



TM TAMAYO
ROYALTIES · PATENTS · TRADEMARKS



Industria
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA PROTECCION
División de Normas

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-130644-00000-0000

Fecha: 2013-05-28 16:11:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 111

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-039830-00015-0000

Fecha: 2013-05-28 16:11:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 111

SOLICITUD
DIVISIONAL DE
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. 10-039830

54. TITULO ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA LA FORMA DE
PROTOFIBRILLAS DE LA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE THE ROCKEFELLER UNIVERSITY

DOMICILIO New York, New, York, , ESTADO UNIDOS DE
AMERICA

74. APODERADO CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ

22. BOGOTA, D.C. 28 de mayo de 2013

1/111



TM TAMAYO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-130644-00000-0000

Fecha: 2013-05-28 16:11:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 111

Señor
JEFE DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-039830-00015-0000

Fecha: 2013-05-28 16:11:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 111

REF: EXPEDIENTE : 10-39830

SOLICITUD INTERNACIONAL: PCT/US2008/083033

ACTUACIÓN : PRESENTACIÓN VOLUNTARIA DE PATENTE DIVISIONAL

Estimados señores:

Damos alcance a la solicitud de patente de invención, radicada ante su despacho bajo el expediente citado en la referencia, con el fin informar que se ha decidido realizar presentación voluntaria de una **(01) solicitud DIVISIONAL de este caso.**

Lo anterior según lo establecido en el Artículo 36 de la Decisión 486 CAN., que a la letra dice:

“Artículo 36.- El solicitante podrá, en cualquier momento del trámite, dividir su solicitud en dos o más fraccionarias, pero ninguna de éstas podrá implicar una ampliación de la protección que corresponda a la divulgación contenida en la solicitud inicial.

(...)

“A efectos de la división de una solicitud, el solicitante consignará los documentos que fuesen necesarios para formar las solicitudes fraccionarias correspondientes.”

De igual forma, según lo establecido en la Resolución 173 de Enero 11 de 2013 expedida por la Superintendencia de Industria y Comercio, numeral 1.1.6 en donde manifiesta:

1.1.6. Conversión de solicitudes en trámite de Nuevas Creaciones
(...)

“En el caso de División, el peticionario cancelará la tasa correspondiente para cada una de las divisiones resultantes, conforme a las tasas vigentes al momento de la solicitud de la división.”

(...)

Por lo anterior se presenta dicha solicitud Divisional, para la cual se adjunta:

- Formulario único de División de Solicitudes.
- Recibo de pago para los servicios administrativos según la tasas vigentes



COLOMBIA:

Carrera 13-A No. 28-38 Bufete 230
Tel (571) 341 9841 / Fax (571) 243 5423
Parque Central Bavaria
Bogotá D.C. / Colombia / Sur América

USA:

COL 12010 TM Tamayo
10000 NW 25 Th St Unit 1 L
33172-2204
MIAMI / FL, U.S.A.

E-mail: consultas@tmtamayo.net
ip@tmtamayo.com

Web: www.tmtamayo.com



TM TAMAYO
ROYALTIES • PATENTS • TRADEMARKS

- Recibo de pago por Excedente en reivindicaciones
- Copia de Poderes
- Capitulo descriptivo
- Capitulo reivindicatorio
- Resumen

Por lo tanto, respetuosamente solicito se acepte esta División de patente y ordene lo pertinente para que el expediente en mención, siga su curso normal

Del señor Jefe,

CARLOS ORLANDO MAYA RODRÍGUEZ
No.17.117.818 expedida en Bogotá,
T.P No. 17.402 del C.S.J.



COLOMBIA:

Carrera 13-A No. 28-38 Bufete 230
Tel (571) 341 9841 / Fax (571) 243 5423
Parque Central Bavaria
Bogotá D.C. / Colombia / Sur América

USA:

COL 12010 TM Tamayo
10000 NW 25 Th St Unit 1 L
33172-2204
MIAMI / FL, U.S.A.

E-mail: consultas@tmtamayo.net
ip@tmtamayo.com

Web: www.tmtamayo.com



No. 13-130644- -00000-0000

Fecha: 2013-05-28 16:11:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 111

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-039830- -00015-0000

Fecha: 2013-05-28 16:11:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 111

**DIRECCIÓN DE NUEVAS CR
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN**

1. Identificación del Trámite

☐

Conversión

☒

División

☐

Fusión

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☐

Registro de Diseño Industrial

☐

Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐

Persona Jurídica ☒

THE ROCKEFELLER UNIVERSITY

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa

Micro ☐

Pequeña ☐

Mediana ☐

Otra ☒

Documento de identificación:

☐

C.C.

☐

C.E.

☐

NIT

☒

Otro

Número EMPRESA EXTRANJERA

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
USA	1230 York Avenue, New York, New York 10021-6399	New York
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☐

Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

MAYA RODRÍGUEZ CARLOS ORLANDO

Apellidos y Nombre

17.117.818

Documento de identificación

17.402- C.S.de la J.

Tarjeta profesional

Dirección y domicilio	Ciudad:	
CRA 13 A No. 28-38 Ofc. 2030 MZ 2	BOGOTÁ D.C.	
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
<u>consultas@tmtamayo.net</u>	2-435423	3-419841

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sirvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

4. Datos del trámite		
CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente _____ De: PATENTE DE INVENCION A: _____	Expediente _____ 10-39830 De: _____ A: _____	Expediente _____ De: _____ A: _____

5.	Comprobante de Pago No <u>13-0050692</u> Fecha <u>27-05-2013</u> Comprobante de Pago No <u>13-0050694</u> Fecha <u>27-05-2013</u> POR EXCEDENTE EN REIVINDICACIONES
-----------	---

6. Anexos
☐ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
☐ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
☐ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ	
Nombre y apellidos	Firma
17.117.818 -Bogotá-	No. 17.402 del C. S. de la J.
C.C	Tarjeta Profesional

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0050692

Bogotá D.C., Mayo 27 de 2013 - 12:05:22

RECIBIDO DE : TM TAMAYO Y ASOCIADOS NI 830.091.650

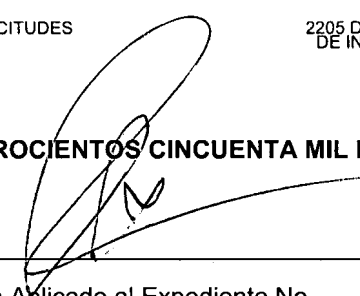
*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	409691951	27/05/2013	1.440.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERE	450.000.00	450.000.00
				\$450.000.00

SON: **CUATROCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-039830- -00015-0000

Fecha: 2013-05-28 16:11:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 111

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-130644- -00000-0000

Fecha: 2013-05-28 16:11:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 111

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 27 de 2013 - 12:05:23

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0050694

Bogotá D.C., Mayo 27 de 2013 - 12:05:22

RECIBIDO DE : TM TAMAYO Y ASOCIADOS NI 830.091.650

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	409691951	27/05/2013	1.440.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
11	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	330.000.00
				\$330.000.00

SON: **TRESCIENTOS TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-039830-00015-0000

Fecha: 2013-05-28 16:11:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 111

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-130644-00000-0000

Fecha: 2013-05-28 16:11:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 111

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 27 de 2013 - 12:05:23



Colombia 7

N 011996322

FOLIO 451.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA NUMERO DOSCIENTOS VEINTI-

SEIS.- En la Ciudad de Buenos Aires, Capital de la República Argentina, a dieciséis de marzo de dos mil diez, ante mi, Escribano Autorizante, **COMPARECE** don **Daniel GOYTIA**, argentino, mayor de edad, casado, Libreta de Enrolamiento número 4.526.965, domiciliado en Bartolomé Mitre 226, 4º piso, de esta Ciudad.- El compareciente es persona de mi conocimiento, doy fe, así como que **DICE**: I.- Que por escritura de fecha 21 de noviembre de 2008, pasada ante mí al folio 2.742 del Protocolo de este Registro, al que me remito, doy fe, se protocolizó un **Poder** otorgado por **THE ROCKEFELLER UNIVERSITY**, con domicilio en 1230 York Avenue, New York, NY 10021-6399, US, a su favor, el que transcripto en sus partes pertinentes **DICE**: "... El abajo firmante - (1) - **THE ROCKEFELLER UNIVERSITY** - domiciliado en - (2) - 1230 York Avenue, New York, NY 10021-6399, US - por el presente otorga a **DANIEL GOYTIA** domiciliado en Buenos Aires, Argentina, poder amplio y suficiente para recabar de las autoridades nacionales que corresponda, sean estas administrativas y/o judiciales, la obtención de "**Patentes, Marcas, Modelos, Diseños y sus renovaciones**" y realizar todos los trámites conducentes para proteger los derechos de la mandante, a cuyo efecto, los faculta para efectuar ante dichas autoridades nacionales, administrativas y/o judiciales todos los trámites necesarios a los objetos indicados; presentar solicitudes, alegatos, oposiciones, protestas, apelaciones y demandas; desistir, arreglar y transigir; aceptar cesiones y transferencias; solicitar testimonios; recibir documentos y otros valores; justificar explotaciones; cobrar y percibir; firmar instrumentos públicos, privados y escrituras públicas; para renunciar o no a las gestiones judiciales; y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades nacionales, judiciales y/o administrativas, sea como demandante o como demandado, para proteger los intereses del mandante, con facultad de substituir

LEGAL IZACION
100325 130201
25/03/2010 12:38:42

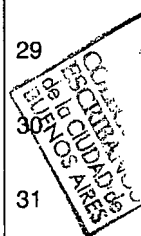


N 011996322

este instrumento y revocar tal substitución. Se deja constancia que las facultades enumeradas en este mandato, son meramente ejemplificativas y no limitativas de otras facultades implícitas, por cuyo motivo, los mandatarios quedan autorizados para ejercer sin restricción alguna todos los derechos que acuerde la ley que se relacionen y/o emerjan y/o que sean consecuencia del objeto del presente poder y ya sea ello en razón de la legislación vigente y/o de la legislación que en el futuro se promulgue. El presente documento entrará en vigencia a partir del 29 de septiembre de 2008 ... ".- LO TRANSCRIPTO ES COPIA FIEL, doy fe, de las partes pertinentes del mandato relacionado.- II.- Continúa diciendo el compareciente que viene por la presente a **SUSTITUIR** el citado mandato, reservándose para si las facultades, a favor de **"CARLOS TAMAYO & ASOCIADOS"** y/o **Carlos Orlando Maya Rodriguez y/o Luis Fernando Pinzon Galindo y/o Gustavo Calderon Rose-ro**, con domicilio en Carrera 13A N° 28-38, Buffette 245, Manzana 02, Parque Central Bavaria, Bogotá, **COLOMBIA**, para actuar exclusivamente en **COLOMBIA** con todas y cada una de las facultades enumeradas precedentemente.- LEIDA y ratificada, así lo expresó, otorgó, aceptó y firmó, por ante mi, doy fe.- **"SIGUE UNA FIRMA"**.- Esta mi sello.- Ante mi: **ALEJANDRO M. LIPORACE**.- CONCUERDA con su escritura matriz que pasó ante mi, al folio 451 del Protocolo del Registro 1331 a mi cargo.- PARA LOS APODERADOS expido esta **PRIMERA COPIA** en UNA FOJA de Actuación Notarial número N 011996322 que sello y firmo en el mismo lugar y fecha de su otorgamiento, doy fe.-

ALEJANDRO M. LIPORACE
MATRICULA 3837
ESCRIBANO PUBLICO

26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50





L 009372566

EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley orgánica vigente, LEGALIZA la firma y sello del escribano ALEJANDRO MARIA LIPORACE

obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el N° 100325130201/C La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.

Buenos Aires, Jueves 25 de Marzo de 2010



ESQ. ELENA VALENZUELA DE FAILLA
COLEGIO DE ESCRIBANOS
LEGALIZADORA



REPÚBLICA ARGENTINA
MINISTERIO *de*
RELACIONES EXTERIORES
COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

APOSTILLE
(Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

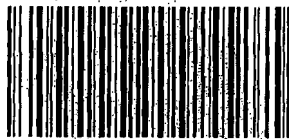
1. País ARGENTINA
El presente documento público
2. Ha sido firmado por ELENA I. VALENTINIS DE FAILLA
3. Quien actúa en calidad de FUNCIONARIO HABILITANTE
4. Lleva el sello/timbre de COLEGIO DE ESCRIBANOS DE CAPITAL FEDERAL
5. En BUENOS AIRES 6. El día 26/03/2010
7. Por UNIDAD DE COORDINACION LEGALIZACIONES
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO
INTERNACIONAL Y CULTO
8. Bajo el Número: 59830/2010
9. Sello/Timbre: 39

Dr. ROBERTO DANIEL PEREZ
Unidad de Coordinación Legalizaciones
Ministerio de Relaciones Exteriores
Comercio Internacional y Culto

10. Firma

Tipo de Documento: ACTUACION NOTARIAL
Titular del Documento: DANIEL GOYTIA

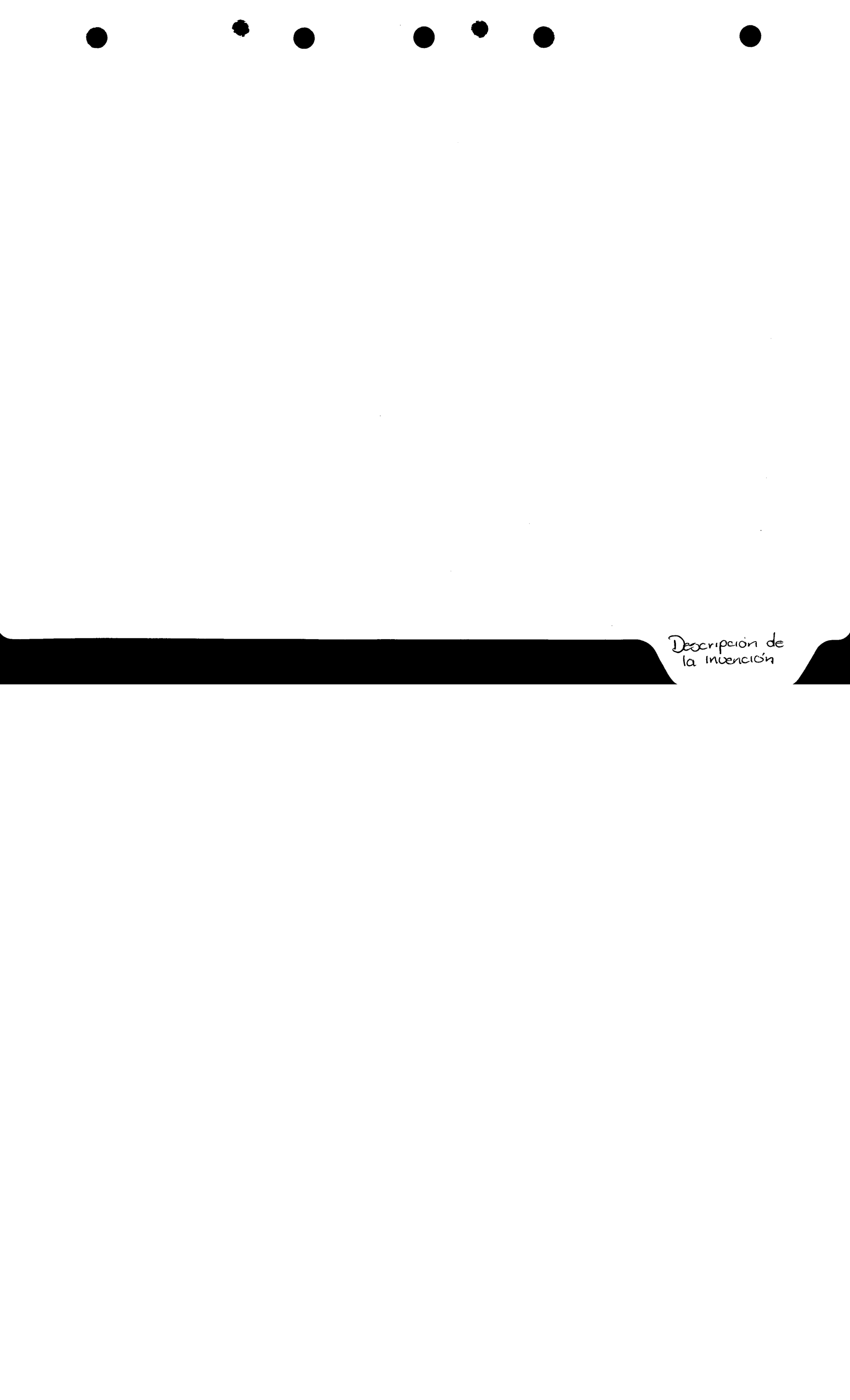
LA PRESENTE LEGALIZACION TIENE
COMO UNICO EFECTO AUTENTICAR
LA FIRMA Y CARACTER DEL OTORGANTE.
SIN JUZGAR EL CONTENIDO DEL DOCUMENTO



2010059830



B056C98364F6BE5DEB9E0E00899085CF



Descripción de
la invención

ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA LA FORMA DE PROTOFIBRILLAS DE LA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE

Referencia Cruzada a Solicitudes de Patentes Relacionadas

Esta solicitud de patente reivindica prioridad de las solicitudes provisionales de patentes: 60/988.481 presentada el 16 de noviembre de 2007; y 61/019.747 presentada el 8 de enero de 2008, cuyo contenido se incorpora como referencia.

