



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PGT

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

10-391830

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO "ANTICUERPOS ESPECÍFICOS
PARA LA FORMA DE PROTOFIBRILLAS
DE LA PROTEÍNA BETA-AMILÓIDE

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE THE ROCKEFELLER UNIVERSITY

DOMICILIO NEW YORK, NY, USA

74. APODERADO CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ

22. BOGOTÁ, D.C., 07 de ABRIL de 2010

(FORMA P-10)

16-06-2010

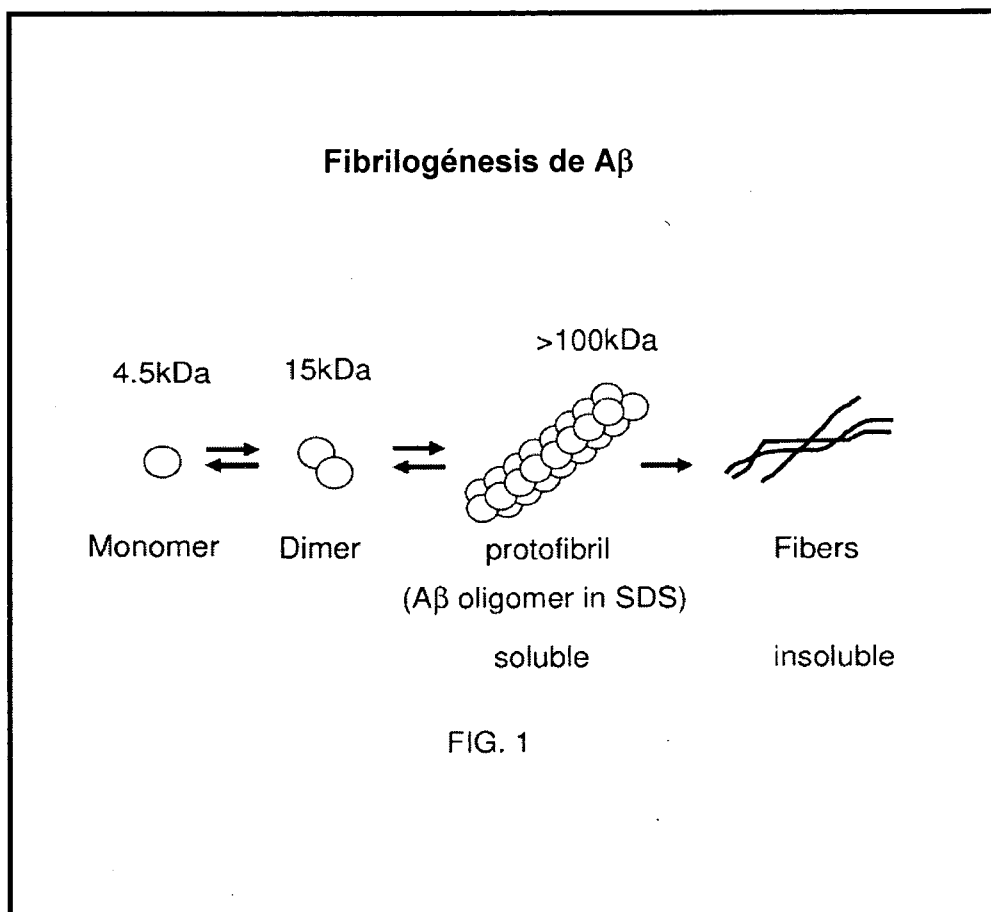
Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PETITORIO		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO	
				No. 10-039830- -00000-0000	
		Fecha: 2010-04-07 17:06:58		Dep. 2020 DIR.NUEVASCR	
		Tra. 11 PATENTEIYII		Eve: 379 FASENACIONALII	
		Act. 411 PRESENTACION		Folios: 235	
FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE					
PCT					
ENTRADA EN FASE NACIONAL					
1. SOLICITUD DE:					
☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad					
☒ Capitulo I (Folio 401) ☒ Capitulo II					
2. SOLICITANTE (71)		Nombre: THE ROCKEFELLER UNIVERSITY Dirección: 1230 York Avenue, New York, NY 10021-6399 Nacionalidad o Domicilio: New York, New York , USA. Lugar de Constitución: Teléfono Fax: E-mail:		IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número: _____	
3. REPRESENTANTE O APODERADO		Nombre: CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ Dirección: Cr. 13 A No 28-38, Mz 2 Bufo 230. Parque Central Bavaria Teléfono 3419841 Fax: 3368592 E-mail: pct@tmtamayo.net		IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número: 17.117.818 TP: 17.402	
4. INVENTOR(ES) (72)		Nombres: 1.- RAVETCH, Jeffrey V 2.- FUKUYAMA, Hidehiro Dirección: 1.- 500 Park Avenue, New York, NY 10022, USA. 2.- 10 rue de Haguenau, Strasbourg 6700, France Nacionalidad o Domicilio: 1.- Nacionalidad: Estadounidense 2.- Nacionalidad: Japonés			
5. PCT (86)					
Solicitud internacional No.		PCT/US2008/083659		Fecha: 14/11/2008	
Publicación internacional No.		WO 2009/065054 A2		Fecha: 22/05/2009	
6. Título (54)					
ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA LA FORMA DE PROTOFIBRILLAS DE LA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE					
7. Clasificación Internacional (51) 6 01 N 33/53					
8. Prioridad		(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud	
Si ☒ No ☐		US	16/11/2007	60/988,481	
		US	08/01/2008	61/019,747	
9.					
Comprobante de pago No.		10-25737		Fecha ABRIL 07 DE 2010	

