con CPHPC solo o sin nada, y a continuación se sacrificaron para la estimación de la carga de amiloide 28 días después. Cada punto representa la puntuación de amiloide para un solo animal: 0, no se detectó amiloide; 10⁰, trazas de motitas; 10¹, trazas perifoliculares; 10², perifolicular general; 10³, perifolicular denso; 10⁴, perifolicular e interfolicular denso. En las pruebas U de Mann Whitney para determinar la diferencia entre las puntuaciones en los grupos, los valores de P fueron los siguientes: grupo 1 vs grupo 2 P = 0,0000; grupo 1 vs grupo 3 P = 0,0000; grupo 2 vs grupo 3 p = 0,2635. No hubo diferencias en las puntuaciones de amiloide entre machos y hembras dentro de ninguno de los grupos (no mostrado).

Figura 2. Depósitos de amiloide en los hígados de ratones después del tratamiento.

Tres grupos de ratones de línea pura transgénicos para SAP humano con una modificación genética para inactivar el gen SAP de ratón C57BL/6 estrechamente emparejados con amiloidosis AA sistémica establecida, con la misma carga de amiloide inicial que la mostrada por la retención de ¹²⁵I-SAP en todo el organismo, se trataron, respectivamente, con CPHPC y una dosis única de anti-anticuerpo anti-SAP humano de oveja, con CPHPC solo o sin nada, y a continuación se sacrificaron para la estimación de la carga de amiloide 28 días después. Cada punto representa la puntuación de amiloide para un solo animal: 0, no se detectó amiloide; 10⁰, trazas de motitas; 10¹, trazas en/alrededor de la mayoría de los tractos portales; 10², depósitos significativos en/alrededor de todos los tractos portales; 10³, depósitos portales y parenquimales; 10⁴, depósitos portales y parenquimales masivos. En las pruebas U de Mann Whitney para determinar la diferencia entre las puntuaciones en los grupos, los valores de P fueron los siguientes: grupo 1 vs grupo 2 P =

0,0000; grupo 1 vs grupo 3 $P = 0,0000$; grupo 2 vs grupo 3 $p = 0,4740$. No hubo diferencias en las puntuaciones de amiloide entre machos y hembras dentro de ninguno de los grupos (no mostrado).

Figura 3. Depósitos de amiloide teñidos con rojo Congo y observados en luz polarizada transversal.

El amiloide se identifica por su birrefringencia de color verde patognomónica que se debe distinguir de la birrefringencia de color blanco u otra brillante del colágeno en los tejidos y artefactos de cuerpos extraños, polvo, etc. Puntuaciones de amiloide del bazo: 7722, cero (sin amiloide presente); 7723, 10^0 (una sola motita presente); 7482, 10^1 ; 6865, 10^2 ; 7481, 10^3 ; 8272, 10^4 . Puntuaciones de amiloide del hígado: 6980, cero (sin amiloide birrefringente de color verde, solo birrefringencia de colágeno de color blanco-amarillo); 7482, 10^1 ; 8028, 10^2 ; 8156, 10^3 ; 8272, 10^4 .

Figura 4. Curso temporal de la infiltración celular y la destrucción de amiloide después de la administración de anticuerpo anti-SAP. Secciones de bazo teñidas con rojo Congo y observadas en luz polarizada (izquierda) y teñidas con hematoxilina y eosina (derecha) de animales sacrificados en los momentos indicados después del tratamiento con anticuerpos. El día 1 (**Figura 4A**) hay abundante amiloide birrefringente de color verde en la zona marginal perifolicular típica, pero en contraste con su apariencia celular habitual, está densamente infiltrada con células inflamatorias predominantemente mononucleares. El día 2 (**Figura 4B**) Los macrófagos que rodean el amiloide ya se están fusionando para formar células gigantes multinucleadas. Para el día 4 (**Figura 4C**) los depósitos de amiloide son claramente menos abundantes y se fragmentan en asociación con la actividad fagocítica intensa de los macrófagos y numerosas células gigantes multinucleadas que rodean y envuelven las islas de amiloide. El día 7 (**Figura 4D**) se encuentra presente mucho menos amiloide y hay menos células gigantes, pero éstas aún contienen claramente fragmentos degradados de amiloide.

Figura 5. Micrografías electrónicas de bazo tomadas 1 día después del tratamiento con anticuerpos anti-SAP. **Figura 5A**, macrófagos (arriba a la derecha) que rodean el depósito amiloide fibrilar típico (centro e izquierda); Aumento $\times 4.500$. **Figura 5B**, granulocitos (mitad superior de la imagen) y depósito de amiloide (mitad inferior de la imagen); los neutrófilos y macrófagos tienen un citoplasma más oscuro; se observa un eosinófilo en el centro de la imagen; $\times 3.000$. **Figura 5C**, fragmento aumentado de un depósito de amiloide, granulocitos y macrófagos (también observado en 5B); $\times 7.000$.

Figura 6. Identificación inmunoquímica de células y proteínas en el aclaramiento mediado por anticuerpos anti-SAP de los depósitos de amiloide AA. Los dos paneles superiores muestran la intensa infiltración de macrófagos, identificada por una fuerte tinción con anti-F4/80, en todos los depósitos de amiloide congófilos en el bazo y el hígado. Tal tinción está completamente ausente en los depósitos amiloides de ratones no tratados con anticuerpo anti-SAP (no mostrado). El tercer panel muestra la co-localización de amiloide AA, CD68 (un marcador de actividad endocítica fagocítica) y C3 de ratón. El panel inferior muestra macrófagos fagocíticamente activos que rodean y envuelven un fragmento de amiloide AA de ratón. **Figura 6A** es el bazo el día 1 con rojo Congo, a la izquierda; anti-F4/80, derecha; **Figura 6B** es el hígado el día 1 con rojo Congo, a la izquierda; anti-F4/80, derecha; **Figura 6C** es el bazo el día 4 con proteína anti-AA, izquierda; anti-CD68, centro; anti-C3 de ratón, derecha; **Figura 6D** es la imagen confocal del día 4 con anti-CD68, rojo; anti- proteína AA, verde; contratinción nuclear, azul.

Figura 7. Tinción inmunohistoquímica con anticuerpo anti-SAP humano en el bazo de un ratón de tipo salvaje amiloidótico después de la inyección de SAP humano puro aislado. Hay una fuerte tinción positiva de todos los depósitos de amiloide en su distribución típica de la zona marginal. Este SAP humano unido es la diana del anticuerpo terapéutico anti-SAP según la presente invención.

Figura 8. Estructura tridimensional de la molécula de SAP. La molécula de SAP está compuesta por cinco subunidades idénticas asociadas no covalentemente dispuestas con simetría pentamérica cíclica en una configuración de tipo disco. Sobre una cara plana del disco, cada promotor tiene una hélice α corta mostrada en color rojo y esta cara se denomina cara A. Sobre la cara opuesta, cada promotor tiene el bolsillo de unión al ligando dependiente de calcio a través del cual SAP reconoce y se une a sus ligandos, incluyendo las fibrillas de amiloide, y se denomina cara B. Los dos átomos de calcio de cada bolsillo de unión se muestran como esferas de color amarillo.

Figura 9. Mapeo epitópico para anticuerpo anti-SAP humano monoclonal SAP-5. **A.** secuencia de aminoácidos completa de SAP humano que muestra los puntos en los que es escindida por CNBr en TFA al 70% (residuo 159M, en color azul) y por quimotripsina, sin reducción/carbamidometilación, en bicarbonato de amonio en ausencia de calcio, (residuos 140Y y 144F, en color rojo). **B.** Análisis SDS-PAGE de SAP escindido con CNBr. Panel izquierdo: tinción con azul de Coomassie; calle 1, SAP de control no tratado; calle 2, SAP después de la escisión con CNBr, que muestra el promotor intacto no escindido residual y vestigial y los fragmentos esperados a aproximadamente 20 kD (residuos 1-159) y 5 kD (160-204) respectivamente. Estos se confirmaron mediante espectrometría de masas. Panel derecho: transferencia Western con SAP-5 que muestra una tinción intensa de SAP no tratado intacto en las calles 1 (100 ng cargados) y 2 (10 ng), y también SAP intacto residual y el fragmento de los residuos 1-159 más grande en SAP escindido con CNBr

en las calles 3 (600 ng), 4 (130 ng) y 5 (64 ng). La calle 6 contenía CRP humana pura aislada con la cual SAP-5 no reaccionaba en absoluto. **C.** análisis SDS-PAGE de SAP digerido con quimotripsina. Panel izquierdo: tinción con azul de Coomassie; calle 1, SAP de control no tratado; calle 2, SAP después de la digestión con quimotripsina, que muestra los principales fragmentos esperados correspondientes a los residuos 1-140 y 145-204. Estos se confirmaron mediante espectrometría de masas. Panel derecho: transferencia Western con SAP-5 que muestra una tinción intensa de SAP no tratado intacto en las calles 1 (500 ng cargados) y 2 (100 ng), y también SAP intacto residual en las calles 3 y 4 que contenían SAP digerido con quimotripsina a diferentes cargas. Se observa una unión muy débil de SAP-5 al fragmento de los residuos 1-140 solamente en la calle 3 que era la más intensamente cargada. Las calles 5 (500 ng) y 6 (100 ng) contenían CRP humana pura aislada con la cual SAP-5 no reaccionaba en absoluto. **D.** Comparación de secuencias entre SAP humano (h) y SAP de ratón (m) para los residuos 136-147. Panel superior, diferencias indicadas más arriba por los residuos mostrados en color rojo en la secuencia murina. Panel inferior, posición de este bucle extendido con 140Y en su parte más alta mostrado en color rojo en la estructura 3D de SAP humano. Los residuos diferentes en la secuencia murina se muestran en color azul. Las esferas de color amarillo representan los átomos de calcio unidos en el bolsillo de unión al ligando de cada promotor.

Figura 10. El complejo de SAP con CPHPC. El complejo de SAP con CPHPC comprende dos moléculas de SAP pentaméricas entrecruzadas, cara B con cara B por 5 moléculas de CPHPC, los grupos de cabeza de la D-prolina en cualquiera de los extremos a los que están unidos en los bolsillos de unión al ligando dependientes de calcio de pares opuestos de los promotores de SAP.

Figura 11. El complejo de SAP y CPHPC entrecruzados con BS3. El complejo de SAP y CPHPC se entrecruzó covalentemente utilizando el entrecruzador bifuncional, BS3, para producir un complejo estable en el que la mayor parte de la cara B de SAP está ocluida exactamente como debe estar cuando el SAP se une a las fibrillas de amiloide *in vivo*. Los anticuerpos anti-SAP humano de acuerdo con la presente invención deben ser capaces de reconocer y unirse a SAP cuando éste está en esta forma unida al ligando.

Figura 12. Inmunoprecipitación de SAP humano por anticuerpos monoclonales de ratón. Doble difusión en gel de agarosa entre SAP humano puro aislado en el pocillo central a 0,5 mg/ml y anticuerpos monoclonales purificados aislados en los pocillos circundantes a diluciones seriadas desde 1,5 mg/ml (pocillo 1) hasta 0,04875 mg/ml (pocillo 6). Tanto SAP-5 como Abp1 (6H1.G2) precipitan con SAP humano pero Abp1 es notablemente más fuerte, mostrando precipitación incluso en exceso del antígeno principal en el pocillo 5 mientras SAP-5 no muestra nada después del pocillo 2.

Figura 13. Análisis de inmunotransferencia de SAP humano nativo y proteína C reactiva (CRP). Se sometieron a electroforesis en gel de agarosa SAP humano puro y CRP aislados, mostrado mediante tinción con azul de Coomassie a la izquierda de cada panel, y se transfirieron geles duplicados sobre una membrana mediante técnicas convencionales y a continuación se detectaron utilizando SAP-5 a 3 µg/ml o Abp1 a 10 µg/ml. La IgG de ratón unida se reveló utilizando anti-IgG de conejo policlonal marcada con peroxidasa seguido de sustrato de peroxidasa y DAB, a la derecha en cada panel. Tanto SAP-5 como Abp1 se unen a SAP humano pero ninguno se une a CRP humana, la proteína más estrechamente relacionada con SAP humano con el que comparte 55% de identidad estricta residuo a residuo.

Descripción detallada de la invención

Amiloidosis

Los aspectos de la presente invención se refieren el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad causada por el depósito de amiloide en los tejidos, siendo conocida tal enfermedad como amiloidosis.

Los términos "profilaxis", "prevención", "prevenir", "que previene", "supresión", "suprimir" y "que suprime" como se emplean en la presente memoria se refieren al curso de una acción (tal como la administración de uno o más compuestos o composiciones farmacéuticas) iniciada (p. ej., antes de la aparición de un síntoma clínico de amiloidosis) con el fin de prevenir, suprimir o reducir, de forma temporal o permanente, la aparición de una manifestación clínica de amiloidosis.

Los términos "tratamiento", "tratar" y "que trata", como se utilizan en la presente memoria, se refieren al curso de una acción (tal como la administración de uno o más compuestos o composiciones farmacéuticas) iniciada después del inicio de las manifestaciones clínicas de amiloidosis con el fin de eliminar o reducir, ya sea de forma temporal o permanente, una manifestación clínica o progresión de la amiloidosis.

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

El término "amiloide" se refiere a los depósitos extracelulares en los tejidos de fibras de proteínas insolubles compuestas de fibrillas con una morfología ultraestructural característica, una estructura de núcleo de lámina cruzada β y la propiedad patognomónica histológica de tinción de unirse al colorante rojo Congo de una solución alcohólica alcalina y después producir dicroísmo de color rojo-verde cuando se visualiza al microscopio con luz

polarizada cruzada fuerte. Se sabe que aproximadamente 25 proteínas diferentes no relacionadas forman fibrillas de amiloide que se depositan en los tejidos humanos y comparten todas estas propiedades típicas. Los depósitos de amiloide en la sustancia cerebral, el amiloide cerebral, difieren un poco de los depósitos de amiloide en otras partes del cuerpo ya que siempre son focales y de tamaño microscópico, y se refieren comúnmente como placas amiloides.

La amiloidosis, que es una enfermedad causada directamente por el depósito de amiloide en los tejidos, comprende tanto la amiloidosis local, en la que los depósitos están confinados a una región anatómica y/o un sistema de tejidos u órganos, como la amiloidosis sistémica en la que los depósitos pueden aparecer en cualquier órgano o tejido en el organismo, incluyendo los vasos sanguíneos y los tejidos conectivos. La causa de la amiloidosis puede ser adquirida o hereditaria. La amiloidosis adquirida surge como una complicación de una afección médica anterior, que puede ser a su vez adquirida o hereditaria. Por lo tanto, la amiloidosis sistémica reactiva, conocida como de tipo proteína A amiloide (AA) es una complicación de las enfermedades inflamatorias crónicas activas como la artritis reumatoide, la artritis reumatoide juvenil, la enfermedad de Crohn, las infecciones crónicas y la sepsis crónica, y los síndromes de fiebre periódica hereditaria tales como la Fiebre Mediterránea familiar, el síndrome de Muckle-Wells y el síndrome CINCA. La amiloidosis relacionada con la diálisis está causada por la acumulación de $\beta 2$ -microglobulina como resultado de insuficiencia renal en fase terminal. La amiloidosis de la cadena ligera (AL) de inmunoglobulina monoclonal es una complicación del mieloma múltiple o la gammopatía monoclonal benigna (gammopatía monoclonal de significado incierto, MGUS). La amiloidosis adquirida de tipo transtiretina puede ocurrir sin ninguna enfermedad previa y es simplemente una complicación de la vejez. La amiloidosis hereditaria está causada por mutaciones en los genes de varias proteínas que codifican la expresión de proteínas variantes que tienen una mayor propensión a formar fibrillas de amiloide, e incluye la enfermedad causada por transtiretina, apolipoproteína A1, gelsolina, lisozima, cistatina C y proteína β amiloide. Las descripciones exhaustivas de todas las formas diferentes de amiloidosis y las proteínas involucradas están disponibles en los libros de texto y en la bibliografía científica^{1,8,21}.

El depósito de amiloide local, confinado a un órgano o tejido, puede ser clínicamente silencioso o puede causar daños y enfermedades graves en los tejidos. Por ejemplo, la angiopatía amiloide cerebral en la que los depósitos vasculares de amiloide están compuestos de proteína A β , generalmente es una afección adquirida esporádica que surge por razones que no se entienden en ausencia de cualquier otra patología, y es una causa importante de hemorragia cerebral y apoplejía. Existen varias enfermedades muy importantes y comunes, en particular la enfermedad de Alzheimer y la diabetes tipo 2, en las que los depósitos de amiloide siempre están presentes, pero en las que aún no se conocen los mecanismos precisos que causan estas enfermedades respectivas. Sin embargo, es muy probable que el depósito local de amiloide en el cerebro y los vasos sanguíneos cerebrales en la enfermedad de Alzheimer, y en los islotes pancreáticos en la diabetes exacerbe la patología y la enfermedad. Por consiguiente, en una realización, la invención se refiere al tratamiento tanto de la enfermedad de Alzheimer como de la diabetes tipo 2, de hecho, a cualquier afección asociada con la presencia de depósitos de amiloide en los tejidos.

Muchas formas de encefalopatía espongiiforme transmisible (enfermedades priónicas) están asociadas con depósitos de amiloide en el cerebro y, por lo tanto, la presente invención se relaciona con todas estas afecciones, incluyendo la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en los seres humanos, la propia enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, el kuru y otras diversas formas de enfermedad priónica humana, y también la encefalopatía espongiiforme bovina, enfermedad de desgaste crónico de ciervos mula y alces, y la encefalopatía transmisible del visón.

Se contempla el tratamiento de animales, incluyendo aves de corral tales como pollos, patos, pavos y gansos y, preferiblemente, mamíferos, incluyendo seres humanos, así como perros, gatos, caballos, vacas, ovejas, cerdos, cobayas, ratones y ratas. En particular, se prefiere el tratamiento de seres humanos.

Por consiguiente, en un aspecto, se proporciona un compuesto que agota SAP combinado con un anticuerpo específico para SAP para su uso en el tratamiento de la amiloidosis.

Anticuerpo anti-SAP

Las referencias en la presente memoria a anticuerpos anti-SAP, anticuerpos de unión a SAP y anticuerpos específicos para SAP son equivalentes y se refieren a anticuerpos que se unen a SAP de una manera específica y sustancialmente no reaccionan de forma cruzada con otras moléculas presentes en la circulación o los tejidos. En particular, los anticuerpos de acuerdo con la invención se dirigen a SAP que está unido a fibrillas de amiloide en los depósitos de amiloide de los tejidos.

La molécula de SAP es un pentámero compuesto por cinco protómeros asociados no covalentemente idénticos dispuestos con simetría pentamérica cíclica en una configuración de tipo disco. Sobre una cara de la molécula cada promotor tiene una hélice α corta, denominada en la presente memoria cara A. Sobre la cara opuesta cada promotor tiene el bolsillo de unión al ligando dependiente de calcio a través del cual SAP reconoce y se une a sus ligandos, incluyendo las fibrillas de amiloide, y denominada en la presente memoria cara B. Existen dos átomos de calcio en cada bolsillo de unión (Figura 8). En ausencia de calcio, el SAP humano forma dímeros decaaméricos estables, probablemente a través de interacciones cara A con cara A. En presencia de calcio, el SAP humano aislado se agrega rápidamente y precipita, como resultado de la formación de un entramado molecular debido a la unión del carboxilato expuesto del residuo Glu167 sobre una molécula de SAP por el sitio de unión al ligando dependiente de

calcio de otra molécula de SAP. Esta autoagregación de SAP está inhibida por otros ligandos a los que SAP se une.

Un "anticuerpo" como se utiliza en la presente memoria incluye, pero no se limita a, fragmentos Fab, biespecíficos, de cadena sencilla, injertados con regiones determinantes de la complementariedad (CDR), quiméricos, recombinantes, monoclonales, policlonales, y fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab. Tales fragmentos incluyen fragmentos de anticuerpos anti-SAP completos que conservan su actividad de unión a SAP, fragmentos Fv, F(ab'), F(ab')₂ y fragmentos de anticuerpos F(v), así como proteínas de fusión y otras proteínas sintéticas que comprenden el sitio de unión a antígeno del anticuerpo anti-SAP. Además, los anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos humanizados, como se describe con más detalle a continuación.

Las regiones variables y las CDR en una secuencia de anticuerpos se pueden identificar alineando las secuencias frente a una base de datos de regiones variables conocidas. Los métodos para identificar estas regiones son descritos, por ejemplo, por Kontermann y Dubel, eds., *Antibody Engineering*, Springer, Nueva York, NY, 2001. Las bases de datos de secuencias de anticuerpos se describen, por ejemplo, en VBASE2 en www.vbase2.org, como describen Retter et al., en *Nucl. Acids Res.*, 33 (Database Issue): D671-D674 (2005).

El anticuerpo monoclonal anti-SAP producido en ratón está disponible comercialmente de varias fuentes, tales como Sigma-Aldrich, Gillingham, Dorset, Reino Unido (Número de catálogo A9191); US Biological (Núm. de catálogo S1003-3, 1003-4); Acris Antibodies (Núm. de catálogo BM225); Kamy Biomedical Co. (Núm. de catálogo MC-978); Cell Sciences (Núm. de catálogo MON 6006); Abnova Corp. (Núm. de catálogo H0000325-MO7). Los ejemplos de anticuerpos anti-SAP humano monoclonales incluyen ocho anticuerpos IgG anti-SAP humano monoclonales distintos (SAP-1 - SAP-7 y NH) generados utilizando técnicas convencionales y sometidos a prueba mediante ensayos inmunoradiométricos (IRMA) para determinar su unión a SAP humano (véase el Ejemplo 9 a continuación). Dos de estos anticuerpos, SAP-5 y SAP-2, son del isotipo IgG2a mientras los otros son del isotipo IgG1. De manera importante, la IgG2a murina es un isotipo conocido por activar el complemento de ratón mientras los anticuerpos IgG1 murinos no lo hacen y el mecanismo de aclaramiento de amiloide de acuerdo con la presente invención es dependiente del complemento (véanse los Ejemplos 6 y 7, más abajo). El hibridoma que secreta SAP-5 será depositado. Los ejemplos de anticuerpos anti-SAP humano monoclonales también incluyen un conjunto de sus anticuerpos IgG2a anti-SAP monoclonales distintos generados mediante técnicas convencionales (3H8.H3, 3H8.H6, 3H8.H8, 6H1.G2, 6H1.G3, 6H1.H1, uno de los cuales, 6H1.G2 se denomina aquí Abp1 y se ha depositado en la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC) y se le ha asignado el número de acceso (Pendiente de Asignación; número de expediente del agente de EEUU 674599-2007; número de expediente del agente PCT 305407-20073, ambos referidos en los documentos de depósito).

El epítipo de SAP humano que es reconocido y unido por SAP-5 es parte de la secuencia de aminoácidos lineal de SAP humano, como demuestra el hecho de que este anticuerpo se une igualmente bien a SAP humano completamente desnaturalizado y nativo (Ejemplo 9). La presente solicitud también muestra que SAP-5 se une a una secuencia de aminoácidos lineal en el fragmento amino terminal grande de SAP humano, residuos 1-159, después de la escisión de SAP por bromuro de cianógeno en el residuo 159M (Figura 9). La digestión de SAP humano con quimotripsina escinde SAP inmediatamente después de los residuos 140Y y 144F para proporcionar los fragmentos 1-140 y 145-204 perdiéndose el fragmento pequeño intermedio 140-144. El anticuerpo monoclonal SAP-5 reacciona muy débilmente con el fragmento 1-140 pero muy fuertemente con la pequeña cantidad de promotor de SAP intacto no digerido residual, sugiriendo que la secuencia reconocida por SAP-5 puede incluir los residuos 140-159 (Figura 9). La comparación de secuencia entre SAP humano y de ratón revela 3 diferencias de aminoácidos en los residuos 139, 143 y 145, compatibles con la inmunogenicidad potencial de esta parte de la secuencia de SAP humano en ratones en los que se había producido el anticuerpo monoclonal (Figura 9). Por el contrario, el anticuerpo Abp1 solamente se une a SAP humano nativo y no al desnaturalizado o escindido y por lo tanto reconoce un epítipo discontinuo o conformacional (Ejemplo 9). El SAP humano nativo, una proteína compuesta por 5 protómeros glicosilados de 204 residuos idénticos cada uno con una masa de 25.462 Da⁷, contiene epítopos discretos y diferentes. Dos de estos epítopos son: (1) una secuencia de aminoácidos lineal (contigua) encontrada en los 159 residuos amino terminales de la proteína, y (2) un epítipo conformacional presente solamente en la molécula nativa. Sin embargo, ambos anticuerpos descritos anteriormente se unen óptimamente a SAP en su conformación unida al ligando (Ejemplo 9), que es esencial para un anticuerpo anti-SAP humano eficaz de acuerdo con la presente invención en la que el anticuerpo se debe unir a, y activar el complemento sobre, el SAP humano unido a los depósitos de amiloide *in vivo*.

Por lo tanto, los anticuerpos de la presente invención se unen a un epítipo de SAP humano que es reconocido por SAP-5 o Abp1, incluyendo anticuerpos que se unen a la secuencia de aminoácidos lineal en el fragmento amino terminal de SAP humano después de la escisión de la proteína por quimotripsina y el epítipo conformacional descrito más arriba.

El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido de un único clon de células plasmáticas derivadas de linfocitos B que produce un anticuerpo homogéneo de una única clase de cadena pesada y ligera y especificidad epítópica.