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con anticuerpos aislados que interactúan específicamente con epítopes conformacionales de una forma de protofibrilla de péptido beta-amiloide humano. Estos anticuerpos presentan mínima o ninguna afinidad detectable hacia formas de peso molecular más bajo de péptido beta-amiloide. Los anticuerpos revelados en la presente serán útiles en el diagnóstico, tratamiento y/o prevención de la deposición de placas beta-amiloides asociadas al inicio y avance de la enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes de la invención

Se cree que los péptidos beta-amiloides ($A\beta$) son un agente causales de la enfermedad de Alzheimer ("AD") a través de la formación de fibrillas de péptidos $A\beta$ insolubles y la deposición de estas fibrillas para formar placas amiloides. La formación de dichas placas dentro del área del cerebro crítica para la memoria y otras funciones cognitivas se cree que deriva en la demencia asociada a esta enfermedad (véase Selkoe, 1994, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53:438-447). Los péptidos beta-amiloides comprenden un grupo péptidos de 39-43 aminoácidos de longitud que se procesan en forma proteolítica desde la proteína precursora amiloide (APP), tanto por β -secretasa como γ -secretasa en los extremos de amino y carboxilo, respectivamente. Existen por lo menos cinco isoformas distinguibles de APP: de 563, 695, 714, 751, y 770 aminoácidos de longitud, respectivamente (véase Wirak et al., 1991 *Science* 253:323). Estas isoformas de APP se generan mediante el empalme alternativo de transcripciones primarias del gen de APP. Se han identificado numerosas mutaciones de cambio de sentido en APP en familias con enfermedad de Alzheimer de inicio precoz dominante autosómica. Algunas mutaciones se agrupan cerca de los sitios de descomposición de secretasa y afectan el metabolismo de APP aumentando la producción o la proporción de formas de $A\beta$ (por ejemplo, $A\beta_{42}$), que tiende a ser más fibrillogénica y a agregarse más rápido

que otras formas. La toxicidad neuronal puede residir en las fibrillas de alto peso molecular que se forman a través del agregado de péptidos A β solubles en las fibrillas insolubles y, posteriormente, la incorporación de fibrillas en placas amiloides. Una forma de fibrilla intermedia es la forma de protofibrilla (PF), una forma oligomérica de alto peso molecular de péptidos A β que es soluble in Vitro y se puede aislar como una entidad de aproximadamente 670 kDa. Por lo tanto, la formación in Vitro de fibrillas de péptidos A β insolubles es el resultado final de la oligomerización inicial de péptido A β para formar una forma de protofibrilla de peso molecular más alto soluble, estructuralmente distinguible. Estas estructuras de protofibrillas transitorias son precursores de las fibras amiloides responsables de la disfunción celular y la pérdida neuronal en la enfermedad de Alzheimer (AD) y otras enfermedades de agregado de proteína.

Se han promovido diferentes tratamientos en intentos de prevenir la formación del péptido A β , por ejemplo, inhibidores para prevenir el procesamiento proteolítico de APP. Además, se han reclutado estrategias de inmunoterapia tales como la administración de anticuerpos anti-A β (para inducir el aclaramiento de depósitos de amiloide) o la inmunización con antígenos de péptido A β (para promover una respuesta humoral)

en un intento de reducir el tamaño y la densidad de las placas.

La Patente Estadounidense N° 7.179.463, concedida a Lannfelt et al revela un método para tratar la enfermedad de Alzheimer administrando un anticuerpo creado contra una protofibrilla que comprende la mutación Arctic dentro de la región de codificación del péptido A β . No se presenta ningún ejemplo de anticuerpos creados en la memoria descriptiva ni se presenta ninguna comparación en cuanto a la afinidad para formas de bajo peso molecular de péptido A β .

Las Patentes Estadounidenses N° 6.761.888 y 6.750.324, concedidas a Schenk et al, revelan una serie de anticuerpos que reconocen diferentes epítopes a lo largo de la secuencia de aminoácidos de A β_{42} . Anticuerpos específicos para el extremo de N y regiones del medio de A β_{42} presentaron eficacia en la reducción de las placas tanto ex vivo como in vivo.

A pesar de los conocimientos actuales en el campo del tratamiento y la prevención de la enfermedad de Alzheimer, aún subsiste la necesidad de composiciones y métodos mejorados para tratar y/o prevenir esta enfermedad. Las composiciones y los métodos de la presente invención enfrentan y satisfacen

estas necesidades revelando anticuerpos específicos para formas protofibrilares del péptido A β mientras que presentan afinidad detectable contra formas de bajo peso molecular del péptido A β . Las composiciones farmacéuticamente eficaces que comprenden tal anticuerpo o anticuerpos serán útiles en el tratamiento y/o la prevención de la deposición de placas beta-amiloides que se sabe que están asociadas al inicio y el avance de la enfermedad de Alzheimer.

Resumen de la invención

La presente invención se relaciona con un anticuerpo aislado que presenta unión específica a un epítipo conformacional de una forma de protofibrilla de péptido β -amiloide. El monómero del péptido beta-amiloide (A β) de tipo silvestre es conocido en el arte y se muestra en la presente como SEQ ID NO 1. Los anticuerpos aislados de la presente invención tienen afinidad para tal epítipo conformacional repetido para la forma de protofibrilla de mayor peso molecular del péptido A β mientras que presentan mínima o ninguna afinidad para otras formas de péptido A β , tales como formas monoméricas o diméricas del péptido A β .

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo aislado que interactúa específicamente y presenta una afinidad medible a un epítoto conformacional de la forma de protofibrilla de péptido A β , por lo cual el epítoto de protofibrilla está representado por una región expuesta de una forma de protofibrilla de A β que comprende la parte de extremo de amino de una parte expuesta del péptido A β .

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo aislado que interactúa específicamente y presenta una afinidad medible a un epítoto conformacional de una forma de protofibrilla del péptido A β , por lo cual el epítoto de protofibrilla está representado por una región expuesta de una forma de protofibrilla de A β que comprende los aminoácidos 1-20 (SEQ ID NO 2) de una parte expuesta del péptido A β .

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo aislado que interactúa específicamente y presenta una afinidad medible a un epítoto conformacional de una forma de protofibrilla de péptido A β , por lo cual el epítoto de protofibrilla está representado por una región expuesta de una forma de protofibrilla de A β que comprende los aminoácidos 4-12 y 9-20 (SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4, respectivamente) de una parte expuesta del péptido A β .

La presente invención se relaciona en parte con los anticuerpos monoclonales 13C3, 1D1 y 19A6, y todas las formas maduras de afinidad de 13C3, 1D1 y 19A6. La presente invención además se relaciona con un anticuerpo que imita la especificidad funcional descrita en la presente para 13C3, 1D1 y 19A6. Con este fin, la presente invención también se relaciona con fragmentos biológicamente activos y/o mutantes de 13C3, 1D1, 19A6 o un anticuerpo similar a 13C3, 1D1, o 19A6, que incluyen en forma no taxativa sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, como una forma dirigida de maduración de afinidad de las regiones V_H o V_L), eliminaciones, agregados, truncaduras del extremo de carboxi de manera tal que estas mutaciones proporcionan una base para un anticuerpo o una parte de unión al anticuerpo que deriva en una versión similar o mejorada de una parte de unión al anticuerpo similar a 13C3, 1D1, 19A6 o 13C3. En una realización de esta parte de la invención, la región V_H y V_L de 13C3 comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO 7 (V_H) y/o SEQ ID NO 5 (V_L), respectivamente.

La presente invención además se relaciona con una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótido que codifica las regiones V_H y/o V_L de un anticuerpo 13C3, 1D1 o 19A6; y especialmente una molécula de ácido nucleico (polinucleótido) que codifica una parte

biológicamente relevante de 13C3, o la versión madurada de afinidad o una versión mutada de otro modo del anticuerpo 13C3, 1D1 o 19A6. Con este fin, una realización de la presente invención se relaciona con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido que codifica la región V_H y V_L de 13C, como se expone en SEQ ID NO 8 (13C3: región de V_H) y SEQ ID NO 6 (13C3: región de V_L), respectivamente.

La presente invención también se relaciona con anticuerpos aislados 13C3, 1D1 o 19A6 que se revelan en la presente, anticuerpos que interactúan específicamente y presentan una afinidad medible con un epítopo conformacional de una forma de protofibrilla del péptido A β .

La presente invención también se relaciona con un hibridoma capaz de producir un anticuerpo monoclonal de la presente invención. Los hibridomas particulares de la presente invención incluyen hibridomas que producen anticuerpos monoclonales ejemplificados 13C3, 19A6 y 1D1, respectivamente.

La presente invención se relaciona con composiciones farmacéuticamente eficaces que comprenden un anticuerpo aislado que se revela y además se define en la presente: un anticuerpo aislado que interactúa específicamente y presenta una afinidad medida y capacidad de unirse específicamente a un

epítope conformacional repetido de una forma de protofibrilla de A β mientras que presenta afinidad mínima o medible con formas de bajo peso molecular de A β . Estas composiciones pueden comprender opcionalmente uno o más portadores, uno o más excipientes, y/o uno o más derivados químicos.

La presente invención también se relaciona con métodos para tratar a un individuo afectado con la enfermedad de Alzheimer que comprende administrar al individuo una composición farmacéuticamente eficaz que comprende un anticuerpo aislado revelado en la presente, a saber un anticuerpo que interactúa específicamente y presenta una afinidad medida con un anticuerpo conformacional repetido de una forma de protofibrilla del péptido A β mientras que presenta mínima o ninguna afinidad detectable hacia formas de peso molecular más bajo de péptido A β . Estos métodos proporcionan una intervención terapéutica de manera tal que reduzca la cantidad de depósitos de amiloide en el cerebro de un individuo afectado con la enfermedad de Alzheimer. Las realizaciones particulares de esta parte de la presente invención se relacionan con métodos para tratar a un individuo afectado con la enfermedad de Alzheimer que comprende administrar una composición farmacéuticamente eficaz formulada con un anticuerpo que presenta afinidad específica (por lo menos comparada con las

formas de peso molecular bajo de péptidos A β) a un epítoto conformacional de una forma de protofibrilla de péptido A β , especialmente por lo cual el epítoto de protofibrilla está representado por una región expuesta de una forma de protofibrilla de A β que comprende los aminoácidos 1-20 (SEQ ID NO 2) de una parte expuesta del péptido A β . Las realizaciones específicas que se relacionan con estos métodos terapéuticos y profilácticos revelados en la presente pueden utilizar anticuerpos monoclonales de ratón ejemplificados 13C3, 19A6, 1D1, así como versiones maduradas de afinidad de de cualquiera de tales anticuerpos, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo monoclonal humano, y/o cualquier otra de tales formas de anticuerpos conocidas en el arte, que incluyen en forma no taxativa el anticuerpo o los miembros de unión específica revisados en la presente. Cualquiera de tales anticuerpos o miembros de unión específica se puede denominar dentro de esta memoria descriptiva "anticuerpo similar a 13C3". Por lo tanto, un "anticuerpo similar a 13C3" se entiende que comprende el anticuerpo monoclonal 13C3 revelado en la presente.

La presente invención también se relaciona con métodos para detectar y seleccionar componentes que pueden actuar como un inhibidor de la formación de fibrillas y/o placas seniles

asociadas a la enfermedad de Alzheimer. Dicha metodología comprende utilizar un anticuerpo con características similares a 13C3 (por ejemplo, afinidad específica a las formas de PF contra LMW del péptido A β) en diferentes ensayos de interacción de anticuerpo/péptido/compuesto puro para seleccionar un compuesto que modula el proceso de la formación de fibrillas y/o placas.

La presente invención además se relaciona con métodos de ensayo de diagnóstico para determinar en forma específica los niveles de protofibrillas dentro de un sujeto o paciente. Dichos ensayos se pueden realizar mediante cualquier técnica conocida y a disposición del experto en el arte, que incluye en forma no taxativa Western blot, ELISA, radioinmunoensayos, ensayos inmunohistoquímicos, inmunoprecipitaciones, u otros ensayos inmunoquímicos conocidos en el arte. Por lo tanto, una realización de esta parte de la invención se relaciona con la toma de una muestra de tejido de un sujeto o paciente y la determinación del nivel de PF de A β en la muestra usando un estuche de diagnóstico y un ensayo asociado; por lo cual el estuche comprende un anticuerpo similar a 13C3, que por lo tanto permite la determinación específica de los niveles de PF de A β en la muestra de tejido. La muestra de tejido para el

análisis generalmente es sangre, plasma, suero, mucosidad o fluido cerebral espinal del sujeto o paciente.

Con este fin, los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar para al menos los siguientes usos: (1) como un agente profiláctico o terapéutico para prevenir o reducir los depósitos de placas asociados a la enfermedad de Alzheimer, solo o en conjunto con cualquier terapia de combinación existente; (2) en el diseño de inmunogenes de péptidos que se pueden usar para producir una respuesta de anticuerpo eficaz en estrategias de vacunación profiláctica o terapéutica relacionadas con el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer; (3) generar un anticuerpo antiidiotípico profiláctico o terapéutico (Ab2) que imita el epítotope(s) críptico que se une a los anticuerpos de la presente invención; y (4) en el diseño de péptidos derivados de las regiones de determinación complementarias (CDR) de los anticuerpos neutralizadores de la presente invención para su uso en la detección de inhibidores de la formación de protofibrillas para su uso en regímenes profilácticos y/o terapéuticos y (4) como un reactivo de diagnóstico para determinar el nivel de A β protofibrilar en suero o CSF de un paciente en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

También es un objetivo de la presente invención proporcionar anticuerpos que interactúan específicamente y presentan afinidad a un epítipo conformacional expuesto de una forma de protofibrilla de péptido A β que comprende los aminoácidos 1-20 (SEQ ID NO 2) de una parte expuesta del péptido A β .

Otro objeto de la presente invención es proporcionar anticuerpos que interactúan y presentan un epítipo conformacional expuesto de una forma de protofibrilla de péptido A β que comprende los aminoácidos 4-12 y 9-20 (SEQ ID NO 3, 4) de una parte expuesta del péptido A β .

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar anticuerpos similares a 13C3 que previenen o reducen la formación de protofibrillas de péptido A β vinculada a la deposición de placas asociadas a la enfermedad de Alzheimer.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar ensayos que utilizan anticuerpos similares a 13C3 en ensayos de interacción de anticuerpo/péptido/compuesto de ensayo para seleccionar compuestos que son útiles en el tratamiento de la deposición de placas asociadas a la enfermedad de Alzheimer.

Como se utiliza en la presente, "ka" se refiere a la constante de asociación de una interacción de anticuerpo y antígeno particular, "Kd" se refiere a la constante de disociación de una interacción anticuerpo y antígeno particular.

Como se utiliza en la presente, el término "epítotope" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno al cual responden las células B y/o T o un sitio en una molécula contra la cual se producirá un anticuerpo y/o a la cual se unirá un anticuerpo. Por ejemplo, un epítotope puede ser reconocido por un anticuerpo que define el epítotope. Un epítotope puede ser un "epítotope lineal" (donde una secuencia de aminoácido primario comprende el epítotope; generalmente por lo menos 3 residuos de aminoácidos contiguos, y más habitualmente, por lo menos 5, y hasta 8 a 10 aminoácidos en una secuencia única) o un "epítotope conformacional" (un epítotope en donde la secuencia de aminoácido contigua primaria no es la única que define el componente del epítotope). Un epítotope conformacional puede comprender una cantidad aumentada de aminoácidos en relación con un epítotope lineal, ya que este epítotope conformacional reconoce una estructura tridimensional del péptido o de la proteína. Por ejemplo, cuando una molécula de proteína se dobla para formar una estructura tridimensional, ciertos aminoácidos y/o la cadena principal del polipéptido que forma el epítotope conformacional se

yuxtapone permitiendo que el anticuerpo reconozca el epítope. Los métodos para determinar la conformación de epítopes incluyen en forma no taxativa, por ejemplo, cristalografía de rayos X, espectroscopio de resonancia nuclear magnética bidimensional y marcado con rotación dirigido al sitio y espectroscopio de resonancia paramagnética electrónica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996), cuya invención se incorpora en su totalidad como referencia.

Como se utiliza en la presente, "unión específica" entre dos entidades significa una afinidad de por lo menos 10^6 M^{-1} , 10^7 M^{-1} , 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , o 10^{10} M^{-1} .

Como se utiliza en la presente, "protofibrillas" son agregados protofibrilares que incluyen estructuras esféricas que comprenden péptidos A β que parecen representar cuerdas de las estructuras esféricas que forman las estructuras curvilíneas.