10.

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ OTROS:

11. FIGURA CARACTERISTICA



12. Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ

FIRMA:

C.C. 17.117.818 TP 17.402

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176099-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 25,737
FECHA : ABRIL 7 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-039830- -00000-0000

Fecha: 2010-04-07 17:06:58 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 235

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CARLOS TAMAYO Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	97745863	07/04/2010	1,245,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____



ACTUACION NOTARIAL

LEY 304



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 compa-

reciente 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 Pro-

toloco 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 suficien-

te para recabar de las autoridades nacionales que corresponda, sean estas adminis-

trativas y/o judiciales, la obtención de "**Patentes, Marcas, Modelos, Diseños y sus**

renovaciones" y realizar todos los trámites conducentes para proteger los dere-

chos de la mandante, a cuyo efecto, los faculta para efectuar ante dichas autorida-

des nacionales, administrativas y/o judiciales todos los trámites necesarios a los

objetos indicados; presentar solicitudes, alegatos, oposiciones, protestas, apelacio-

nes 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 co-

mo demandado, para proteger los intereses del mandante por facultad de sustituir

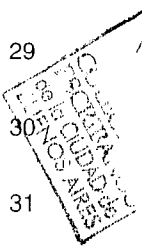




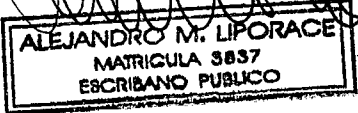
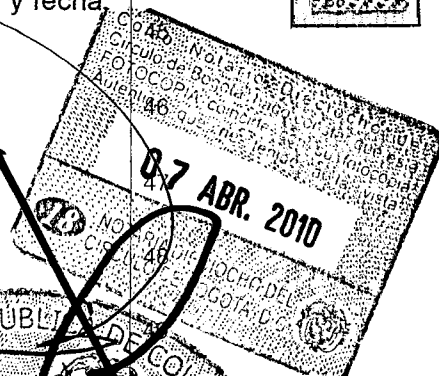
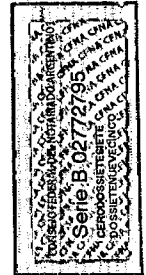
N 011996322