Los anticuerpos monoclonales son típicamente muy específicos, y se dirigen contra un solo sitio antigénico (epítipo), en contraste con los anticuerpos convencionales dentro de un suero inducido en un animal completo, por

inmunización con un antígeno particular. Tales anticuerpos convencionales derivan de muchos clones diferentes de linfocitos B que reconocen epítomos iguales o diferentes en el antígeno inmunizante, y se conocen como anticuerpos policlonales. Además de su especificidad muy restringida, los anticuerpos monoclonales son producidos fácilmente en forma pura no contaminados por otras inmunoglobulinas, mientras que el aislamiento de anticuerpos específicos de un antisuero policlonal requiere procedimientos de inmunopurificación exigentes. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar por el método del hibridoma (véase Kohler et al., *Nature*, 256:495-7, 1975), o por métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales pueden incluso aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fagos utilizando técnicas bien conocidas.

Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de los anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos concreta, mientras el resto de las cadenas es idéntico u homólogo a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos Núm. 4.816.567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)).

En el método de hibridoma, un animal anfitrión, típicamente un ratón, se inmuniza con el antígeno deseado para inducir la generación de clones de linfocitos B que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a ese antígeno. Los linfocitos recogidos del animal inmunizado se fusionan *in vitro* a continuación con una línea continua de células de mieloma desarrollada *in vitro* para formar las llamadas células de hibridoma. A continuación, éstas se seleccionan por crecimiento en un medio de cultivo adecuado que permita la supervivencia solamente de las células fusionadas y no de las células de mieloma parentales no fusionadas. Los ejemplos de células de mieloma incluyen, pero no se limitan a, líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano que se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos.

El medio de cultivo de las células de hibridoma en crecimiento se puede analizar para determinar anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. La especificidad de unión de los anticuerpos producidos por las células se puede determinar por varios métodos - tales como la inmunoprecipitación o un ensayo de unión *in vitro* - tal como el radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA) o un ensayo inmunorradiométrico (IRMA).

Después de identificar las células de hibridoma que producen los anticuerpos deseados, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y cultivar mediante métodos convencionales. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan del medio de cultivo o del suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas bien conocidos - tales como proteína A-Sefarosa, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía de hidroxilapatita o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos policlonales se pueden producir en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas, intramusculares o intraperitoneales del antígeno relevante y un coadyuvante. Se puede obtener una respuesta de anticuerpos mejorada conjugando el antígeno relevante con una proteína que sea inmunogénica en la especie a inmunizar. Los animales se pueden inmunizar contra el antígeno, productos conjugados inmunogénicos o derivados combinando, p. ej., 100 µg o 5 µg de la proteína o producto conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con coadyuvantes adecuados, incluyendo, pero no limitados a, coadyuvante completo de Freund, hidróxido de aluminio, coadyuvante incompleto de Freund, L-tirosina, proteína adsorbida sobre nitrocelulosa, complejos inmuno-estimulantes (ISCOMS, micelas de saponina/colesterol modificadas con antígeno) o coadyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético), por ejemplo, e inyectando la solución intradérmicamente en múltiples sitios. Los animales se pueden reforzar a continuación con 1/5 de la cantidad original de péptido o producto conjugado en coadyuvante mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. A los 7-14 días de la inyección de refuerzo, se pueden tomar muestras de sangre de los animales y someter a ensayo el suero para determinar el título de anticuerpos.

Los anticuerpos y fragmentos anti-SAP también abarcan variantes de los anticuerpos anti-SAP y fragmentos de los mismos. Las variantes incluyen péptidos y polipéptidos que comprenden una o más sustituciones, deleciones y/o adiciones de secuencias de aminoácidos que tienen la misma o sustancialmente la misma afinidad y especificidad de unión al epítipo que el anticuerpo anti-SAP o sus fragmentos.

Las deleciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos pueden producir un cambio silencioso y dar como resultado una sustancia funcionalmente equivalente. Se pueden hacer sustituciones de aminoácidos deliberadas sobre la base de la similitud en polaridad, carga, solubilidad, carácter hidrófobo, carácter hidrófilo, y/o naturaleza anfipática de los residuos. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polares sin carga que tienen valores de carácter hidrófilo similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparragina, glutamina, serina, treonina, fenilalamina y tirosina.

Se pueden hacer sustituciones conservativas, por ejemplo, de acuerdo con la siguiente Tabla. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna se pueden sustituir entre sí:

ALIFÁTICOS	No polares	G A P
		I L V
	Polares - sin carga	C S T M
		N Q
	Polares - cargados	D E
		K R
AROMÁTICOS		H F W Y

Se puede producir una sustitución homóloga (tanto sustitución como remplazo se utilizan en la presente memoria para significar el intercambio de un residuo de aminoácido existente, por un residuo alternativo), *es decir* una sustitución de similar por similar, tal como alcalino por alcalino, ácido por ácido, polar por polar, etc. También se puede producir una sustitución no homóloga, *es decir* de una clase de residuo por otra o alternativamente, que implique la inclusión de aminoácidos no naturales - tales como ornitina (en lo sucesivo denominada Z), ácido diaminobutírico-ornitina (en lo sucesivo denominado B), norleucina-ornitina (en lo sucesivo denominado O), piridilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

Los reemplazos también se pueden realizar por aminoácidos no naturales incluyendo; aminoácidos alfa* y alfa-disustituídos*, aminoácidos N-alkilados*, ácido láctico*, derivados haluro de aminoácidos naturales tales como trifluorotirosina*, p-Cl-fenilalanina*, p-Br-fenilalanina*, p-I-fenilalanina*, L-alil-glicina*, β-alanina*, ácido L-α-amino butírico*, ácido L-γ-amino butírico*, ácido L-α-amino isobutírico*, ácido L-ε-amino caproico#, ácido 7-amino heptanoico*, L-metionina sulfona#, L-norleucina*, L-norvalina*, p-nitro-L-fenilalanina*, L-hidroxiprolina#, L-tioprolina*, derivados metílicos de fenilalanina (Phe) tales como 4-metil-Phe*, pentametil-Phe*, L-Phe (4-amino)#, L-Tyr (metilo)*, L-Phe (4-isopropilo)*, L-Tic (ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolino-3-carboxílico)*, ácido L-diaminopropiónico# y L-Phe (4-bencilo)*. La notación * se ha utilizado para los fines de la discusión anterior (en relación con la sustitución homóloga o no homóloga), para indicar la naturaleza hidrófoba del derivado, mientras que # se ha utilizado para indicar la naturaleza hidrófila del derivado, ## indica características anfipáticas.

Por lo tanto, las variantes pueden incluir péptidos y polipéptidos que comprenden una o más sustituciones, deleciones y/o adiciones de secuencias de aminoácidos, en los anticuerpos anti-SAP y fragmentos de los mismos en donde tales sustituciones, deleciones y/o adiciones no causan cambios sustanciales en la afinidad y especificidad de la unión del epítipo. Por ejemplo, una variante de un anticuerpo anti-SAP o fragmento del mismo puede ser el resultado de uno o más cambios en un anticuerpo anti-SAP o fragmento del mismo, donde el anticuerpo anti-SAP o fragmento del mismo modificados tienen la misma o sustancialmente la misma afinidad y especificidad de unión al epítipo que la secuencia de partida. Las variantes pueden ser de origen natural, tales como las variantes alélicas o de empalme, o se pueden construir artificialmente. Se pueden preparar variantes a partir de las correspondientes moléculas de ácido nucleico que codifican dichas variantes. Las variantes de los anticuerpos anti-SAP o fragmentos de los mismos pueden tener cambios en las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y/o pesadas que son de origen natural o son introducidas por medio de modificación genética *in vitro* de secuencias nativas utilizando técnicas de ADN recombinante. Las variantes de origen natural incluyen variantes "somáticas" que se generan *in vivo* en las secuencias de nucleótidos de la línea germinal correspondientes durante la generación de una respuesta de anticuerpo a un antígeno foráneo.

Las variantes de anticuerpos de unión a SAP y fragmentos de unión también se pueden preparar mediante técnicas de mutagénesis. Por ejemplo, se pueden introducir cambios de aminoácidos al azar a lo largo de una región codificante de anticuerpo y las variantes resultantes se pueden escrutar para determinar la afinidad de unión para SAP o para otra propiedad. Alternativamente, se pueden introducir cambios de aminoácidos en regiones seleccionadas del anticuerpo anti-SAP, tal como en las CDR de las cadenas ligeras y/o pesadas, y/o en las regiones marco, y los anticuerpos resultantes se pueden escrutar para determinar su unión a SAP o alguna otra actividad. Los cambios de aminoácidos abarcan una o más sustituciones de aminoácidos en una CDR, que van desde una diferencia de un único aminoácido hasta la introducción de múltiples permutaciones de aminoácidos dentro de una CDR dada. También se incluyen las variantes generadas por la inserción de aminoácidos para aumentar el tamaño de una CDR.

Los anticuerpos anti-SAP o fragmentos de los mismos se pueden proporcionar con una región Fc modificada en la que una región Fc natural se modifica para aumentar la semivida del anticuerpo o fragmento en un entorno biológico, por ejemplo, la semivida en suero o una semivida medida por medio de un ensayo *in vitro*.

Las variantes también incluyen anticuerpos anti-SAP o fragmentos de los mismos que comprenden una región Fc modificada, en donde la región Fc modificada comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo salvaje. La región Fc variante se puede diseñar, en relación con una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje, para que se una a los receptores de Fc con una afinidad mayor o menor. Por ejemplo, los anticuerpos de unión a SAP y fragmentos de los mismos pueden comprender una región Fc modificada.

La región Fc se refiere a polipéptidos sintéticos o de origen natural homólogos al dominio C-terminal de IgG que se produce en la digestión con papaína de la IgG. La Fc de IgG tiene un peso molecular de aproximadamente 50 kD. En los anticuerpos y fragmentos, se puede utilizar una región Fc completa, o solamente una porción que mejora la semivida. Además, son aceptables muchas modificaciones en la secuencia de aminoácidos, ya que la actividad nativa no es necesaria o deseable en todos los casos.

Los anticuerpos de unión a SAP y los fragmentos de los mismos también abarcan derivados de los anticuerpos, fragmentos y secuencias descritos en la presente memoria. Los derivados incluyen polipéptidos o péptidos, o variantes, fragmentos o derivados de los mismos, que se han modificado químicamente. Los ejemplos incluyen el anclaje covalente de uno o más polímeros - tales como polímeros solubles en agua, carbohidratos conectados a N o conectados a O, azúcares, fosfatos y/u otras moléculas similares. Los derivados se modifican de una manera que es diferente de los péptidos o polipéptidos de origen natural o de partida, en el tipo o la ubicación de las moléculas ancladas. Los derivados incluyen adicionalmente la delección de uno o más grupos químicos que están presentes de forma natural en el péptido o polipéptido.

La presente invención también abarca anticuerpos de unión a SAP que incluyen dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa. Alternativamente, los anticuerpos de unión a SAP pueden ser construcciones tales como anticuerpos de cadena sencilla o anticuerpos "mini" que conservan la actividad de unión a SAP. Tales construcciones se pueden preparar por métodos bien conocidos en la técnica.

Se contemplan métodos para crear versiones de ADN recombinante de las regiones de unión a antígeno de moléculas de anticuerpos que eluden la generación de anticuerpos monoclonales para los anticuerpos de unión a SAP y fragmentos de los mismos. El ADN se clona en un sistema de expresión bacteriano. Un ejemplo de tal técnica utiliza un sistema de vector lambda de bacteriófago que tiene una secuencia líder que hace que la proteína Fab expresada migre al espacio periplásmico (entre la membrana de la célula bacteriana y la pared celular) o que se secrete. Se pueden generar y escrutar rápidamente grandes cantidades de fragmentos Fab funcionales para determinar aquellos que se unen a SAP. Tales agentes de unión a SAP (fragmentos Fab con especificidad para un polipéptido de SAP) están incluidos específicamente en los anticuerpos de unión a SAP y fragmentos de los mismos.

Los anticuerpos de unión a SAP y fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos humanizados o humanos modificados por ingeniería genética. Como se emplea en la presente memoria, "un anticuerpo humanizado", o un fragmento de unión a antígeno del mismo, es un polipéptido recombinante que comprende una porción de un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo no humano y una porción de las regiones marco y/o constantes de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humano modificado genéticamente o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo no humano (p. ej., de ratón) que ha sido modificado genéticamente modificando (p. ej., eliminando, insertando o sustituyendo) aminoácidos en posiciones específicas para reducir o eliminar cualquier inmunogenicidad detectable del anticuerpo modificado en un ser humano.

Los anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos quiméricos y anticuerpos injertados con CDR. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos que incluyen una región variable de un anticuerpo no humano unida a una región constante humana. Así, en los anticuerpos quiméricos, la región variable es en su mayoría no humana, y la región constante es humana. Los anticuerpos quiméricos y los métodos para elaborararlos se describen, por ejemplo, en *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 81: 6841-6855 (1984). Aunque pueden ser menos inmunogénicos que un anticuerpo monoclonal de ratón, las administraciones de anticuerpos quiméricos se han asociado con respuestas inmunitarias humanas (HAMA) a la porción no humana de los anticuerpos. Los anticuerpos quiméricos también se pueden producir mediante el empalme de los genes de una molécula de anticuerpo de ratón con una especificidad de unión a antígeno adecuada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano con una actividad biológica apropiada, tal como la capacidad para activar el complemento humano y mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Un ejemplo es el reemplazo de una región Fc por la de un isotipo diferente.

Los anticuerpos injertados con CDR son anticuerpos que incluyen las CDR de un anticuerpo "donador" no humano unidas a la región marco de un anticuerpo "receptor" humano. En general, los anticuerpos injertados con CDR incluyen más secuencias de anticuerpos humanos que los anticuerpos quiméricos porque incluyen tanto secuencias de la región constante como secuencias de la región variable (marco) de anticuerpos humanos. Así, por ejemplo, un anticuerpo humanizado injertado con CDR de la invención puede comprender una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos contigua (p. ej., aproximadamente 5 o más, 10 o más, o incluso 15 o más residuos de aminoácidos contiguos) de la región marco de un anticuerpo humano (p. ej., FR-1, FR-2 o FR-3 de un anticuerpo humano) u, opcionalmente, la mayor parte o toda la región marco completa de un anticuerpo humano. Los anticuerpos injertados con CDR y los métodos para elaborararlos se describen en *Nature*, 321: 522-525 (1986). Los métodos que se pueden utilizar para producir anticuerpos humanizados también se describen, por ejemplo, en los documentos US 5.721.367 y 6.180.377.

Los "anticuerpos remodelados" son anticuerpos no humanos o humanizados (p. ej., anticuerpos quiméricos o injertados con CDR) que se han modificado genéticamente para reemplazar ciertos residuos de aminoácidos expuestos al disolvente para reducir su inmunogenicidad o mejorar su función. La remodelación de un anticuerpo quimérico puede comprender la identificación de los residuos expuestos a los disolventes en la región marco no humana de un anticuerpo quimérico y el reemplazo de al menos uno de ellos por los residuos de superficie

correspondientes de una región marco humana. La remodelación se puede lograr mediante cualquier técnica de ingeniería genética adecuada.

Se pueden encontrar detalles adicionales sobre los anticuerpos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos modificados genéticamente y los métodos para su preparación en *Antibody Engineering*, Springer, Nueva York, NY, 2001.

Los ejemplos de anticuerpos humanizados o humanos diseñados genéticamente son los anticuerpos IgG, IgM, IgE, IgA e IgD. Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, etc.) o isotipo y pueden comprender una cadena ligera kappa o lambda. Por ejemplo, un anticuerpo humano puede comprender una cadena pesada de IgG o un fragmento definido, tal como al menos uno de los isotipos, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Como un ejemplo adicional, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden comprender una cadena pesada de IgG1 y una cadena ligera kappa o lambda.

Los anticuerpos anti-SAP y los fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos humanos - tales como los anticuerpos que se unen a los polipéptidos de SAP y están codificados por secuencias de ácido nucleico que pueden ser variantes somáticas naturales de la secuencia de ácido nucleico de inmunoglobulina de la línea germinal humana, y fragmentos, variantes sintéticas, derivados y fusiones de los mismos. Tales anticuerpos se pueden producir mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo mediante el uso de mamíferos transgénicos (tales como ratones transgénicos) en los que las inmunoglobulinas nativas se han reemplazado por genes de V humana en el cromosoma de los mamíferos.

Los anticuerpos humanos dirigidos contra SAP también se pueden producir utilizando animales transgénicos que no tienen producción de inmunoglobulina endógena y están diseñados genéticamente para que contengan loci de inmunoglobulina humana, como se describe en los documentos WO 98/24893 y WO 91/00906.

Utilizando un animal transgénico descrito anteriormente, se puede producir una respuesta inmunitaria a una molécula antigénica seleccionada, y las células productoras de anticuerpos se pueden eliminar del animal y utilizar para producir hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos. Los protocolos de inmunización, los coadyuvantes y similares son conocidos en la técnica, y se utilizan en la inmunización, por ejemplo, de un ratón transgénico.

El desarrollo de tecnologías para elaborar repertorios de genes de anticuerpos humanos recombinantes, y la visualización de los fragmentos de anticuerpos codificados sobre la superficie de bacteriófagos filamentosos, han proporcionado un medio para elaborar anticuerpos humanos directamente. Los anticuerpos producidos por la tecnología de fagos se producen como fragmentos de unión a antígeno - generalmente fragmentos Fv o Fab - en bacterias y, por lo tanto, carecen de funciones efectoras. Las funciones efectoras pueden ser introducidas por medio de una de dos estrategias: los fragmentos se pueden modificar genéticamente en anticuerpos completos para su expresión en células de mamíferos, o en fragmentos de anticuerpos biespecíficos con un segundo sitio de unión capaz de desencadenar una función efectora.

Los anticuerpos humanos pueden ser generados a través del escrutinio *in vitro* de bibliotecas de presentación de anticuerpos (*J. Mol. Biol.* (1991) 227: 381). Se han descrito diversas bibliotecas de presentación en fagos que contienen anticuerpos y se pueden preparar fácilmente. Las bibliotecas pueden contener una diversidad de secuencias de anticuerpos humanos, tales como los fragmentos Fab, Fv y scFv humanos, que se pueden escrutar frente a una diana apropiada. Las bibliotecas de presentación en fagos pueden comprender péptidos o proteínas distintos de los anticuerpos que pueden ser escrutados para identificar agentes capaces de unirse selectivamente a SAP.

Los procesos de presentación en fagos imitan la selección inmunitaria mediante la presentación de repertorios de anticuerpos sobre la superficie de bacteriófagos filamentosos, y la posterior selección de fagos por su unión a un antígeno de elección. Uno de tales métodos se describe en el documento WO 99/10494. Los anticuerpos anti-SAP se pueden aislar escrutando una biblioteca de anticuerpos combinatorios recombinantes, preferiblemente una biblioteca de presentación en fagos de scFv, preparada utilizando los ADNc de V_L y V_H humanos preparados a partir de ARNm derivado de linfocitos humanos. Las metodologías para preparar y escrutar tales bibliotecas son conocidas en la técnica. Se encuentran disponibles comercialmente kits para generar bibliotecas de presentación en fagos.

Los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos "entrecruzados". El término "entrecruzado" se utiliza en la presente memoria para hacer referencia a la unión de al menos dos moléculas de IgG entre sí para formar una (única) molécula. Los anticuerpos contra SAP se pueden entrecruzar utilizando diversas moléculas conectoras y opcionalmente los anticuerpos se entrecruzan utilizando una molécula anti-IgG, complemento, modificación química o modificación genética molecular. Entre los diversos isotipos de Ig, se sabe que IgM, IgG2a e IgG2b fijan el complemento.

Los anticuerpos de la invención comprenden ventajosamente anticuerpos de "fijación del complemento" (Ejemplos 6 y 7). Un anticuerpo de fijación del complemento es aquél que habiéndose unido a sus epítopos específicos sobre el antígeno diana, activa a continuación la cascada del complemento. En el caso de los anticuerpos IgG requeridos para la presente invención, tal activación tiene lugar predominantemente a través de la ruta clásica a través de C1q,

aunque toda la activación del complemento se amplifica por el bucle retroalimentación de la ruta alternativa. Los efectos clave del complemento en relación con la presente invención son la escisión y la unión de C3, el componente del complemento fundamental y más abundante, y la posterior activación y escisión de C5. Los pequeños fragmentos separados de C3 y C5, respectivamente C3a y C5a, son potentes atrayentes quimiotácticos para las células fagocíticas de todos los tipos, granulocitos polimorfonucleares y fagocitos mononucleares, monocitos y macrófagos. El último grupo es esencial para el aclaramiento de amiloide de acuerdo con la presente invención (Ejemplo 8). La presencia sobre los depósitos de amiloide de complemento unido, predominantemente C3b y sus productos de degradación adicionales, C3bi, C3c y C3d, es reconocida por los receptores específicos sobre las células fagocíticas para tales fragmentos del complemento unidos y de ese modo opsoniza los depósitos, lo que potencia su fagocitosis y destrucción, conduciendo a la eliminación deseable y clínicamente beneficiosa del amiloide que es el propósito de la presente invención.

Los anticuerpos de la presente invención son específicos para SAP y no reconocen ni unen ninguna superficie celular a otros antígenos celulares. Por consiguiente están libres de actividad agonística específica.

Adicionalmente, los anticuerpos de la invención pueden comprender opcionalmente anticuerpos diméricos, así como formas multivalentes de anticuerpos. Los expertos en la técnica pueden construir tales dímeros o formas multivalentes mediante mecanismos conocidos en la técnica y utilizar los anticuerpos anti-SAP de la presente memoria.

Los anticuerpos de la invención también pueden comprender anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de la cadena ligera de inmunoglobulina y la cadena pesada modificada. Alternativamente, los residuos de cisteína relevantes se sustituyen por otro residuo de aminoácido o se suprimen con el fin de evitar el entrecruzamiento.

Los métodos in vitro también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de los anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente, fragmentos Fab, se puede lograr utilizando mecanismos rutinarios conocidos en la técnica. Por ejemplo, la digestión se puede realizar utilizando papaína. Los ejemplos de la digestión con papaína se describen en el documento WO 94/29348 publicado el 22 de diciembre de 1994, y en la Patente de Estados Unidos Núm. 4.342.566. La digestión con papaína de los anticuerpos produce típicamente dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos Fab, cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento Fc residual. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con el antígeno y todavía es susceptible de entrecruzar el antígeno.

Los anticuerpos de unión a SAP y sus fragmentos pueden comprender una o más porciones que no se unen a SAP, sino que son responsables de otras funciones, tales como la semivida en circulación, el efecto citotóxico directo, el marcaje detectable o la activación de la cascada del complemento endógeno del receptor o la citotoxicidad celular endógena. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden comprender la totalidad o una porción de la región constante y pueden ser de cualquier isotipo, incluyendo IgA (p. ej., IgA1 o IgA2), IgD, IgE, IgG (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), o IgM. Además, o en lugar, de comprender una región constante, los compuestos de unión a antígeno de la invención pueden incluir una etiqueta epitópica, un epítipo del receptor de rescate, un radical de marcaje con fines de diagnóstico o purificación, o un radical citotóxico tal como un radionúclido o toxina.

El anticuerpo anti-SAP o fragmento del mismo se pueden modificar para aumentar su semivida en suero, por ejemplo, añadiendo moléculas - tales como PEG u otros polímeros solubles en agua, incluidos los polímeros de polisacáridos para aumentar la semivida.

Los anticuerpos de unión a SAP y fragmentos de los mismos pueden ser biespecíficos. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden parecer a anticuerpos individuales (o fragmentos de anticuerpos) pero tienen dos sitios de unión a antígeno diferentes (regiones variables). Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante diversos métodos - tales como técnicas químicas, técnicas de "polidoma" o técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos biespecíficos pueden tener especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes, al menos uno de los cuales es un epítipo de SAP.

Los anticuerpos y fragmentos de unión a SAP pueden ser heteroanticuerpos. Los heteroanticuerpos son dos o más anticuerpos, o fragmentos de unión a anticuerpo (Fab) conectados entre sí, teniendo cada anticuerpo o fragmento una especificidad diferente.

Como se emplea en la presente memoria, el término "fragmentos de anticuerpo" se refiere a porciones de un anticuerpo de longitud completa intacto - tal como una región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla (p. ej., scFv); fragmentos de anticuerpos multiespecíficos, tales como anticuerpos biespecíficos, triespecíficos y multiespecíficos (p. ej., diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos); proteínas de fusión de inmunoglobulinas con dominios de unión; anticuerpos camelizados; minicuerpos; anticuerpos quelantes recombinantes; tricuerpos o bicuerpos; intracuerpos; nanocuerpos; inmunofármacos modulares pequeños (SMIP), anticuerpos que contienen V_{HH}; y cualquier otro polipéptido formado a partir de fragmentos de anticuerpos.

El término "fragmentos", como se emplea en la presente memoria, se refiere a fragmentos capaces de unirse a SAP, por ejemplo, cualquiera de al menos 3 aminoácidos contiguos (p. ej., al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más aminoácidos contiguos, por ejemplo, de una CDR) del anticuerpo involucrado en la unión del antígeno, y abarca los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v), o las regiones variables de cadenas ligeras o pesadas individuales o porciones de las mismas. Los fragmentos de unión a SAP incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y scFv. Estos fragmentos carecen del fragmento Fc de un anticuerpo intacto, se aclaran más rápidamente de la circulación y pueden tener menos unión a tejidos no específicos que un anticuerpo intacto. Estos fragmentos se pueden producir a partir de anticuerpos intactos utilizando métodos bien conocidos, por ejemplo mediante escisión proteolítica con enzimas tales como la papaína (para producir fragmentos Fab) o la pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂).

Ventajosamente, los fragmentos activan el complemento.

Los fragmentos de unión a SAP también abarcan fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla (scFv) que se unen a SAP. Un scFv comprende una región variable de cadena pesada (V_H) de anticuerpo conectada operablemente a una región variable de la cadena ligera (V_L) del anticuerpo en donde la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera, juntas o individualmente, forman un sitio de unión que se une a SAP. Un scFv puede comprender una región V_H en el extremo amino terminal y una región V_L en el extremo carboxilo terminal. Alternativamente, scFv puede comprender una región V_L en el extremo amino terminal y una región V_H en el extremo carboxilo terminal. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que permite elaborarlos como una única cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv)). Un scFv puede comprender opcionalmente además un conector polipeptídico entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera.