Como se utiliza en la presente, el término "aislado" se utiliza en la presente como se utiliza dentro del arte. Es decir, el estado en el cual se encuentran los anticuerpos / miembros de unión específica, moléculas de ácido nucleico y similares. Los anticuerpos/miembros de unión específica y moléculas de ácido nucleico están libres o sustancialmente

libres de material con el cual están asociados naturalmente tal como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los cuales se hallan en el medio natural, o el medio en el cual se preparan (por ejemplo, cultivo celular) cuando dicha preparación es mediante tecnología de ADN recombinante (paracticada in vitro) o in vivo. "Aislado" comprende todas las formas que contienen el componente(s) identificado y caracterizado de la presente invención después de la remoción desde ese medio inicial. Ejemplos, ciertamente no taxativos, incluyen formulaciones farmacéuticas, formulaciones con diluyentes, anticuerpos/miembros de unión específica, moléculas de ácido nucleico y partes de ellas que se han modificado (por ejemplo, glicosilación de anticuerpo) in Vitro o in vivo y removido de ese medio.

Como se utiliza en la presente, el término "anticuerpo human recombinante" representa un subgrupo viable de "anticuerpos" generados por diferentes medios de tecnología de ADN recombinante y transgénicos no humanos que son conocidos en el arte. Dicha metodología se utiliza para generar un anticuerpo de uno o más de los siguientes orígenes: (i) un scFv o un anticuerpo similar aislado de una biblioteca combinatoria de anticuerpos humanos, (ii) un anticuerpo parcial o completo generado a partir de un vector de expresión respectivo tranfectado en forma estable o transitoria en una célula

huésped, preferentemente una célula huésped de mamífero (por ejemplo, subclonando secuencias de nucleótidos que codifican cadenas de VH y VL en un vector de expresión en conjunto con secuencias de nucleótidos CN y CL respectivas, de manera tal que promuevan la expresión de una forma predeterminada de anticuerpo que presenta especificidad de la forma de PF de A β ; y/o (iii) un anticuerpo aislado de un animal transgénico no humano que contiene genes de inmunoglobulina humana, o mediante cualquier otra metodología conocida que se basa en la "mezcla e emparejado" recombinante de secuencias de genes de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN para generar el anticuerpo recombinante humano de interés.

Se entiende que los términos "sujeto" o "paciente" incluyen todos miembros del Filum Cordata, que incluyen, en forma no taxativa, humanos y otros primates, que incluyen primates no humanos tales como chimpancés y otras especies de simios y monos; animales de granja tales como vacas, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio que incluyen roedores tales como ratones, ratas y conejillos Indias; aves, que incluyen, aves domésticas, silvestres y de caza tales como pollos, pavos y otras aves gallináceas, patos, gansos y similares.

El término "tratar" o "tratamiento" de una enfermedad se refiere a ejecutar un protocolo, que puede incluir administrar uno o más fármacos a un sujeto (humano u otro), en un esfuerzo para aliviar signos o síntomas de la enfermedad. El alivio puede ocurrir antes de que aparezcan los signos o síntomas de la enfermedad, así como después de su aparición. Por lo tanto, "tratar" o "tratamiento" incluye "prevenir" o "prevención" de la enfermedad. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, "prevenir" o "prevención" también puede ocurrir en una situación en la cual se avanza en un curso de tratamiento para prevenir o detener el inicio de los síntomas asociados a la enfermedad de Alzheimer. Además, "tratar" o "tratamiento" no requiere el alivio completo de signos o síntomas, no requiere una cura y específicamente incluye protocolos que tienen un efecto positivo solamente marginal sobre el sujeto.

Como se utiliza en la presente, el término "ingrediente activo" se refiere a un anticuerpo similar a 13C3 que presenta afinidad y especificidad (por ejemplo, unión específica) a la parte del extremo de amino de la estructura de la protofibrilla de beta-amiloide.

Como se usan en la presente, los términos "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo, como se provee en la presente, se refiere a una cantidad no tóxica

pero suficiente del ingrediente activo para proporcionar el resultado biológico deseado. Una cantidad "eficaz" apropiada en cualquier caso individual puede ser determinada por un experto en el arte usando experimentación de rutina.

Como se usa en la presente, los términos "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" significan que un material se puede administrar a un individuo en un dispositivo de suministro de fármaco junto con el agente biológico formulado sin provocar ningún efecto biológico indeseable o interactuar en una forma perjudicial con ninguno de los componentes de la composición en la cual está contenido (por ejemplo, una "composición farmacéuticamente aceptable").

Como se usan en la presente, las frases "portador fisiológicamente aceptable" y "portador farmacéuticamente aceptable" que se pueden usar en forma intercambiable se refieren a un portador, diluyente y excipiente que no provoca irritación significativa a un organismo y no impide la actividad y las propiedades biológicas del compuesto administrado. En estas frases está incluido un coadyuvante.

Como es usa en la presente, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte agregada a una composición farmacéutica

para facilitar adicionalmente la administración de un ingrediente activo.

El término "afinidad mínima" como se usa en la comparación de la afinidad de los anticuerpos para la forma protofibrilar del péptido A β con la afinidad de los anticuerpos para otras formas de péptido A β , tales como fibrillas, estructuras de hojas, y oligómeros y monómeros de bajo peso molecular, indica que la relación de la afinidad para la forma de A β protofibrilar a la afinidad para otras formas de A β es mayor que 2. Preferentemente, la relación es mayor que 3, o que 4, o que 5.

Breve Descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra el proceso de fibrillogénesis de A β , que incluye la formación de oligómeros de protofibrillas.

Las Figuras 2A-B muestran el proceso de fibrillogénesis de A β y purificación de las formas de A β a la hora 0 (A) y a las 4 horas (B) como lo indica la absorbencia a mAU₂₁₅ (absorbencia a 215 nm) para volúmenes de elución. A las 4 horas (B), la forma de bajo peso molecular (LMW) eluye como un dímero de 15 kDa mientras que la el tamaño de la protofibrilla eluye a 670 kDa.

Las Figuras 3A-B muestran la especificidad de los anticuerpos monoclonales 13C3 (A) y 4G8 (B) para las formas de protofibrilla (PF: -♦-) y de bajo peso molecular (LMW: -■-) de A β , como lo indica la lectura de densidad óptica (OD) a 450/650 nm para aumentar las concentraciones de las formas de PF y de LMW de A β .

Las Figuras 4A-C muestran datos de un ensayo de unión Biacore® que muestra la afinidad de los anticuerpos monoclonales 4G8 (A), 13C3 (B) e IgG₁ control (C) para variar concentraciones de la forma de bajo peso molecular (LMW) de A β de 0,25 g/ml de A β de LMW a 4,0 μ g/ml de A β de LMW.

Las Figuras 5A-B muestran datos que identifican los epítopes reconocidos por los anticuerpos anti-A β descritos anteriormente. La Figura 5A ilustra un análisis Western Dot Blot con anticuerpos monoclonales 13C3 (panel superior", 1D1 (panel central) y 4G8 (panel inferior) contra una serie de péptidos de 13 aminoácidos superpuestos que se describen en el Ejemplo 5. La Figura 5B ilustra la secuencia de aminoácidos de A β ₁₋₄₂ (SEQ ID NO 1), así como los epítopes predichos de los anticuerpos monoclonales 13C3 y 1D1.

La Figura 6 muestra la reactividad de los anticuerpos monoclonales 13C3 (-■-) y 4G8 (-◆-) con fracciones de SEC del sobrenadante de 7PA2 que segrega oligómeros de A β . Las fracciones de protofibrillas (PF) y de bajo peso molecular (LMW) se indican en el eje X medido mediante la lectura de densidad óptica (OD) a 450/650.

Las Figuras 7A-C muestran micrografías de microscopio inmunoelectrónico de corte delgado que muestra la afinidad del anticuerpo monoclonal 13C3 a estructuras repetidas en las fibrillas de A β (B, C). El microscopio inmunoelectrónico control es IgG₁ (A).

Las Figuras 8A-B muestran datos de micrografías electrónicas que muestran la reducción en los números de placas en un ratón transgénico TgCRND8 representativo después de de la administración del anticuerpo de IgG₁ control comparada con la administración de los anticuerpos monoclonales 13C3 (B).

Las Figuras 9A-B muestran que el tratamiento de los ratones transgénicos TgCRND8 con anticuerpos monoclonales 13C3 en un régimen de una vez por semana (A) o dos veces por semana (B) deriva en una reducción de la formación de placas seniles.

La Figura 10 muestra la secuencia de nucleótido y de aminoácido de las regiones variables livianas y pesadas clonadas para 13C3 de mAb.

La Figura 11 muestra que la administración periférica aguda de 13C3 en ratones transgénicos de APP no deriva en un aumento en A β de plasma a diferencia de la administración del anticuerpo 3D6 de referencia.

La Figura 12 muestra que 13C3 reconoce placas neuríticas amiloides humanas (agregadas) en cerebros con enfermedad de Alzheimer pero no los depósitos de A β difuso a diferencia del anticuerpo anti-A β de 3D6 de referencia.

Descripción Detallada de la invención

La proteína precursora amiloide (APP) cumple una función importante en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (AD). El procesamiento proteolítico de APP por β - y γ -secretasas generan péptidos de A β (A β) que normalmente están en la gama de la longitud de 39 a 43 aminoácidos de longitud. El inicio de la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la acumulación de las formas oligoméricas o agregadas de A β en el cerebro. Las composiciones inmunológicas de la presente

invención son útiles en el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer, para su uso como reactivos en ensayos de diagnóstico, así como para el diseño de inhibidores de molécula pequeña de la deposición de amiloide. Los anticuerpos similares a 13C3 de la presente invención se pueden administrar en forma profiláctica a la población general de un mamífero, especialmente un humano, en una formulación farmacéuticamente aceptable contemplada en una cantidad y/o régimen de dosificación suficiente para eliminar, reducir o retardar el inicio de la enfermedad. Los métodos de tratamiento profiláctico están especialmente garantizados con individuos que se sabe que están en riesgo genético o familiar de enfermedad de Alzheimer. Se han identificado numerosos marcadores genéticos de riesgo para la enfermedad de Alzheimer, que incluyen en forma no taxativa mutaciones de APP (por ejemplo, la mutación india (Val717Phe), las mutaciones suecas (Lys670Asn, Met671Leu), la mutación de Hendricks (Ala692Gly), la mutación holandesa (Glu693Gln), la mutación india (Thr714Ala), la mutación alemana (Val715Ala), y la mutación de Florida (Ile716Val), para enumerar algunas. Otras mutaciones que pueden indicar un mayor riesgo de enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones en los genes de presenilina 5 (PS1 y PS2) y ApoE4. La presente invención también se relaciona con la intervención terapéutica a través de composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden un

anticuerpo similar a 13C3 para individuos que actualmente sufren la enfermedad de Alzheimer que también se puede reconocer a partir de la demencia característica, especialmente en la presencia de factores de riesgo descritos anteriormente o que ya sufren una enfermedad en una cantidad suficiente para curar, o por lo menos detener parcialmente, los síntomas y complicaciones de la enfermedad de Alzheimer. Los métodos de tratamiento basados en profiláctico o terapéutico contemplados en la presente se pueden usar para enfrentar la enfermedad de Alzheimer de inicio precoz o tardío. En vista de la importancia de las formas oligoméricas de A β en el inicio de la enfermedad de Alzheimer, la presente invención se relaciona con un anticuerpo aislado que interactúa específicamente y muestra una afinidad medida a un epítipo conformacional repetido de una forma de protofibrilla del péptido A β . El monómero del péptido A β de tipo silvestre (A β ₄₂; la forma de 42 aminoácidos) es conocida en el arte y se muestra en la presente como SEQ ID NO 1:

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln
Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala
Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala (SEQ ID
NO:1).

Los anticuerpos aislados de la presente invención presentan afinidad para un epítipo conformacional repetido de la forma protofibrilar oligomérica de mayor peso molecular del péptido

A β mientras que presenta afinidad para otras formas de péptido A β , tales como monómeros y dímeros de bajo peso molecular.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo aislado que interactúa y presenta una afinidad medible a un epítoto conformacional de una forma de protofibrilla de péptido A β , por lo cual el epítoto de protofibrilla está representado por una región expuesta de una forma de protofibrilla de A β que comprende la parte de extremo de amino de una parte expuesta del péptido A β .

La presente invención además se relaciona con un anticuerpo aislado que interactúa específicamente y presenta una afinidad medible a un epítoto conformacional de una forma de protofibrilla de péptido A β , por lo cual el epítoto de protofibrilla está representado por una región expuesta de una forma de protofibrilla de A β que comprende los aminoácidos 1-20 de SEQ ID NO 2) de una parte expuesta del péptido A β , siguiente: Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gin Lys Leu Val Phe Phe (SEQ ID NO:2).

Como se ejemplifica en la presente, se han identificado anticuerpos monoclonales de ratón que presentan afinidad específica para la forma de protofibrilla (PF) del péptido A β ,

mientras que presenta afinidad mínima para especies de bajo peso molecular del péptido A β . La forma de dímero de A β (15 kDa) en el tiempo se polimeriza y forma una forma de PF de A β , con un peso molecular de aproximadamente 670 kDa. Se inmunizó a ratones con esta protofibrilla de A β de peso molecular más alto. Los anticuerpos monoclonales se evaluaron por la especificidad de la forma de PF de alto peso molecular del péptido A β mientras que presenta mínima o ninguna capacidad para unirse a formas de peso molecular más bajo de A β . Esta parte de la presente invención se ejemplifica mediante la evaluación, aislamiento y caracterización de la serie de 13C3 de anticuerpos monoclonales creados contra la forma de protofibrilla de alto peso molecular de 670 kDa del péptido A β (es decir, 13C3, 1D1 y 19A6. Esta serie de anticuerpos monoclonales presenta la especificidad deseada in Vitro mientras que también reduce la formación de placas asociada con la enfermedad de Alzheimer en un modelo de enfermedad de Alzheimer de ratones transgénicos. Por lo tanto, en una realización particular de la invención, el anticuerpo aislado interactúa específicamente y presenta afinidad medible a un epítipo conformacional de una forma de protofibrilla de péptido A β , por lo cual el epítipo de protofibrilla está representado por una región expuesta de una forma de protofibrilla de A β que comprende los aminoácidos 4-12 (SEQ ID NO: 3) y 9-20 (SEQ ID NO 4) de una parte expuesta del

péptido A β : Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val (SEQ ID NO: 3);
Gly Tyr Glu Val His His Gin Lys Leu Val Phe Phe (SEX ID NO:4).

Una realización de la presente invención se relaciona con un anticuerpo que comprende una región de V_H (SEQ ID NO: 7) y/o V_L (SEQ ID NO: 5) revelado para 13C3, de manera tal que imparta especificidad similar a 13C3 a la forma de PF contra LMW del péptido A β . Otra realización es un anticuerpo similar a 13C3 o un fragmento biológicamente diferente de él que presenta especificidad a la forma de PF sobre la forma de LMW del péptido A β . Por lo tanto, la presente invención también se relaciona con fragmentos biológicamente activos y/o mutantes del 13C3, 1D1, 19A6 o un anticuerpo similar a 13C3, que incluye en forma no taxativa sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, como una forma dirigida de maduración de afinidad de las regiones V_H o V_L), eliminaciones, agregados, truncados de extremo de amino y truncados de extremo de carboxi de manera tal que estas mutaciones proporcionen una base para un anticuerpo o parte de unión al anticuerpo que deriva en una versión similar o mejorada de un 13C3, 1D1, 19A6 o proteína de unión al anticuerpo similar a 13C3. Como se indicó en la presente, una realización de esta parte de la invención se relaciona con la región de V_H y/o V_L de dicho anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO 7

y/o SEQ ID NO 5, respectivamente. La presente invención señala la secuencia de redundancia de codón que puede derivar en diferentes moléculas de ADN que expresan un anticuerpo idéntico o una parte de él (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico alternativas que codifican un scFv idéntico o una parte de V_H y/o V_L de una IgG). Para los fines de esta memoria descriptiva, una secuencia que lleva uno o más codones reemplazados se define como una variación degenerada. Otro origen de variación de secuencia puede ocurrir a través de la edición de ARN. Dicha edición de ARN puede derivar en otra forma de redundancia de codón, en donde un cambio en el marco de lectura abierta no deriva en un residuo de aminoácido alterado en la proteína expresada. También están incluidas dentro de esta invención las mutaciones en la secuencia de ADN o el anticuerpo traducido que mejoran las propiedades físicas últimas del anticuerpo expresado. Con este fin, la presente invención se relaciona con (i) versiones maduras de afinidad de un 13C3, 1D1, 19 A6 o cualquier otro anticuerpo similar a 13C3, y/o (ii) formas mutadas de 13C3, 1D1 19A6 o cualquier otro anticuerpo similar a 13C3, que incluye en forma no taxativa una o más mutaciones en las regiones de CDR1, CDR2 y/o CDR3 generada a través de la metodología de maduración de afinidad conocida y técnicas de ADN recombinante conocidas para introducir mutaciones específicas del sitio. Por lo tanto, los anticuerpos aislados de la presente invención son

anticuerpos que interactúan específicamente con un epítipo conformacional de una forma de protofibrilla de péptido A β . los anticuerpos aislados de la presente invención presentan afinidad para dicho epítipo conformacional para la forma de protofibrilla de mayor peso molecular del péptido A β mientras que presentan afinidad mínima para otras formas del péptido A β , tales como fibrillas, estructuras de hojas, y oligómeros y monómeros de bajo peso molecular.