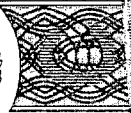
este instrumento y revocar tal substitución. Se deja constancia que las facultades enumeradas en este mandato, son meramente ejemplificativas y no limitativas de otras facultades implícitas, por cuyo motivo, los mandatarios quedan autorizados para ejercer sin restricción alguna todos los derechos que 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.-

26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44



RELACIONES





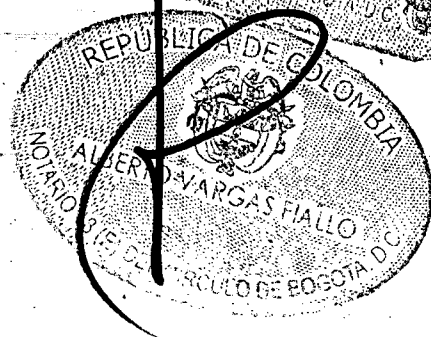
L 009372566

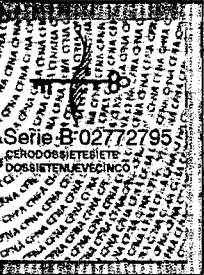
EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley orgánica vigente, LEGALIZA la firma y sello del escribano ALEJANDRO MARIA LIPORACE obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el N° 100325130201/C La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.



Buenos Aires, Jueves 25 de Marzo de 2010

EQC. 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
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



BD56C98364F6BE50EB9E0E00899085CF



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
22 May 2009 (22.05.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/065054 A2

(51) International Patent Classification:
G01N 33/53 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/083659

(22) International Filing Date:
14 November 2008 (14.11.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/988,481 16 November 2007 (16.11.2007) US
61/019,747 8 January 2008 (08.01.2008) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **THE ROCKEFELLER UNIVERSITY** [US/US]; 1230 York Avenue, New York, NY 10021-6399 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **RAVETCH, Jeffrey** [US/US]; 500 Park Avenue, New York, NY 10022 (US). **FUKUYAMA, Hidehiro** [JP/FR]; Strasbourg (FR).

(74) Agents: **NORTON, Gerard, P.** et al.; Fox Rothschild LLP, 997 Lenox Drive, Bldg. #3, Lawrenceville, NJ 08648 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(54) Title: ANTIBODIES SPECIFIC FOR THE PROTOFIBRIL FORM OF BETA-AMYLOID PROTEIN

(57) Abstract: Isolated antibodies have been characterized which show specific affinity to a repeating conformational epitope of a protofibril form of the human β -amyloid peptide as compare to low molecular weight forms of β -amyloid peptide. These isolated antibodies and related pharmaceutically effective compositions may be useful in the therapeutic and/or prophylactic treatment of Alzheimer's disease by effectively blocking the ability of the protofibril form of β -amyloid peptide to form fibril forms linked with complications associated with Alzheimer's disease. The isolated antibodies of the present invention are also useful in various diagnostic assays and associated kits.

WO 2009/065054 A2

ANTIBODIES SPECIFIC FOR THE PROTOFIBRIL FORM OF BETA-AMYLOID
PROTEIN

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application claims priority to provisional patent
5 applications: 60/988,481 filed November 16, 2007; and
61/019,747 filed January 8, 2008, the contents of which are
incorporated by reference.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to isolated antibodies
10 that interact specifically with conformational epitopes of a
protofibril form of human beta-amyloid peptide. These
antibodies show minimal or no detectable affinity towards
lower molecular weight forms of beta-amyloid peptide. The
antibodies disclosed herein will be useful in the diagnosis,
15 treatment and/or prevention of beta-amyloid plaque
deposition associated with the onset and progression of
Alzheimer's disease.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Beta-Amyloid ($A\beta$) peptides are thought to be a
20 causative agent for Alzheimer's disease ("AD") through the
formation of insoluble $A\beta$ peptide fibrils and deposition of
these fibrils to form amyloid plaques. The formation of
such plaques within the area of the brain critical for
memory and other cognitive functions is thought to lead to
25 dementia associated with this disease (see Selkoe, 1994, *J.*
Neuropathol. Exp. Neurol. 53:438-447). Beta-Amyloid
peptides comprise a group of peptides 39-43 amino acids long
that are proteolytically processed from amyloid precursor
protein (APP), by both β -secretase and γ -secretase at the