Los fragmentos de unión a SAP también abarcan fragmentos de anticuerpo de dominio (dAb) como se describe en *Nature* 341: 544-546 (1989) que consisten en un dominio V_H.

Los fragmentos de unión a SAP también abarcan anticuerpos de cadena pesada (HCAb). Aparentemente, estos anticuerpos pueden formar regiones de unión a antígeno utilizando solamente la región variable de la cadena pesada, ya que estos anticuerpos funcionales son dímeros de cadenas pesadas solamente (denominados "anticuerpos de cadena pesada" o "HCAb"). Por consiguiente, los anticuerpos y fragmentos de unión a SAP pueden ser anticuerpos de cadena pesada (HCAb) que se unen específicamente a SAP.

Los fragmentos de unión a SAP también abarcan anticuerpos que son SMIP o proteínas de fusión de inmunoglobulina con dominios de unión específicos para la proteína SAP. Estas construcciones son polipéptidos de cadena sencilla que comprenden dominios de unión a antígeno fusionados a dominios de inmunoglobulina necesarios para llevar a cabo funciones efectoras de anticuerpos (véase el documento WO03/041600).

Los fragmentos de unión a SAP también incluyen diacuerpos. Estos son anticuerpos bivalentes en los que los dominios V_H y V_L se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero utilizando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Esto obliga a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y, por lo tanto, crea dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, el documento WO 93/11161). Los diacuerpos pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Los anticuerpos de unión a SAP y fragmentos de los mismos también abarcan las inmunoadhesinas. Se pueden incorporar una o más CDR a una molécula covalentemente o no covalentemente para convertirla en una inmunoadhesina. Una inmunoadhesina puede incorporar las CDR como parte de una cadena polipeptídica más grande, puede conectar covalentemente las CDR a otra cadena polipeptídica, o puede incorporar las CDR de manera no covalente. Las CDR permiten que la inmunoadhesina se una específicamente a SAP.

Los anticuerpos de unión a SAP y fragmentos de los mismos también abarcan miméticos de anticuerpos que comprenden una o más porciones de unión a SAP construidas sobre un armazón orgánico o molecular (tal como un armazón de proteínas o carbohidratos). Las proteínas que tienen estructuras tridimensionales relativamente definidas, comúnmente denominadas armazones de proteínas, se pueden utilizar como reactivos para el diseño de miméticos de anticuerpos. Estos armazones contienen típicamente una o más regiones que son susceptibles de variación de secuencia específica o aleatoria, y tal aleatorización de la secuencia se lleva a cabo a menudo para producir bibliotecas de proteínas a partir de las cuales se pueden seleccionar los productos deseados. Por ejemplo, un mimético de anticuerpo puede comprender un polipéptido que no se une a inmunoglobulina quimérico que tiene un armazón que contiene un dominio similar a inmunoglobulina que tiene dos o más bucles expuestos al disolvente que contienen una CDR diferente de un anticuerpo parental insertado en cada uno de los bucles y que muestran actividad de unión selectiva hacia un ligando unido al anticuerpo parental. Se han propuesto armazones de proteínas distintas de inmunoglobulinas para obtener proteínas con nuevas propiedades de unión.

Los anticuerpos anti-SAP o fragmentos de anticuerpo de los mismos típicamente se unen a SAP humano con alta afinidad (p. ej., según lo determinado con BIACORE), tal como por ejemplo con una constante de disociación de unión en equilibrio (K_D) para SAP de aproximadamente 15 nM o menos, 10 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos, aproximadamente 500 pM o menos, aproximadamente 250 pM o menos,

aproximadamente 100 pM o menos, aproximadamente 50 pM o menos, o aproximadamente 25 pM o menos, aproximadamente 10 pM o menos, aproximadamente 5 pM o menos, aproximadamente 3 pM o menos aproximadamente 1 pM o menos, aproximadamente 0,75 pM o menos, o aproximadamente 0,5 pM o menos.

Adecuadamente, el anticuerpo anti-SAP o fragmento de anticuerpo del mismo no reacciona de forma cruzada con ninguna diana que no sea SAP.

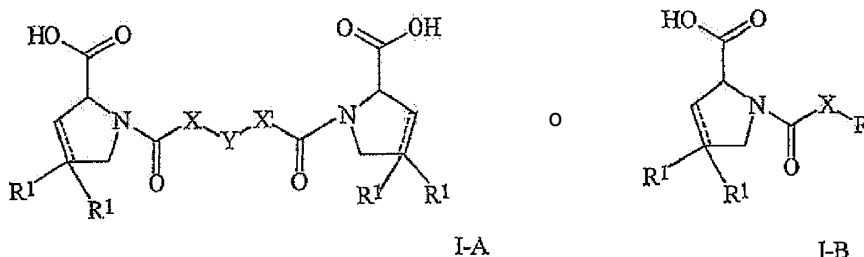
Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden preparar mediante cualquier método adecuado. Los métodos adecuados para preparar tales anticuerpos y fragmentos de anticuerpos son conocidos en la técnica. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede aislar o purificar en cualquier grado.

Como se emplea en la presente memoria, un "compuesto aislado" es un compuesto que se ha retirado de su entorno natural.

"Un compuesto purificado" es un compuesto cuya pureza se ha incrementado, de modo que existe en una forma que es más pura de lo que existe en su entorno natural y/o cuando se sintetiza y/o amplifica inicialmente en condiciones de laboratorio. Pureza es un término relativo y no significa necesariamente pureza absoluta.

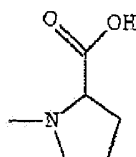
Compuesto que agota SAP

El compuesto que agota SAP es una D-prolina de la Fórmula:



en donde

Res



y el grupo

R¹ es hidrógeno o halógeno;

X-Y-X' es un conector que tiene al menos 4, ventajosamente al menos 5, ventajosamente al menos 6, hasta 20 átomos de carbono de cadena lineal o recta, en donde

X es $-(\text{CH}_2)_n-$; $-\text{CH}(\text{R}^2)(\text{CH}_2)_n-$; $\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_n-$; $\text{CH}_2\text{NH}-$; bencilo, $-\text{C}(\text{R}^2)=\text{CH}-$; $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})-$; o tiazol-2,5-dijilo; O:

Y es -S-S-; -(CH₂)_n-; -O-; -NH-; -N(R²)-; -CH=CH-; -NHC(O)NH-; -N(R²)C(O)N(R²)-; -N[CH₂C₆H₃(OCH₃)₂]-; -N(CH₂C₆H₅)-; -N(CH₂C₆H₅)C(O)N(CH₂C₆H₅)-; -N(alcoxiaalquil)-; N(cicloalquilmetil)-; 2,6-piridilo; 2,5-furanilo; 2,5-tienilo; 1,2-ciclohexilo; 1,3-ciclohexilo; 1,4-ciclohexilo; 1,2-naftilo; 1,4-naftilo; 1,5-naftilo; 1,6-naftilo; bifenileno; o 1,2-fenileno, 1,3-fenileno y 1,4-fenileno, en donde los grupos fenileno están opcionalmente sustituidos con 1-4 sustituyentes, seleccionados entre halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, hidroxilo, carboxi, -COO-alquilo inferior, nitrilo, 5-tetrazol, (ácido pirrolidin-1-il 2-carboxílico)-2-oxo-etoxi, N-hidroxicarbamidilolo, 5-oxo [1,2,4]oxadiazolilo, 2-oxo [1,2,3,5]-oxatiadiazolilo, 5-tioxo [1,2,4] oxadiazolilo y 5-terc-butilsulfanil-[1,2,4] oxadiazolilo;

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

R² es alquilo inferior, alcoxi inferior o bencilo y

n es 0-3,

o una sal o un mono- o diéster farmacéuticamente aceptables del mismo. El compuesto que agota SAP de la circulación, incluyendo las realizaciones preferidas mencionadas anteriormente, se denomina en lo sucesivo compuesto que agota SAP.

En una realización, la D-prolina de fórmula I-A anterior se puede escribir como Ligando - conector - Ligando, en donde el radical X-Y-X' de la fórmula I-A forma el conector. Está dentro del alcance de la presente invención que el conector (X-Y-X') pueda tener una longitud de 4 a 20 átomos de carbono lineales, incluyendo de 4 a 15 átomos de carbono lineales, de 5 a 10 átomos de carbono lineales y de 6 a 8 átomos de carbono lineales de longitud. El conector puede ser una cadena lineal o ramificada, o puede formar opcionalmente una o más estructuras anulares, con la condición de que al menos 4 átomos de carbono de cadena lineal o recta estén presentes en el conector. En una realización, al menos uno de los átomos de C de cadena lineal o recta puede estar opcionalmente sustituido con al menos un heteroátomo seleccionado entre N, O o S, ventajosamente O o S, preferiblemente O.

Por lo tanto, un "conector opcionalmente sustituido" puede tener una o más sustituciones que conducen a la ramificación y/o una o más sustituciones del átomo o los átomos de carbono de los átomos de carbono de cadena lineal o recta del conector, p. ej. el conector puede ser un éter o un éter sustituido.

Complejo de SAP-CPHPC

El complejo de SAP con CPHPC comprende dos moléculas de SAP pentaméricas entrecruzadas, cara B con cara B por medio de cinco moléculas de CPHPC, y los grupos de cabeza de D-prolina en cualquier extremo de los cuales están unidos los bolsillos de unión al ligando dependientes de calcio de los pares opuestos de los promotores de SAP (Figura 10). Este complejo puede estar entrecruzado covalentemente, utilizando el entrecruzador bifuncional, BS3, para producir un complejo estable en el que las moléculas de SAP se fijan en orientación y con la misma accesibilidad estereoquímica para la unión por los anticuerpos que SAP deposita sobre las fibrillas amiloides *in vivo* (Figura 11). La unión de los anticuerpos anti-SAP humano a SAP inmovilizado sobre una superficie sólida, tal como placas de microtitulación, se puede cuantificar con precisión. La comparación de tal unión a SAP inmovilizado solo y en el complejo estable con CPHPC después del entrecruzamiento con BS3, y en presencia y ausencia de calcio, proporciona información acerca de la posición y la naturaleza del epítipo reconocido por cada anticuerpo.

Composiciones farmacéuticas

Adecuadamente, el compuesto que agota SAP que se describe en la presente memoria y el anticuerpo anti-SAP humano o fragmento del mismo descritos en la presente memoria se administrarán como composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades terapéuticamente eficaces.

Como se emplea en la presente memoria, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de compuesto que agota SAP y el anticuerpo anti-(SAP) humano o un fragmento del mismo o como parte de una composición farmacéutica, que puede tener cualquier efecto positivo detectable sobre cualquier síntoma, aspecto o característica de la amiloidosis cuando se administra a un paciente (p. ej., en forma de una o más dosis).

Como se emplea en la presente memoria, el término "paciente", incluye un sujeto, ventajosamente un sujeto animal. Los sujetos animales de la presente invención incluyen mamíferos, es decir, seres humanos, animales de compañía incluyendo felinos y cánidos, así como otros animales incluyendo équidos.

La combinación de un compuesto que agota SAP y el anticuerpo anti-SAP o fragmento del mismo se puede administrar por separado, simultáneamente, secuencialmente, concurrentemente o consecutivamente, o la combinación se puede presentar en forma de una formulación farmacéutica.

Por lo tanto, la presente invención también implica el compuesto que agota SAP y el anticuerpo anti-SAP como una preparación combinada para uso simultáneo, por separado o secuencial en el tratamiento terapéutico o profiláctico de la amiloidosis.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto que agota SAP se pueden administrar por separado de los anticuerpos anti-SAP, y tales administraciones separadas se pueden realizar en el mismo punto temporal o en puntos temporales diferentes, tal como, por ejemplo, los mismos días o días diferentes. Si la combinación de compuesto que agota SAP y anticuerpo anti-SAP se va a administrar secuencialmente, en ese caso, primero se administra el compuesto que agota SAP de manera que el tratamiento con compuesto que agota SAP pueda eliminar casi todo el SAP circulante. Dado que esto deja cantidades sustanciales de SAP asociadas con los depósitos de amiloide en los tejidos, la administración secuencial del anticuerpo anti-SAP permite la localización y la unión específica a los depósitos de amiloide para promover su rápida y exhaustiva regresión. Adecuadamente, el anticuerpo anti-SAP se puede administrar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20 o 25 o más días después del tratamiento o tratamientos con el compuesto que agota SAP.

La administración secuencial puede implicar dos o más tratamientos secuenciales con compuesto que agota SAP seguido de dos o más tratamientos secuenciales con el anticuerpo anti-SAP.

La administración secuencial puede implicar un tratamiento con compuesto que agota SAP seguido de un

tratamiento secuencial con el anticuerpo anti-SAP, que después se repite una o más veces.

La dosis secuencial/subsiguiente puede ser una cantidad que sea mayor que la dosis inicial/previa o menor que la dosis inicial/previa.

5 La administración de una dosis inicial de compuesto que agota SAP y/o el anticuerpo anti-SAP puede estar seguida de la administración de una o más dosis secuenciales (p. ej., subsiguientes) de compuesto que agota SAP y/o el anticuerpo anti-SAP, y en donde dichas una o más dosis secuenciales pueden estar en una cantidad que sea aproximadamente igual o menor que la dosis inicial.

10 La administración de una dosis inicial de compuesto que agota SAP y/o el anticuerpo anti-SAP puede estar seguida de la administración de una o más dosis secuenciales (p. ej., subsiguientes), y en donde al menos una de las dosis subsiguientes es una cantidad que es mayor que la dosis inicial.

15 Por consiguiente, la administración puede utilizar un programa predeterminado o de rutina para la administración, dando como resultado un período de tiempo designado predeterminado entre las administraciones de dosis. El programa puede abarcar períodos de tiempo idénticos o de duración diferente, siempre que el programa esté predeterminado. Cualquier combinación en particular estaría cubierta por el programa siempre que se determine con anticipación que el programa apropiado implica la administración en un día determinado.

20 Las composiciones farmacéuticas pueden ser para su uso en seres humanos o animales en medicina humana y veterinaria y típicamente comprenderán uno o más de los compuestos farmacéuticamente aceptables, tales como portadores, excipientes, diluyentes, antioxidantes, conservantes, colorantes, aromatizantes y agentes diluyentes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, disolventes, cargas, agentes voluminizantes, tampones, vehículos de suministro, agentes de tonicidad, codisolventes, agentes humectantes, agentes complejantes, agentes tamponadores, antimicrobianos y tensioactivos. Los compuestos aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y son descritos, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985).

25 Las composiciones farmacéuticas pueden incluir antioxidantes - tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas - tales como albúmina del suero y/o gelatina, polímeros hidrófilos - tales como polivinilpirrolidona; agentes quelantes - tales como EDTA; alcoholes de azúcares - tales como manitol y/o sorbitol; aminoácidos; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos; contraiones formadores de sal - tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos - tales como Tween, pluronics o polietilenglicol (PEG). También a modo de ejemplo, los agentes mejoradores de la tonicidad adecuados incluyen haluros de metales alcalinos (preferiblemente cloruro de sodio o potasio), manitol, sorbitol y similares. Los conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio, timerosal, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, alcohol fenílico y ácido sórbico. Los codisolventes adecuados incluyen glicerina y/o propilenglicol. Los agentes complejantes adecuados incluyen cafeína y/o polivinilpirrolidona. Los tensioactivos o agentes humectantes adecuados incluyen ésteres de sorbitán y/o polisorbatos. Los tampones pueden ser tampones convencionales tales como citrato, acetato, borato, bicarbonato o Tris-HCl. El tampón de acetato puede tener un pH de aproximadamente 4-5,5, y el tampón Tris puede tener un pH de aproximadamente 7-8,5. Otros agentes farmacéuticos se exponen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990.

35 El portador farmacéutico, excipiente o diluyente. etc. se pueden seleccionar basándose en la ruta de administración prevista y la práctica farmacéutica convencional.

40 Los requisitos de composición/formulación pueden diferir dependiendo de los diferentes sistemas de suministro.

45 La composición puede estar en forma líquida, liofilizada o secada mediante congelación y puede incluir uno o más lioprotectores, excipientes, tensioactivos, aditivos estructurales de alto peso molecular y/o agentes voluminizantes. En una realización, se incluye un lioprotector, que es un azúcar no reductor, tal como sacarosa y/o lactosa. La cantidad de lioprotector generalmente incluida es tal que, tras la reconstitución, la formulación resultante será típicamente isotónica. Se puede incluir un tensioactivo - tales como tensioactivos no iónicos y tensioactivos iónicos. Las cantidades ilustrativas de tensioactivo que pueden estar presentes en la formulación pre-liofilizada son de aproximadamente 0,001-0,5%. Se pueden incluir aditivos estructurales de alto peso molecular (p. ej., cargas, aglutinantes). Las concentraciones ilustrativas de aditivos estructurales de alto peso molecular son de 0,1% a 10% en peso. En otras realizaciones, se puede incluir un agente voluminizante (p. ej., manitol, glicina).

50 Las composiciones pueden ser adecuadas para administración parenteral. Las composiciones pueden ser adecuadas para inyección o infusión en un animal por cualquier ruta disponible para el experto, tal como la ruta intraarticular, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatosas), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intralesional, oral e inhalada. Una formulación parenteral típicamente será una solución acuosa isotónica estéril, libre de pirógenos, que contenga opcionalmente conservantes farmacéuticamente aceptables.

55 Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para un suministro controlado o sostenido de una manera que proporcione una concentración local del producto (p. ej., embolada, efecto de depósito), una liberación sostenida y/o

un aumento de la estabilidad o semivida en un entorno local concreto. En ciertas realizaciones, tales composiciones pueden incluir una cantidad significativamente mayor del compuesto que agota SAP y/o el anticuerpo anti-SAP en el depósito inicial, mientras que la cantidad eficaz de anticuerpo realmente liberada y disponible en cualquier momento es en una cantidad mucho menor que el depósito inicial. Las composiciones pueden incluir la formulación con preparaciones particuladas de compuestos poliméricos, así como agentes tales como una matriz biodegradable, microesferas inyectables, partículas microcapsulares, microcápsulas, esferas de partículas bioerosionables, liposomas y dispositivos de suministro implantables que proporcionan la liberación controlada o sostenida del agente activo que después puede ser administrado como una inyección de depósito.

Se conocen técnicas para formular tales medios de suministro sostenido o controlado y se ha desarrollado y utilizado una variedad de polímeros para la liberación controlada y el suministro de medicamentos. Tales polímeros son típicamente biodegradables y biocompatibles. Los hidrogeles de polímeros, incluyendo los formados por la complejación de segmentos de polímeros enantioméricos o polipéptidos, e hidrogeles con propiedades sensibles a la temperatura o al pH, pueden ser deseables para proporcionar un efecto de depósito de fármacos debido a las condiciones suaves y acuosas involucradas en la captura de agentes proteicos bioactivos (p. ej., anticuerpos).

También pueden estar presentes en las composiciones polímeros bioadhesivos. Los bioadhesivos son materiales sintéticos y naturales que pueden adherirse a sustratos biológicos durante largos períodos de tiempo. Por ejemplo, Carbopol y los policarbofilos son derivados sintéticos entrecruzados de poli(ácido acrílico).

La composición farmacéutica se puede formular para inhalación, tal como, por ejemplo, en forma de un polvo seco. Las soluciones para inhalación también se pueden formular en un propelente licuado para el suministro en aerosol. En otra formulación más, las soluciones pueden ser nebulizadas. Otras composiciones farmacéuticas para la administración pulmonar incluyen aquellas descritas, por ejemplo, en la Publicación de la Solicitud PCT WO 94/20069, que describe el suministro pulmonar de proteínas modificadas químicamente. Para el suministro pulmonar, el tamaño de partícula debe ser adecuado para el suministro al pulmón distal. Por ejemplo, el tamaño de partícula puede ser de 1 μm a 5 μm ; sin embargo, se pueden utilizar partículas más grandes, por ejemplo, si cada partícula es bastante porosa.

Otra preparación puede implicar una mezcla con excipientes no tóxicos que sean adecuados para la fabricación de comprimidos. Al disolver los comprimidos en agua estéril u otro vehículo apropiado, las soluciones se pueden preparar en forma de dosis unitaria. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, lactosa o fosfato de calcio; o agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o acacia; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Ciertas formulaciones se pueden administrar por vía oral. Las formulaciones administradas de esta manera se pueden formular con o sin aquellos portadores utilizados habitualmente en la composición de formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, se puede diseñar una cápsula para liberar la porción activa de la formulación en el punto del tracto gastrointestinal donde la biodisponibilidad se maximiza y la degradación presistémica se minimiza. Se pueden incluir agentes adicionales para facilitar la absorción de un agente aglutinante selectivo. También se pueden emplear diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes disgregantes de comprimidos y aglutinantes.

Las composiciones farmacéuticas utilizadas en la invención pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz o una cantidad profilácticamente eficaz del compuesto que agota SAP y/o el anticuerpo anti-SAP.

"Una cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o la porción de anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o la porción de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

"Una cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado.

Una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de la composición farmacéutica dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos - tales como la indicación para la cual se está utilizando la composición, la ruta de administración y el estado del sujeto. Las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz para tratar la amiloidosis. Una "cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz" es aquella cantidad que puede tratar o prevenir uno o más síntomas de amiloidosis en un sujeto.

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

Sal farmacéutica

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

Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas por los expertos en la técnica y, por ejemplo, incluyen las mencionadas por Berge et al., en *J. Pharm. Sci.*, 66, 1-19 (1977). Las sales de adición de ácido adecuadas se forman a partir de ácidos que forman sales no tóxicas e incluyen las sales hidrocloreuro, hidrobromuro, hidroyoduro, nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, hidrogenofosfato, acetato, trifluoroacetato, gluconato, lactato, salicilato, citrato, tartrato, ascorbato, succinato, maleato, fumarato, gluconato, formiato, benzoato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato y p-toluensulfonato.

Cuando están presentes uno o más radicales ácidos, se pueden formar sales de adición de álcalis farmacéuticamente aceptables adecuadas a partir de álcalis que forman sales no tóxicas e incluyen las sales de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio, cinc y aminas farmacéuticamente activas tales como las sales de dietanolamina.

Una sal farmacéuticamente aceptable se puede preparar fácilmente mezclando soluciones del compuesto que agota SAP y el ácido o álcali deseados, según sea apropiado. La sal puede precipitar de la solución y se puede recoger por filtración o se puede recuperar por evaporación del disolvente.

Administración

Los componentes se pueden administrar solos, pero generalmente se administrarán en forma de una composición farmacéutica - p. ej. cuando los componentes se encuentran como una mezcla con un excipiente, diluyente o portador farmacéutico adecuado seleccionado con respecto a la ruta de administración prevista y la práctica farmacéutica convencional.

Por ejemplo, los componentes se pueden administrar en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, soluciones o suspensiones, que pueden contener agentes aromatizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada, modificada, sostenida, pulsada o controlada.

Si el producto farmacéutico es un comprimido, en ese caso el comprimido puede contener excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico y glicina, disgregantes tales como almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), sal de sodio de glicolato de almidón, croscarmelosa sódica y ciertos silicatos complejos, y aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y acacia. Además, se pueden incluir agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

También se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa, almidón, celulosa, azúcar de leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para suspensiones acuosas y/o elixires, el agente se puede combinar con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, materias colorantes o tintes, con agentes emulsionantes y/o de suspensión y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

Las rutas de administración (suministro) pueden incluir, pero no se limitan a, una o más de oral (p. ej., en forma de comprimido, cápsula o como una solución ingerible), tópica, mucosa (p. ej., en forma de una pulverización nasal o aerosol para inhalación) nasal, parenteral (p. ej., mediante una forma inyectable), gastrointestinal, intraespinal, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intrauterina, intraocular, intradérmica, intracraneal, intratraqueal, intravaginal, intracerebroventricular, intracerebral, subcutánea, oftálmica, (incluyendo intravítrea o intracameral), transdérmica, rectal, bucal, vaginal, epidural y sublingual.

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

Niveles de dosis

Las formulaciones farmacéuticas adecuadas y/o preferidas se pueden determinar en vista de la presente descripción y el conocimiento general de la tecnología de formulación, dependiendo de la ruta de administración pretendida, el formato de suministro y la dosificación deseada.

Típicamente, un médico determinará la dosificación real que será más adecuada para un sujeto individual.

El nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación para cualquier paciente particular pueden variar y dependerán de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad de la afección en particular y el individuo que recibe la terapia. Por ejemplo, el compuesto que agota SAP se puede administrar a una dosis de entre 2 mg/kg y 0,1 mg/kg, dependiendo de su actividad.

El anticuerpo anti-SAP se puede administrar como una dosis fija, independientemente de la razón de dosis por peso del sujeto, o a una dosis apropiada en mg/kg de peso corporal con un máximo aproximado de 200 mg/kg. El anticuerpo se puede administrar a un individuo de 70 kg en una o más dosis separadas, simultáneas o secuenciales de 14.000 mg o menos de anticuerpo, 13.000 mg o menos de anticuerpo 12.000 mg o menos de anticuerpo, 11.000 mg o menos de anticuerpo, 10.000 mg o menos de anticuerpo, 9.000 mg o menos de anticuerpos, 8.000 mg o menos de anticuerpo, 7.000 mg o menos de anticuerpo, 6.000 mg o menos de anticuerpo, 5.000 mg o menos de anticuerpo, 4.500 mg o menos de anticuerpo, 4.000 mg o menos de anticuerpo, 3.700 mg o menos de anticuerpo, 3.500 mg o menos de anticuerpo, 3.200 mg o menos de anticuerpo, 3.000 mg o menos de anticuerpo, 2.700 mg o menos de anticuerpo, o 2.500 mg o menos de anticuerpo, 2.200 mg o menos de anticuerpo o 2.100 mg o menos de anticuerpo, 1.700 mg o menos de anticuerpo, 1.500 mg o menos de anticuerpo, 1.200 mg o menos de anticuerpo, o 1.100 mg o menos de anticuerpo, 1.000 mg o menos de anticuerpo, 700 mg o menos de anticuerpo, 500 mg o menos de anticuerpo, 200 mg o menos de anticuerpo, o 100 mg o menos de anticuerpo. En otra realización, el anticuerpo se administra en una o más dosis de al menos 20 mg de anticuerpo. Puesto que la concentración total de proteína en plasma humano es de 70.000 mg/l, y que la transfusión de sangre o las infusiones de plasma o albúmina convencionales suministran rutinariamente decenas o incluso centenas de gramos de proteína intravenosamente, la administración de las dosis máximas de anticuerpo anti-SAP son seguras y aceptables.