La presente invención también se relaciona con el anticuerpo aislado, 13C3. Esta parte de la invención también se relaciona con un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal, 13C3. Un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 13C3 está disponible con el Acceso de ATCC N° PTA-8830.

La presente invención también se relaciona con el anticuerpo monoclonal aislado, 1D1. Esta parte de la invención también se relaciona con un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal, 1D1.

La presente invención también se relaciona con el anticuerpo monoclonal aislado 19A6. Esta parte de la invención también se relaciona con un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 19A6.

La presente invención también se relaciona con métodos para evaluar y seleccionar los compuestos que pueden actuar como un inhibidor de la formación de fibrillas y/o placas seniles asociada a la enfermedad de Alzheimer. Dicha metodología comprende utilizar un anticuerpo con afinidad similar a 13C3 a la forma de PF del péptido A β en diferentes ensayos de interacción de anticuerpo/péptido compuesto de ensayo para seleccionar un compuesto que modula el proceso de la formación de fibrillas y/o placas. El compuesto puede ser una molécula orgánica o inorgánica no proteínica, un péptido (por ejemplo, como una vacuna de péptido profiláctica o terapéutica), una proteína, ADN (de una sola hebra o de hebra doble) o ARN (tal como siARN o shARN). Se hará evidente al revisar la invención y las enseñanzas de esta memoria descriptiva que cualquiera de tales péptidos o moléculas pequeñas que compite eficazmente con un anticuerpo similar a 13C3 por la unión a la forma de PF de péptido A β representa un compuesto principal posible relacionado con el tratamiento profiláctico o terapéutico de la enfermedad de Alzheimer. Con este fin, se pueden utilizar ensayos de interacción con el propósito de la evaluación de alto rendimiento para identificar compuestos que ocupan o interactúan con los epítopes de 13C3 de la forma de PF del péptido A β y desplazar al anticuerpo.

Se pueden usar diferentes ensayos basados en anticuerpos /antígenos conocidos en el arte que incorporan y se basan en un anticuerpo similar a 13C3 de la presente invención como un reactivo esencial en la evaluación de compuestos útiles en el tratamiento profiláctico o terapéutico de la enfermedad de Alzheimer (por ejemplo, una molécula inorgánica pequeña o una vacuna de péptido candidata), que incluye en forma no taxativa un ensayo ELISA, un radioinmuno ensayo, un análisis Western blot, cualquier ensayo homogéneo basado en una interacción biológica detectable que no requiere pasos de separación o lavado (por ejemplo, véase AlphaScreen de PerkinElmer) y/o una tecnología basada en SPR (por ejemplo, véase BIACore)). Los compuestos y/o vacunas de péptido candidatos identificados a través del uso de un anticuerpo similar a 13C3 se pueden detectar mediante una variedad de ensayos. El ensayo puede ser un ensayo de "sí/no" simple para determinar si hay un cambio en la capacidad de formar el complejo de anticuerpo y antígeno conocido, o se puede hacer de carácter cuantitativo utilizando un ensayo tal como un ensayo basado en ELISA, un ensayo homogéneo, o un ensayo basado en SPR. Con este fin, la presente invención se relaciona con cualquiera de tales ensayos, independientemente de la metodología conocida empleada, que mide la capacidad de un compuesto de ensayo de competir con el anticuerpo similar a 13C3, con un péptido o

proteína mimética apropiada de la parte del extremo de amino de un epítipo de 13C3 de la forma de PF del péptido A β .

Los anticuerpos descritos en la presente se pueden utilizar como los reactivos básicos en numerosos inmunoensayos diferentes para determinar la presencia de una forma de protofibrilla de A β en una muestra de tejido. Hablando en general, los anticuerpos se pueden emplear en cualquier tipo de inmunoensayo, ya sea cualitativo o cuantitativo. Esto incluye tanto ensayo de sándwich de dos sitios como el inmunoensayo de un solo sitio del tipo no competitivo, así como en ensayos de unión competitiva tradicionales. Una realización de interés, para facilidad de detección y su carácter cuantitativo, es el ensayo de anticuerpo sándwich o doble, del cual existen numerosas variaciones, la totalidad de las cuales están comprendidas por esta parte de la presente invención. Por ejemplo, en un ensayo de sándwich de ida típico, el anticuerpo no marcado se inmoviliza sobre un sustrato sólido, por ejemplo, receptáculos de placa de microtítulo y la muestra que se debe ensayar se pone en contacto con la molécula unida. Después de un período de incubación adecuado, durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo binario de anticuerpo y antígeno, un segundo anticuerpo, marcado con una

molécula indicadora capaz de inducir una señal detectable, luego se agrega y se continúa la incubación que deja suficiente tiempo la unión al antígeno en un sitio diferente y la formación de un complejo ternario de anticuerpo-antígeno-anticuerpo marcado. Todo el material que no reaccionó se lava, y la presencia del antígeno se determina mediante la observación de una señal, que se puede cuantificar mediante la comparación con una muestra control que contiene cantidades conocidas de antígeno. Las variaciones en el ensayo de sándwich de ida incluyen el ensayo simultáneo, en el cual tanto la muestra como el anticuerpo se agregan simultáneamente al anticuerpo unido, o un ensayo de sándwich de vuelta en el cual el anticuerpo marcado y la muestra que se deben ensayar primero se combinan, se incuban y se agregan al anticuerpo unido de superficie no marcado. Estas técnicas son conocidas para los expertos en el arte y la posibilidad de variaciones menores se hará fácilmente evidente. Como se usa en la presente, "ensayo de sándwich" comprende todas las variaciones en la técnica de dos sitios básica.

Para los ensayos de sándwich de la presente invención, el único factor limitante es que ambos anticuerpos tienen especificidades de unión diferentes para la forma de protofibrilla de A β . Por lo tanto, son posibles numerosas combinaciones. Como un ejemplo más específico, en un ensayo de

sándwich de ida típico, un anticuerpo primario se une en forma covalente o pasiva a un soporte sólido. La superficie sólida es habitualmente vidrio o un polímero, los polímeros usados más comúnmente son celulosa, poliacrilamida, nylon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en la forma de tubos, cuentas, discos o microplacas, o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los procesos de unión son conocidos en el arte. Después de la unión, el complejo de fase sólida y anticuerpo se lava en preparación para la muestra del ensayo. Una alícuota del fluido corporal que contiene una forma de protofibrilla de A β que se debe ensayar luego se agrega al complejo de fase sólida y se incuba a 25°C durante un período de tiempo suficiente para permitir la unión de cualquier proteína de forma de protofibrilla de A β presente al anticuerpo específico para la forma de protofibrilla de A β . El segundo anticuerpo entonces se agrega al complejo de fase sólida y se incuba a 25°C durante otro período de tiempo suficiente para permitir que el segundo anticuerpo se una al complejo de fase sólida de anticuerpo y antígeno primario. El segundo anticuerpo se une a una molécula indicadora, cuya señal visible se usa para indicar la unión del segundo anticuerpo a cualquier antígeno en la muestra. Por "molécula indicadora", como se usa en la presente memoria descriptiva se

entiende una molécula que por su naturaleza química, proporciona una señal detectable analíticamente que permite la detección de un anticuerpo unido a un antígeno. La detección debe ser por lo menos relativamente cuantificable, para permitir la determinación de la cantidad de antígeno en la muestra, esto se puede calcular en forma absoluta, o se puede hacer comparado con un estándar (o serie de estándares) que contiene un nivel normal conocido de antígeno.

Las moléculas indicadoras usadas más comúnmente en este tipo de ensayo son enzimas o fluoróforos. En el caso de un inmunoensayo de enzimas se conjuga una enzima al segundo anticuerpo, frecuentemente por medio de glutaraldehído o peryodato. Como se reconocerá fácilmente, sin embargo, existe una amplia variedad de diferentes técnicas de conjugación, que son conocidas para los expertos en el arte. Las enzimas usadas comúnmente incluyen peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, y fosfatasa alcalina, entre otras. Los sustratos que se deben usar con las enzimas específicas generalmente se eligen para la producción, luego de la hidrólisis por la enzima correspondiente, de un cambio de color detectable. Por ejemplo, el fosfato de p-nitrofenilo es adecuado para su uso con conjugados de fosfatasa alcalina; para conjugados de peroxidasa, comúnmente se usan 1,2-fenilidendiamina o toluidina. También es posible emplear

sustratos fluorogénicos, que dan un producto fluorescente en lugar de los sustratos cromogénicos indicados anteriormente. En todos los casos, el anticuerpo marcado por enzimas se agrega al complejo de primer anticuerpo y proteína de protofibrilla de A β y se deja que se una al complejo y luego el exceso de reactivo se lava. Una solución que contiene el sustrato apropiado luego se agrega al complejo terciario de anticuerpo-antígeno-anticuerpo marcado. El sustrato reacciona con la enzima unida al segundo anticuerpo, lo cual da una señal visual cualitativa, que se cuantifica adicionalmente, habitualmente en forma espectrofotométrica, para dar una evaluación de la cantidad de antígeno que está presente en la muestra de suero.

Además, los compuestos fluorescentes, tales como fluoresceína o rodamina, se pueden acoplar químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa mediante iluminación con luz de una longitud de onda, el anticuerpo marcado con flurocromo absorbe la energía de la luz, que induce un estado de excitabilidad en la molécula, seguida por la emisión de la luz a una mayor longitud de onda característica. La emisión aparece como un color característico detectable visualmente con un microscopio de luz. Como en el inmunoensayo de enzimas (EIA), se deja que el anticuerpo marcado fluorescente se una al complejo de primer

anticuerpo y proteína de forma de protofibrilla de A β . Después de lavar el reactivo que no se unió, el complejo ternario remanente luego se expone a la luz de la longitud de onda apropiada, y la fluorescencia observada indica la presencia del antígeno. Las técnicas de inmunofluorescencia y EIA están ambas bien establecidas en el arte y son particularmente preferidas para el presente método. Sin embargo, también se pueden emplear otras moléculas indicadoras, tales como radioisótopos, moléculas quimioluminiscentes o bioluminiscentes. Será rápidamente evidente para el experto en el arte cómo variar el procedimiento para adecuar al uso requerido.

En otra realización, la muestra que se debe ensayar (por ejemplo, sangre o fluido espinal humano que contiene una forma de protofibrilla de A β) se puede usar en un inmunoensayo de un solo sitio en donde se adhiere a un sustrato sólido en forma covalente o no covalente. Un anticuerpo de proteína de protofibrilla anti-A β se pone en contacto con la muestra unida al sustrato sólido. Después de un período de incubación adecuado, durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo binario de anticuerpo y antígeno un segundo anticuerpo, marcado con una molécula indicadora capaz de inducir una señal detectable, luego se

agrega y se continúa la incubación dejando suficiente tiempo para la formación de un complejo ternario de antígeno-anticuerpo-anticuerpo marcado. Para el inmunoensayo de un solo sitio, el segundo anticuerpo puede ser un anticuerpo general (por ejemplo, un anticuerpo xenogénico a inmunoglobulina, particularmente anti-(IgM e IgG) unido a una molécula indicadora) que es capaz de unirse a un anticuerpo que es específico de la forma de protofibrilla de A β interés.

Un anticuerpo similar a 13C3 puede tomar una de numerosas formas conocidas en el arte. Los anticuerpos pueden tomar la forma de cualquier tipo de fragmento de anticuerpo relevante, parte de unión al anticuerpo, miembro de unión específico, una imitación sintética que no es una proteína, o cualquier otra terminología relevante conocida en el arte que retiene por lo menos sustancialmente la especificidad de la unión/actividad de neutralización. Por lo tanto, se entiende que el término "anticuerpo" como se usa en cualquier contexto dentro de esta memoria descriptiva incluye, en forma no taxativa, cualquier miembro de unión específico, clase de inmunoglobulina y/o isotipo (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgM, IgA, IgD, IgE y IgM); y un fragmento biológicamente relevante o un miembro de unión específico de él, que incluye en forma no taxativa Fab, F(ab')₂, Fv, y scFv (cadena simple o entidad relacionada). En consecuencia, se sabe bien en el

arte está incluido solamente como revisión, que un "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L) interconectadas por enlaces de disulfuro, o una parte de unión al antígeno de ella. Una cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Una cadena liviana comprende una región variable de cadena variable (VL) y una región constante de cadena liviana (CL). Las regiones variables de ambas cadenas pesada y liviana comprenden regiones marco (FWR) y regiones de determinación de complementariedad (CDR). Las cuatro regiones FWR están relativamente invertidas mientras que las regiones CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) representan regiones hipervariables y están dispuestas desde el extremo de NH₂ al extremo de COOH de la siguiente manera: FWR1, CDR1, FWR2, CDR2, FWR3, CDR3, FWR4. Las regiones variables de la cadenas pesada y liviana contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno mientras que, según el isotipo, la región(es) constante puede mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores huésped. Dicho esto, también están incluidos en la definición o "anticuerpo" los anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, un anticuerpo recombinante, como anticuerpos humanos generados desde un animal transgénico, así como los anticuerpos seleccionados de bibliotecas usando tecnologías de enriquecimiento a

disposición del experto en el arte. Los fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas fácilmente conocidas y que están a disposición de los expertos en el arte, que se revisan a continuación. En consecuencia, un "anticuerpo" es toda aquella entidad o miembro de unión específico, que se une específicamente al epítope conformacional de la forma de protofibrilla de A β que se describe a continuación. En consecuencia, el término "anticuerpo" describe una inmunoglobulina, sea natural o producido en forma parcial o totalmente sintética; todo polipéptido o proteína que tiene un dominio de unión que es, o es sustancialmente homóloga a un anticuerpo de un dominio de unión al anticuerpo. Estos pueden derivar de orígenes naturales, o se pueden producir en forma parcial o totalmente sintética. Ejemplos de anticuerpos son los isotipos de inmunoglobulina y sus subclases isotópicas; fragmentos que comprenden un dominio de unión al antígeno tal como Fab, scFv, Fv, dAb, Fd y diacuerpos, que se discuten en forma no taxativa a continuación. Se sabe en el arte que es posible manipular anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos y usar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que retienen la especificidad del anticuerpo original. Dichas técnicas pueden evolucionar introduciendo ADN que codifica la región variable de inmunoglobulina, o las regiones de determinación de complementariedad (CDR) de un anticuerpo a las regiones

constantes, o regiones constantes más regiones marco, de una inmunoglobulina diferente. Un hibridoma u otra célula que produce un anticuerpo puede estar sujeto a mutación genética u otros cambios, que pueden o no alterar la especificidad de la unión de los anticuerpos producidos. Los anticuerpos se pueden modificar de numerosas maneras, y el término "anticuerpo" debe interpretarse que comprende todos los miembros de unión específicos o una sustancia que tiene un dominio de unión con la especificidad requerida. Por lo tanto, este término comprende fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de "anticuerpos" que incluyen todos los polipéptidos que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Dicha entidad puede ser un fragmento de unión comprendido dentro del término "parte de unión al antígeno" o "miembro de unión específico" de un anticuerpo que incluye en forma no taxativa (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que comprende los dominios de VL, VH, CL y CH; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente de disulfuro en la región de puente; (iii) un fragmento Fd que comprende los dominios de VH y CH; (iv) un fragmento Fv que comprende los dominios de VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb, que comprende un dominio de VH; (vi) una región de determinación de complementariedad aislada (CDR); (vii) un "scAb", un fragmento de anticuerpo que

contiene VH y VL así como CL o CH; y (viii) anticuerpos artificiales basados en andamios de proteína, que incluyen en forma no taxativa anticuerpos de polipéptido de fibronectina tipo III (por ejemplo, véase la Patente Estadounidense N° 6.703.199, concedida a Koide el 9 de marzo de 2004 y la Publicación de la Solicitud de Patente Internacional PCT N° WO 02/32925). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes por separado, se pueden unir, usando métodos recombinantes, con un conector sintético que permite que se elaboren como una sola cadena de proteína en donde las regiones de VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (denominadas Fv de cadena simple (scFv)).