9

amino- and carboxyl-terminus, respectively. There are at least five distinct isoforms of APP: 563, 695, 714, 751, and 770 amino acids in length, respectively (see Wirak et al., 1991 *Science* 253:323). These isoforms of APP are generated

5 by alternative splicing of primary transcripts of the APP gene. Numerous missense mutations have been identified in APP in families with autosomal dominant early-onset Alzheimer's disease. Some mutations cluster near the secretase cleavage sites and affect APP metabolism either by

10 increasing the production or the proportion of A β forms (e.g., A β ₄₂), which tends to be more fibrillogenic and to aggregate faster than other forms. Neuronal toxicity may reside in the large molecular weight fibrils which are formed via aggregation of soluble A β peptides into insoluble

15 fibrils and, subsequently, fibril incorporation into amyloid plaques. An intermediate fibril form is the protofibril (PF) form, a large molecular weight oligomeric form of A β peptides which is soluble *in vitro* and may be isolated as an approximately ~670 kDa entity. Thus, the *in vitro* formation

20 of insoluble A β peptide fibrils is the end result of the initial oligomerization of A β peptide to form a structurally distinct, soluble higher molecular weight protofibril form. These transient protofibrils structures are precursor to the amyloid fibers responsible for cell dysfunction and neuronal

25 loss in Alzheimer's disease (AD) and other protein aggregation diseases.

Various treatments have been forwarded in attempts to prevent the formation of A β peptide, for example, inhibitors to prevent the proteolytic processing of APP. Also,

30 immunotherapy strategies such as administration of anti-A β antibodies (to induce clearance of amyloid deposits) or immunization with A β peptide antigens (to promote a humoral

10

response) have been enlisted in an attempt to reduce plaque size and density.

U.S. Patent No. 7,179,463, issued to Lannfelt *et al.*, discloses a method of treating Alzheimer's disease by administering an antibody raised against a protofibril consisting of the Arctic mutation within the A β peptide coding region. No exemplification of raised antibodies are presented in the specification and no comparison as to affinity for low molecular weight forms of A β peptide are presented.

U.S. Patent Nos 6,761,888 and 6,750,324, issued to Schenk *et al.*, disclose a series of antibodies which recognize various epitopes along the amino acid sequence of A β ₄₂. Antibodies specific for the N-terminus and mid-regions of A β ₄₂ showed efficacy in reducing plaque both *ex vivo* and *in vivo*.

Despite current knowledge in the field of treating and preventing Alzheimer's disease, there remains a need for an improved compositions and methods of treating and/or preventing this disease. The compositions and methods of the present invention address and meet these needs by disclosing antibodies specific for protofibrillar forms of A β peptide while showing minimal detectable affinity against low molecular weight forms of the A β peptide. Pharmaceutically effective compositions comprising such an antibody or antibodies will be useful in treating and/or preventing beta-amyloid plaque deposition known to be associated with the onset and progression of Alzheimer's disease.

30

77

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to an isolated antibody that shows specific binding to a conformational epitope of a protofibril form of β -amyloid peptide. The monomer of wild type beta-amyloid ($A\beta$) peptide is known in the art and is shown herein as SEQ ID NO: 1. The isolated antibodies of the present invention have affinity for such a repeated conformational epitope for the larger molecular weight protofibril form of the $A\beta$ peptide while showing minimal or no affinity for other forms of $A\beta$ peptide, such as monomer or dimer forms of $A\beta$ peptide.