El compuesto que agota SAP se puede administrar como una dosis fija, independientemente de la razón de dosis por peso del sujeto. El compuesto que agota SAP se puede administrar en una o más dosis parenterales separadas, simultáneas o secuenciales de 100 mg o menos, 50 mg o menos, 25 mg o menos, o 10 mg o menos. Alternativamente, el compuesto que agota SAP se puede administrar a una razón de dosis por peso del sujeto, fácilmente determinada por un experto en la técnica.

Formulación

El componente o los componentes se pueden formular en una composición farmacéutica, por ejemplo mezclando con uno o más de un portador, diluyente o excipiente adecuados, utilizando mecanismos que se conocen en la técnica.

Expresión

Existe una amplia variedad de sistemas de expresión disponible para la producción de anticuerpos anti-SAP y fragmentos de anticuerpos que incluyen fragmentos Fab, scFv y V_{HH}. Por ejemplo, se pueden utilizar sistemas de expresión de origen procariótico y eucariótico para la producción a gran escala de fragmentos de anticuerpos y proteínas de fusión de anticuerpos.

La bacteria gram negativa *E. coli* es ampliamente utilizada como anfitrión para la expresión de genes heterólogos. Sin embargo, grandes cantidades de proteínas heterólogas tienden a acumularse dentro de la célula. La posterior purificación de la proteína deseada de la masa de proteínas intracelulares de *E. coli* a veces puede resultar difícil.

A diferencia de *E. coli*, las bacterias del género *Bacillus* son muy adecuadas como anfitriones heterólogos debido a su capacidad para secretar proteínas al medio de cultivo. Otras bacterias adecuadas como anfitriones son las de los géneros *Streptomyces* y *Pseudomonas*.

Dependiendo de la naturaleza del polinucleótido que codifica el polipéptido, y/o la conveniencia de un procesamiento adicional de la proteína expresada, se pueden preferir anfitriones eucarióticos tales como levaduras u otros hongos. En general, las células de levadura son preferidas a las células de hongos porque son más fáciles de manipular. Sin embargo, algunas proteínas son escasamente secretadas por la célula de levadura, o en algunos casos no se procesan adecuadamente (p. ej., hiperglicosilación en levadura). En estos casos, se debe seleccionar un organismo anfitrión fúngico diferente.

Los ejemplos de anfitriones de expresión adecuados dentro del alcance de la presente invención son hongos tales como especies de *Aspergillus* (tales como las descritas en los documentos EP-A-0184438 y EP-A-0284603) y especies de *Trichoderma*; bacterias tales como especies de *Bacillus* (tales como las descritas en los documentos EP-A-0134048 y EP-A-0253455), especies de *Streptomyces* y especies de *Pseudomonas*; y levaduras tales como especies de *Kluyveromyces* (tales como las descritas en los documentos EP-A-0096430 y EP-A-0301670) y especies de *Saccharomyces*.

El uso de células anfitrionas adecuadas - tales como las células anfitrionas de levaduras, hongos y plantas - puede proporcionar modificaciones post-traduccionales (p. ej. miristoilación, glicosilación, truncamiento, lipidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina) según sea necesario para conferir una actividad biológica óptima sobre productos de expresión recombinantes.

Son particularmente ventajosos los sistemas de expresión que permiten la secreción de grandes cantidades de fragmentos de anticuerpos al medio de cultivo.

Kit

En un ejemplo de la descripción, se proporciona un artículo de fabricación, o "kit", que contiene materiales útiles para el tratamiento de la amiloidosis.

5 Adecuadamente, el kit está formulado para la administración separada o secuencial de la D-prolina y el anticuerpo anti-SAP o un fragmento del mismo.

En un ejemplo de la descripción, el kit comprende un recipiente que comprende el compuesto que agota SAP y el anticuerpo anti-SAP o fragmento del mismo. En otro ejemplo de la descripción, el kit comprende un primer recipiente que comprende el compuesto que agota SAP y un segundo recipiente que comprende el anticuerpo anti-SAP o fragmento del mismo.

10 Adecuadamente, el compuesto que agota SAP y el anticuerpo anti-SAP o fragmento del mismo están presentes en cantidades terapéuticamente o profilácticamente eficaces para el tratamiento y/o prevención de la amiloidosis.

Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, envases de tipo burbuja, *etc.* El recipiente puede estar formado a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico.

15 El recipiente contiene el compuesto que agota SAP o una formulación farmacéutica del mismo y/o el anticuerpo anti-SAP o un fragmento del mismo, en una cantidad eficaz para el tratamiento de la amiloidosis, y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica).

El kit puede comprender adicionalmente una etiqueta o un prospecto en o asociado con el recipiente. La etiqueta o el prospecto pueden indicar que la composición o las composiciones se utilizan para el tratamiento de la amiloidosis.

20 Alternativamente, o adicionalmente, el kit puede comprender adicionalmente un recipiente adicional que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

25 El kit puede comprender adicionalmente instrucciones para la administración del compuesto que agota SAP y el anticuerpo anti-SAP o fragmento del mismo para el tratamiento o la prevención de la amiloidosis. Por ejemplo, si el kit comprende una primera composición que comprende un compuesto que agota SAP y una segunda composición que comprende el anticuerpo anti-SAP, el kit puede comprender adicionalmente instrucciones para la administración simultánea, secuencial o separada de la primera y segunda composiciones farmacéuticas a un sujeto que lo necesite.

30 En otro ejemplo de la descripción, los kits pueden ser adecuados para el suministro de formas orales sólidas de las composiciones - tales como comprimidos o cápsulas. Semejante kit incluye, por ejemplo, varias dosis unitarias. Tales kits pueden incluir una tarjeta que tenga las dosificaciones orientadas en el orden de uso previsto. Un ejemplo de tal kit es un "envase de tipo burbuja". Los envases de tipo burbuja son bien conocidos en la industria del envasado y se utilizan ampliamente para envasar formas farmacéuticas de dosificación unitaria. Si se desea, se puede proporcionar un recordatorio, por ejemplo, en forma de números, letras u otras marcas o con un inserto de calendario, designando los días en el programa de tratamiento en el que se pueden administrar las dosis.

35 En otros ciertos ejemplos de la descripción en donde el kit comprende una formulación farmacéutica del compuesto que agota SAP y una segunda formulación que comprende el anticuerpo anti-SAP o un fragmento del mismo, el kit puede comprender un recipiente separado para contener las formulaciones separadas, tales como un frasco dividido o un paquete de aluminio dividido; sin embargo, las composiciones separadas también pueden estar contenidas dentro de un recipiente único, no dividido. Típicamente, el kit comprende instrucciones para la administración de los componentes separados. Esta forma de kit es particularmente ventajosa cuando los componentes separados se administran en diferentes formas de dosificación (p. ej., oral y parenteral), se administran a diferentes intervalos de dosificación, o cuando el médico que prescribe desea la titulación de los componentes individuales de la combinación.

Método de ensayo

40 Un ejemplo adicional de la descripción proporciona un método de ensayo para identificar uno o más agentes que se pueden utilizar combinados con un compuesto que agota SAP como se describe en la presente memoria para el tratamiento de la amiloidosis, en particular, para el aclaramiento esencialmente completo de los depósitos de amiloide.

45 El agente puede ser un compuesto orgánico u otro producto químico. El agente puede ser un compuesto, que se puede obtener a partir de, o producir mediante, cualquier fuente adecuada, ya sea natural o artificial. El agente puede ser una molécula de aminoácido, un polipéptido, o un derivado químico del mismo, o una combinación de los mismos. El agente puede ser incluso una molécula polinucleotídica - que puede ser una molécula efectora o

antisentido, o un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo monoclonal humanizado.

En un ejemplo de la descripción, el agente es un anticuerpo - tal como un anticuerpo que se obtiene o se puede obtener de un anticuerpo anti-SAP.

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

Técnicas generales de metodología de ADN recombinante

La presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las capacidades de un experto normal en la técnica. Tales técnicas se explican en la bibliografía. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda edición, Libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 y suplementos periódicos; *Current Protocols in Molecular Biology*, cap. 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree y A. Kahn, 1996, *Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; y, D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press.

La invención se describirá a continuación adicionalmente a modo de Ejemplos, que se pretende que sirvan para ayudar al experto en la técnica a llevar a cabo la invención y no se pretende que limiten de ninguna manera el alcance de la invención.

Ejemplos

20 Ejemplo 1: Aclaramiento de depósitos de amiloide sistémicos en ratones transgénicos que expresan SAP humano

En el presente estudio, se indujo la amiloidosis AA en ratones mediante la inyección del factor potenciador de amiloide seguida de inyecciones repetidas de caseína para provocar una inflamación aguda persistente y, por lo tanto, un aumento suficientemente sostenido en la producción de SAA para promover el depósito de amiloide AA en todos los animales. Se utilizó una cepa única de animales de la línea C57BL/6 pura en la que se ha suprimido el gen SAP de ratón¹³ y se introdujo un transgén SAP humano^{14,15}. Por lo tanto, no expresan ningún SAP de ratón, pero sí expresan SAP humano y a concentraciones significativamente mayores que las observadas en el ser humano. Los autores de la presente invención confirman que todos los ratones habían desarrollado abundantes depósitos de amiloides sistémicos al demostrar una retención del trazador de SAP humano radiomarcado en todo el organismo enormemente incrementada en comparación con los ratones de control no tratados sin amiloide. A continuación los autores de la presente invención trataron tres grupos muy parecidos de la siguiente manera:

Grupo 1,

Ácido (R)-1-[6-[(R)-2-carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidino-2-carboxílico (CPHPC), fármaco que agota SAP^{16,17}, y una dosis única de anticuerpo anti-SAP humano de oveja;

Grupo 2, CPHPC e IgG de oveja de control de un antisuero no relacionado;

35 **Grupo 3,** sin tratamiento.

Estos grupos de control son esenciales para proporcionar una comparación con la regresión espontánea conocida de los depósitos de amiloide cuando cesa la inflamación. Los grupos también deben ser lo suficientemente grandes como para compensar las diferentes tasas de regresión de amiloide en diferentes ratones individuales, incluso en estos animales de línea endogámica puros. De manera similar, el experimento no se puede realizar mientras la inducción de amiloide continúa debido a las tasas variables a las que se produce el depósito de amiloide. En un experimento preliminar en grupos de 15 ratones cada uno, realizado de acuerdo con exactamente el mismo protocolo y con los mismos reactivos que se describen aquí, los autores de la presente invención obtuvieron el mismo resultado que se muestra a continuación. El presente experimento se realizó después con números más grandes en cada grupo para confirmar que el efecto observado era reproducible y no debido a la posibilidad de una regresión de amiloide acelerada en uno de los grupos no relacionada con el tratamiento administrado.

En los ratones transgénicos para SAP humano, el SAP humano está presente tanto en la circulación como en los depósitos de amiloide. El fármaco CPHPC está específicamente unido al SAP humano en un complejo compuesto por dos moléculas pentaméricas de SAP nativo y 5 moléculas de CPHPC¹⁶. Este complejo es reconocido como anormal por el hígado y es absorbido muy rápidamente por los hepatocitos y degradado, aclarando así el SAP de la circulación de manera eficaz¹⁶. Las concentraciones de SAP en plasma permanecen muy bajas mientras se administre el fármaco¹⁶. El CPHPC es extremadamente bien tolerado y ni el fármaco en sí ni el agotamiento de SAP que produce han causado efectos adversos¹⁶ (y Gillmore, "Sustained Pharmacological Knockout of Serum Amyloid P Component in Patients with Systemic Amyloidosis", presentado para su publicación). Existe evidencia de beneficio clínico del tratamiento con CPHPC en pacientes con amiloidosis sistémica humana, especialmente con respecto a la

preservación de la función renal en individuos con amiloidosis predominantemente renal (Gillmore, presentado para su publicación). A pesar de estas observaciones prometedoras, la eficacia terapéutica rápida y óptima capaz de preservar la función del órgano y prolongar la vida en pacientes con amiloidosis sistémica requerirá un aclaramiento sustancial o completo de los depósitos de amiloide. Como demuestran aquí los autores de la presente invención, esto se puede lograr ahora de acuerdo con la presente invención mediante el tratamiento con una combinación de CPHPC y anticuerpos anti-SAP humanos.

El tratamiento con CPHPC aclara casi todos el SAP humano circulante, pero deja cantidades sustanciales de SAP asociadas con los depósitos de amiloide en los tejidos (observaciones no publicadas). El mayor agotamiento de SAP de los depósitos de amiloide que han observado los autores de la presente invención en pacientes humanos es de aproximadamente 90% después de meses de administración continua de CPHPC. La infusión intravenosa de anticuerpos monoespecíficos contra SAP humano en pacientes cuyo SAP circulante se ha agotado permite que los anticuerpos se localicen y se unan específicamente a los depósitos de amiloide y promuevan su rápida y exhaustiva regresión, con el correspondiente beneficio clínico. Los autores de la presente invención muestran aquí la eficacia de este procedimiento en el modelo de ratón transgénico para SAP humano de amiloidosis AA.

Protocolo experimental y métodos

Se indujo una amiloidosis AA sistémica en ratones C57BL/6 adultos macho (n = 61) y hembra (n = 32) de línea pura con el gen SAP de ratón eliminado y que eran transgénicos para SAP humano¹⁵. Cada ratón recibió una dosis única de factor de potenciación amiloide⁹ mediante inyección intravenosa seguida 4 días después por 10 inyecciones subcutáneas diarias de caseína al 10% p/v en solución en NaHCO₃ 0,1 M administrada durante un período de 12 días¹³. Siete días después de la última inyección de caseína, se introdujo KI en el agua de bebida de todos los ratones y 3 días después, cada ratón recibió una inyección intravenosa de una dosis patrón de SAP humano marcado con I¹²⁵ 6, 18. También se administraron como controles KI e I¹²⁵-SAP a cuatro ratones adultos macho y cuatro hembras de la misma colonia, pero que no habían recibido ningún otro tratamiento. Todos los ratones se sometieron a un recuento en todo el organismo 24, 48, 72 96 y 168 h después de la inyección del trazador para determinar la retención de la radiactividad como un índice de la carga amiloide de todo el organismo. Hubo de modo sistemático una mayor retención en todos los ratones tratados en comparación con los controles en todos los puntos temporales, lo que indica que todos tenían depósitos de amiloidosis sistémicos sustanciales¹⁸. A continuación, los ratones se asignaron a tres grupos muy parecidos, con un número total y una distribución de sexos lo más parecidos entre sí en cada grupo. Diez días después de la inyección de I¹²⁵-SAP, se inició la administración de CPHPC en el agua de bebida a los grupos uno y dos a 1 mg/ml y se continuó con ese tratamiento hasta el final del experimento. El grupo tres no recibió tratamiento en esta fase o en cualquier fase posterior del estudio. Cinco días después de iniciar la administración de CPHPC, cada animal del grupo uno recibió una inyección intraperitoneal que comprendía 1 ml de la fracción total de IgG de antisero anti-SAP humano de oveja monoespecífico a 50 mg/ml que contenían 7 mg/ml de anticuerpo específico en solución en solución salina fisiológica tamponada con fosfato. El antisero se generó mediante inmunización de ovejas con SAP humano 100% puro. Al mismo tiempo, todos los animales del grupo 2 recibieron una inyección intraperitoneal que comprendía 1 ml de la fracción total de IgG de antisero anti-receptor humano de oncostatina M de oveja monoespecífico a 50 mg/ml en solución salina fisiológica tamponada con fosfato. Este antisero, utilizado aquí como control para el reactivo anti-SAP, no mostró reactividad con SAP humano, con plasma de ratón o con tejidos de ratón normales mediante pruebas inmunoquímicas e inmunohistoquímicas convencionales. Veintiocho días después de las inyecciones intraperitoneales, todos los ratones se sacrificaron desangrándolos bajo anestesia terminal y se extrajeron el hígado y el bazo de cada uno. Cada órgano se pesó y a continuación se dividió en tres porciones, una de las cuales también se pesó y se usó para la extracción de SAP, mientras que la segunda porción se congeló instantáneamente para su posterior análisis inmunohistoquímico y citoquímico sin fijación, y la última parte se fijó en formalina tamponada para realizar una histología de rutina y una estimación de amiloide por tinción de rojo Congo¹⁹. Todos los ratones se pesaron en el momento de la asignación a los grupos después de la inducción de amiloidosis pero antes de la administración de I¹²⁵-SAP. Se pesaron nuevamente antes de ser sacrificados al final del experimento. Se tomaron muestras de sangre de todos los ratones cuatro veces: (1) inmediatamente antes de que los grupos dos y tres comenzaran a recibir CPHPC; (2) el día antes de la inyección de preparaciones de IgG en los grupos dos y tres; (3) 14 días después de las inyecciones de IgG; (4) a la hora del sacrificio. Las secciones de bazo e hígado de todos los animales teñidas con rojo Congo fueron examinadas de forma independiente por tres observadores expertos diferentes ciegos con respecto al tratamiento que cada ratón había recibido y se puntuó la cantidad de amiloide presente como se informó anteriormente. Las puntuaciones de 10⁰ -10⁴ representan aproximadamente una escala de clasificación de logaritmo en base 10 de 10⁰, que corresponde a una o dos motitas diminutas de amiloidosis entre varias secciones de un órgano en particular, a 10⁴ que corresponde a abundantes depósitos extensos que comprenden aproximadamente 10.000 veces más amiloide¹³. Hubo una concordancia de casi 100% entre las puntuaciones de los diferentes observadores, y por lo tanto se utilizaron las puntuaciones del observador más experimentado para el presente análisis. Las concentraciones de SAP humano en los sueros y los extractos de órganos de los órganos se midieron por electroinmunoensayo⁵.

La línea temporal del protocolo se resume aquí:

	Día	Procedimiento de día
	-41	Injectar AEF i.v. en todos los ratones
	-36 a -31	Inyección s.c. diaria de caseína en todos los ratones
5	-29 a -24	Inyección s.c. diaria de caseína en todos los ratones
	-20	Pesar todos los ratones
	-17	Iniciar KI en agua de bebida para todos los ratones
	-14	Injectar i.v. ¹²⁵ I-SAP en todos los ratones
	-13 a -10	
10	y -7	Recuento en todo el organismo de todos los ratones cada día
	-5	Recogida de sangre de todos para muestra de pretratamiento
	-4	Inicio de 1 mg/ml de CPHPC en agua de bebida para los grupos 1 y 2; no hay tratamiento para el grupo 3
	-1	Recogida de sangre para la muestra pre-tratamiento con anticuerpo post-CPHPC
15	0	Injectar anticuerpo anti-SAP humano IgG de oveja grupo 1
		Injectar IgG de oveja de control grupo 2
		Sin tratamiento grupo 3
	14	Tomar muestras de sangre de todos
	23	Pesar todos
20	28	Desangrar y sacrificar todos los ratones, recoger órganos

Resultados

Peso corporal y supervivencia. El peso corporal no fue significativamente diferente entre los grupos. Los pesos medios (DT) en gramos el día -20, es decir, después de la inducción de amiloide y antes de la inyección del trazador, fueron:

- 25 grupo 1, 28,0 (2,7)
 grupo 2, 27,7 (3,2)
 grupo 3, 27,3 (3,1).

Los pesos medios (DT) en gramos el día 23, justo antes del final del estudio fueron

- grupo 1, 28,5 (2,8)
 30 grupo 2, 28,4 (3,6)
 grupo 3, 27,8 (3,3).

Ningún animal murió durante la fase de tratamiento del experimento. Junto con los pesos corporales constantes, está claro que la administración de CPHPC y anticuerpos anti-SAP no tuvo efectos clínicos adversos significativos.

- 35 **Valores humanos de SAP.** Las concentraciones séricas de SAP humano fueron las mismas en todos los grupos en la primera toma de muestra de sangre después de la inducción de la amiloidosis y antes de cualquier otro tratamiento, con valores significativamente más altos entre los ratones hembra que en los machos (Tabla 1), como han observado los autores de la presente invención anteriormente en esta cepa. En la segunda toma de muestras de sangre, recogida 4 días después de haber comenzado el tratamiento con CPHPC en los grupos uno y dos, y antes de la administración del anticuerpo anti-SAP o de la IgG de oveja de control, hubo un agotamiento de más de 90% del SAP humano circulante (Tabla 1), tal como han informado previamente los autores de la presente invención^{16,17}.
 40 Las estimaciones de la concentración de SAP humano no fueron posibles en los sueros del grupo uno y dos

animales en los días 14 y 28 después de la inyección del anticuerpo anti-SAP de oveja o IgG de control debido a la interferencia con el ensayo por la persistencia de estos reactivos en la circulación. En el grupo tres, que no recibió ningún otro tratamiento, los valores de SAP humano se mantuvieron sin cambios el día 14, pero fueron significativamente más bajos el día 28 (Tabla 1), posiblemente debido al daño del hígado por la amiloidosis.

Las cantidades de SAP humano presentes en los bazo retirados al final del experimento se muestran en la Tabla 3. El SAP, incluido el SAP humano transgénico en estos ratones, se produce en el hígado. La interpretación de los resultados del ensayo de SAP humano en los hígados al final del experimento es complicada por lo tanto por el hecho de que algo de SAP se encuentra inevitablemente presente como resultado de su síntesis por los hepatocitos y no solo debido a la unión del SAP circulante a los depósitos de amiloide dentro del hígado, si éstos estuvieran presentes. Además, las hembras tienen concentraciones de SAP humano en circulación (Tabla 1) y hepáticas mucho más altas que los machos (Tabla 3). Sin embargo, el contenido de SAP humano de los hígados en los diferentes grupos se clasificó en el mismo orden que los resultados inequívocos del contenido de SAP humano en bazo.

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

Grupo	Machos			Hembras		
	1 (n=21)	2 (n=20)	3 (n=20)	1 (n=10)	2 (n=10)	3 (n=12)
Tratamiento	CPHPC + anti-SAP	CPHPC	ninguno	CPHPC + anti-SAP	CPHPC	ninguno
Día 2 antes de toma de muestra de sangre	37,1 (14,1)	35,1 (7,9)	35,8 (12,0)	72,0 (14,3)	82,6 (20,2)	78,2 (21,3)
Día 0 después de CPHPC antes de anticuerpo	2,6 (2,5)	2,9 (1,3)	35,4 (14,6)	3,1 (1,9)	4,0 (1,4)	74,3 (17,3)
Día 14 después de anticuerpo	NI	vestigios	33,2 (11,1)	NI	vestigios	67,9 (20,9)
Día 28 después de anticuerpo	NI	vestigios	*24,0 (6,4)	NI	vestigios	**54,0 (12,6)

NI, no interpretable debido a la persistencia de anticuerpo anti-SAP en suero; Vestigios, concentración muy baja pero no cuantificable debido a interferencia por la persistencia de IgG de oveja en suero. * Significativamente más bajo que las muestras de sangre anteriores, $P = 0,0047$ por ANOVA. ** Significativamente más bajo que las muestras de sangre anteriores, $P = 0,0131$ por ANOVA

Tabla 2. Contenido de SAP humano de bazo al final del experimento ($\mu\text{g}/\text{órgano completo}$)

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

SAP no se expresaba en el bazo y no había diferencia entre machos y hembras con respecto a la cantidad de amiloide en el bazo o la cantidad de SAP humano en cualquiera de los tres grupos. El contenido de SAP de los bazos se muestra aquí por lo tanto para la totalidad de cada grupo. Significación estadística de las diferencias entre los grupos (Test de Mann Whitney): grupo 1 vs grupo 2, $P = 0,0000$; grupo 1 vs grupo 3, $P = 0,0000$; grupo 2 vs grupo 3, $P = 0,0000$.

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

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

* La muestra de un ratón no estaba disponible para el ensayo. Significación estadística (pruebas de Mann Whitney) de las diferencias entre los grupos: grupo 1 machos vs grupo 2 o grupo 3, $P = 0,000$; grupo 2 vs grupo 3, $P = 0,0337$; grupo hembras 1 vs grupo 2, $P = 0,0413$; grupo 1 vs grupo 3, $P = 0,0069$; grupo 2 vs grupo 3, $p = 0,0698$

Carga de amiloide. La carga amiloide de todo el organismo fue la misma en los tres grupos después de la inducción de amiloide y antes de comenzar los diferentes tratamientos. A las 72 h de la inyección del trazador ^{125}I -SAP la retención de radioactividad en todo el organismo fue solamente 10-11% de la dosis inyectada en cada uno de los 8 controles no amiloidóticos. Entre los ratones amiloidóticos, la retención media (DT) fue:

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

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

grupo 3, 50,1% (21,5).

Estas diferencias no fueron significativas, $P = 0,054$ por ANOVA de una vía.