En una realización, la región liviana variable (VL) para los dos anticuerpos 13C3 y similar a 13C3 aislados de la presente invención pueden comprender una secuencia de péptido de 113 aminoácidos (SEQ ID NO 5) codificado por una secuencia de nucleótido de 339 pares de base (SEQ ID NO 6):

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

GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCC
ATCTCTTGCAGATCTGGTCAGAGCCTGTACACAGTAATGGAAACACCTATTACATTGG
TACCTGCAGAAGCCAGGCCASTCTCCAAAGCTCCTGATCTATACAGTTTCCAACCGATTT
TCTGGGGTCCCGGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGTCAGATTTCACTCAAGATC
AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAATACATTTGTTTCT
TGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAACGG (SEQ ID NO: 6)

En otra realización, la región pesada variable (VH) para los anticuerpos 13C3 y similar a 13C3 de la presente invención puede comprender una secuencia de péptido de 115 aminoácidos (SEQ ID NO 7) codificada por una secuencia de nucleótido de 345 pares de base (SEQ ID NO 8):

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly
Val Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
Asp Tyr Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu
Glu Trp Ile Gly Val Ile Ser Thr Lys Tyr Gly Lys Thr Asn Tyr
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Gln Asp
Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Asp Gly Tyr Ser Trp
Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO: 7);
CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGCCTGAGCCTGGTGAAGCCTGGGGTCTCAGTGAAGATT
TCTGCAAGGGTTCCGGCTACACATTCAGTATTATGCTATGCACTGGGTGAAGCAGAGT
CATGCAAAAGAGTCTAGAGTGGATTGGAGTTATTAGTACTAAGTATGGTAAGACAAACTAC
AACCAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCACAATGACTGTTGACAAATCCTCCAGCACAGCCTAT
ATCGAGCTTGCCAGATTGACATCTCAGGATTCTGCCATCTATTACTGTGCAAGAGGGGAC
GATGGTTATTCTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTCTCA (SEQ ID NO:
8).

En otra realización, las regiones marco, FWR1, FWR2, FWR3 y FWR4, de la cadena de VL pueden estar compuestas por el aminoácido que se expone en SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11 y SEQ ID NO 12, respectivamente, a continuación:

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

En otra realización, las regiones de determinación de complementariedad, CDR1, CDR2, y CDR3, de la cadena de VL pueden estar compuestas por los aminoácidos expuestos en SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15, respectivamente, a continuación:

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr (SEQ ID NO: 13);
Thr Val Ser (SEQ ID NO: 14);
Ser Gln Asn Thr Phe Val Pro Trp Thr (SEQ ID NO: 15).

En otra realización, las regiones marco, FWR1, FWR2, FWR3 y FWR4, de la cadena de VH pueden estar compuestas por los aminoácidos expuestos en SEQ ID NO 16, SEQ ID NO 17, SEQ ID NO 18 y SEQ ID NO 19, respectivamente, siguientes:

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

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

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

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

En otra realización, las regiones de determinación de complementariedad, CDR1, CDR2 y CDR3, de la cadena de VH pueden estar compuestas por los aminoácidos expuestos en SEQ ID NO 20, SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 22, respectivamente, siguientes:

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

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

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

Los anticuerpos policlonales o monoclonales para su uso en los métodos de tratamiento revelados se pueden crear mediante técnicas conocidas. Los anticuerpos de roedores (ratón) monoespecíficos que presentan especificidad para un epítipo conformacional de un blanco elegido se pueden purificar desde antisuero de mamífero que contienen anticuerpos reactivos contra esta región, o se pueden preparar como anticuerpos monoclonales usando la técnica de Kohler y Milstein (1975, *Nature* 256: 495-497). El anticuerpo monoespecífico como se usa en la presente se define como una especie de anticuerpo simple

o una especie de anticuerpo múltiple con características de unión homogéneas, tales como los anticuerpos monoclonales de ratón ejemplificados en la presente con la serie 13C3 de anticuerpos monoclonales. Las células de hibridomas se producen mezclando los linfocitos esplénicos con un compañero de fusión apropiado, preferentemente células de mieloma, en condiciones que permiten la formación de hibridomas estables. El anticuerpo esplénico que produce células y células de mieloma se fusionan, se seleccionan y se evalúan para la producción de anticuerpos. Las células de hibridomas de receptáculos positivos de anticuerpos se clonan mediante una técnica tal como la técnica de agar blando de MacPherson (1973, *Soft Agar Techniques*, en *Tissue Culture Methods and Applications*, Kruse y Paterson, Eds, Academic Press). Los anticuerpos monoclonales se producen in vivo inyectando células de hibridomas respectivas en ratones cebados originales, recogiendo fluido de ascitis después de un intervalo de tiempo, y se preparan mediante técnicas conocidas en el arte.

Más allá de los anticuerpos monoclonales específicos de especies descritos anteriormente, los anticuerpos de la presente invención también pueden estar en la forma de un "anticuerpo quimérico", un anticuerpo monoclonal construido a partir de regiones variables derivadas de digamos, el origen

de roedor, y regiones constantes derivadas del origen de huésped deseado (por ejemplo, humano; para una revisión, véase Morrison y Oi, 1989, *Advances in Immunology*, 44: 65-92). Por ejemplo, las secuencias de ADN liviana y pesada variables (por ejemplo, SEQ ID NO 6 y 8, respectivamente) del anticuerpo de roedor (por ejemplo, ratón) se pueden clonar en un vector de expresión de mamífero. Estos vectores de expresión "quiméricos" livianos y pesados se cotransfectan a una línea de células receptora y se seleccionan y expanden mediante técnicas conocidas. Esta línea de células puede entonces someterse a técnicas de cultivo, que derivan en la producción de la cadena liviana y la cadena pesada de un anticuerpo quimérico. Se ha mostrado históricamente que dichos anticuerpos quiméricos tienen la capacidad de unirse al antígeno del monoclonal de roedor original mientras que reducen significativamente los problemas de inmunogenicidad después de la administración al huésped.

Una mejora lógica al anticuerpo quimérico es el "anticuerpo humanizado", que se argumenta que reduce la posibilidad de que el paciente monte una respuesta inmune contra un anticuerpo terapéutico comparado con el uso de un anticuerpo monoclonal de roedor quimérico o completo. La estrategia de "humanizar" un Mab de roedor está basada en el reemplazo de residuos de aminoácidos que difieren de aquellos de las secuencias humanas

mediante la mutagénesis dirigida al sitio de residuos individuales o el injerto de regiones de determinación de complementariedad (Jones et al., 1986, *Nature* 321: 522-526). Esta tecnología es nuevamente ahora conocida en el arte y está representada por numerosas estrategias para mejorar esta tecnología; a saber implementando estrategias que incluyen, en forma no taxativa, "dar forma nuevamente" (véase Verhoeven, et al., 1988, *Science* 239: 1534-1536), "hiperquimerización" (véase Queen, et al., 1991, *Proc. Nati. Acad. Sci.* 88:2869-2873) o "enchapado" (Mark, et al., 1994, Derivation of Therapeutically Active Humanized and Veneered anti-CD18 Antibodies Metcalf y Dalton, eds. *Cellular Adhesion: Molecular Definition to Therapeutic Potential*. New York: Plenum Press, 291-312). Estas estrategias comprenden todas algún nivel de comparación de secuencia entre las secuencias de roedor y humana para determinar si las sustituciones de aminoácidos específicos de un roedor a un consenso humano son apropiadas. Cualquiera que sea la variación, el tema central involucrado en la generación de un anticuerpo humanizado se basa en el injerto de CDR, donde estos tres sitios de unión al antígeno de la cadena liviana y pesada se eliminan eficazmente del clon de anticuerpo que expresa el roedor y se subclonan (o "injertan") en un vector de expresión que codifica la región marco del anticuerpo humano. Por ejemplo, mediante la utilización de las técnicas precedentes se puede expresar un anticuerpo

humanizado en donde las regiones CEDR1, CDR2, y CDR3 de la cadena liviana variable se exponen en SEQ ID NO 13, 14 y 15, respectivamente y las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada variable se exponen en SEQ ID NO 20, 21 y 22, respectivamente. En consecuencia, un "anticuerpo humanizado" es efectivamente un anticuerpo construido con solamente CDR de roedor (menos cualquier mejora adicional generada incorporando una o más de las estrategias mencionadas anteriormente), donde el resto de las regiones variables y la totalidad de la región constante se obtienen de un origen humano.

La presente invención también se relaciona con moléculas de ácido nucleico aisladas y secuencias de aminoácidos asociadas que se relacionan con las regiones de V_H y V_L del anticuerpo 13C3, y más específicamente, una molécula de ácido nucleico aislada (polinucleótido) que codifica una parte biológicamente relevante de 13C3, o una versión madurada de afinidad una versión mutada de otro modo de 13C3, 1D1, 19A6 u otro anticuerpo similar a 13C3. Estos ácidos nucleicos están sustancialmente libres de otros ácidos nucleicos. Para la mayor parte de los objetivos, el ADN es un ácido nucleico preferido. Estas moléculas de ADN se pueden subclonar en un vector de expresión y posteriormente transfectar a una célula elegida en donde la célula huésped recombinante provee un origen para niveles sustanciales de una parte relevante del

anticuerpo 13C3, 1D1, 19A6 o similar a 13C3, 1D1, o 19A6, o una versión madurada de afinidad de él. Dichos procedimientos se pueden utilizar para una variedad de utilidades, tales como generar scFv o para coexpresar estas cadenas de V_H y V_L en un sistema de vector de expresión de mamífero que codifica las regiones C_H y C_L , de digamos, un anticuerpo de IgG. La degeneración del código genético es tal que, para todos excepto dos aminoácidos, más de un solo codón codifica un aminoácido específico. Esto permite la construcción de ADN sintético que codifica un anticuerpo de la presente invención donde la secuencia de nucleótido del ADN sintético difiere de las secuencias de nucleótidos reveladas en la presente, pero aún codifica dicho anticuerpo. Se desea que dichos ADN sintéticos estén dentro del alcance de la presente invención. No se desea expresar dichos ADN sintéticos en una célula u organismo huésped específico, el uso de codón de tales ADN sintéticos se puede ajustar para reflejar el uso de codón de ese huésped específico, derivando entonces en niveles más altos de expresión de un anticuerpo de la presente invención. En otras palabras, esta redundancia en los diferentes codones que codifican aminoácidos específicos está dentro del alcance de la presente invención. En consecuencia, esta invención también se refiere a aquellas secuencias de ADN que codifican ARN que comprende codones que codifican la traducción final del aminoácido idéntico, como se muestra a continuación: GCA, GCC, GCG, GCU; C=Cys=Cisteína:

codones UGC, UGU; D=Asp=Ácido Aspártico: codones GAC, GAU
 E=Glu=Ácido glutámico: codones GAA, GAG; F=Phe=Fenilalanina:
 codones UUC, UUU; G=Gly=Glicina: codones GGA, GGC, GGG, GGU;
 H=His =Histidina: codones CAC, CAU; I=Ile=Isoleucina: codones
 AUA, AUC; AUU; K=Lys-Lisina: codones AAA, AAG; L=Leu=Leucina:
 codones UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU; M=Met=Metionina: codón
 AUG; N=Asp=Asparagina: codones GAU, GAC; P=Pro=Prolina:
 codones CCA, CCC, CCG, CCU; Q=Gln=Glutamina: codones CAÁ, CAG;
 R=Arg=Arginina: codones AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU;
 S=Ser=Serina: codones AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU;
 T=Thr=Treonina: codones ACA, ACC, ACG, ACU; V=Val=Valina:
 codones GUA, GUC, GUG, GUU; W=Trp=Triptofano: codón UGG;
 Y=Tyr=Tirosina: codones UAC, UAU. Dichos vectores de expresión
 recombinante pueden entonces transfectarse en forma estable o
 transitoria en una línea de células apropiada para la generación
 de la forma de anticuerpo alternativo.

La presente invención indica la existencia de redundancia de
 codón que puede derivar en moléculas de ADN diferente que
 expresan un anticuerpo idéntico o una parte de él (por ejemplo,
 moléculas de ácido nucleico alternativas que codifican un scFv o
 una parte de VH y/o VL de una IgG). Para los fines de esta
 memoria descriptiva, una secuencia que lleva uno o más codones
 reemplazados se define como una variación degenerada. Otro origen
 de variación de secuencia puede ocurrir a través de la edición de

ARN. Dicha edición de ARN puede derivar en otra forma de redundancia de codón, en donde un cambio en el marco de lectura abierto no deriva en un residuo de aminoácido alterado en la proteína expresada. También están incluidas dentro del alcance de esta invención las mutaciones en la secuencia de ADN o el anticuerpo transfectado que mejora las propiedades físicas finales del anticuerpo expresado. Con este fin, la presente invención se relaciona con (i) versiones maduradas de afinidad de un anticuerpo similar a 13C3, que incluye en forma no taxativa 13C3, 19A6 y 1D1, y/o (ii) formas mutadas de un anticuerpo similar a 13C3, que incluyen en forma no taxativa 13C3, 19A6 y/o 1D1, que incluye en forma no taxativa una o más mutaciones en las regiones de CDR1, CDR2 y/o CDR3 generadas a través de la metodología de maduración de afinidad y técnicas de ADN recombinante conocidas para introducir una mutación específica del sitio. Dichas moléculas de ácido nucleico aisladas o purificadas representan las partes de VH y/o VL de un anticuerpo similar a 13C3. Estos ácidos nucleicos están sustancialmente libres de otros ácidos nucleicos. Para la mayor parte de los propósitos de clonación, el ADN es un ácido nucleico preferido. Estas moléculas de ADN se pueden subclonar en un vector de expresión y posteriormente transfectarse en una célula huésped elegida en donde la célula huésped recombinante provee un origen para niveles sustanciales de una parte relevante de un anticuerpo similar a 13C3, o versiones maduradas de afinidad de él. dichos

procedimientos se pueden usar para una variedad de utilidades, tales como generar scFv o para coexpresar estas cadenas de VH y VL en un sistema de vector de expresión de mamífero que codifica regiones de CH y CL humanas, de digamos, un anticuerpo de IgG.

La presente invención también se relaciona con vectores recombinantes y huéspedes recombinantes, procarióticos y eucarióticos, que contienen moléculas de ácido nucleico que codifican las regiones pesada y/o liviana respectivas de un anticuerpo similar a 13C3. Estas moléculas de ácido nucleico, se pueden unir total o parcialmente con otras moléculas de ADN (es decir, moléculas de ADN que comprenden genes de inmunoglobulina usados para la generación de un anticuerpo humano recombinante) que no se unen naturalmente, para formar "moléculas de ADN recombinante" que codifican un anticuerpo recombinante humano respectivo. Estos vectores pueden estar compuestos de ADN o ARN. Para la mayor parte de los fines de clonación se prefieren los vectores de ADN. Los vectores típicos incluyen plásmidos, virus modificados, bacteriófagos, cósmidos, cromosomas artificiales de levadura, y otras formas de ADN episómico o integrado. Está dentro de la incumbencia del experto en el arte determinar un vector apropiado para una transferencia de gen específico, generación de un anticuerpo humano recombinante u otro uso. Se conocen métodos para subclonar moléculas de ácido nucleico de interés en vectores de expresión, transformar o transferir

células huésped que contienen los vectores, y métodos para elaborar proteína sustancialmente pura que comprende los pasos de introducir el vector de expresión respectivo en una célula huésped y cultivar la célula huésped en condiciones apropiadas. El anticuerpo (tal como un anticuerpo humano recombinante de IgG) así producido se puede cultivar desde las células huésped en formas convencionales. Cualquier vector de expresión conocido se puede utilizar para practicar esta parte de la invención, que incluye cualquier vector que contiene un promotor adecuado y otros elementos regulatorios de la transcripción apropiados. La construcción de expresión resultante se transfiere en una célula huésped procariótica o eucariótica para producir proteína recombinante. Los vectores de expresión se definen en la presente como secuencias de ADN que son necesarias para la transcripción de ADN clonado y la traducción de sus rnARN en un huésped apropiado. Dichos vectores se pueden usar para expresar el ADN eucariótico en una variedad de huéspedes tales como bacterias, algas verde azules, células vegetales, células de insectos y células de animales. Los vectores diseñados específicamente permiten la lanzadera de ADN entre huéspedes tales como bacteria-levadura o bacteria-células de animales. Un vector de expresión construido apropiadamente debe contener: un origen de replicación para la replicación autónoma en células huésped, marcadores seleccionables, una cantidad limitada de sitios de enzima de restricción útiles, un potencial para alta cantidad de copias, y

promotores activos. Un promotor se define como una secuencia de ADN que dirige la ARN polimerasa a unirse al ADN e iniciar la síntesis del ARN. Un promotor fuerte es aquel que provoca que se inicien rnARN a alta frecuencia. Las técnicas para dichas manipulaciones se pueden hallar descritas en Sambrook, et al. (1989, Molecular Cloning. A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York), son conocidas y están a disposición del experto en el arte. Los vectores de expresión pueden incluir, en forma no taxativa, vectores de clonación, vectores de clonación modificados, plásmidos o virus diseñados específicamente. Los vectores de expresión de mamíferos disponibles comercialmente que pueden ser adecuados, incluyen en forma no taxativa, pcDNA3.neo (Invitrogen), pcDNA3.1 (Invitrogen), pCI-neo (Promega), pLITMUS28, pLITMUS29, pLITMUS38 y pLITMUS39 (New England Biolabs), pcDNAI, pcDNAIamp (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pMCIneo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO pSV2-neo (ATCC 37593) pBPV-1(8-2) (ATCC 37110), pdBPV-MMTneo(342-12) (ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC 37199), pRSVneo (ATCC 37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUCTag (ATCC 37460), y 1ZD35 (ATCC 37565). Además, una variedad de vectores de expresión bacteriano están disponibles, que incluyen en forma no taxativa pCR2.1 (Invitrogen), pET1 1a (Novagen), lambda gtl 1 (Invitrogen), y pKK223-3 (Pharmacia). Además, se puede usar una variedad de vectores de expresión de células fúngicas, que

incluyen en forma no taxativa, pYES2 (Invitrogen) y el vector de expresión Pichie (Invitrogen). Además, se puede usar una variedad de vectores de expresión de células de insectos que incluyen en forma no taxativa pBlueBacIII y pBlueBacHis2 (Invitrogen), y pAcG2T (Pharmlngen).