The present invention also relates to an isolated antibody that specifically interacts with and shows a measurable affinity to a conformational epitope of a protofibril form of $A\beta$ peptide, whereby the protofibril epitope is represented by an exposed region of a $A\beta$ -protofibril form comprising the amino terminal portion of an exposed portion of the $A\beta$ peptide.

The present invention further relates to an isolated antibody that specifically interacts and shows a measurable affinity to a conformational epitope of a protofibril form of $A\beta$ peptide, whereby the protofibril epitope is represented by an exposed region of a $A\beta$ -protofibril form comprising amino acids 1-20 (SEQ ID NO:2) of an exposed portion of the $A\beta$ peptide.

The present invention also relates to an isolated antibody that specifically interacts and shows a measurable affinity to a conformational epitope of a protofibril form of $A\beta$ peptide, whereby the protofibril epitope is represented by an exposed region of a $A\beta$ -protofibril form

which comprises amino acids 4-12 and 9-20 (SEQ ID NOS: 3 and 4, respectively) of an exposed portion of the A β peptide.

The present invention relates in part to monoclonal antibodies 13C3, 1D1 and 19A6, and any affinity matured form of 13C3, 1D1 and 19A6. The present invention further relates to an antibody which mimics the functional specificity as described herein for 13C3, 1D1 and 19A6. To this end, the present invention also relates to biologically active fragments and/or mutants of the 13C3, 1D1, 19A6 or a 13C3-, 1D1-, or 19A6-like antibody, including but not necessarily limited to amino acid substitutions (e.g., as a directed form of affinity maturation of the V_H or V_L regions), deletions, additions, amino terminal truncations and carboxy-terminal truncations such that these mutations provide a basis for an antibody or antibody binding portion that results in a similar or improved version of a 13C3, 1D1, 19A6 or 13C3-like antibody binding protein. In one embodiment of this portion of the invention, the V_H and V_L region of 13C3 comprises the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 7 (V_H) and/or SEQ ID NO:5 (V_L), respectively.

The present invention further relates to an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which encodes the V_H and/or V_L regions of a 13C3, 1D1 or 19A6 antibody; and especially an isolated nucleic acid molecule (polynucleotide) encoding a biologically relevant portion of 13C3, or affinity matured version or otherwise mutated version of 13C3, 1D1 or 19A6 antibody. To this end, one embodiment of the present invention relates to a nucleic acid molecule which comprises a nucleotide sequence encoding the V_H and V_L region of 13C, as set forth in SEQ ID NO:8

(13C3: V_H region) and SEQ ID NO:6 (13C3: V_L region), respectively.

The present invention also relates to isolated antibodies 13C3, 1D1 or 19A6 as disclosed herein, antibodies
5 that specifically interact and show a measurable affinity to a conformational epitope of a protofibril form of A β peptide.

The present invention also relates to a hybridoma capable of producing a monoclonal antibody of the present
10 invention. Particular hybridomas of the present invention include hybridomas which produce exemplified monoclonal antibodies 13C3, 19A6 and 1D1, respectively.

The present invention relates to pharmaceutically effective compositions which comprise an isolated antibody
15 as disclosed and further defined herein: an isolated antibody that specifically interacts with and shows a measured affinity to and ability to specifically bind to a repeating conformational epitope of a protofibril form of A β while showing minimal or no measurable affinity to low
20 molecular weight forms of A β . These compositions may optionally comprise one or more carriers, one or more excipients, and/or one or more chemical derivatives.