Al final del experimento, la evaluación histológica de amiloide en el bazo y el hígado mostró diferencias altamente significativas entre los grupos, $P = 0,0000$ por medio del análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis. Hubo notablemente menos amiloide en el grupo 1 (CPHPC más anti-SAP) que en los otros dos grupos, pero no hubo diferencia entre los grupos 2 (CPHPC solo) y 3 (control sin tratamiento) (Figs. 1 y 2). Entre los 31 ratones del grupo 1, no se detectó amiloide en 23 y los 8 restantes solamente tenían motitas microscópicas ocasionales. En contraste, no hubo ningún animal entre los 62 individuos en los dos grupos de control que no recibiera anti-SAP y que no tuviera amiloide en absoluto. Esta diferencia fue altamente significativa según la prueba exacta de Fisher, $P < 0,0001$.

	Amiloide presente	Amiloide ausente
Grupo 1: CPHPC + anti-SAP	8	23
Grupo 2: CPHPC + control IgG	30	0
Grupo 3: Sin tratamiento.	32	0

Entre los 62 ratones de control, solo 12 tenían vestigios o pequeñas cantidades de amiloide, los depósitos en todo el resto eran moderados o intensos. En la Fig. 3 se muestran ejemplos típicos de la tinción histoquímica para amiloide correspondiente a cada una de las puntuaciones de clasificación.

Aspectos histológicos. Las secciones teñidas con hematoxilina y eosina de todos los tejidos del bazo y el hígado se examinaron "a ciegas" para los grupos y tratamientos por parte del profesor AP Dhillon, Profesor de histopatología en el University College de Londres. Aparte de los depósitos de amiloide presentes en los grupos dos y tres, y ausentes en el grupo uno, hubo cambios modestos compatibles con inflamación crónica en muchos de los tejidos, aunque no todos, y estos no fueron diferentes entre los grupos.

Discusión

Todos los ratones se sacrificaron para estimar su carga de amiloide 60 días después de la última inyección de caseína y 28 días después del tratamiento del grupo de prueba con anticuerpos anti-SAP. Todos los ratones tenían

depósitos de amiloide sustanciales antes de los tratamientos anti-SAP o de control, como demuestra la retención de ¹²⁵I-SAP medida 10 días después de la última inyección de caseína. No hubo diferencias significativas entre los grupos y hubo, como se esperaba, cierta regresión espontánea de los depósitos de amiloide en unos pocos ratones de control al final del estudio. Sin embargo, no había un solo ratón entre los 62 animales de control en los grupos dos y tres que no tuviera amiloide en absoluto. En cambio, 23 de los 31 ratones que recibieron anticuerpos anti-SAP y CPHPC no tenían amiloide detectable en su bazo o hígado. Los únicos depósitos de amiloide encontrados en cualquier animal tratado con anti-SAP fueron unas pocas motitas microscópicas, órdenes de magnitud menores que los depósitos principales presentes en 50 de los 62 ratones que no recibieron anti-SAP. Es inequívocamente claro que el tratamiento anti-SAP fue responsable de este notable aclaramiento de los depósitos de amiloide en el grupo uno, ya que los ratones que recibieron CPHPC y la fracción de IgG de oveja de control de un antisuero no relacionado (grupo dos) tenían amiloide abundante en una cantidad indistinguible de los controles del grupo tres que no recibieron ningún tratamiento.

Los resultados del análisis histoquímico mediante tinción con rojo Congo se confirmaron mediante la estimación del contenido de SAP humano de los bazos e hígados. No hubo SAP humano detectable en los bazos de 29 de los 31 ratones en el grupo uno y solo cantidades vestigiales en los dos animales restantes. Los animales de control del grupo tres tenían cantidades sustanciales de SAP humano presente, correspondientes a su gran carga de amiloide, y los ratones del grupo dos tenían aproximadamente una cuarta parte del contenido de SAP humano, a pesar de tener la misma carga de amiloide, ya que habían recibido CPHPC continuamente durante 33 días antes de ser sacrificados. Las concentraciones de SAP humano se redujeron en > 90% en los sueros de todos los ratones que recibieron CPHPC en los grupos uno y dos, en comparación con el grupo tres de control. Este resultado demuestra la capacidad de CPHPC para agotar el SAP humano de la circulación, mientras que cantidades sustanciales de SAP humano permanecen en los depósitos de amiloide para proporcionar la diana para el efecto terapéutico de los anticuerpos anti-SAP. La combinación de CPHPC y anticuerpo anti-SAP es, por lo tanto, esencial para la presente invención: el fármaco de molécula pequeña aclara el plasma y los compartimentos de fluido extravascular del SAP humano para que el anticuerpo anti-SAP administrado posteriormente pueda alcanzar el SAP específicamente localizado en los depósitos de amiloide y ejercer allí su función crucial de desencadenar la regresión y el aclaramiento de las fibrillas amiloides.

Conclusión

El tratamiento combinado de individuos con depósitos de amiloide sistémicos establecidos utilizando CPHPC y anticuerpos anti-SAP causa de manera segura y eficaz el aclaramiento rápido y esencialmente completo de los depósitos. Esto nunca se había logrado previamente en ningún paciente o modelo animal o por cualquier otro método. La invención será aplicable a todas las formas de amiloidosis sistémica y local adquirida y hereditaria, y también a todas las demás enfermedades asociadas con depósitos de amiloide, incluida la enfermedad de Alzheimer y la diabetes tipo 2.

Ejemplo 2: Tratamiento de un paciente con amiloidosis sistémica utilizando CPHPC y anticuerpo anti-SAP

Un paciente que padece amiloidosis sistémica se diagnostica mediante un examen clínico e investigaciones de rutina que conducen a una sospecha de amiloidosis, seguido de una confirmación específica por un examen histoquímico por expertos de biopsias de tejidos afectados. La gammagrafía de SAP radiomarcado se realiza en el UK NHS National Amyloidosis Centre al the Centre for Amyloidosis and Acute Phase Proteins in the Department of Medicine of University College London en el Royal Free Hospital. El examen de tejido identifica el tipo particular de amiloide presente y el barrido, junto con el examen ecocardiográfico del corazón, muestra dónde está presente el amiloide y cuantifica su extensión. Las investigaciones clínicas de rutina sobre la función de los órganos establecen el alcance y la gravedad del daño tisular y orgánico causado por los depósitos de amiloide, así como la presencia y gravedad de cualquier enfermedad primaria subyacente que pueda haber conducido al depósito de amiloide.

Convencionalmente, las dos primeras etapas esenciales en el tratamiento de tal paciente consisten en: (1) mantenimiento de la función del órgano por todos los medios posibles, incluyendo la terapia con fármacos según sea apropiado y el reemplazo de órganos si es necesario, que comprende diálisis renal y trasplante de órganos, y (2) la implantación de cualquier terapia puede estar disponible para reducir la abundancia de la proteína precursora que forma las fibrillas amiloides. Esto último puede ser muy difícil de lograr y, a veces, es imposible, por lo que el daño a los órganos progresa hacia un fallo orgánico, a una grave morbilidad y generalmente conduce a la muerte.

De acuerdo con la presente invención, en este caso, se trata al paciente para detener el depósito de amiloide y eliminar los depósitos de amiloide establecidos existentes de los tejidos, lo que lleva a un beneficio clínico.

El paciente se trata con el fármaco que agota SAP, CPHPC, administrado mediante inyección intravenosa en embolada de una dosis de 100 mg. Al día siguiente se toma una muestra de sangre. Esto confirma por medio de inmunoensayo específico que la concentración de SAP en suero se ha reducido 90%. A continuación se inicia una infusión intravenosa de anticuerpo anti-SAP y durante un período de varias horas se administra una dosis de 1.000 mg de anticuerpo suficiente para unirse a SAP dentro de los depósitos de amiloide en todo el organismo. Se administra CPHPC por vía parenteral dos veces al día durante las próximas dos semanas, para garantizar que los valores plasmáticos de SAP permanezcan suprimidos. Todos los aspectos del estado clínico y la función de los

órganos del paciente se controlan de cerca diariamente, y se detectan mejoras en la función del órgano unos días después de la infusión del anticuerpo. Un mes después del tratamiento, cuando el CPHPC se hubo eliminado del organismo y el anticuerpo anti-SAP se hubo catabolizado, el paciente se sometió a una repetición de la gammagrafía de SAP para estimar la presencia y el alcance de cualquier depósito de amiloide residual. A partir de entonces, se reanuda el tratamiento con CPHPC administrando 0,5 mg/kg dos veces al día mediante inyección subcutánea para garantizar que se acumula la menor cantidad de SAP posible en cualquier amiloide residual en los tejidos. La gammagrafía de SAP se repite 3 veces al mes para controlar la regresión continua de amiloide, con la interrupción de CPHPC una semana antes de cada barrido y su restablecimiento inmediatamente después. Una vez que se considera que el paciente está libre de depósitos de amiloide, se detiene la administración de CPHPC, pero se continúa con los controles mediante gammagrafía de SAP para detectar cualquier depósito anormal adicional de amiloide. El paciente permanece libre de enfermedad durante el período de observación, pero si los depósitos de amiloide se repiten, el tratamiento con CPHPC y anti-SAP se repite según sea necesario para aclarar y mantener el aclaramiento de amiloide.

Ejemplo 3. Efecto de diferentes dosis de anticuerpo anti-SAP sobre el aclaramiento de amiloide

Protocolo experimental y métodos

En un experimento que utiliza exactamente el mismo protocolo y reactivos que se describen en el Ejemplo 1 anterior, diferentes grupos de 5 ratones recibieron cada uno las siguientes dosis de la misma fracción de IgG de antisero anti-SAP humano de oveja que en el Ejemplo 1: 50 mg (la misma dosis que en el Ejemplo 1); 10 mg; 2 mg; 0,4 mg; ninguna. La cantidad de anticuerpo anti-SAP en estas dosis fue de 7 mg, 1,4 mg, 0,28, 0,056 mg y cero respectivamente.

Resultados

En los dos grupos que recibieron las dosis más altas de anticuerpo anti-SAP, se aclararon prácticamente todos los depósitos de amiloide en el bazo y el hígado. En ninguno de los otros grupos tratados con anticuerpo, hubo una reducción en los depósitos de amiloide y no hubo diferencia con el grupo de control que no recibió anticuerpo.

Discusión

La dosis mínima eficaz de este anticuerpo policlonal anti-SAP de oveja en particular administrado en una sola dosis en el protocolo descrito en el Ejemplo 1 fue superior a 0,28 mg, y una dosis de 1,4 mg mostró una eficacia máxima.

Utilizando el ejemplo anterior, un experto en la técnica sería capaz de determinar las dosificaciones apropiadas para la administración a seres humanos teniendo en cuenta las diferencias conocidas en el aclaramiento y el metabolismo entre las dos especies.

Ejemplo 4. Curso temporal, mecanismo y efectos clínicos del aclaramiento de amiloide por el anticuerpo anti-SAP

Protocolo experimental y métodos

En un experimento que utiliza exactamente el mismo protocolo y reactivos que se describen en el Ejemplo 1 anterior, diferentes grupos de 5 ratones recibieron cada uno exactamente los mismos tratamientos que en ese experimento, incluyendo la dosis de 50 mg de fracción de IgG que contiene 7 mg de anticuerpo anti-SAP, y a continuación se sacrificaron a los 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, 21 y 25 días respectivamente de la administración del anticuerpo. Las muestras de plasma obtenidas de cada animal en el momento en que se sacrificó a cada grupo de ratones se almacenaron congeladas antes del análisis bioquímico en un solo lote al final del experimento. El bazo y el hígado se retiraron de cada ratón en el momento de la muerte y se procesaron para el análisis como se describe en el Ejemplo 1. Además de la tinción con rojo Congo para determinar la extensión del depósito de amiloide, las secciones de tejido fijadas teñidas de manera convencional con hematoxilina y eosina se examinaron para la evaluación histopatológica y se analizaron tejidos adecuadamente procesados mediante inmunohistoquímica y tinción inmunocitoquímica para detectar proteínas y marcadores celulares relevantes utilizando reactivos y métodos bien validados disponibles de forma rutinaria. Algunos tejidos también fueron examinados por microscopía electrónica de transmisión convencional. Todos los exámenes, la lectura y la puntuación de las diapositivas fueron realizados por observadores expertos que estaban ciegos a la identidad de las muestras. Los tejidos de control fueron proporcionados por ratones que habían sufrido la misma inducción de la amiloidosis AA sistémica pero que habían recibido IgG de oveja de control sin actividad anti-SAP.

Resultados

En el punto temporal más temprano, 24 horas después de la inyección del anticuerpo anti-SAP, ya había una infiltración masiva de depósitos de amiloide por células inflamatorias, identificadas por tinción con hematoxilina y eosina predominantemente como macrófagos con algunos granulocitos (Fig. 4). Esta apariencia estaba en marcado contraste con los depósitos de amiloide típicamente acelulares en los ratones de control que no recibieron el anticuerpo. Las micrografías electrónicas de tejidos en el día 1 mostraron un compromiso íntimo de los macrófagos y

granulocitos con los depósitos de amiloide (Fig. 5). Durante los días siguientes, la infiltración celular de los depósitos de amiloide persistió, se volvió abrumadoramente mononuclear y contuvo un número creciente de células gigantes multinucleadas que rodeaban y aparentemente engullían los grupos de amiloide progresivamente fragmentados y decrecientes (Fig. 4). El producto infiltrado celular y la cantidad de amiloide disminuyeron notablemente a los 7-10 días y, a los 15 días, los depósitos de amiloide y las células infiltrantes casi habían desaparecido. Las apariencias histológicas a los 21 y 25 días fueron casi indistinguibles del tejido normal no amiloidótico.

La tinción inmunohistoquímica con anticuerpo contra F4/80, un marcador global de macrófagos, identificó estos como el componente predominante de la invasión celular masiva temprana de los depósitos de amiloide (Fig. 6). Casi no hubo tinción para F4/80 en los depósitos de amiloide de los ratones de control que no recibieron anticuerpo anti-SAP, ni hubo una mayor tinción para F4/80 en los tejidos de los ratones tratados con anti-SAP que no fueran en y alrededor de los depósitos de amiloide. El día 4 hubo una tinción intensa para CD68, un marcador de actividad fagocítica por macrófagos, en todas las células en y alrededor de los depósitos de amiloide, como demuestran tanto la histoquímica con inmunoperoxidasa como la microscopía confocal (Fig. 6). Los restos fragmentados del amiloide, en su mayoría rodeados o internalizados por macrófagos y células gigantes, se tiñeron con el anticuerpo contra AA de ratón que se co-localizó con la tinción con anticuerpos anti-SAP humano, anti- IgG de oveja y anti C3 de ratón (Fig. 6). C3 es el componente del complemento más abundante y es responsable de las actividades quimiotácticas y opsonicas clave del sistema del complemento.

No hubo anomalías significativas ni diferencias significativas entre los grupos en ninguno de los analitos de plasma sometidos a prueba, que comprendían: sodio, potasio, cloruro, urea, creatinina, calcio, fosfato, fosfatasa alcalina, alanina transaminasa, aspartato transaminasa, proteína total, albúmina, colesterol total, triglicéridos, glucosa, bilirrubina total, creatina quinasa, lactato deshidrogenasa.

Discusión

La administración de anticuerpos anti-SAP a ratones amiloidóticos en los cuales el CPHPC había agotado el SAP en circulación, indujo una infiltración de los depósitos de amiloide predominantemente por macrófagos muy rápida e intensa. Muchas de estas células se fusionaron rápidamente para formar células gigantes multinucleadas que rodeaban y envolvían islas de amiloide y esto estuvo seguido por el aclaramiento rápido y casi completo de los depósitos. A los 15 días de la administración del anticuerpo, el amiloide había desaparecido virtualmente y la población celular de los tejidos volvió rápidamente a la normalidad. No hubo efectos adversos clínicamente aparentes del tratamiento y las muestras de plasma tomadas en el momento de la muerte de todos los ratones en cada grupo no mostraron alteraciones de la función renal o hepática, lípidos plasmáticos, proteínas totales o albúmina, ni evidencia bioquímica de daño muscular. Por lo tanto, el aclaramiento esencialmente completo de los depósitos de amiloides viscerales sustanciales en estos animales fue clínicamente silencioso y no perjudicial.

El tipo de célula predominante que invadía persistentemente los depósitos de amiloide se identificó mediante tinción con hematoxilina y eosina como macrófagos y esto se confirmó mediante microscopía electrónica e inmunocitoquímica, al igual que su papel activo en la fagocitosis y destrucción del amiloide. La presencia de SAP humano, IgG de oveja y C3 de ratón en los depósitos de amiloide de AA dentro y rodeados de macrófagos es coherente con el siguiente mecanismo. El anticuerpo anti- SAP humano se une al SAP humano asociado con los depósitos de amiloide y activa el complemento, generando los atrayentes quimiotácticos potentes, C3a y C5a. Las células fagocíticas, en su mayoría macrófagos, rodean e infiltran a continuación los depósitos de amiloide e ingieren activamente el amiloide que ha sido opsonizado por el complemento y el anticuerpo IgG, y la degradación mediada por macrófagos aclara rápidamente los depósitos.

Ejemplo 5. Validación de protocolos simplificados para el uso de anticuerpos anti-SAP

El protocolo convencional descrito con detalle en el Ejemplo 1 utiliza ratones en los que se ha eliminado el gen SAP del ratón y se ha insertado el transgén de SAP humano para proporcionar la expresión de SAP humano. También se utiliza la administración de CPHPC en el agua de bebida desde poco antes de la administración del anticuerpo anti-SAP y continuando a lo largo del resto del experimento. Para explorar la necesidad de tal tratamiento prolongado con CPHPC, se utilizó una dosis única de CPHPC parenteral en ratones que eran transgénicos para SAP humano sobre un fondo de tipo salvaje, en lugar de modificaciones genéticas para inactivar el gen de SAP ("knockout") de ratón como en los ejemplos anteriores. En otro enfoque, que es crítico para los estudios en ratones con modificaciones genéticas no relacionadas con SAP, los ratones no transgénicos amiloidóticos de tipo salvaje tenían sus depósitos de amiloide "cargados" con SAP humano mediante una única inyección parenteral de SAP humano puro aislado.

Protocolos experimentales y métodos

La amiloidosis AA se indujo y se confirmó en ratones transgénicos para SAP humano sobre el fondo de tipo salvaje como en el Ejemplo 1 anterior. A continuación recibieron una única inyección intraperitoneal de 1 mg de CPHPC, seguida 5 horas más tarde, en el grupo de prueba (n = 10), de una inyección intraperitoneal de 25 mg de la fracción de IgG del mismo suero anti- SAP humano de oveja que se utilizó en todos los ejemplos anteriores. Los ratones de control (n = 8) recibieron IgG de oveja sin actividad anti-SAP. Dieciséis días después, todos los ratones se

sacrificaron para estimar la carga de amiloide mediante tinción con rojo Congo.

Posteriormente, se cargaron 15 ratones de tipo salvaje en los que se había inducido y confirmado la amiloidosis AA como se detalla en el Ejemplo 1, con SAP humano mediante una única inyección intraperitoneal de 10 mg por ratón de SAP humano puro aislado. El SAP humano inyectado en ratones amiloidóticos se localiza en los depósitos de amiloide y persiste allí (Fig. 7) con un tiempo medio de aproximadamente 3-4 días, mientras que cualquier SAP humano no unido al amiloide es aclarado de la circulación con una semivida de aproximadamente 3-4 horas.^{16, 18}

Tres días después de la inyección de SAP humano, cuando el SAP humano ya no era detectable en la circulación, cada ratón recibió una sola inyección intraperitoneal de 50 mg de la fracción de IgG de antisero anti-SAP de oveja y todos fueron sacrificados 15 días después de eso para la estimación de su carga de amiloide por tinción con rojo Congo.

Resultados

Los depósitos de amiloide en los ratones transgénicos para SAP humano sobre el fondo de tipo salvaje se aclararon tan eficazmente con la dosis única de anticuerpo anti-SAP como se había visto en todos los experimentos previos en ratones con modificaciones genéticas transgénicas para SAP humano.

De manera similar, tras la carga de depósitos de amiloide AA de ratón en ratones de tipo salvaje con SAP humano administrado pasivamente, la administración de anticuerpo anti-SAP produjo el mismo aclaramiento notable de depósitos que se observó anteriormente.

Discusión

Estos resultados demuestran que la presencia de SAP humano en los depósitos de amiloide y la ausencia de una concentración significativa de SAP humano en la circulación son suficientes para la eficacia terapéutica del anticuerpo anti-SAP de acuerdo con la presente invención. Estas condiciones suficientes se lograron más fácilmente utilizando una dosis parenteral única de CPHPC en animales transgénicos para SAP humano o cargando los depósitos de amiloide en ratones de tipo salvaje con SAP humano a través de una inyección parenteral única del mismo. El último modelo es extremadamente útil porque permite el análisis del mecanismo de acción del anticuerpo anti-SAP en ratones modificados genéticamente (véase el Ejemplo 6 a continuación) sin necesidad de realizar cruzamientos prolongados.

Es importante destacar que el CPHPC es esencial en sujetos humanos en los que siempre hay una producción continua de SAP a 50-100 mg por día⁶ y donde sea absolutamente necesario agotar el SAP de plasma antes de administrar el anticuerpo anti-SAP.

Ejemplo 6. Dependencia del complemento del aclaramiento de amiloide por anticuerpo anti-SAP

El papel del complemento en el aclaramiento de amiloide por el anticuerpo anti-SAP se investigó comparando la eficacia del tratamiento entre ratones con deficiencia de complemento y animales de tipo salvaje normales con complemento suficiente. La delección dirigida del gen para los C1q bloquea la activación de la ruta clásica del complemento, que se inicia mediante la unión de C1q a los complejos antígeno-anticuerpo, pero la activación de C3, la etapa funcional fundamental responsable de la quimiotaxis y la opsonización, las principales funciones biológicas del complemento, todavía se puede realizar a través de las rutas alternativa y de lectina, así como por la escisión directa de C3 por serina proteinasas que no son del complemento. La delección dirigida del gen para C3 anula completamente estas funciones.

Protocolos y métodos experimentales

La amiloidosis AA se indujo y confirmó como se detalla en el Ejemplo 1 anterior, en dos grupos de ratones con deficiencia de complemento: modificados genéticamente para inactivar el gen C3 (n = 14) y modificados genéticamente para inactivar el gen C1q (n = 12). A continuación, todos los ratones se cargaron con SAP humano y todos, excepto dos en cada grupo, se trataron con anti-SAP como se describe en el Ejemplo 5, antes de ser sacrificados el día 15 a partir de entonces para la estimación de la carga de amiloide.

Resultados

En marcado contraste con el aclaramiento eficaz de los depósitos de amiloide en todos los ratones con suficiente complemento previamente tratados con anti-SAP, y descritos en los Ejemplos 1 a 5, aún había abundante amiloide presente en ambos grupos de animales con deficiencia de complemento, aunque tendía a tener una apariencia más fragmentada que en los dos ratones de control con deficiencia de complemento de cada tipo. Las puntuaciones de amiloide del bazo fueron ligeramente más altas en los que tenían deficiencia de C1q (mediana 10^4 , rango 10^2 - 10^4) que en los ratones con deficiencia de C3 (mediana 10^3 , rango 10^2 - 10^4) pero esto no alcanzó significación estadística.

Discusión

En ratones que carecían de C1q o C3, el tratamiento con anti-SAP no aclaró los depósitos de amiloide. La eficacia

terapéutica del anti-SAP es, por lo tanto, muy dependiente del complemento y no está mediada por el anticuerpo IgG solo, que podría, en teoría, involucrar a las células fagocíticas a través de sus receptores Fc (γ). Sin embargo, la apariencia más fragmentada de los depósitos de amiloide persistentes en los ratones con deficiencia de complemento sugirió al menos algún efecto del anticuerpo solo. Además, la tendencia a un mayor aclaramiento en animales con deficiencia de C1q en comparación con los animales con deficiencia de C3 sugirió que la activación de C3 es crítica y que incluso en ausencia de C1q y la ruta clásica, que normalmente se activa con el anticuerpo IgG, puede tener lugar alguna activación del complemento.

Ejemplo 7. Requerimiento de un anticuerpo IgG anti-SAP completo

La activación del complemento por el anticuerpo IgG requiere la totalidad de la molécula intacta, incluida la región Fc, y procede a través de la ruta clásica iniciada por la unión de C1q. En algunos sistemas anticuerpo-antígeno, la activación del complemento menos eficaz a través de la ruta alternativa puede estar mediada por el fragmento F(ab)₂. Con el fin de confirmar la dependencia del complemento del aclaramiento de amiloide por el anticuerpo anti-SAP y para investigar el requisito potencial de la región Fc del anticuerpo, se sometió a prueba el efecto del anticuerpo anti-SAP F(ab)₂.

Protocolo y métodos

Se indujo y confirmó amiloidosis AA en ratones C57BL/6 de tipo salvaje, como se detalla en el Ejemplo 1 anterior. Después de cargar los depósitos de amiloide con SAP humano como se detalla en el Ejemplo 5, se trataron grupos de ratones con fracción de IgG completa del antisuero anti-SAP humano policlonal de oveja (n = 8), con vehículo de tampón solo (n = 10) o con fragmento F(ab)₂ de la fracción de IgG (n = 5) producida por digestión con pepsina a pH 4,0. La dosis de actividad de anticuerpo anti-SAP inyectada fue de 7,28 mg por ratón que recibió F(ab)₂ y 7 mg (50 mg de IgG total como de costumbre) por ratón que recibió IgG completa. Todos los ratones se sacrificaron 14 días después para la estimación de la carga de amiloide mediante tinción con rojo Congo.

Resultados

El aclaramiento de los depósitos de amiloide fue casi completa en los ratones que recibieron anticuerpos IgG anti-SAP, que tuvieron una mediana (rango) de la puntuación de amiloide en bazo de 10⁰ (10⁰-10³), en comparación con los depósitos masivos de amiloide en los ratones de control con una mediana (rango) de la puntuación de amiloide en bazo de 10⁵ (10⁴-10⁶). Los ratones que recibieron F(ab)₂ tenía menos amiloide que los controles no tratados, mediana de la puntuación 10², rango 10⁰-10⁴, pero aún sustancialmente más que los ratones tratados con anticuerpo IgG anti-SAP completo.