Las células huésped recombinantes pueden ser procarióticas o eucarióticas, que incluyen en forma no taxativa, E. coli, bacterias fúngicas tales como levadura, células de mamíferos que incluyen, en forma no taxativa, líneas de células de origen bovino, porcino, de mono y de roedor; y células de insectos. Las especies de mamíferos que pueden ser adecuadas, -26 incluyen en forma no taxativa, células L L-M(TK-) (ATCCCCL1.3), células L L-M (ATCC CCL 1.2), Saos-2 (ATCCHTB-85), 293 (ATCCCRL1573), Raji (ATCC CCL 86), CV-1 (ATCC CCL 70), COS-1 (ATCC CRL1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), CHO-K1 (ATCC CCL 61), 3T3 (ATCC CCL 92), NIH/3T3 (ATCC CRL 1658), HeLa (ATCC CCL 2), C127I (ATCC CRL 1616), BS-C-1(ATCC CCL 26), MRC-5 (ATCCCCL171) y CPAE (ATCC CCL 209).

Aún otra mejora sobre los anticuerpos de reingeniería como se revisó anteriormente es la generación de anticuerpos monoclonales totalmente humanos. El primero comprende el uso de cepas de ratón creadas genéticamente que poseen un sistema inmune mediante el cual los genes de anticuerpos de ratón se

han inactivado y a su vez reemplazado con un repertorio de genes de anticuerpos humanos funcionales, mientras que dejan otros componentes del sistema inmune de ratón sin cambiar. Dichos ratones creados genéticamente permiten la respuesta inmune in vivo natural y el proceso de maduración de afinidad que deriva en anticuerpos monoclonales totalmente humanos, de alta afinidad. Esta tecnología nuevamente es conocida en el arte y se detalla completamente en diferentes publicaciones, que incluyen, en forma no taxativa, las Patentes Estadounidenses N° 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y miembros de la familia relacionados (cedidas a Abgenix, que revela su tecnología XenoMouse); asó como las Patentes Estadounidenses N° 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429 (cedidas a GenPharm International y disponibles a través de Medarex, bajo el paraguas de "UltraMab Human Antibody Development System" ["Sistema de Desarrollo de Anticuerpo Humano UltraMab"]). Véase también la revisión de Kellerman y Green (2002, *Curr. Opinion in Biotechnology* 13: 593-597).

Finalmente, hay técnicas a disposición del experto en el arte para la selección de fragmentos de anticuerpos de bibliotecas usando tecnologías de enriquecimiento, que incluyen en forma no taxativa presentación de fagos, presentación de ribosomas

(Hanes y Pluckthun, 1997, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94: 4937-4942), presentación bacteriana (Georgiou, et al., 1997, *Nature Biotechnology* 15: 29-34) y/o presentación de levadura (Kieckhefer, et al., 1997, *Protein Engineering* 10: 1303-1310) se pueden utilizar como alternativas para las tecnologías discutidas anteriormente para seleccionar anticuerpos de cadena simple que se unen específicamente a la citoquina blanco. Los anticuerpos de cadena simple se seleccionan de una biblioteca de anticuerpos de cadena simple producidos directamente utilizando la tecnología de fagos filamentosos. La tecnología de presentación de fagos es conocida en el arte (por ejemplo, véase la tecnología de Cambridge Antibody Technology (CAT)) revelada en las Patentes Estadounidenses N° 5.565.332; 5.733.743; 5.871.907; 5.872.215; 5.885.793; 5.962.255; 6.140.471; 6.225.447; 6.291.650; 6.492.160; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915; 6.593.081, así como otros miembros de la familia de patentes estadounidenses, o solicitudes de patentes se basan en la presentación de prioridad GB 9206318, presentada el 24 de mayo de 1992; véase también Vaughn, et al. 1996, *Nature Biotechnology* 14: 309-314). Los anticuerpos de cadena simple también se pueden diseñar y construir usando tecnologías de ADN recombinante, tales como el método de ampliación de ADN (por ejemplo, PCR), o posiblemente usando cADN de hibridoma respectivo como plantilla. Los anticuerpos de una sola cadena pueden ser

monoespecíficos o biespecíficos; bivalentes o tetravalentes. Una secuencia de nucleótido que codifica un anticuerpo de cadena simple se puede construir usando síntesis de nucleótido manual o automática, clonada en una construcción de expresión usando métodos de ADN recombinante estándar, e introducida en una célula para expresar la secuencia de codificación, como se describe a continuación.

La presente invención también se relaciona con una composición farmacéutica basada en anticuerpos que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo similar a 13C3, o una versión madurada de afinidad que provee una opción de tratamiento profiláctico o terapéutico para inhibir la formación de fibrillas y/o placas seniles asociada a la enfermedad de Alzheimer. La composición farmacéutica basada en anticuerpos de la presente invención se puede formular mediante cualquier cantidad de estrategias conocidas en el arte (por ejemplo, véase McGoff y Scher, 2000, *Solution Formulation of Proteins/Peptides*: En McNally, E.J., ed. Protein Formulation and Delivery. New York, NY: Marcel Dekker; pp. 139-158; Akers y Defilippis, 2000, *Peptides and Proteins as Parenteral Solutions*. En: Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins. Philadelphia, PA: Talyor y Francis; pp. 145-177; Akers, et al., 2002, *Pharm. Biotechnol.* 14:47-127). Una composición farmacéuticamente aceptable adecuada para la

administración a pacientes contiene una cantidad eficaz del anticuerpo en una formulación que retiene la actividad biológica mientras que promueve la estabilidad máxima durante el almacenamiento dentro de una gama de temperatura aceptable. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir, según la formulación deseada, diluyentes farmacéuticamente aceptables, portadores farmacéuticamente aceptables y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de tales vehículos usados comúnmente para formular composiciones farmacéuticas para la administración a humanos o animales. El diluyente se selecciona de manera tal que no afecte la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina con tampón de fosfato fisiológico, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. La cantidad de un excipiente que es útil en la composición o formulación farmacéutica de esta invención es una cantidad que sirve para distribuir uniformemente el anticuerpo en toda la composición de manera tal que se pueda dispersar uniformemente cuando se administre a un sujeto que la necesita. Puede servir para diluir el anticuerpo a una concentración que provee los resultados paliativos o curativos beneficiosos deseados mientras que al mismo tiempo minimiza todos los efectos colaterales adversos que podrían aparecer a partir de una concentración demasiado alta. También puede tener un efecto de preservación. Por lo

tanto, para el anticuerpo que tiene alta actividad fisiológica, se emplea mayor cantidad del excipiente. Por otra parte, para todos los ingredientes que presentan una actividad fisiológica más baja, se emplea una menor cantidad del excipiente. En general, la cantidad de excipiente en la composición es entre el 50% en peso (p) y el 99,9% en peso de la composición total. Si el anticuerpo presenta una actividad fisiológica particularmente baja, la cantidad de excipiente puede ser tan poco como el 1% en peso. Por otra parte, para un anticuerpo que tiene una actividad fisiológica particularmente alta, la cantidad del excipiente puede ser entre el 98,0% y el 99,9% en peso. Además, el anticuerpo o anticuerpos se puede administrar en la forma de un "derivado químico" (una molécula que contiene grupos químicos adicionales que normalmente no forman parte de la molécula de base). Dichos grupos pueden mejorar la solubilidad, semivida, absorción, etc. del agente biológico. Alternativamente, estos grupos pueden atenuar los efectos colaterales indeseables del anticuerpo. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir macromoléculas metabolizadas lentamente, grandes tales como proteínas, polisacáridos, ácido polilácticos, ácidos poliglicólicos, y copolímeros (tales como sefaroza con funcionalidad de látex, agarosa, celulosa, y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, y agregados de lípidos (tales como gotas de aceite o liposomas).

Además, estos portadores pueden funcionar como agentes inmunoestimulantes (es decir, coadyuvantes). Para la administración parenteral, se pueden administrar agentes de la invención como dosificaciones inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un portador farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua aceites, solución salina, glicerol, o etanol. Además, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, surfactantes, sustancias tampones de pH y similares pueden estar presentes en las composiciones. Otros componentes de las composiciones farmacéuticas son aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de maní, aceite de soja, y aceite mineral. En general, los glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol son portadores líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables.

La formulación de anticuerpo puede estar en forma líquida o en forma sólida. Una formulación sólida generalmente se liofiliza y se coloca en solución antes de la administración para una sola o varias dosificaciones. Las formulaciones no deben exponerse a temperaturas o pH extremos de manera tal que se evite la desnaturalización térmica. Por lo tanto, es esencial formular una composición de anticuerpo de la presente invención dentro de una gama de pH biológicamente relevante.

Se indica una solución con tampón para mantener una gama de pH correcta durante el almacenamiento, especialmente para formulaciones líquidas almacenadas durante períodos de tiempo más prolongados entre la formulación y la administración. Hasta la fecha, tanto las formulaciones líquidas como las sólidas requieren un almacenamiento a temperaturas más bajas (habitualmente de 2°C-8°C) para retener la estabilidad durante períodos más largos. Las composiciones de anticuerpos formuladas especialmente formulaciones líquidas, pueden contener un bacteriostato para prevenir o minimizar la proteólisis durante el almacenamiento, que incluye en forma no taxativa a concentraciones eficaces (habitualmente el 1% p/v) de alcohol bencílico, fenol, m-cresol, clorobutanol, metilparabeno, y/o propilparabeno. Un bacteriostato puede estar contraindicado para algunos pacientes. En consecuencia, una formulación liofilizada se puede reconstituir en una solución que contiene o no contiene dicho componente. Otros componentes se pueden agregar a una formulación de anticuerpo líquida o sólida, que incluyen en forma no taxativa azúcares como un crioprotector (que incluyen en forma no necesariamente taxativa polihidroxi hidrocarburos tales como sorbitol, manitol, glicerol y dulcitol y/o disacáridos tales como sacarosa, lactosa, maltosa o trehalosa) y, en algunos casos, una sal relevante (que incluye en forma no taxativa NaCl, KCl o LiCl). Dichas formulaciones de anticuerpos, especialmente formulaciones líquidas nominadas

para almacenamiento de largo plazo, están basadas en una gama útil de somolaridad total para promover la estabilidad de largo plazo a temperatura de 2°C-8°C, o más alta, mientras que también hacen a la formulación útil para la inyección parenteral. Una gama eficaz de osmolaridad total (la cantidad total de moléculas en solución) es de 200 mOs/L a 800 mOs/L. Será evidente que la cantidad de un citoprotector, tal como sacarosa o sorbitol, depende de la cantidad de sal en la formulación para que la osmolaridad total de la solución permanezca dentro de una gama apropiada. En consecuencia una formulación libre de sal puede contener del 5% al 25% de sacarosa, con una gama preferida de sacarosa del 1% al 15%, donde una concentración de sacarosa especialmente preferida en una formulación libre de sal es del 10% al 12%. Alternativamente, una formulación basada en sorbitol libre de sal puede contener sorbitol dentro de una gama del 3% al 12%, donde una gama preferida del 4% al 7% y una gama especialmente preferida es del 5% al 6% de sorbitol en una formulación libre de sal. Las formulaciones libres de sal naturalmente asegura gamas aumentadas del crioprotector respectivo para mantener niveles de osmolaridad eficaces. Estas formulaciones pueden también contener un catión divalente (que incluye en forma no taxativa $MgCl_2$, $CaCl_2$ y $MnCl_2$); y un surfactante no iónico (que incluye en forma no taxativa Polisorbato 80 (Tween 80®), Polisorbato 60 (Tween 60®), Polisorbato 40 (Tween 40®) y Polisorbato 20 (Tween 20®), éteres

de polioxietileno alquilo, que incluyen en forma no taxativa Brij 58®, Brij 35®, así como otros tales como Triton X-100®, Triton X 114®, NP40®, Span 85 y la serie de Pluronic de surfactantes no iónicos (por ejemplo, Pluronic 121)). Todas las combinaciones de tales componentes, que incluyen la inclinación probable de un bacteriostato, pueden ser útiles para cubrir las formulaciones que contienen anticuerpos. La composición de anticuerpo de la presente invención también puede ser un "derivado químico", que describe un anticuerpo que contiene grupos químicos adicionales que normalmente no forman parte de la molécula de inmunoglobulina (por ejemplo, pegilación). Dichos grupos pueden mejorar la solubilidad, la semivida, la absorción, etc. de la molécula de base. Alternativamente, los grupos pueden atenuar los efectos colaterales indeseables de la molécula de base o reducir la toxicidad de la molécula de base.

Numerosos ejemplos de diferentes portadores, diluyentes, excipientes y similares son conocidos en el arte y se revelan en referencias citadas anteriormente, así como en *Remington 's 20 Pharmaceutical Sciences* (18th ed.; Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990), cuyo contenido se incorpora en la presente como referencia. En resumen, se apreciará que los portadores, excipientes y otros agentes adecuados se pueden incorporar para formular las composiciones farmacéuticas para proporcionar la transferencia, suministro, tolerancia mejorados y similares. Los

métodos para incorporar el agente biológico y/o el ingrediente(s) activo adicional en el portador son conocidos para un experto en el arte y dependen de la naturaleza del agente biológico y de la naturaleza del portador seleccionado por una persona que practica la presente invención. La unión iónica, la encapsulación de gel o el atrapamiento físico dentro del portador, la iontoforesis y el remojo del portador en una solución del agente biológico son ejemplos adecuados contemplados en la formulación de una composición farmacéutica que se debe usar para practicar los métodos de tratamiento revelados. Alternativamente, el portador puede ser poco más que un diluyente para el agente biológico. Las formulaciones pueden incluir por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, gelatina, ceras, aceites, lípidos, bases de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite, emulsiones carbonera (polietilenglicoles de una variedad de pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen carbonera. El régimen de dosificación que utiliza los compuestos de la presente invención se selecciona de acuerdo con una variedad de factores que incluyen el tipo, especie, edad, peso, sexo y condición médica del paciente; la severidad de la condición que se debe tratar; la vía de administración; la función renal, hepática y cardiovascular del paciente; y el agente biológico particular de él empleado. Un médico o veterinario con conocimiento ordinario del arte podrá determinar fácilmente y

prescribir la cantidad eficaz del fármaco requerido para prevenir, contrarrestar o detener el progreso de la condición. La precisión óptima en lograr concentraciones de fármaco dentro de la gama que produce eficacia sin toxicidad requiere un régimen basado en la cinética de la disponibilidad del fármaco a los sitios blanco. Esto consiste en la consideración de la distribución, el equilibrio, y la eliminación de un fármaco. Cualquiera de las formulaciones precedentes puede ser apropiada en tratamientos y terapias de acuerdo con la presente invención, siempre que el ingrediente activo de la formulación no sea inactivado por la formulación y que la formulación sea fisiológicamente compatible.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar al huésped de cualquier manera, estrategia y/o combinación existente en el arte en cantidades suficientes para ofrecer un tratamiento terapéutico contra la enfermedad de Alzheimer. Estas composiciones se pueden proveer al individuo mediante una variedad de vías conocidas en el arte, especialmente vías parenterales, que incluyen en forma no taxativa las vías parenterales tales como administración intravenosa (IV), intramuscular (IM); o subcutánea (SC), donde la administración IV es la norma dentro del arte de la administración de anticuerpos terapéuticos. Estas composiciones se pueden administrar como dosis por separado o varias dosis (es

decir, la administración del anticuerpo en tiempos escalonados manteniendo la condición estéril de la formulación a través del régimen de tratamiento). El régimen de dosificación que utiliza los compuestos de la presente invención se selecciona de acuerdo con una variedad de factores que incluyen el tipo, la especie, la edad, el peso, el sexo y la condición médica del paciente (tal como un paciente humano); la severidad de la condición que se debe tratar; la vía de administración; la función renal, hepática y cardiovascular del paciente; y el anticuerpo particular de él empleado. Un médico o veterinario con conocimientos ordinarios del arte podrán determinar fácilmente y prescribir la cantidad terapéutica eficaz del anticuerpo. La precisión óptima en obtener concentraciones del anticuerpo dentro de la gama que produce eficacia sin toxicidad requiere un régimen basado en la cinética de la disponibilidad de fármaco a los sitios blanco. Esto consiste en una combinación de la distribución, el equilibrio y la eliminación de un fármaco. Los anticuerpos descritos en la presente pueden usarse solos a dosificaciones apropiadas. Alternativamente, la coadministración o la administración secuencial de otros agentes pueden ser deseables. Es posible presentar un régimen de dosificación terapéutica para los anticuerpos de la presente invención en conjunto con la administración de regímenes profilácticos o terapéuticos. Un régimen de dosificación eficaz varía según muchos factores diferentes, que incluyen medios de administración, sitio blanco,

estado fisiológica del paciente, ya sea que el paciente sea humano o un animal, otras medicaciones administradas, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Para la administración de un anticuerpo similar a 13C3, la dosificación está en la gama de 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg del peso corporal del huésped. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, los depósitos amiloides aparecen en el cerebro, agentes de la invención también se pueden administrar en conjunto con otros agentes que aumentan el pasaje de los agentes de la invención a través de la barrera de sangre-cerebro.