The present invention also relates to methods of treating an individual afflicted with Alzheimer's disease
25 comprising administering to the individual a pharmaceutically effective composition which comprises an isolated antibody disclosed herein, namely an antibody that specifically interacts and shows a measured affinity to a repeating conformational epitope of a protofibril form of A β
30 peptide while showing minimal or no detectable affinity toward lower molecular weight forms of A β peptide. These methods will provide for a therapeutic intervention so as to

14

reduce the amount of amyloid deposits in the brain of an individual afflicted with Alzheimer's disease. Particular embodiments of this portion of the present invention relate to methods of treating an individual afflicted with

5 Alzheimer's disease comprising administering a pharmaceutically effective composition formulated with an antibody showing specific affinity (as at least compared to low molecular weight forms of A β peptide) to a conformational epitope of a protofibril form of A β peptide,

10 especially whereby the protofibril epitope is represented by an exposed region of a A β -protofibril form which comprises amino acids 1-20 (SEQ ID NO:2) of an exposed portion of the A β peptide. Specific embodiments relating to these therapeutic and prophylactic methods disclosed herein may

15 utilize exemplified mouse monoclonal antibodies 13C3, 19A6, 1D1, as well as affinity matured versions of any such antibody, chimeric antibody, humanized antibody, human monoclonal antibody, and/or any other such antibody form known in the art, including but not limited to the antibody

20 or specific binding members reviewed herein. Any such antibody or specific binding member may be referred to within this specification as a "13C3-like antibody." Thus, a "13C3-like antibody" is meant to also encompass the 13C3 monoclonal antibody disclosed herein.

25 The present invention also relates to methods of screening for and selecting compounds which may act as an inhibitor of fibril and/or senile plaque formation associated with Alzheimer's disease. Such a methodology comprises utilizing an antibody with 13C3-like

30 characteristics (e.g., specific affinity to the PF vs. LMW forms of A β peptide) in various antibody/peptide/test compound interaction assays in order to select a compound

which modulates the process of fibril and/or plaque formation.

The present invention further relates to diagnostic assay methods to specifically determine protofibril levels within a subject or patient. Such assays may be carried out by any techniques known and available to the artisan, including but not limited to Western blots, ELISAs, radioimmunoassays, immunohistochemical assays, immunoprecipitations, or other immunochemical assays known in the art. Thus, one embodiment of this portion of the invention relates to taking a tissue sample from a subject or patient and determining the level of PF A β in the sample using a diagnostic kit and associated assay; whereby the kit comprises a 13C3-like antibody, thus allowing for the specific determination of PF A β levels in the tissue sample. The tissue sample for analysis is typically blood, plasma, serum, mucus or cerebral spinal fluid from the subject or patient

To this end, the antibodies of the present invention may be utilized for at least the following uses: (1) as a prophylactic or therapeutic agent to prevent or reduce plaque deposits associated with Alzheimer's disease, either alone or in conjunction with any available combination therapy; (2) in designing peptide immunogens that may be used to elicit an effective antibody response in prophylactic or therapeutic vaccination strategies relating to treatment of Alzheimer's disease; (3) to generate a prophylactic or therapeutic anti-idiotypic antibody (Ab2) mimicking the cryptic epitope(s) that bind the antibodies of the present invention; and, (4) in designing peptides derived from the complementarity determining regions (CDRs) of the neutralizing antibodies of the present invention for

use in either screening inhibitors of protofibril formation for use in prophylactic and/or therapeutic regimes and (4) as a diagnostic reagent to determine the level of protofibrillar A β in serum or CSF of a patient at risk for developing AD.

It is an object of the present invention to provide for antibodies that specifically interact and show affinity to an exposed, conformational epitope of a protofibril form of A β peptide which comprises amino acids 1-20 (SEQ ID NO:2) of an exposed portion of the A β peptide.

It is a further object of the present invention to provide for antibodies that interact and show affinity to an exposed conformational epitope of a protofibril form of A β peptide which comprises amino acids 4-12 and 9-20 (SEQ ID NO:3, 4) of an exposed portion of the the A β peptide.

Another object of the present invention is to provide 13C3-like antibodies which prevent or reduce A β peptide protofibril formation linked to the deposition of plaques associated with Alzheimer's disease.