Discusión

La dosis molar de anticuerpo anti-SAP F(ab)₂ utilizado en este estudio fue aproximadamente un tercio mayor que la del anticuerpo IgG, dado el peso molecular más pequeño del fragmento F(ab)₂ comparado con la IgG completa. Sin embargo, el efecto sobre el aclaramiento de amiloide fue sustancialmente menor, lo que demuestra que la acción principal del anticuerpo anti-SAP requiere la región Fc. Esto no se debe a la participación directa del reconocimiento celular por los receptores Fc(γ), ya que la IgG completa fue incluso menos eficaz en animales con deficiencia de complemento que F(ab)₂ en ratones con suficiente complemento. Es probable que la alta dosis de F(ab)₂ que se utilizó fuera capaz de activar algo de complemento a través de la ruta alternativa.

Ejemplo 8. Requerimiento de macrófagos

Los estudios histológicos e histoquímicos descritos aquí muestran que las células que se infiltran, rodean y fagocitan los depósitos de amiloide en ratones tratados con anticuerpos anti-SAP son macrófagos. Para confirmar que efectivamente son responsables del aclaramiento del amiloide, se sometió a prueba el efecto del tratamiento anti-SAP en ratones en los que toda la actividad de los macrófagos se había inhibido mediante la administración de clodronato liposomal. Los reactivos, el protocolo experimental y los efectos sobre la función de macrófagos del clodronato liposomal están bien establecidos y ampliamente documentados²².

Protocolo y métodos

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

Resultados

El tratamiento con anti-SAP produjo un aclaramiento casi completo de los depósitos de amiloide en comparación con el grupo que no recibió anticuerpo, siendo la mediana (rango) de la puntuación de amiloide en bazo 10^0 ($0-10^3$) y 10^3 (10^3-10^4) respectivamente. En ratones que recibieron el clodronato liposomal en un régimen que se sabe que anula completamente la función de los macrófagos, no hubo eliminación de depósitos de amiloide, siendo la puntuación de la carga de amiloide de 10^5 (10^2-10^5)

Discusión

El resultado en este experimento confirmó que la función de los macrófagos es esencial para la eliminación de los depósitos de amiloide por el anticuerpo anti-SAP humano.

Ejemplo 9: Unión *in vitro* a SAP de anticuerpos monoclonales de ratón contra SAP humano

Se sometieron a prueba por separado dos grupos de anticuerpos monoclonales anti-SAP para determinar su unión a SAP humano *in vitro*, y los dos anticuerpos que mostraron la mayor unión se compararon entre sí en diferentes ensayos.

Protocolos y métodos

El primer conjunto de anticuerpos comprendía los anticuerpos de 7 hibridomas generados en un único protocolo de inmunización y fusión convencional y se denominaron SAP-1 a SAP-7, y éstos se sometieron a prueba junto con un anticuerpo monoclonal separado, denominado NH. Dos de estos anticuerpos, SAP-5 y SAP-2, son de isotipo IgG2a, mientras los otros están dentro del isotipo IgG1.

El segundo conjunto de anticuerpos comprendía 6 anticuerpos monoclonales IgG2a diferentes obtenidos mediante técnicas convencionales de inmunización con SAP humano puro y una fusión convencional para producir hibridomas que se clonaron mediante métodos rutinarios. Los sobrenadantes de la fusión evaluados inicialmente después de la fusión original se escrutaron inicialmente mediante un ensayo de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA) convencional para identificar los seis anticuerpos monoclonales IgG anti-SAP humano de ratón que se unían más abundantemente a SAP humano puro aislado que se había inmovilizado no covalentemente no específicamente sobre placas de microtitulación. Después de clonar los sobrenadantes y después de que los anticuerpos aislados fueran evaluados por medio de IRMA como se describe a continuación, se seleccionaron los clones de hibridomas que producían anticuerpos IgG2a con una unión máxima a SAP.

La unión de los anticuerpos a SAP se cuantificó mediante ensayos inmunorradiométricos realizados en placas de microtitulación recubiertas con SAP humano puro inmovilizado. La IgG de ratón unida se detectó con anticuerpo policlonal del oveja radiomarcado o bien para todas las clases de IgG de ratón o bien con anticuerpos de oveja específicos de isotipo contra IgG2a de ratón. Se utilizó proteína C reactiva (CRP) humana pura aislada como antígeno de control de especificidad. La CRP es la proteína más íntimamente relacionada con SAP y comparte 55% de residuos estrictos para la identidad de residuos con este. Ninguno de los anticuerpos mostró reactividad alguna con CRP humana. Se inmovilizó SAP humano puro aislado sobre las placas en varios formatos diferentes: directamente mediante unión no covalente, no específica a la superficie de plástico; mediante anclaje covalente a través de sus grupos amino libres a placas activadas con N-hidroxisuccinimida; mediante captura sobre anticuerpos anti-SAP humano de oveja específicos aplicados como recubrimiento sobre placas; y en forma de complejos de SAP co CPHPC que habían sido entrecruzados adicionalmente mediante interacción covalente con el reactivo BS3 bifuncional. En esta última configuración las moléculas de SAP se asocian en pares con sus caras de unión, B, opuestas y de ese modo ocluidas como están cuando SAP se une a las fibrillas de amiloide. El uso de SAP en este formato por lo tanto analiza si un anticuerpo anti-SAP puede acceder a su epítipo específico cuando la molécula de SAP está unida a un ligando macromolecular. Además, se llevaron a cabo pruebas en presencia de concentraciones de calcio fisiológicas, como *in vivo*, y en ausencia de calcio iónico libre producido utilizando EDTA 10 mM en todos los tampones. Este enfoque identificó si un anticuerpo anti-SAP estaba dirigido específicamente a un epítipo creado por la organización dependiente de calcio del bolsillo de unión al ligando sobre la cara B de la molécula.

La unión de anticuerpos seleccionados a SAP se caracterizó adicionalmente cualitativamente mediante inmunodifusión doble en gel, y mediante transferencia tanto desde electroforesis en agarosa nativa como SDS-PAGE (transferencia western), todo mediante métodos convencionales de rutina. El análisis cuantitativo de los parámetros termodinámicos de la unión de anticuerpos se realizó en el aparato Biacore, utilizando SAP puro aislado solo inmovilizado sobre el chip, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados

Los resultados de IRMA, mostrados en las **Tablas 4 y 5**, mostraron que, entre el primer conjunto de anticuerpos monoclonales IgG anti-SAP humano, SAP-5 se unía más exhaustivamente a SAP humano, y que reconocía SAP unido al ligando igualmente bien.

Tabla 4. Unión de anticuerpos monoclonales IgG anti-SAP-humano de ratón a SAP humano solo y a SAP humano complejo con CPHPC, cada uno inmovilizado directamente por anclaje covalente, y anticuerpo unido detectado por anti-IgG de ratón de oveja radiomarcado.

	En EDTA media (n=3)		En calcio media (n=3)	
	SAP solo	Complejo SAP-CPHPC	SAP solo	Complejo SAP-CPHPC
Tampón	0	0	0	0
SAP-1 IgG1	2683	3322	3103	3922
SAP-2 IgG2a	3522	4591	1723	2340
SAP-3 IgG1	1910	2869	2847	3778
SAP-4 IgG1	2149	3002	2844	3370
SAP-5 IgG2a	4053	5135	5583	6165
SAP-6 IgG1	2021	2650	3007	3663
SAP-7 IgG1	1884	2449	1651	2112
NH IgG1	2514	3236	2766	3929

- 5 Tabla 5. Unión de anticuerpos IgG anti-SAP humano monoclonales de ratón a SAP humano solo y SAP humano complejo con CPHPC, cada uno capturado sobre anti-SAP humano policlonal de oveja inmovilizado, y anticuerpo unido detectado por anti-IgG de ratón de cabra radiomarcado.

Actividad unida (d.p.m.) en calcio media (n=3)		
	SAP solo	Complejo SAP-CPHPC
Tampón	0	0
SAP-1 IgG1	1148	2298
SAP-2 IgG2a	1680	2142
SAP-3 IgG1	853	1949
SAP-4 IgG1	642	1647
SAP-5 IgG2a	9310	7125
SAP-6 IgG1	1028	1931
SAP-7 IgG1	13	442
NH IgG1	1868	2064

- 10 El segundo conjunto de anticuerpos anti-SAP se seleccionó inicialmente como los de isotipo IgG2a con la unión más abundante en los ensayos ELISA, y a continuación se evaluaron mediante IRMA utilizando tanto anti-IgG de ratón polivalente como anti-IgG2a de ratón específico del isotipo, como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Unión de anticuerpos IgG2a anti-SAP humano monoclonales de ratón a SAP humano directamente inmovilizado mediante anclaje no covalente y detectada con anti-IgG de ratón polivalente de oveja radiomarcado o anti-IgG2a anti-ratón específico de oveja.

Anticuerpo monoclonal	Actividad anti-IgG de ratón polivalente unida (d.p.m.)		
	Dilución de sobrenadante		
	neto	1/100	1/1000
3H8.H3	11766	6516	1156
3H8.H6	11646	4440	758
3H8.H8	11627	2361	486
6H1.G2 (Abp1)	11055	8571	2996
6H1.G3	12661	1743	244
6H1.H1	14892	4802	837
Anticuerpos	Actividad anti-IgG2a de ratón unido (d.p.m.)		
	Dilución de sobrenadante		
	neto	1/100	1/1000
3H8.H3	1139	355	93
3H8.H6	1465	289	85
3H8.H8	1791	286	95
6H1.G2 Abp1	4799	3013	1145
6H1.G3	4724	871	307
6H1.H1	6175	2003	738

- 5 Cuando todos estos sobrenadantes se sometieron a prueba para determinar la unión a SAP en los diferentes formatos descritos más arriba, no hubo diferencia en su reconocimiento de SAP independientemente de si SAP estaba solo o entrecruzado, o en presencia de calcio. Sin embargo, el clon 6H1.G2 mostró constantemente la unión más abundante en todas las condiciones y por lo tanto fue seleccionado para un estudio y uso adicionales, y se designa en adelante Abp1. La unión de Abp1 y SAP-5 se comparó mediante IRMA utilizando SAP directamente inmovilizado sobre las placas y los resultados mostrados en la Tabla 7 demuestran que Abp1 se une más abundantemente que SAP-5. Los valores más bajos observados para Abp1 a las concentraciones de entrada más altas, detectados con anti-IgG de ratón polivalente representan un fenómeno prozona por exceso de anticuerpo típico creado por la cantidad limitada de antígeno SAP inmovilizado sobre las placas. Los valores notablemente superiores observados para la unión de Abp1 a una concentración de entrada más baja proporcionan la evidencia inequívoca de su mayor potencia.

Tabla 7. Unión de anticuerpos IgG2a anti-SAP humano monoclonales de ratón SAP-5 y Abp1 a SAP humano inmovilizado directamente mediante anclaje no covalente y detectada con anti-IgG de ratón polivalente de oveja radiomarcado y anti-IgG2a específico de oveja.

Actividad anti-IgG de ratón polivalente unido (d.p.m.)						
	Concentración de anticuerpo monoclonal (µg/ml)					
	100	10	1	0,1	0,01	0,001
SAP-5	16229	15434	12073	4555	902	195
Abp1	9376	10230	11970	6717	1676	544
Blanco	75					
	100					
Actividad anti-IgG2a de ratón unido (d.p.m.)						
	Concentración de anticuerpo monoclonal (µg/ml)					
	100	10	1	0,1	0,01	0,001
SAP-5	2200	1979	1649	589	222	94
Abp1	2652	2599	2251	1359	522	368

Blanco	100					
	77					

Ambos anticuerpos, SAP-5 y Abp1, se unen ávidamente a SAP nativo humano como demuestra su precipitación de este antígeno en la doble inmunodifusión en gel de agarosa tanto con SAP humano puro como con SAP en suero humano completo. Para todas las razones de concentración de anticuerpo para antígenos diferentes, la precipitación por Abp1 fue más fuerte que la de SAP-5 (Fig. 11).

Ambos anticuerpos, SAP-5 y Abp1, también se unieron ávidamente a SAP humano nativo después de la separación electroforética de suero humano completo en gel de agarosa. Sin embargo, cuando SAP humano puro aislado se había desnaturizado mediante ebullición en SDS y reducción con mercaptoetanol, seguido de SDS-PAGE, solamente el anticuerpo SAP-5 fue capaz de unirse específicamente al mismo. Por el contrario, el anticuerpo Abp1 ya no reconocía SAP en esta forma.

La afinidad y la cinética de unión de los dos anticuerpos monoclonales anti-SAP se muestran en la Tabla 8, donde k_{on} es la constante de la tasa de asociación, k_{off} es la constante de la tasa de disociación, y K_D es la constante de unión en equilibrio.

Tabla 8. Afinidad de los anticuerpos monoclonales (mAb) por hSAP determinada por medio de BIAcore

	k_{on} ($M^{-1} \text{ seg}^{-1}$)	k_{off} (seg^{-1})	K_D (M^{-1})
SAP-5	$2 \pm 5 \times 10^4$	$6 \pm 4 \times 10^{-5}$	$5 \pm 4 \times 10^{-9}$
Abp1	$3,18 \pm 5 \times 10^4$	$1,7 \pm 0,9 \times 10^{-5}$	$1 \pm 1,7 \times 10^{-9}$

Discusión

Estos resultados caracterizan dos anticuerpos anti-SAP humano de ratón monoclonales que se unen ávidamente a SAP humano nativo con una afinidad comparable y elevada. Ambos son del isotipo IgG2a, lo que tiene una importancia crítica para la presente invención ya que el mecanismo de aclaramiento del amiloide es completamente dependiente y se sabe que IgG2a de ratón es una de las clases de anticuerpos murinos capaces de activar potentemente la ruta clásica del complemento. Ambos anticuerpos precipitan el SAP humano nativo, confirmando su ávida unión. La inmunoprecipitación por anticuerpos monoclonales es extremadamente inusual, pero en este caso refleja la naturaleza polimérica de la molécula de SAP, que comprende 5 subunidades idénticas y de ese modo permite la formación de un entramado con anticuerpos IgG bivalentes que es responsable de la formación del entramado de antígeno-anticuerpo que conduce a la precipitación. La unión a SAP nativo es necesaria para la presente invención, ya que el SAP de los depósitos de amiloide retiene indefinidamente su conformación nativa. Sin embargo, SAP-5 todavía se une a SAP después de haber sido desnaturizado casi completamente mediante ebullición en SDS y reducción de los puentes disulfuro intracatenarios presentes en cada promotor de SAP, demostrando que SAP-5 reconoce un epítipo de secuencia (Figura 9). Por el contrario, Abp1 no se une a SAP desnaturizado, indicando que reconoce un epítipo conformacional o discontinuo (Figura 9). Sin embargo ambos anticuerpos se unen ávidamente a SAP cuando el propio SAP está unido a un ligando específico. Esto resulta crucial para la presente invención en la que el anticuerpo anti-SAP debe reconocer y unirse a SAP unido a fibrillas amiloides en los depósitos de amiloide *in vivo*. Por lo tanto se presentan aquí dos extremos polares de reconocimiento de epítopos por anticuerpos monoclonales.

Ejemplo 10. Eficacia del anticuerpo monoclonal anti-SAP humano de ratón SAP-5 en el aclaramiento de depósitos de amiloide AA sistémicos en ratón.

El aclaramiento de amiloide de acuerdo con la presente invención requiere un anticuerpo anti-SAP humano que se una con suficiente avidez al SAP humano asociado con los depósitos de amiloide en los tejidos y active el complemento con el fin de atraer y activar a los macrófagos para que medien en la destrucción y el aclaramiento de los depósitos de amiloide. Se buscó la capacidad de diversos anticuerpos monoclonales para mediar este efecto en comparación con el anticuerpo policlonal anti-SAP humano de oveja convencional como control positivo.

Protocolos y métodos

Se indujo amiloidosis AA sistémica en ratones C57BL/6 con el gen SAP desactivado transgénicos para SAP humano como se describe en el Ejemplo 1. Nueve días después de la inyección final de caseína a los ratones, se confirmaron la presencia y el grado de depósito de amiloide de la manera habitual mediante recuento de amiloide en todo el organismo después de una inyección de una dosis de trazador de SAP humano marcado con ^{125}I . Todos los ratones tenían cantidades sustanciales y comparables de amiloide, y fueron distribuidos en grupos estrechamente compensados para recibir los diferentes tratamientos. Una semana después de la inyección de trazador, cada ratón recibió una sola dosis de 5 mg de CPHPC mediante inyección intraperitoneal, seguido 5 horas más tarde, a través

de la misma ruta, de la fracción de IgG policlonal anti-SAP humano de oveja convencional (1 ml a 50 mg/ml de proteína total, 7 mg/ml de anticuerpo anti-SAP humano) o 5 mg de cada uno de los diferentes anticuerpos monoclonales anti-SAP humano. Todos los ratones se sacrificaron 21 días después de la inyección de anticuerpo y se determinó la carga de amiloide mediante histología con rojo Congo de sus bazo.

5 Resultados

Los resultados mostrados en la Tabla 9 son las puntuaciones para la abundancia de amiloide en el bazo de acuerdo con la escala logarítmica expuesta en el Ejemplo 1.

Tabla 9. Presencia de amiloide en el bazo de ratones con amiloidosis AA sistémica después del tratamiento con CPHPC y diversos anticuerpos anti-SAP humano.

Tratamiento con anticuerpo	Isotipo	Puntuaciones de amiloide en bazo en ratones individuales	Mediana de puntuación de amiloide (rango)
Ninguno		10², 10², 10², 10², 10², 10², 10², 10², 10³, 10³, 10⁴	10² (10²-10⁴)
Policlonal	NA	10⁰, 10⁰, 10⁰, 10⁰, 10⁰, 10⁰, 10⁰, 10⁰, 10⁰, 10⁰, 10⁰	10⁰ (10⁰-10⁰)
Monoclonal SAP-1	IgG1	10 ¹ , 10 ² , 10 ² , 10 ² , 10 ² , 10 ³ , 10 ³	10 ² (2-10 ³)
Monoclonal SAP-2	IgG2a	10 ¹ , 10 ² , 10 ² , 10 ² , 10 ² , 10 ³	10 ² (10 ¹ -10 ³)
Monoclonal SAP-3	IgG1	10 ¹ , 10 ² , 10 ² , 10 ³ , 10 ³ , 10 ³ , 10 ³	10 ³ (10 ¹ -10 ³)
Monoclonal SAP-4	IgG1	10 ³	10 ³
Monoclonal SAP-5	IgG2a	10⁰, 10⁰, 10⁰, 10⁰, 10⁰	10⁰ (10⁰-10⁰)
Monoclonal SAP-6	IgG1	10 ¹	10 ¹
Monoclonal SAP-7	IgG1	10 ¹ , 10 ¹ , 10 ² , 10 ² , 10 ² , 10 ³ , 10 ³	10 ² (10 ¹ -10 ³)
Monoclonal SAP-5,4A	IgG1	10 ¹ , 10 ² , 10 ² , 10 ³	10 ² (10 ¹ -10 ³)
Monoclonal SAP-5,4D	IgG1	10 ¹ , 10 ¹ , 10 ¹ , 10 ¹ , 10 ² , 10 ³ , 10 ³	10 ¹ (10 ¹ -10 ³)

Entre los anticuerpos monoclonales sometidos a prueba, solamente SAP-5 produjo un aclaramiento de los depósitos de amiloide pero su efecto fue el mismo que la acción drástica y altamente reproducible del anticuerpo policlonal de oveja. De manera importante, SAP-5 es del isotipo IgG2a, que se sabe que activa el complemento de ratón mientras todos los demás anticuerpos monoclonales, excepto SAP-2 eran del isotipo IgG1 que no activa el complemento. Aunque SAP-2 es del isotipo IgG2a, su unión a SAP cuantificada *in vitro* en el Ejemplo 9, Tablas 4 y 5, era notablemente menor que la de SAP-5 y evidentemente no había suficiente *in vivo* como para resultar eficaz.

Discusión

Estos resultados demuestran que un anticuerpo monoclonal anti-SAP humano de ratón IgG2a activador del complemento con suficiente avidez media el aclaramiento de amiloide *in vivo* tan eficazmente como el anticuerpo policlonal anti-SAP humano de oveja. Además, este anticuerpo reconoce un epítipo de secuencia en SAP humano.

Ejemplo 11. Eficacia del anticuerpo monoclonal anti-SAP humano Abp1

Se comparó el efecto de Abp1 sobre los depósitos de amiloide *in vivo* en el modelo de amiloidosis AA de ratón con la acción del anticuerpo policlonal de oveja convencional. En contraste con el anticuerpo SAP-5, que se une a SAP humano desnaturalizado y por lo tanto reconoce un epítipo de secuencia, el anticuerpo Abp1 no se une a SAP desnaturalizado y por lo tanto reconoce un epítipo conformacional.

Protocolo experimental y métodos

Se indujo y se confirmó amiloidosis AA en ratones C57BL/6 de tipo salvaje como se ha detallado en el Ejemplo 1 anterior. Después de cargar los depósitos de amiloide con SAP humano como se detalla en el Ejemplo 5, los grupos de ratones se trataron con 50 mg por ratón de IgG total como fracción de IgG completa del antisero policlonal anti-SAP humano completo de oveja proporcionando una dosis de 7 mg de anticuerpo anti-SAP real (n=5), Abp1 purificado aislado a una dosis de 5 mg por ratón (n=10), Abp1 purificado aislado a una dosis de 1 mg por ratón (n=10), y, como control negativo, anticuerpo monoclonal IgG2a de ratón purificado aislado específico para un antígeno humano no relacionado y no reactivo con SAP humano o cualquier antígeno murino. Todos los ratones se sacrificaron 17 días después para la estimación de la carga de amiloide mediante tinción con rojo Congo. Cuatro ratones en los que se había inducido amiloidosis, pero que mostraban cargas inferiores mediante retención de 125I-SAP antes de que los animales fueran asignados a los diferentes grupos, no recibieron tratamiento adicional, pero se sacrificaron y sus tejidos se procesaron al mismo tiempo que los de los ratones tratados al final del experimento.

Resultados

Los ratones tratados con 5 mg de Abp1 mostraron el mismo aclaramiento notable de los depósitos de amiloide esplénicos y hepáticos que se observa con la dosis de 7 mg de anticuerpo policlonal de oveja. Solamente quedaban motitas vestigiales de amiloide en los bazo de los ratones tratados y no se detectó ninguna en absoluto en muchos de los hígados, lo que contrasta considerablemente con los extensos depósitos de amiloide esplénicos y hepáticos en todos los animales que recibieron el anticuerpo de control (Tabla 10). Incluso los ratones que no fueron tratados porque no habían desarrollado suficiente carga de amiloide al final del período de inducción, tuvieron depósitos de amiloide masivos en todos los casos (Tabla 10), intensificando el contraste con la sorprendente eficacia del aclaramiento de amiloide producido por el anticuerpo policlonal, como es habitual, y por el anticuerpo monoclonal Abp1 específico de la conformación. A la dosis inferior de 1 mg de Abp1 por ratón, hubo una reducción de amiloide en el hígado pero ningún efecto significativo en los bazo.

Tabla 10. Efecto de anticuerpo monoclonal IgG2a anti-SAP humano de ratón Abp1 sobre los depósitos de amiloide viscerales en ratones con amiloidosis AA sistémica.

Tratamiento	Puntuación amiloide bazo		Puntuación amiloide hígado	
	Ratones individuales	Mediana (rango)	Ratones individuales	Mediana (rango)
IgG2a de ratón de control, 5 mg/ratón	10 ² , 10 ³ , 10 ³ , 10 ³ , 10 ³ , 10 ³ , 10 ³ , 10 ⁴	10 ³ (10 ³ -10 ⁴)	10 ¹ , 10 ¹ , 10 ¹ , 10 ¹ , 10 ¹	10 ¹
Anticuerpo policlonal anti-SAP humano de oveja, 7 mg/ratón	10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰	10 ⁰	0, 0, 0, 10 ⁰ , 10 ⁰	0 (0-10 ⁰)
Anticuerpo monoclonal IgG2a anti-SAP humano Abp1, 5 mg/ratón	10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ¹ , 10 ¹ , 10 ¹	10 ⁰ (10 ⁰ -10 ¹)	0, 0, 10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ¹ , 10 ¹ , 10 ¹ , 10 ¹	10 ⁰ (0-10 ¹)
Sin tratamiento	10 ² , 10 ³ , 10 ³ , 10 ⁴		10 ⁰ , 10 ⁰ , 10 ¹ , 10 ¹	

Discusión

Estos resultados demuestran la eficacia en el aclaramiento de los depósitos de amiloide *in vivo* de un anticuerpo monoclonal anti-SAP humano, del isotipo IgG2a activador del complemento, que reconoce específicamente un epítipo conformacional. De este modo, los anticuerpos monoclonales anti-SAP humano para su uso de acuerdo con la presente invención se pueden dirigir a epítipos de secuencia, tales como el anticuerpo SAP-5, o a epítipos conformacionales, tales como Abp1.

Conclusiones de los Ejemplos 1 y 3-11

La administración de anticuerpos policlonales o monoclonales de ratón adecuados anti-SAP causa de manera altamente reproducible un aclaramiento rápido y casi completo de los depósitos de amiloide viscerales en ratones

con amiloidosis AA en los cuales el SAP humano está presente en los depósitos de amiloide pero está ausente de la circulación, a través del tratamiento de ratones transgénicos para SAP humanos con CPHPC o por aclaramiento natural después de la administración pasiva de SAP humano a ratones de tipo salvaje.

No hay efectos adversos clínicos o bioquímicos asociados.