Otro agente referido a los regímenes de suministro y dosificación para una composición de anticuerpo similar a 13C3 de la presente invención se relaciona con el suministro de fármacos a través de vías parenterales, que pueden incluir dispositivos no inyectables e inyectables. Generalmente, también se pueden preparar composiciones inyectables se preparan como soluciones o suspensiones líquidas; formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar o encapsular en liposomas o micropartículas tales como polilactida, poliglicolida, o copolímero para el efecto coadyuvante mejorado, como se discutió anteriormente (véase Langer, 1990, *Science* 249: 1527-1523; y Hanes, 1997, *Advanced*

Drug Delivery Reviews 28: 97-119). Los agentes de esta invención se pueden administrar en la forma de una inyección de depósito o preparación de implante que se pueden formular de manera tal que permita una liberación sostenida o pulsátil del ingrediente activo.

Las realizaciones específicas incluyen microesferas de PLGA, como se discute en la presente y como se conoce también en el arte, así como vehículos no degradables basados en polímeros que comprenden poli (etileno con acetato de vinilo; PEVAc). Además, la liberación controlada y el suministro localizado de productos terapéuticos basados en anticuerpos se revisan en Grainger, et al., 2004, *Expert Opin. Biol. Ther.* 4(7): 1029-1044), que se incorporan en la presente como referencia en su totalidad. Las microcápsulas adecuadas capaces de encapsular el anticuerpo también pueden incluir hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de metacrilato de polimetilo preparadas mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial. Véase la publicación de PCT WO 99/24061 titulada "Method for Producing IGF-1 Sustained-Release Formulations," ["Método para Producir Formulaciones de Liberación Sostenida de IGF-1"], en donde una proteína se encapsula en microcápsulas de PLGA, esta referencia que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. Además, también se pueden usar microemulsiones o sistemas de

suministro de fármaco coloidal tales como liposomas y microesferas de albúmina. Otras composiciones de liberación sostenida preferidas emplean un bioadhesivo para retener el anticuerpo en el sitio de administración. Como se indicó anteriormente, la formulación de liberación sostenida puede comprender un polímero biodegradable en el cual se dispone el anticuerpo, que puede proporcionar la liberación no inmediata. Los dispositivos no inyectables se pueden describir en la presente como un "implante", "implante de depósito farmacéutico", "implante de depósito", "depósito no inyectable" o algún término similar. Los implantes de depósito comunes pueden incluir, en forma no taxativa, dispositivos poliméricos biodegradables y no biodegradables sólidos (tales como un polímero extendido o un dispositivo con forma de varilla coaxial), así como numerosos sistemas de bomba también conocidos en el arte. Los dispositivos inyectables se separan en inyecciones de bolo (liberación y disipación) e inyecciones de repositorio o de depósito, que proveen un depósito de almacenamiento en el sitio de la inyección, que permite la liberación sostenida del agente biológico en el tiempo. Un implante de depósito se puede atar quirúrgicamente al punto de suministro de manera tal que proporcione un depósito adecuado para la liberación prolongada del anticuerpo en el tiempo. Dicho dispositivo es capaz de transportar la formulación de fármaco en aquellas cantidades que se requieren terapéutica o

profilácticamente para el tratamiento durante el período preseleccionado. El implante de depósito también puede proporcionar protección a la formulación desde la degradación mediante procesos corporales (tales como proteasas) durante el tratamiento. Como se sabe en el arte, el término "liberación sostenida" se refiere a la liberación gradual (continua o discontinua) de tal agente desde la matriz polimérica de bloque durante un período de tiempo prolongado. Independientemente del dispositivo específico, la liberación sostenida de la composición de anticuerpo similar a 13C3 deriva en una concentración biológicamente eficaz, local del anticuerpo. Una liberación sostenida del agente(s) biológico es durante un período de un solo día, varios días, una semana o más; pero más probablemente durante un mes o más, o hasta seis meses, según la formulación. Los polímeros naturales o sintéticos conocidos en el arte son útiles como un implante de depósito debido a características tales como la cinética de degradación versátil, seguridad, y biocompatibilidad. Estos copolímeros se pueden manipular para modificar la farmacocinética del ingrediente activo, proteger al agente del ataque enzimático, así como de la degradación en el tiempo en el sitio de unión o de inyección. El experto en el arte entenderá que existen amplias enseñanzas en el arte para manipular las propiedades de estos polímeros, que incluyen el proceso de producción respectivo, los catalizadores usados, y el peso molecular final del implante de depósito o la

inyección de depósito de liberación sostenida. Los polímeros naturales incluyen en forma no taxativa proteínas (por ejemplo, colágeno, albúmina o gelatina); polisacáridos (celulosa, amidón, alginatos, quitina, quitosan, ciclodextrina, dextran, ácido hialurónico) y lípidos. Los polímeros sintéticos biodegradables pueden incluir en forma no taxativa diferentes poliésteres, copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman et al., 1983, Biopolymers 22:547-556), polilactidas ([PLA]; Patente Estadounidense N° 3.773.919 y EP 058.481), polilactato poliglicolato (PLGA) tal como polilactida con glicolido (véanse por ejemplo, las Patentes Estadounidenses N° 4.767.628 y 5.654.008), poliglicolido (PG), polietilenglicol (PEG) conjugados de poli (α -hidroxi ácidos), poliortoésteres, poliaspirinas, polifosfagenos, vinilpirrolidona, alcohol polivinílico (PVA), PVA-g-PLGA, copolímero de PEGT-PBT (poliactivo), metacrilatos, poli(N-isopropilacrilamida), PEO-PPO-PEO (pluronicos), copolímeros de PEO-PPO-PAA, PLGA-PEO-PLGA, poliortoésteres (POE), o cualquier combinación de ellos que se describieron anteriormente (véase por ejemplo, la Patente Estadounidense N° 6.991.654 y la Solicitud de Patente Estadounidense N° 20050187631, cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad, hidrogeles (véase, por ejemplo, Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277; Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105, etileno-

acetato de vinilo no degradable (por ejemplo, discos de etileno y acetato de vinilo y poli(etileno con acetato de vinilo)), copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico degradable tales como Lupron DepotTM, ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP 133.988), geles de ácido hialurónico (véase, por ejemplo, la Patente Estadounidense N° 4.636.524), suspensiones de ácido algínico, poliortoésteres (POE), y similares. La polilactida (PLA) y sus copolímeros con glicolido (PLGA) han sido conocidos en el arte desde la comercialización de Lupron DepotTM, aprobado en 1989 como la primera formulación de liberación sostenida parenteral que utilizó polímeros de PLA. Otros ejemplos de productos que utilizan PLA y PLGA como excipientes para alcanzar la liberación sostenida del ingrediente activo precedente incluyen Atridox (PLA; enfermedad periodontal), Nutropin Depot (PLGA; con hGH), y Trelstar Depot (PLGA; cáncer de próstata). Otros polímeros sintéticos incluyen en forma no taxativa poli(c-caprolactona), poli3-hidroxibutirato, poli (ácido β -málico) y poli (dioxanona)]; polianhídridos, poliuretano (véase WO 2005/013936), poliamidas, ciclodextranos, poliortoésteres, alcohol n-vinílico, óxido de polietileno/tereftalato de polietileno, polifosfazeno, polifosfato, polifosfonato, poliortoéster, policianoacrilato, polietilenglicol, polidihidropiran, y poliacetal. Los dispositivos no biodegradables incluyen en forma no taxativa

diferentes derivados de celulosa (carboximetilcelulosa, acetato de celulosa, propionato de acetato de celulosa, etil celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa) implantes basados en silicio (polidimetilsiloxano), polímeros acrílicos, (polimetacrilato, polimetilmetacrilato, polihidroxi(etilmetilacrilato), así como polietileno con (acetato de vinilo), poloxámero, polivinilpirrolidona, poloxamina, polipropileno, poliamida, poliacetal, poliéster, polietileno-clorotrifluoroetileno, politetrafluoroetileno (PTFE o "TeflonTM"), goma de estireno butadieno, polietileno, polipropileno, óxido de polifenileno-poliestireno, poli-a-cloro-p-xileno, polimetilpenteno, polisulfona y polímeros bioestables relacionados. Los portadores adecuados para formulaciones de depósitos de liberación sostenida incluyen, en forma no taxativa, micoesferas, películas, cápsulas, partículas, geles, recubrimientos, matrices, obleas, pastillas u otras composiciones de suministro farmacéutico. Ejemplos de dichas formulaciones de liberación sostenida se describieron anteriormente. Véanse también las Patentes Estadounidenses N° 6.953.593; 6.946.146; 6.656.508; 6.541.033; y 6.451.346, el contenido de cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia. La forma de dosificación debe ser capaz de transportar la formulación de fármaco en aquellas cantidades y concentración que se necesitan terapéuticamente para el tratamiento durante el período preseleccionado y debe proveer

protección suficiente ala formulación desde la degradación por procesos corporales durante el tratamiento. Por ejemplo, la forma de dosificación puede estar rodeada por un exterior hecho de un material que tiene propiedades para proteger contra la degradación de procesos metabólicos y el riesgo de, por ejemplo, filtración, rajadura, rotura o distorsión. Esto puede impedir la expulsión del contenido de la forma de dosificación e una forma no controlada bajo esfuerzos a los cuales se sometería durante su uso, por ejemplo, debido a las fuerzas físicas ejercidas sobre el dispositivo de liberación de fármaco como resultado de la articulación de unión normal y otros movimientos del sujeto o por ejemplo, en dispositivos de suministro de fármaco convectivo, fuerzas físicas asociadas a la presión generada dentro del depósito. El depósito de fármaco u otro medio para contener el fármaco también debe ser de aquel material que impide reacciones no deseadas con la formulación de agente activo, y es preferentemente biocompatible (por ejemplo, donde la forma de dosificación se implanta, es sustancialmente no reactivo con respecto al cuerpo o fluidos corporales de un sujeto). Generalmente, el agente(s) biológico respectivo se administra a un individuo durante por lo menos 12 horas hasta por lo menos una semana, y más probablemente a través de un implante diseñado para suministrar un fármaco durante por lo menos 10, 20, 30, 100 días o por lo menos 4 meses, o por lo menos 6 meses o más, según sea necesario. El anticuerpo similar

a 13C3 se puede suministrar a aquellos índices de volumen relativamente bajos, por ejemplo de 0,001 ml/día a 1 ml/día de manera tal que minimice la perturbación o el trauma del tejido cerca del sitio donde se libera la formulación. La formulación se puede liberar a una velocidad de, según el agente(s) biológico específico, a una dosis baja, por ejemplo, de 0,01 µg/h o 0,1 µg/h, 0,25 µg/h, 1 µg/h, generalmente hasta 200 µg/h, o la formulación se suministra a un índice de volumen bajo, por ejemplo a un índice de volumen de 0,001 ml/día a 1 ml/día, por ejemplo, desde 0,1 microgramos por día hasta 20 miligramos por día. La dosificación depende de numerosos factores tales como la potencia, biodisponibilidad, y toxicidad del ingrediente activo (por ejemplo, anticuerpo de IgG) usado y los requerimientos del sujeto.

Éstos y otros objetivos, ventajas y características de la presente invención se harán evidentes para los expertos en el arte luego de leer los detalles de la metodología y las composiciones que se exponen en forma más completa a continuación.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: PREPARACIÓN DE LA FORMA PROTOFIBRILAR DE BETA AMILOIDE (Aβ42)

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

Diferentes formas de la proteína de A β 42 se representan mostrando su capacidad como un monómero o dímero para asociarse juntas para formar un oligómero de alto peso molecular (protofibrilla) (Figura 1). Otro agregado de las protofibrillas solubles crea una forma insoluble de la proteína, mientras que las protofibrillas se pueden disociar nuevamente hacia una forma de peso molecular más bajo.

Para purificar la forma protofibrilar de A β desde las proteínas de bajo peso molecular, se fraccionaron muestras con un sistema

de cromatografía de AKTA usando una columna de exclusión de tamaño de Superdex 75. La Figura 2A muestra que sin incubar los péptidos sintéticos de A β 42 a temperatura ambiente, no hay ningún agregado de oligómeros para formar las protofibrillas. La Figura 2B ilustra que después de una incubación de 4 horas de los péptidos sintéticos de A β 42, la purificación de SEC posterior muestra una fracción de protofibrilla definitiva.

EJEMPLO 2: GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CON ESPECIFICIDAD PARA A β PROTOFIBRILAR

Los anticuerpos 13C3, 19A6 y 1D1 se crearon inmunizando ratones Blab/c con la proteína de A β protofibrilar usando un protocolo conocido en el arte. (Harlow, et al. Cold Spring Harbor Laboratory.(1988)). Los bazo se extrajeron y se fusionaron con células de mieloma SP2 en varias placas de 96 receptáculos. Los cultivos de fusión se monitorearon por el crecimiento y los sobrenadantes se evaluaron por su capacidad de unirse a la fracción protofibrilar mediante inmunoensayos de captura de anticuerpos.

EJEMPLO 3: CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CON ESPECIFICIDAD PARA A β PROTOFIBRILAR

Se usaron ensayos de captura de anticuerpos para caracterizar adicionalmente los anticuerpos monoclonales producidos desde

los hibridomas (13C3, 19A6, y 1D1). A placas de microtítulos, 50 μ l de 2 μ g/ml de solución de proteína de A β 42 protofibrilar se agregó a cada receptáculo y las placas se incubaron a 4°C toda la noche. Después de la incubación, la solución de antígeno residual se removió y se lavó con solución de PBS. Se agregaron diluciones en serie de los sobrenadantes de hibridomas a las placas que contienen el antígeno unido y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Esta solución de anticuerpo primario se removió y los receptáculos se lavaron nuevamente con solución de PBS. Luego se agregó un anticuerpo secundario marcado con enzima y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la remoción de la solución de anticuerpo secundario, un sustrato cromógeno específico para la enzima conjugada, se agregó a la reacción y la detección del anticuerpo capturado produjo resultados cuantitativos.

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

Las Figuras 3A y B ilustran las formas de protofibrilla (PF) y de bajo peso molecular (LMW) del péptido de A β 42 usadas para

ensayar la especificidad del anticuerpo 13C3 en inmunoensayos de captura de anticuerpos. Específicamente, la Figura 3A ilustra el gráfico generado a partir de los ELISA que muestran que el anticuerpo 13C3 es específico para la forma de protofibrilla (PF) de A β 42 y no reconoce las formas de bajo peso molecular (LMW) de la proteína. La Figura 3B ilustra los datos de ELISA con el anticuerpo 4G8 disponible comercialmente, que muestra que reconoce las formas de bajo peso molecular y de protofibrilla de la proteína de A β 42.

EJEMPLO 4: ESPECIFICIDAD DE ANTICUERPOS MONOCLONALES A LA FORMA DE PROTOFIBRILLA DE A β 42 USANDO RESONANCIA DE PLASMÓN SUPERFICIAL (bIACORE)

Los anticuerpos monoclonales purificados enumerados en la Tabla 1 (a continuación), se inmovilizaron en un chip de sensor de BIAcore de acuerdo con protocolos publicados. (Nice, *et al.* BioEssays 21: 339-352 (1999)). La alta sensibilidad de la respuesta óptica de BIAcore cuantifica un cambio en la reflectividad y se genera una respuesta de línea base para el ligando solo. El análisis de interacción se realiza como los analitos, la forma de LMW o la forma de PF de A β 42, se inyectan en solución sobre el chip del sensor y el cambio en la resonancia de plasmón superficial genera una respuesta que identifica la especificidad de la capacidad de cada anticuerpo

de unirse a Aβ42 de LMW y de PF. Los anticuerpos 13C3 y 19A6 todos se unieron a la forma de PF de Aβ42 con más alta especificidad que la forma de LMW. De todos los anticuerpos usados en este experimento, los anticuerpos comercialmente disponibles presentaron más alta especificidad para el Aβ42 de LMW sobre la forma de PF de Aβ42, como lo indica la relación de unión a PF / unión a LMW.