Another object of the present invention is to provide assays utilizing 13C3-like antibodies in antibody/peptide/test compound interaction assays to select compounds which will be useful in treating plaque deposition associated with Alzheimer's disease.

As used herein, "Ka" is intended to refer to the association constant of a particular antibody antigen interaction, "Kd" is intended to refer to the dissociation constant of a particular antibody-antigen interaction.

As used herein, the term "epitope" or "antigenic determinant" refers to a site on an antigen to which B and/or T cells respond or a site on a molecule against which an antibody will be produced and/or to which an antibody

will bind. For example, an epitope can be recognized by an antibody defining the epitope. An epitope can be either a "linear epitope" (where a primary amino acid primary sequence comprises the epitope; typically at least 3
5 contiguous amino acid residues, and more usually, at least 5, and up to about 8 to about 10 amino acids in a unique sequence) or a "conformational epitope" (an epitope wherein the primary, contiguous amino acid sequence is not the sole defining component of the epitope). A conformational
10 epitope may comprise an increased number of amino acids relative to a linear epitope, as this conformational epitope recognizes a three-dimensional structure of the peptide or protein. For example, when a protein molecule folds to form a three dimensional structure, certain amino acids and/or
15 the polypeptide backbone forming the conformational epitope become juxtaposed enabling the antibody to recognize the epitope. Methods of determining conformation of epitopes include but are not limited to, for example, x-ray crystallography, two-dimensional nuclear magnetic resonance
20 spectroscopy and site-directed spin labeling and electron paramagnetic resonance spectroscopy. See, for example, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996), the disclosure of which is incorporated in its entirety herein by reference.

25 As used herein, "specific binding" between two entities means an affinity of at least 10^6 M^{-1} , 10^7 M^{-1} , 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , or 10^{10} M^{-1} .

As used herein, "protofibrils" are protofibrillar aggregates which include spherical structures comprising A β
30 peptides that appear to represent strings of the spherical structures forming curvilinear structures.

As used herein, the term "isolated" is used herein as it is used within the art. Namely, the state in which antibodies/specific binding members, nucleic acid molecules and the such are found. Antibodies/specific binding members and nucleic acid molecules will be free or substantially free of material with which they are naturally associated such as other polypeptides or nucleic acids with which they are found in their natural environment, or the environment in which they are prepared (e.g. cell culture) when such preparation is by recombinant DNA technology (practiced *in vitro*) or *in vivo*. "Isolated" covers any form containing the identified and characterized component(s) of the present invention following removal from that initial environment. Examples, but certainly not limitations, include pharmaceutical formulations, formulation with diluents, antibodies/specific binding members, nucleic acid molecules and portions thereof which have been modified (e.g., antibody glycosylation) either *in vitro* or *in vivo* and removed from that environment.

As used herein, the term "recombinant human antibody" represents a viable subset of "antibodies" generated by various means of recombinant DNA technology and non-human transgenics that are well known in the art. Such methodology is utilized to generate an antibody from one or the following origins: (i) a scFv or alternative antibody isolated from a combinatorial human antibody library; (ii) a partial or complete antibody generated from a respective expression vector stably or transiently transfected into a host cell, preferably a mammalian host cell (e.g., subcloning nucleotide sequences encoding VH and VL chains into an expression vector in conjunction with respective CH and CL nucleotide sequences, so as to promote expression of

79

a predetermined form of antibody showing specificity to the PF form of A β); and/or (iii) an antibody isolated from a non-human transgenic animal which contains human immunoglobulin genes, or by any other known methodology which relies of the recombinant 'mixing and matching' of human immunoglobulin gene sequences to other DNA sequences in order to generate the human recombinant antibody of interest.