- 5 La inyección del anticuerpo anti-SAP está seguida rápidamente por una intensa infiltración de los depósitos de amiloide por los macrófagos que rodean y envuelven el amiloide, forman muchas células gigantes multinucleadas y destruyen los depósitos.

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

- 10 El aclaramiento de amiloide requiere un sistema de complemento intacto y es absolutamente dependiente de los macrófagos.

Ambos anticuerpos monoclonales IgG2a anti-SAP humano de ratón, SAP-5 como Abp1, se unen al antígeno SAP humano con una alta afinidad y especificidad, in vitro e in vivo, y se unen igualmente bien a SAP solo y a SAP complejo con ligando.

15 Referencias

1. Pepys, M.B. (2006) *Amyloidosis. Annu. Rev. Med.*, 57: 223-241.
2. Nelson, S.R., Lyon, M., Gallagher, J.T., Johnson, E.A. y Pepys, M.B. (1991) Isolation and characterization of the integral glycosaminoglycan constituents of human amyloid A and monoclonal light-chain amyloid fibrils. *Biochem. J.*, 275: 67-73.
- 20 3. Pepys, M.B., Dyck, R.F., de Beer, F.C., Skinner, M. y Cohen, A.S. (1979) Binding of serum amyloid P component (SAP) by amyloid fibrils. *Clin. Exp. Immunol.*, 38: 284-293.
4. Pepys, M.B., Booth, D.R., Hutchinson, W.L., Gallimore, J.R., Collins, P.M. y Hohenester, E. (1997) Amyloid P component. A critical review. *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.*, 4: 274-295.
- 25 5. Nelson, S.R., Tennent, G.A., Sethi, D., Gower, P.E., Ballardie, F.W., Amatayakul-Chantler, S. y Pepys, M.B. (1991) Serum amyloid P component in chronic renal failure and dialysis. *Clin. Chim. Acta*, 200: 191-200.
6. Hawkins, P.N., Wootton, R. y Pepys, M.B. (1990) Metabolic studies of radioiodinated serum amyloid P component in normal subjects and patients with systemic amyloidosis. *J. Clin. Invest.*, 86: 1862-1869.
7. Pepys, M.B., Rademacher, T.W., Amatayakul-Chantler, S., Williams, P., Noble, G.E., Hutchinson, W.L., Hawkins, P.N., Nelson, S.R., Gallimore, J.R., Herbert, J., Hutton, T. y Dwek, R.A. (1994) Human serum amyloid P component is an invariant constituent of amyloid deposits and has a uniquely homogeneous glycostructure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 5602-5606.
- 30 8. Pepys, M.B. y Hawkins, P.N. (2003) Amyloidosis. In: Oxford Textbook of Medicine, 4ª Ed., Vol. 2 (Warrell, D.A., Cox, T.M., Firth, J.D. y Benz, E.J., Jr., eds.), Oxford University Press, Oxford, pp. 162-173.
9. Baltz, M.L., Caspi, D., Hind, C.R.K., Feinstein, A. y Pepys, M.B. (1986) Isolation and characterisation of amyloid enhancing factor. En: *Amyloidosis* (Glennner, G.G., Osserman, E.F., Benditt, E.P., Calkins, E., Cohen, A.S. y Zucker-Franklin, D., eds.), Plenum Press, Nueva York, pág. 115-121.
- 35 10. Wechalekar, A.D., Goodman, H.J.B., Lachmann, H.J., Offer, M., Hawkins, P.N. y Gillmore, J.D. (2007) Safety and efficacy of risk-adapted cyclophosphamide, thalidomide, and dexamethasone in systemic AL amyloidosis. *Blood*, 109: 457-464.
- 40 11. Hawkins, P.N. y Pepys, M.B. (1991) A primed state exists in vivo following regression of murine AA amyloidosis. En: *Amyloid and Amyloidosis 1990* (Natvig, J.B., Forre, O., Husby, G., Husebekk, A., Skogen, B., Sletten, K. y Westermarck, P., eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pág. 264-267.
12. Gillmore, J.D., Lovat, L.B., Persey, M.R., Pepys, M.B. y Hawkins, P.N. (2001) Amyloid load and clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein. *Lancet*, 358: 24-29.
- 45 13. Botto, M., Hawkins, P.N., Bickerstaff, M.C.M., Herbert, J., Bygrave, A.E., McBride, A., Hutchinson, W.L., Tennent, G.A., Walport, M.J. y Pepys, M.B. (1997) Amyloid deposition is delayed in mice with targeted deletion of the serum amyloid P component gene. *Nature Med.*, 3: 855-859.
14. Yamamura, K.-I., Tashiro, F., Yi, S., Wakasugi, S., Araki, S., Maeda, S. y Shimada, K. (1993) Transgenic mouse model for human genetic diseases. *Mol. Reprod. Dev.*, 36: 248-250.
- 50

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

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

17. Pepys, M.B. Therapeutic agent. Pentraxin Therapeutics Limited, London (GB). Patente de Estados Unidos Núm. 7.045.499 B2, presentada el 16 de mayo de 2006.

18. Hawkins, P.N., Myers, M.J., Epenetos, A.A., Caspi, D. y Pepys, M.B. (1988) Specific localization and imaging of amyloid deposits *in vivo* using ¹²³I-labeled serum amyloid P component. *J. Exp. Med.*, 167: 903-913.

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

20. Tennent, G.A., Dziadzio, M., Triantafillidou, E., Davies, P., Gallimore, R., Denton, P. y Pepys, M.B., (En Prensa) Normal Circulating Serum Amyloid P Component Concentration in Systemic Sclerosis. *Arthritis & Rheumatism* 56: 2013-7.

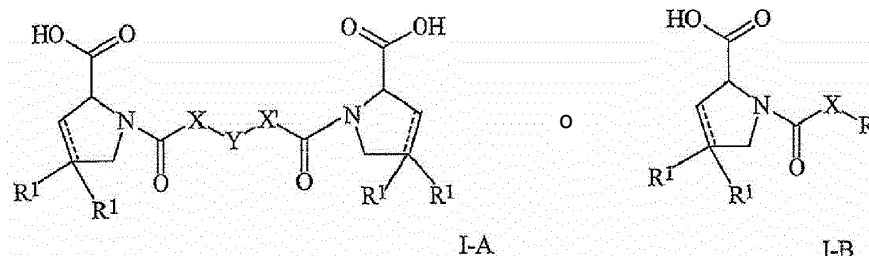
21. Pepys, M.B. y Hawkins, P.N. (2001) Amyloidosis. En: *Samter's Immunologic Diseases, Sexta Ed., Vol. 1* (Austen, K.F., Frank, M.M., Atkinson, J.P. y Cantor, H., eds.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pág. 401-412.

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

Habiendo descrito de este modo en detalle las realizaciones preferidas de la presente invención, de debe entender que la invención definida por los párrafos anteriores no se limita a los detalles particulares expuestos en la descripción anterior ya que son posibles muchas variaciones aparentes de la misma sin apartarse del alcance de la presente invención. Diversas modificaciones y variaciones de los métodos y sistemas descritos de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance de la invención. Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones preferidas específicas, se debe entender que la invención reivindicada no debe limitarse indebidamente a tales realizaciones específicas. De hecho, se pretende que las diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para los expertos en farmacología y biología molecular o campos relacionados estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

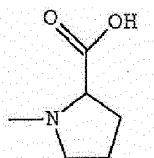
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que agota el componente P de amiloide del suero (SAP) de la circulación en un sujeto y un anticuerpo anti-SAP, en donde dicho anticuerpo se une a los residuos 140-159 de SAP humano como se expone en la figura 9 o se une a un epítipo sobre SAP humano que es el mismo epítipo que el epítipo unido a Abp1, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionados con el amiloide en un paciente, en donde el compuesto es una D-prolina de la Fórmula:



en donde

R es



y el grupo

R¹ es hidrógeno o halógeno;

X-Y-X' es un conector que tiene al menos 4, ventajosamente al menos 5, ventajosamente al menos 6, hasta 20 átomos de carbono de cadena lineal o recta, en donde

X es $-(CH_2)_n-$; $-CH(R^2)(CH_2)_n-$; $CH_2O(CH_2)_n-$; CH_2NH- ; bencilo, $-C(R^2)=CH-$; $-CH_2CH(OH)-$; o tiazol-2,5-diilo; O;

Y es -S-S-; $-(CH_2)_n$ -; -O-; -NH-; $-N(R^2)$ -; $-CH=CH-$; $-NHC(O)NH-$; $-N(R^2)C(O)N(R^2)-$; $-N[CH_2C_6H_3(OCH_3)_2]$ -; $-N(CH_2C_6H_5)-$; $-N(CH_2C_6H_5)C(O)N(CH_2C_6H_5)-$; $-N(\text{alcoialquil})-$; $N(\text{cicloalquil-metil})-$; 2,6-piridilo; 2,5-furanilo; 2,5-tienilo; 1,2-ciclohexilo; 1,3-ciclohexilo; 1,4-ciclohexilo; 1,2-naftilo; 1,4-naftilo; 1,5-naftilo; 1,6-naftilo; bifenileno; o 1,2-fenileno, 1,3-fenileno y 1,4-fenileno, en donde los grupos fenileno están opcionalmente sustituidos con 1-4 sustituyentes, seleccionados entre halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, hidroxilo, carboxi, -COO-alquilo inferior, nitrilo, 5-tetrazol, (ácido pirrolidin-1-il 2 carboxílico)-2-oxo-etoxi, N-hidroxycarbamimidilo, 5-oxo[1,2,4]-oxadiazolilo, 2-oxo[1,2,3,5]oxatiadiazolilo, 5-tioxo [1,2,4]oxadiazolilo y 5-terc-butilsulfanil-[1,2,4]oxadiazolilo;

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

R² es alquilo inferior, alcoxi inferior o bencilo y

n es 0-3,

o una sal o un mono- o di-éster farmacéuticamente aceptables del mismo.

2. El compuesto y anticuerpo anti-SAP según la reivindicación 1, para su uso según la reivindicación 1, en donde el compuesto es ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidino-2-carboxílico (CPHPC).

3. El compuesto y anticuerpo anti-SAP según la reivindicación 1, para su uso según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une a los residuos 140-159 de SAP humano como se expone en la figura 9 y se une igualmente a SAP humano desnaturalizado y nativo.

4. El compuesto y anticuerpo anti-SAP según cualquier reivindicación anterior, para su uso según cualquier reivindicación anterior, en donde dicho anticuerpo anti-SAP está humanizado.

5. El compuesto y anticuerpo anti-SAP según cualquier reivindicación anterior, para su uso según cualquier reivindicación anterior, en donde la administración del compuesto y el anticuerpo es secuencial, simultánea o simultánea separada.

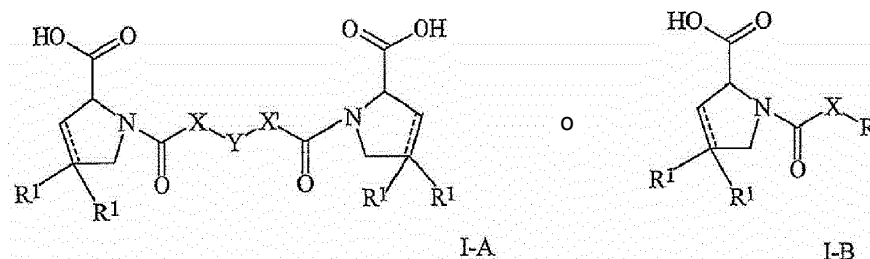
6. El compuesto y anticuerpo anti-SAP según cualquier reivindicación anterior, para su uso según cualquier reivindicación anterior, en donde dicha enfermedad o trastorno relacionados con el amiloide se seleccionan del grupo que consiste en cualquier forma de amiloidosis sistémica (visceral) o local, diabetes tipo 2 y enfermedad de Alzheimer.

5 7. Una composición que comprende:

(i) un compuesto que agota el componente P de amiloide del suero (SAP) de la circulación en un paciente que lo necesita; y

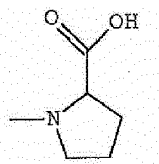
(ii) un anticuerpo humanizado como se expone en la reivindicación 4;

10 en donde el compuesto que agota el componente P de amiloide del suero (SAP) de la circulación en un paciente que lo necesita es una D-prolina de la Fórmula:



en donde

R es



15 y el grupo

R¹ es hidrógeno o halógeno;

X-Y-X' es un conector que tiene al menos 4, ventajosamente al menos 5, ventajosamente al menos 6, hasta 20 átomos de carbono de cadena lineal o recta, en donde

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

20 Y es -S-S-; -(CH₂)_n-; -O-; -NH-; -N(R²)-; -CH=CH-; -NHC(O)NH-; -N(R²)C(O)N(R²)-; -N[CH₂C₆H₃(OCH₃)₂]-; -N(CH₂C₆H₅)-; -N(CH₂C₆H₅)C(O)N(CH₂C₆H₅)-; -N(alcoxilalquil)-; N(cicloalquil-metil)-; 2,6-piridilo; 2,5-furanilo; 2,5-tienilo; 1,2-ciclohexilo; 1,3-ciclohexilo; 1,4-ciclohexilo; 1,2-naftilo; 1,4-naftilo; 1,5-naftilo; 1,6-naftilo; bifenileno; o 1,2-fenileno, 1,3-fenileno y 1,4-fenileno, en donde los grupos fenileno están opcionalmente sustituidos con 1-4 sustituyentes, seleccionados entre halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, hidroxilo, carboxi, -COO-alquilo inferior, nitrilo, 5-tetrazol, (ácido pirrolidin-1-il 2 carboxílico)-2-oxo-etoxi, N-hidroxycarbamimidodiilo, 5-oxo[1,2,4]-oxadiazolilo, 2-oxo[1,2,3,5]oxatiadiazolilo, 5-tioxo [1,2,4]oxadiazolilo y 5-terc-butilsulfanil-[1,2,4]oxadiazolilo;

25 X' es -(CH₂)_n-; -(CH₂)_nCH(R²)-; -(CH₂)_nOCH₂-; -NHCH₂-; bencilo, -CH=C(R²)-; CH(OH)CH₂; o tiazol-2,5-diilo; O;

R² es alquilo inferior, alcoxi inferior o bencilo y

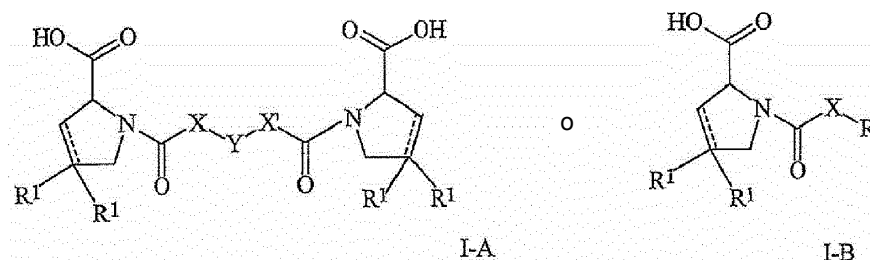
n es 0-3,

30 o una sal o un mono- o di-éster farmacéuticamente aceptables del mismo.

8. La composición según la reivindicación 7, en donde la composición incluye un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptables.

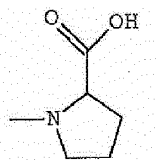
35 9. La composición según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde el compuesto que agota el componente P de amiloide del suero (SAP) de la circulación en un paciente que lo necesite es ácido (R)-1-[6-[(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidino-2-carboxílico (CPHPC).

10. Un anticuerpo anti-SAP, en donde dicho anticuerpo se une a SAP humano unido a amiloide in vivo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociados con amiloide en un paciente al que se le ha administrado previamente una D-prolina de la Fórmula:



5 en donde

R es



y el grupo

R¹ es hidrógeno o halógeno;

10 X-Y-X' es un conector que tiene de 4 a 20 átomos de carbono de cadena lineal o recta, en donde

X es $-(CH_2)_n-$; $-CH(R^2)(CH_2)_n-$; $CH_2O(CH_2)_n-$; CH_2NH- ; bencilo, $-C(R^2)=CH-$; $-CH_2CH(OH)-$; o tiazol-2,5-diilo;

Y es -S-S-; -(CH₂)_n-; -O-; -NH-; -N(R²)-; -CH=CH-; -NHC(O)NH-; -N(R²)C(O)N(R²)-; -N[CH₂C₆H₃(OCH₃)₂]-; -N(CH₂C₆H₅)-; -N(CH₂C₆H₅)C(O)N(CH₂C₆H₅)-; -N(alcoxilalquil)-; N(cicloalquil-metil)-; 2,6-piridilo; 2,5-furanilo; 2,5-tienilo; 1,2-ciclohexilo; 1,3-ciclohexilo; 1,4-ciclohexilo; 1,2-naftilo; 1,4-naftilo; 1,5-naftilo; 1,6-naftilo; bifenileno; o 1,2-fenileno, 1,3-fenileno y 1,4-fenileno, en donde los grupos fenileno están opcionalmente sustituidos con 1-4 sustituyentes, seleccionados entre halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, hidroxilo, carboxi, -COO-alquilo inferior, nitrilo, 5-tetrazol, (ácido pirrolidin-1-il 2 carboxílico)-2-oxo-etoxi, N-hidroxycarbamimidodiilo, 5-oxo[1,2,4]-oxadiazolilo, 2-oxo[1,2,3,5]oxatiadiazolilo, 5-tioxo [1,2,4]oxadiazolilo y 5-terc-butilsulfanil-[1,2,4]oxadiazolilo;

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

20 R² es alquilo inferior, alcoxi inferior o bencilo y

n es 0-3.

o una sal o un mono- o di-éster farmacéuticamente aceptables del mismo, que agota el componente P de amiloide del suero de la circulación, en donde el anticuerpo es un anticuerpo como se expone en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, o 4.

25 11. Un anticuerpo anti-SAP según la reivindicación 10, para su uso según la reivindicación 10, en donde dicha enfermedad o trastorno relacionados con el amiloide se seleccionan del grupo que consiste en cualquier forma de amiloidosis sistémica (visceral) o local, diabetes tipo 2 y enfermedad de Alzheimer.