Tabla 1

Nombre	Epítotope	Isotipo	Origen	Análisis de Unión de BIACORE		
				LMW	PF	Relación (PF/LMW)
1D1	estructura	IgG1	Raveich	23.2	122.3	5.3
13C3	estructura	IgG1	Raveich	25	124.8	5.0
19A6	estructura	IgG3	Raveich			
3D6	Aβ 1-5	IgG2b	Elan Pharmaceuticals	424.6	402.7	0.9
4G8	Aβ 17-22	IgG2b	Senetek Inc.	228.6	340.3	1.5
6E10	Aβ 3-8	IgG2b	Senetek Inc.	400.1	541.1	1.4
82E1	Aβ 1-17	IgG1	IBL	69.9	68.4	1.0

El Análisis de Resonancia de Plasmón Superficial que mostró mediante sensograma que 13C3 (Figura 4B) no se une a las formas de LMW de la proteína de Aβ42. Sin embargo, el 4G8 (Figura 4A) muestra una curva de asociación/disociación estándar para la proteína de Aβ42 de LMW. La IgG1 control de isotipo de anticuerpo (Figura C) no se une al Aβ de LMW tampoco. Los sistemas de BIAcore que usan el principio de detección de Resonancia de Plasmón Superficial, se usaron en estos experimentos. Los datos de especificidad de unión apra el anticuerpo 19A6 mostraron que 19A6 tuvo una relación de unión de 5,8, que es similar a aquella de 13C3 a una relación de 5,3.

EJEMPLO 5: MAPEO DE EPÍTOPES DEL ANTICUERPO 13C3

El mapeo de los epítopes de 13C3, 1D1 y 19A6 se realizó usando el sistema de RepliTope Microarrays (JPT Peptide Technologies GmbH) de acuerdo con el protocolo publicado. (Korth, et al. 390: 74 (1997)). Cada punto en la micromatriz contiene un péptido de 13 aminoácidos de A β 42 donde cada desplazamiento en la posición sobre la micromatriz representa un desplazamiento de aminoácido (del extremo de N al extremo de C), es decir SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24...SEQ ID NO: 51; y SEQ ID NO: 52. A continuación se enumeran los péptidos y su secuencia de aminoácidos precisa, que corresponde a su posición en la matriz del portaobjetos. Una vez que los péptidos se fusionan al RepliTope Microarray, las muestras se incuban con el anticuerpo 13C3 y posteriormente se marcan con un secundario que se conjuga a un marcador de quimioluminiscencia elegido. Los puntos que producen una señal representan los sitios de unión al epítipo sobre la proteína por el anticuerpo.

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His (SEQ ID NO: 23)
 Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His (SEQ ID NO: 24)
 Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln (SEQ ID NO: 25)
 Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys (SEQ ID NO: 26)
 Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu (SEQ ID NO: 27)

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

La Figura 5A ilustra un análisis dot blot de un experimento de RepliTope Microarray que identifica los epítopes de los anticuerpos, 13C3, 1D1 y 4G8 en el péptido de A β 1-42. El anticuerpo unido está representado por una señal quimioluminiscente. La Figura 5B ilustra la secuencia de aminoácidos de A β 1-42 que muestra los segmentos de polipéptido de los epítopes de 13C3 cuando ocurren en la secuencia. El anticuerpo 1D1 muestra los mismos epítopes que el 13C3 mientras que el anticuerpo 4G8 identifica un epítopo diferente.

EJEMPLO 6: CARACTERIZACIÓN DE ESPECIFICIDAD DE 13C3

La Figura 6 ilustra fracciones de la cromatografía de exclusión de tamaño de los sobrenadantes de la línea de células TPA2, una línea de células oligoméricas de A β segregadora. Los ensayos de captura de anticuerpos se usaron para caracterizar adicionalmente la unión del anticuerpo 13C3 con las fracciones de protofibrilla y de bajo peso molecular desde TPA2 purificado por SEC. A placas de microtítulos, se agregó 100 μ l de una dilución 1:100 de cada fracción a cada receptáculo y las placas se incubaron a 4°C toda la noche. Después de la incubación, la solución de antígenos residuales se removió y se lavó con solución de PBS. Las diluciones en

serie de los sobrenadantes de 13C3 se agregaron a las placas que contienen el antígeno unido y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Esta solución de anticuerpo primario se removió y los receptáculos se lavaron nuevamente con solución de PBS. Un anticuerpo secundario marcado con enzima luego se agregó y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la remoción de la solución de anticuerpo secundario, un sustituto cromógeno específico para la enzima conjugada, se agregó a la reacción y la detección del anticuerpo capturado produjo resultados cuantitativos. Este ensayo identificó que la especificidad del anticuerpo 13C3 reconoce solamente la fracción protofibrilar mientras que el anticuerpo 4G8 reconoce todas las fracciones. La línea de células TPA2 fue proporcionada por el Dr. Dennis J. Selkoe, de la Facultad de Medicina de Harvard.

EJEMPLO 7: CARACTERIZACIÓN DE REACTIVIDAD DE 13C3 MEDIANTE EM

El método de manchado se realizó usando un protocolo estándar. (Brenner, *et al.* Biochim. Biophys. Ada 34, 103-110 (1959)). Un pequeño volumen (10 microlitros) de 0,2 mg/ml de solución de protofibrillas se aplicó a rejillas de Formvar recubiertas con carbono (400 mesh) durante 2 minutos. Luego las rejillas se bloquearon en 1% BSA y se incubaron con el anticuerpo 13C3 y luego se incubaron nuevamente con un anticuerpo secundario

conjugado a oro coloidal. Las muestras se mancharon negativamente colocando sobre 2 gotas sucesivas de 2% de ácido fosfotúngstico durante 30 segundos cada uno. El exceso de mancha se retiró con papel de filtro, las rejillas se secaron con aire, y se observaron sobre un microscopio electrónico de transmisión JEOL 100CX a 80 kV. Se registraron imágenes sobre negativos Kodak 4489 de formato grande y se digitalizaron sobre un scanner de lecho plano.

Las imágenes de IEM (Microscopio Inmuno-Electrónico) muestran la especificidad de la unión del clon de anticuerpo anti-A β 13C3 a fibras de A β 42 (Figuras 7B y 7C), mientras que el anticuerpo control de isotipo, IgG1 no presenta ninguna unión (Figura 7A). El anticuerpo secundario se conjuga a una partícula de oro coloidal.

EJEMPLO 8: TRATAMIENTO DE 13C3 DE UN MODELO DE RATÓN DE AD HUMANA

El anticuerpo monoclonal 13C3 se usó para tratar placas de A β en un modelo de ratón de Enfermedad de Alzheimer, TgCRND8. El ratón contiene el transgen de cADN APP695 humano, que acelera la deposición de placas de A β amiloide en el cerebro de ratón, que aparecen dentro de un mes de edad. A un grupo de muestra

de 5 ratones TgCRND8 de cinco semanas de edad se les dieron inmunizaciones del anticuerpo monoclonal 13C3 a una concentración de 10 mg/kg de ratón una vez por semana durante siete semanas. A un segundo grupo de 5 ratones TgCRND8, se les dio el curso de tratamiento, aunque se administró un anticuerpo de IgG1 control de isotipo. Los experimentos se repitieron con tratamientos dos veces por semana en lugar de una vez por semana.

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

Se trataron cortes de cerebros criopreservados de ratones TgCRND8, con anticuerpos monoclonales 13C3 o de IgG1. las Figuras 8A y 8B ilustran diferencias en la cantidad de las placas de A β amiloide entre cada anticuerpo respectivo.

Los ensayos T estadísticos muestran que el tratamiento con anticuerpos 13C3 una vez por semana reduce las placas de A β amiloide en el modelo de enfermedad de Alzheimer (Figura 9A). Sin embargo, los tratamientos dos veces por semana (Figura 9B) muestran el mismo nivel de reducción de placas.

La totalidad de los ratones TgCRND8 fueron provistos por el Dr. David Westaway de la Universidad de Toronto.

EJEMPLO 9: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS REGIONES VARIABLES DE 13C3 DE MAB

La región variable de cadena pesada de IgG y la región de cadena liviana de IgG se clonaron desde hibridomas de 13C3. Ambas secuencias de cadena pesada y liviana (Figura 10) se analizaron usando VBASE2 (<http://www.vbase2.org>), una base de datos de genes similares a germen del lugar de inmunoglobulina de humano y ratón extraída de las bibliotecas de datos EMBL-Bank y Ensembl. (Retter et al. Nucleic Acids Res. 33:D671-4 (2005)). Los resultados para el análisis identificaron que las regiones variables de cadena pesada y liviana eran de inmunoglobulina recién identificada pero tenían un 73% y 81% de identidad, respectivamente, a otras regiones variables de inmunoglobulina en la base de datos. En estas secuencias contra estas bases de datos también se identificaron las Regiones de Marco (FWR) y la Regiones de Determinación de Complementariedad (CDR). Los resultados se variaron sólo ligeramente cuando las secuencias se analizaron contra la base de datos de VBASE, RABAT, y IMGT/LIGM.

EJEMPLO 10: LA ADMINISTRACIÓN PERIFÉRICA AGUDA DE 13C3 EN RATONES TRANSGÉNICOS APP NO DERIVA EN UN AUMENTO EN A β EN PLASMA A DIFERENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN DEL ANTICUERPO DE REFERENCIA 3D6

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

La administración de 3D6, un anticuerpo contra todos los conformeros de A β , deriva en un importante aumento en A β de plasma, probablemente protegiendo a las moléculas de A β de la degradación. Este efecto se usó para sugerir la hipótesis del "hundimiento periférico" potencial como un mecanismo de acción de la inmunoterapia anti-A β (Demattos et al., 2001, PNAS 17:8850). A diferencia de 3D6, la administración de 13C3 no

deriva en ningún aumento en los niveles de A β de plasma. Esto coincide con las propiedades de 13C3, un anticuerpo que es específico para las formas de protofibrillas de A β y que no reconoce las formas monoméricas u oligoméricas solubles del péptido de A β . Estas formas son probablemente las que están presentes en el plasma.

EJEMPLO 11: 13C3 RECONOCE PLCAS NEURÍTICAS AMILOIDES HUMANAS (AGREGADAS) EN CEREBROS CON AD PERO NO LOS DEPÓSITOS DE A β DIFUSO A DIFERENCIA DEL ANTICUERPO ANTI-A β DE REFERENCIA 3D6

Se realizaron estudios de inmunohistoquímica con anticuerpos 13C3 y 3D6 en cortes de cerebro a quienes se diagnosticó enfermedad de Alzheimer humana usando técnicas estándar. Se detectó inmunomanchado de anticuerpos con un cromógeno de DAB (Figura 12). 13C3 marca depósitos de amiloide con una morfología típica de placas neuríticas amiloides maduras (también denominadas placas densas) con un núcleo muy denso rodeado por un halo más liviano o para las placas de mayor tamaño un manchado muy fuerte. En cortes de cerebro adyacentes, 3D6 mancha muchos más objetos que 13C3 como se observa a la ampliación menor (Figura 12, paneles izquierdos). Otra caracterización a una ampliación mayor (Figura 12, paneles derechos) indicó que 3D6 marca las mismas placas

neuríticas amiloides maduras que 13C3 y, además, numerosos depósitos amiloides difusos que se han descrito clásicamente usando el inmunomarcado anti-A β . Las placas difusas no son de carácter de fibrilla como se describe en la bibliografía ya que no se pueden detectar por tioflavina S y otros marcadores histológicos de fibrillas (Mann, 1989, Ann. Med. 21:133). Las diferencias de exclusión en la sensibilidad de ambos anticuerpos, se realizaron experimentos similares con una concentración más alta (20 μ g/ml) de 13C3 y nuevamente los depósitos difusos no se pudieron detectar. Estos datos coinciden con las propiedades de 13C3, un anticuerpo que es específico para las formas de protofibrillas de A β y no reconoce las formas monoméricas u oligoméricas solubles de péptido de A β a diferencia de 3D6.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

La invención tiene aplicaciones en el tratamiento y diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

Todas las publicaciones citadas en la memoria descriptiva, tanto publicaciones de patentes como publicaciones que no son patentes, indican el nivel de conocimiento del arte de los expertos en el arte al cual pertenece esta invención. Todas

estas publicaciones se incorporan totalmente en la presente como referencia en la misma medida que si cada publicación individual se indicara específica e individualmente como incorporada como referencia.

Aunque la invención de la presente se ha descrito con referencia a realizaciones particulares, se debe entender que estas realizaciones son simplemente ilustrativas de los principios y las aplicaciones de la presente invención. En consecuencia se debe entender que se pueden hacer numerosas modificaciones y que se pueden inventar otras disposiciones sin apartarse del espíritu y alcance de la presente invención definida por las siguientes reivindicaciones.



Reivindicaciones

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado caracterizado porque interactúa específicamente y presenta una afinidad medible a un epítoto conformacional de una forma de protofibrilla de péptido A β , en donde dicho anticuerpo monoclonal es el anticuerpo 13C3, producido por el hibridoma con el Acceso de ATCC N° PTA-8830, o una versión humanizada de este.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque es el anticuerpo 13C3, producido por el hibridoma con el Acceso de ATCC N° PTA-8830.
3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque es una versión humanizada del anticuerpo 13C3, producido por el hibridoma con el Acceso de ATCC N° PTA-8830.
4. Un anticuerpo monoclonal aislado caracterizado porque interactúa específicamente y presenta una afinidad medible a un epítoto conformacional de una forma de protofibrilla de péptido A β , en donde:

- dicho anticuerpo presenta mínima o ninguna afinidad para formas monoméricas o diméricas de péptido A β , y
 - dicho anticuerpo comprende una cadena liviana variable que comprende una región CDR1 expuesta en SEQ ID N°:13, una región de CDR2 expuesta en SEQ ID N°:14 y una CDR3 expuesta en SEQ ID N°:15.
5. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque además comprende una cadena pesada variable compuesta de una región de CDR1 expuesta en SEQ ID N°:20, una región de CDR2 expuesta en SEQ ID N°:21, y una región de CDR3 expuesta en SEQ ID N°:22.
6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, caracterizado porque es un anticuerpo monoclonal humanizado.
7. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal humanizado es una versión humanizada del anticuerpo 13C3, producido por el hibridoma con el Acceso de ATCC N° PTA-8830.
8. Un anticuerpo monoclonal aislado caracterizado porque interactúa específicamente y presenta una afinidad medible a un epítoto conformacional de una forma de protofibrilla de péptido A β , en donde la relación de la

afinidad de dicho anticuerpo para la forma de protofibrilla A β a la afinidad para oligómeros y monómeros de bajo peso molecular es mayor que 2, y en donde dicho anticuerpo comprende una cadena liviana variable que comprende una región CDR1 expuesta en SEQ ID N°:13, una región de CDR2 expuesta en SEQ ID N°:14 y una CDR3 expuesta en SEQ ID N°:15.

9. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque la relación de la afinidad de dicho anticuerpo para la forma de protofibrilla A β a la afinidad para oligómeros y monómeros de bajo peso molecular es mayor que 4.
10. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque la relación de la afinidad de dicho anticuerpo para la forma de protofibrilla A β a la afinidad para oligómeros y monómeros de bajo peso molecular es mayor que 5.
11. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizado porque además comprende una cadena pesada variable compuesta de una región de CDR1 expuesta en SEQ ID N°:20, una región de

CDR2 expuesta en SEQ ID N°:21, y una región de CDR3 expuesta en SEQ ID N°:22.

12. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, caracterizado porque es un anticuerpo monoclonal humanizado.
13. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal humanizado es una versión humanizada del anticuerpo 13C3, producido por el hibridoma con el Acceso de ATCC N° PTA-8830.
14. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5 y 6 a 11, caracterizado porque comprende una cadena liviana variable compuesta de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°:7.
15. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque es para usar en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
16. El anticuerpo para usar de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado porque es para usar mediante una vía parenteral de administración.

17. El anticuerpo para usar de acuerdo con la reivindicación 16, caracterizado porque dicha vía parenteral de administración es una vía de administración intravenosa.
18. El anticuerpo para usar de acuerdo con la reivindicación 16, caracterizado porque dicha vía parenteral de administración es una vía de administración subcutánea.
19. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
20. Un método para cuantificar la cantidad de una forma de protofibrilla de péptido β -amiloide en una muestra de tejido o fluido, caracterizado porque comprende:
 - (a) obtener la muestra de tejido o fluido de un sujeto;
 - (b) poner en contacto la muestra de tejido o fluido con un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14; y
 - (c) cuantificar la cantidad de una forma de protofibrilla de péptido β -amiloide en en la muestra.

21. Un estuche para detectar la forma de protofibrilla de péptido β -amiloide mientras que presenta mínima afinidad a las formas de bajo peso molecular de péptido β -amiloide, caracterizado porque comprende:

- (a) un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, y
- (b) un reactivo que se une, directa o indirectamente, a dicho anticuerpo.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se han caracterizado anticuerpos aislados que presentan afinidad específica a un epítoto conformacional repetido de una forma de protofibrilla del péptido β -amiloide humano comparado con formas de bajo peso molecular de péptido β -amiloide. Estos anticuerpos aislados y las composiciones farmacéuticamente eficaces relacionadas pueden ser útiles en el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de la enfermedad de Alzheimer bloqueando eficazmente la capacidad de la forma de protofibrilla de péptido β -amiloide para formar formas de fibrilla vinculadas con complicaciones asociadas a la enfermedad de Alzheimer. Los anticuerpos aislados de la presente invención también pueden ser útiles en diferentes ensayos de diagnóstico y estuches asociados.