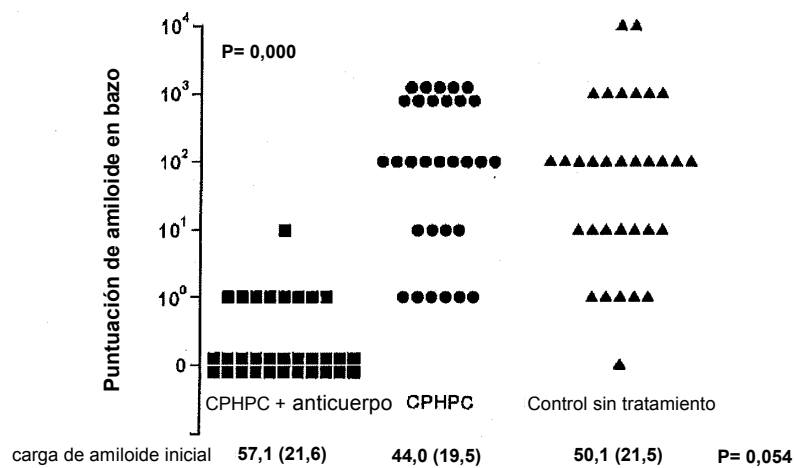


FIGURA 1

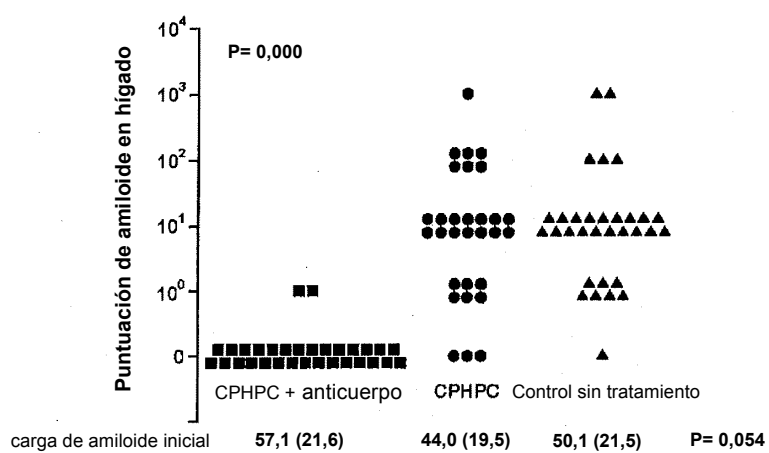


FIGURA 2



FIGURA 3A



FIGURA 3B



FIGURA 3C

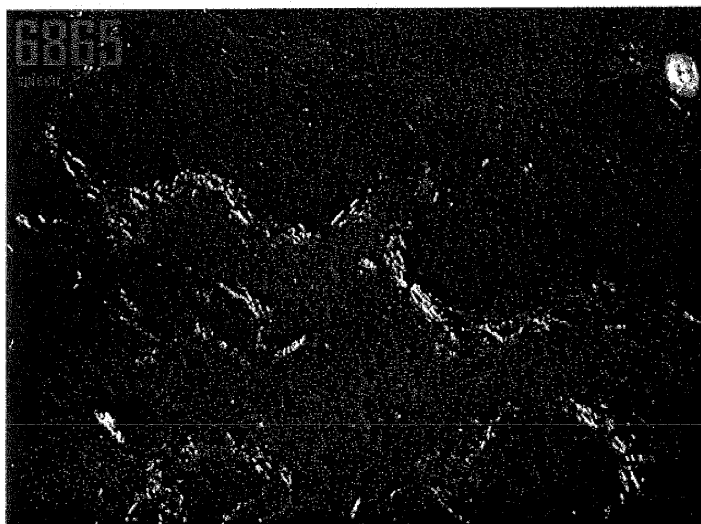


FIGURA 3D

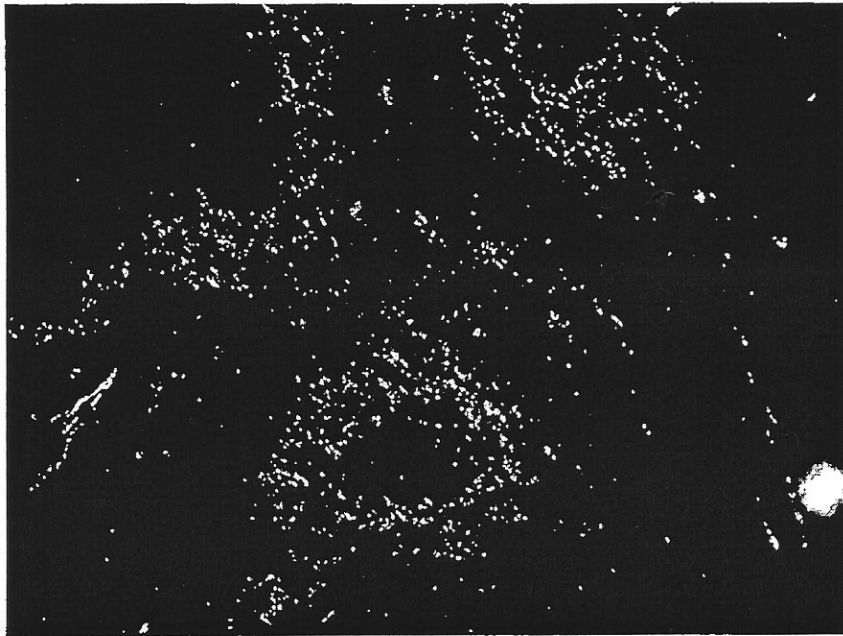


FIGURA 3E

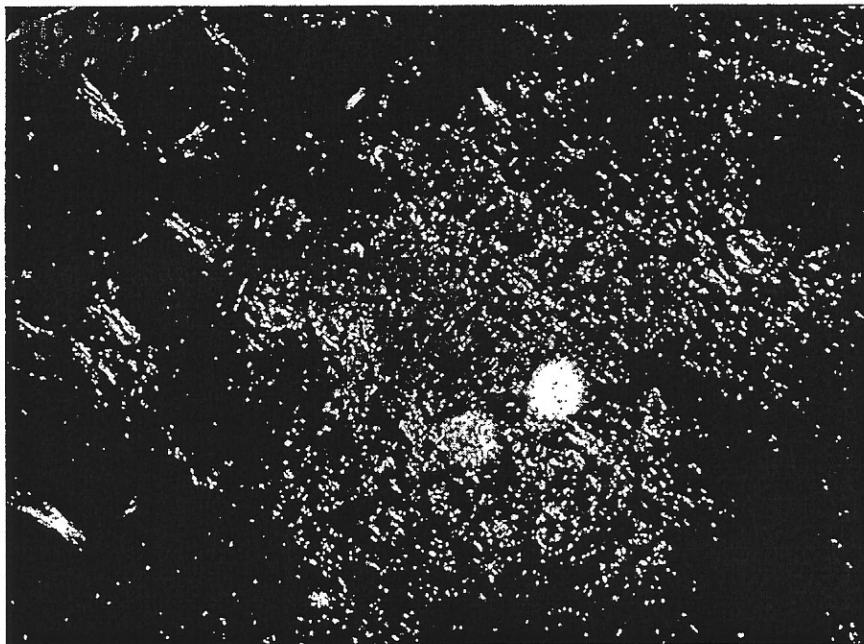


FIGURA 3F

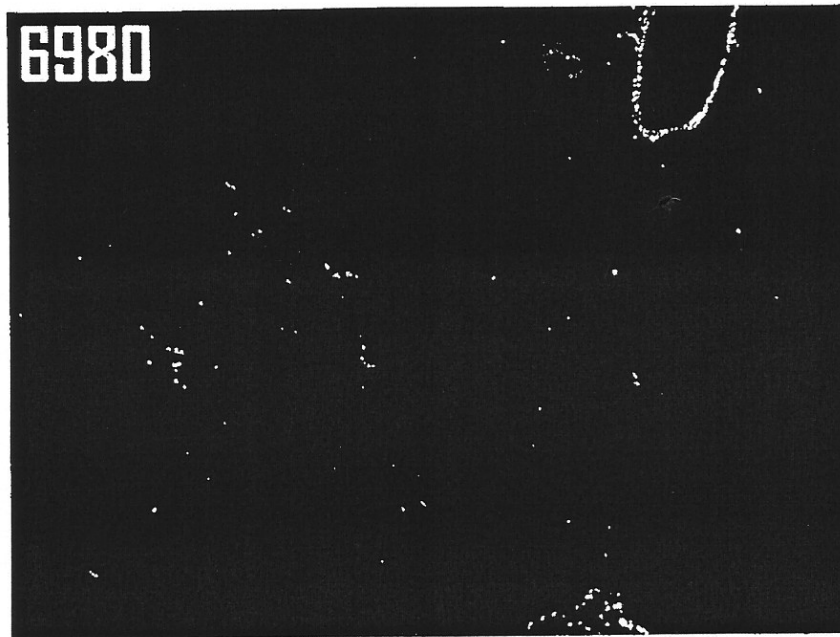


FIGURA 3G

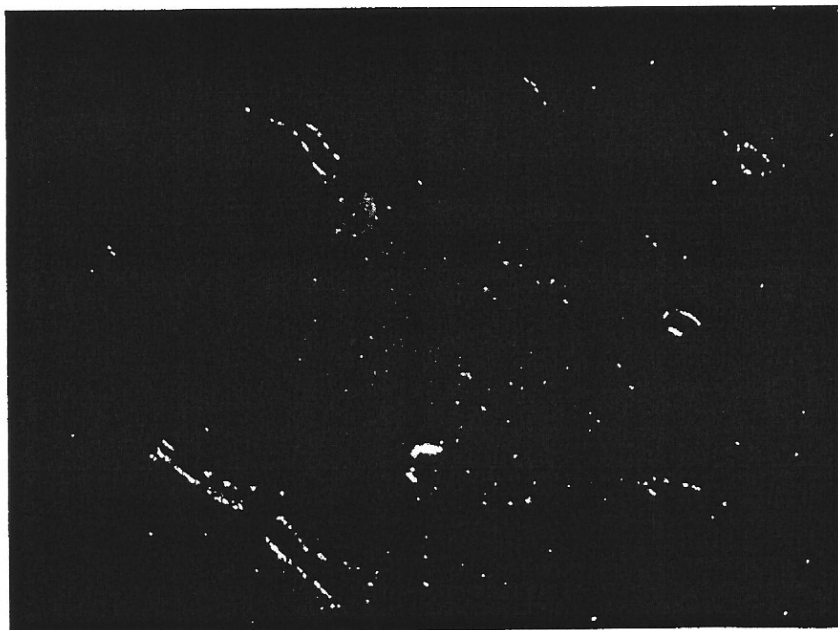


FIGURA 3I



FIGURA 3J

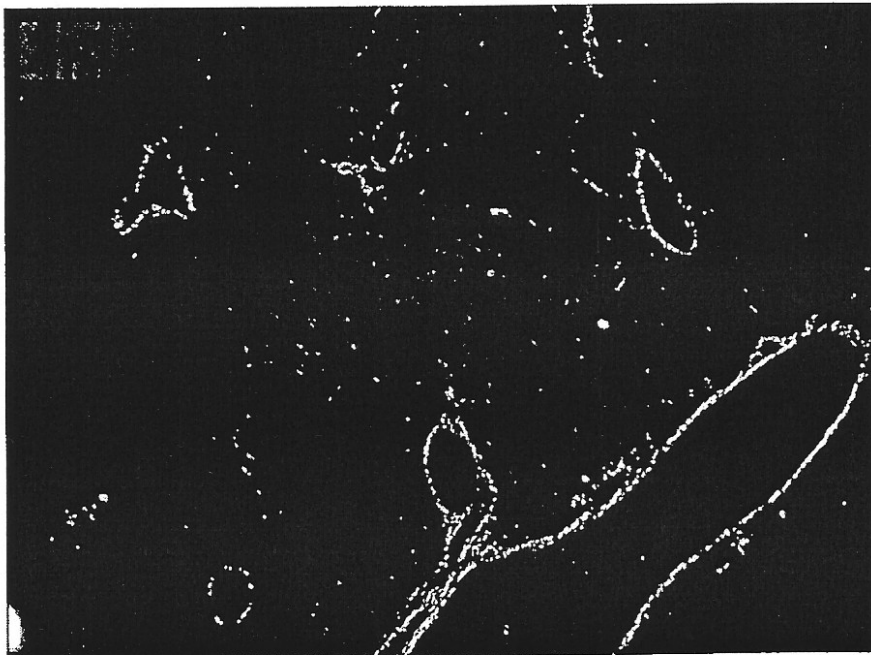


FIGURA 3K

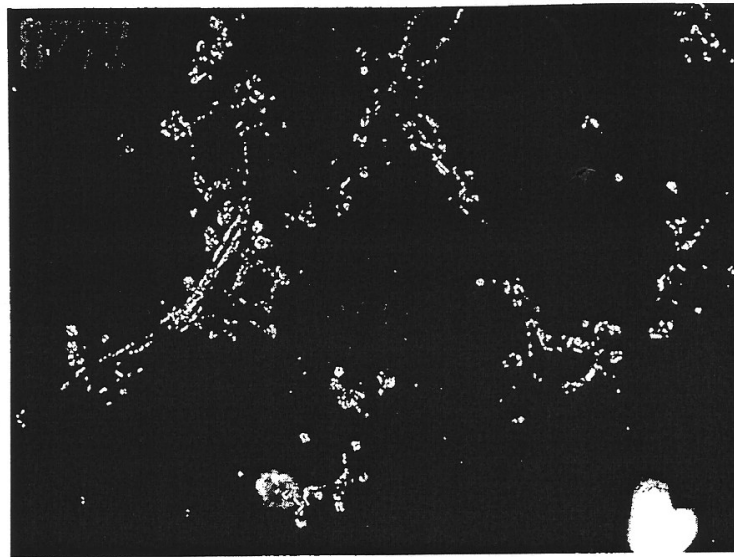


FIGURA 3L

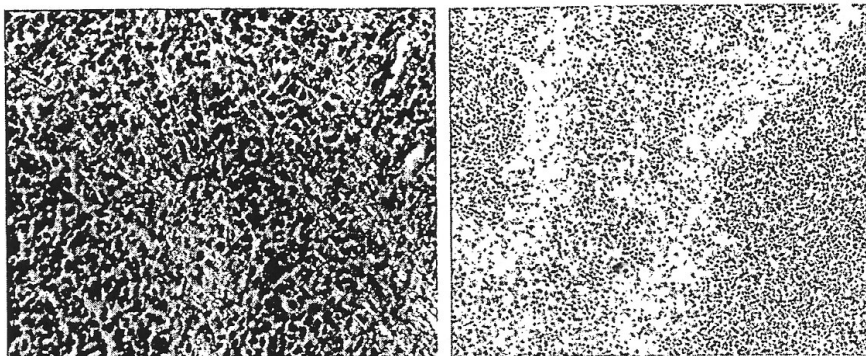


FIGURA 4A

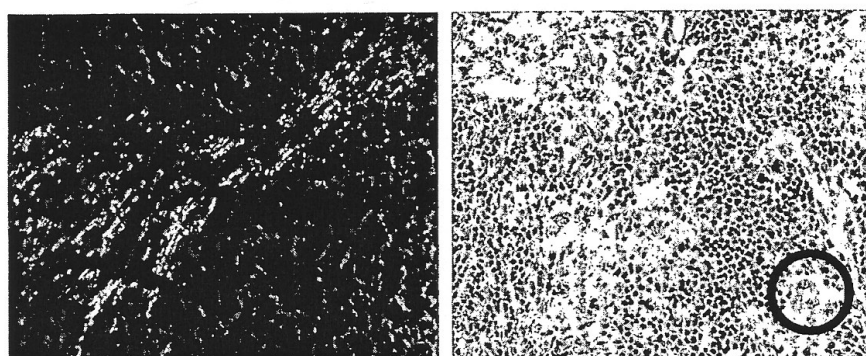


FIGURA 4B

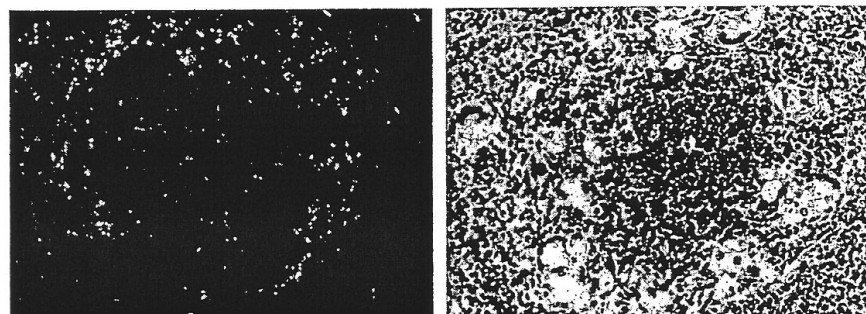


FIGURA 4C

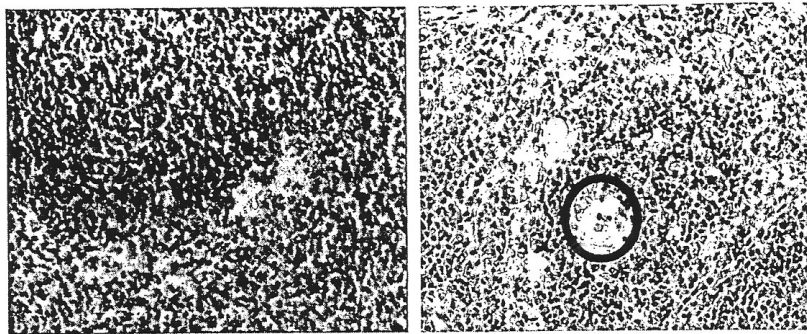


FIGURA 4D

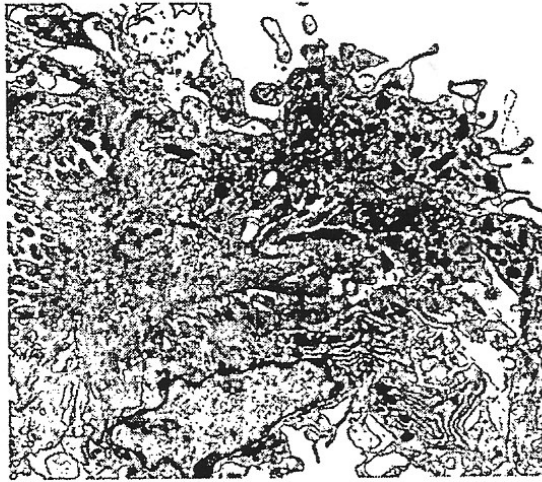


FIGURA 5A



FIGURA 5B



FIGURA 5C

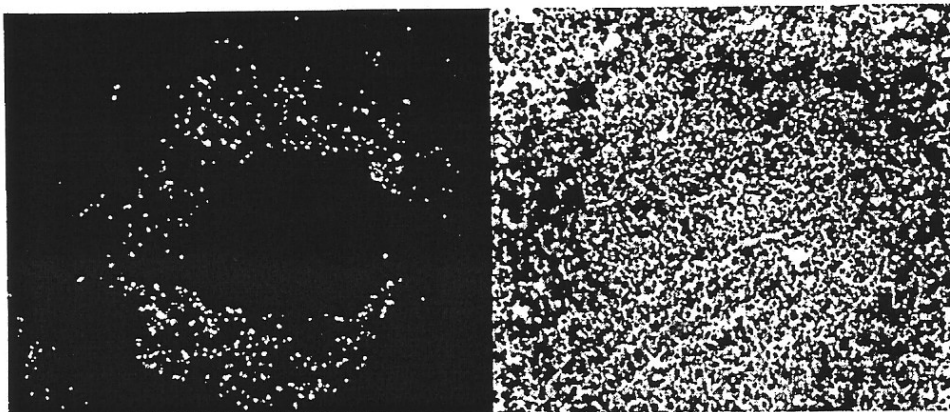


FIGURA 6A

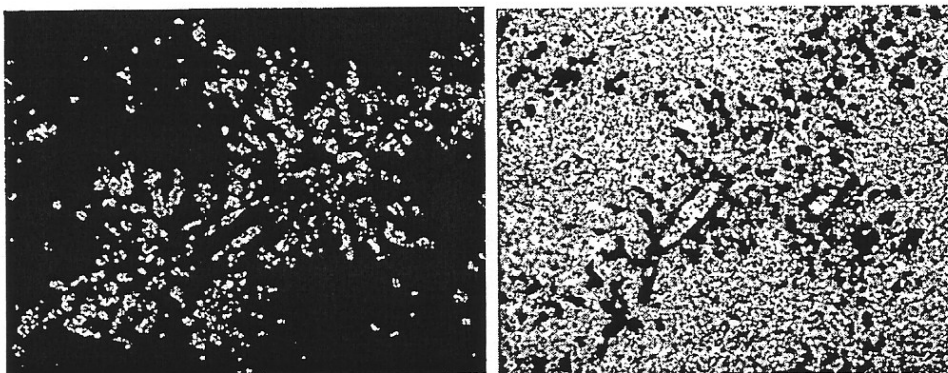


FIGURA 6B

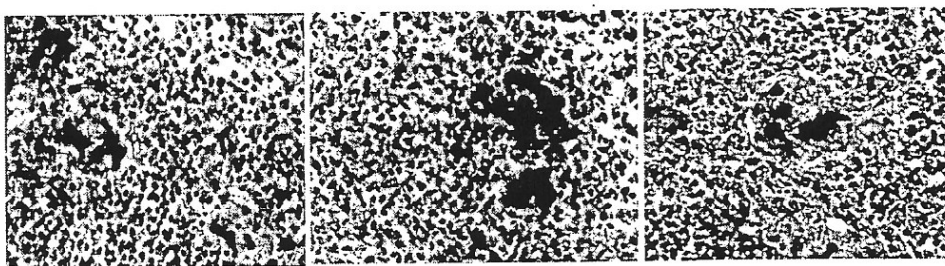


FIGURA 6C

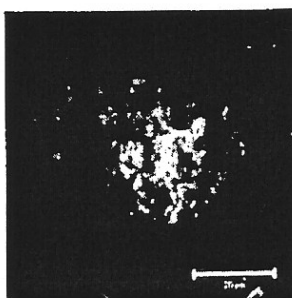


FIGURA 6D

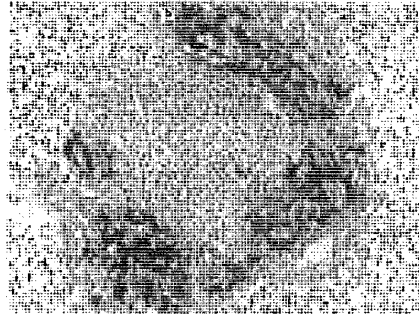


FIGURA 7

FIGURA 8

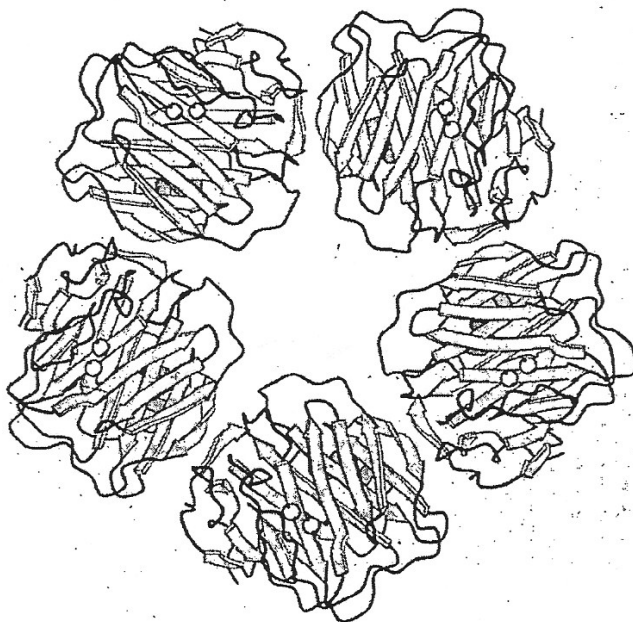
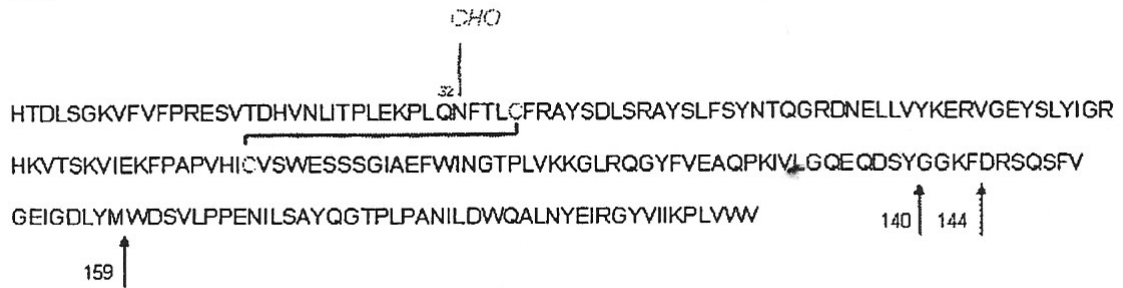
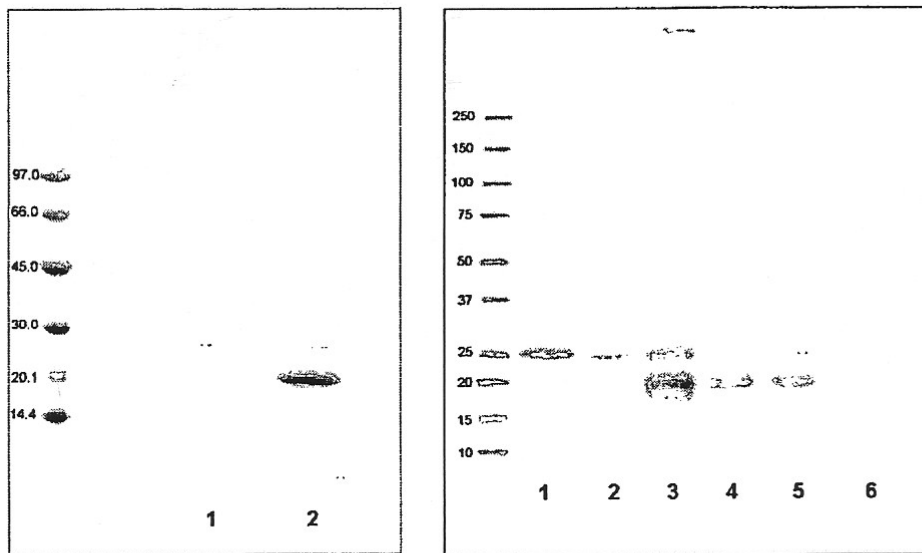


FIGURA 9

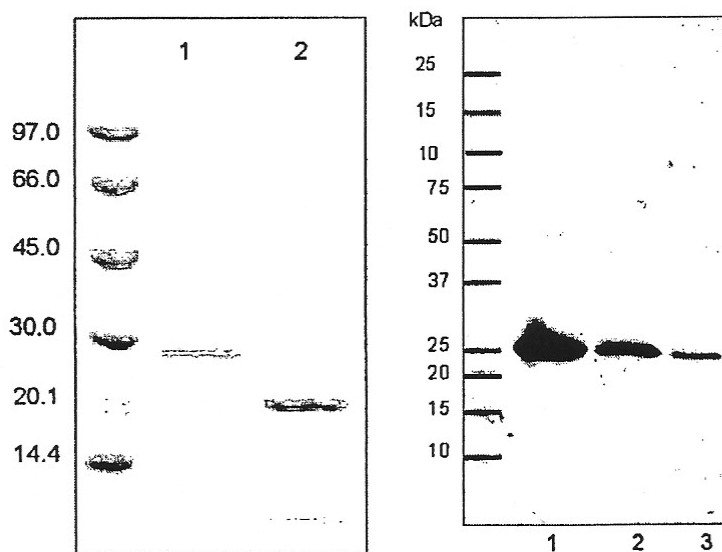
9A



9B



9C



9D

	136	140	147
h	EQDSYGGKFDRS		
m	EQDNYGGGFQRS		

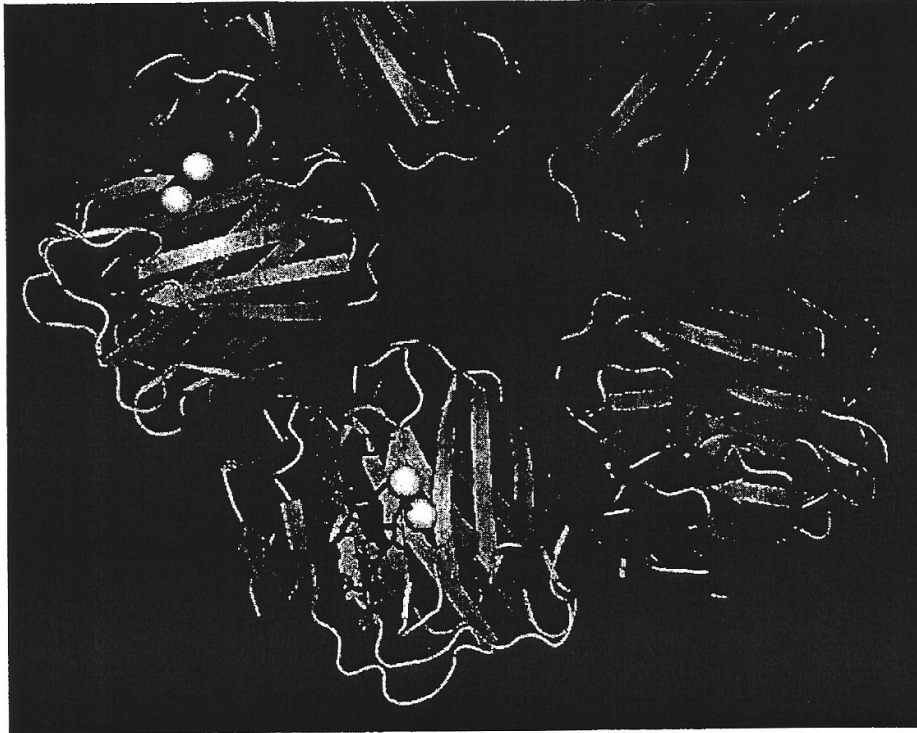


FIGURA 10

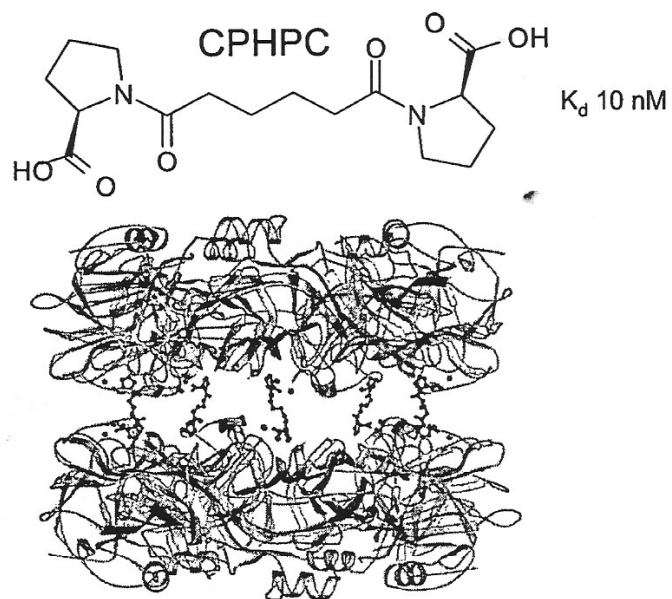


FIGURA 11

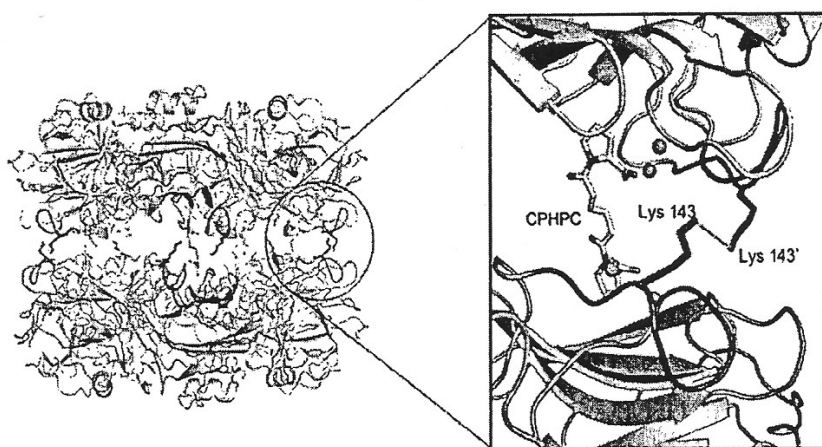


FIGURA 12

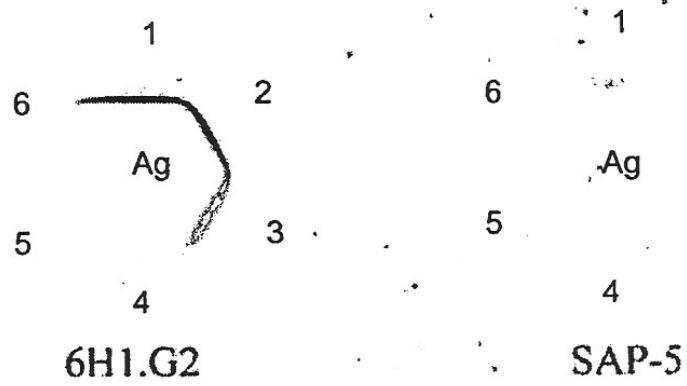


FIGURA 13