The terms "subject" or "patient" is meant to include any member of the Phylum Chordata, including, without limitation, humans and other primates, including nonhuman primates such as chimpanzees and other apes and monkey species; farm animals such as cattle, sheep, pigs, goats and horses; domestic mammals such as dogs and cats; laboratory animals including rodents such as mice, rats and guinea pigs; birds, including domestic, wild and game birds such as chickens, turkeys and other gallinaceous birds, ducks, geese, and the like.

The term "treating" or "treatment" of a disease refers to executing a protocol, which may include administering one or more drugs to a subject (human or otherwise), in an effort to alleviate signs or symptoms of the disease. Alleviation can occur prior to signs or symptoms of the disease appearing, as well as after their appearance. Thus, "treating" or "treatment" includes "preventing" or "prevention" of disease. In the case of Alzheimer's disease, "preventing" or "preventing" may also occur in a situation where a course of treatment is advanced in order to prevent or stall onset of the symptoms associated with Alzheimer's disease. In addition, "treating" or "treatment" does not require complete alleviation of signs or symptoms,

does not require a cure, and specifically includes protocols which have only a marginal positive effect on the subject.

As used herein, the term "active ingredient" refers to a 13C3-like antibody which shows affinity and specificity
5 (e.g., specific binding) to the amino terminal portion of the protofibril structure of beta-amyloid.

As used herein, the terms "effective amount" or "pharmaceutically effective amount" of antibody, as provided herein, refers to a nontoxic but sufficient amount of the
10 active ingredient in order to provide the desired biological result. An appropriate "effective" amount in any individual case may be determined by one of ordinary skill in the art using routine experimentation.

As used herein, the terms "pharmaceutically acceptable"
15 or "pharmacologically acceptable" mean a material may be administered to an individual in a drug delivery device along with the formulated biological agent without causing any undesirable biological effects or interacting in a deleterious manner with any of the components of the
20 composition in which it is contained (e.g., a "pharmaceutically acceptable composition").

As used herein, the phrases "physiologically acceptable carrier" and "pharmaceutically acceptable carrier" which may be interchangeably used refer to a carrier, diluent, and
25 excipient that does not cause significant irritation to an organism and does not abrogate the biological activity and properties of the administered compound. An adjuvant is included under these phrases.

As used herein, the term "excipient" refers to an inert
30 substance added to a pharmaceutical composition to further facilitate administration of an active ingredient.

The term "minimal affinity" as used in comparing affinity of the antibodies for the protofibrillar form of the A β peptide with affinity of the antibodies for other forms of A β peptide, such as fibrils, sheet structures, and low molecular weight oligomers and monomers, indicates that ratio of the affinity for the protofibrillar A β form to the affinity for other A β forms is greater than about 2. Preferably, the ratio is greater than about 3, or about 4, or about 5.

10 BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 shows the process of A β fibrillogenesis, including formation of protofibril oligomers.

Figure 2A-B show the process of A β fibrillogenesis and purification of A β forms at time 0 (A) and 4 hours (B) as indicated by absorbance at mAU₂₁₅ (absorbance @ 215 nm) for elution volumes. At 4 hours (B), the low molecular weight (LMW) form elutes as a ~15 kDa dimer while the protofibril form size elutes at ~670 kDa.

Figure 3A-B show the specificity of monoclonal antibodies 13C3 (A) and 4G8 (B) for the protofibril (PF:—◆—) and low molecular weight (LMW: —■—) forms of A β , as indicated by optical density (OD) read at 450/650 nm for increasing concentrations of both the PF and LMW forms of A β .

Figure 4A-C show data from a Biacore® binding assay showing affinity of monoclonal antibodies 4G8 (A), 13C3 (B) and control IgG₁ (C) to varying concentrations of low molecular weight (LMW) form of A β from 0.25 μ g/ml LMW A β to 4.0 μ g/ml LMW A β .

Figure 5A-B show data identifying the epitopes recognized by the anti- $A\beta$ antibodies described above. Figure 5A illustrates a Western Dot Blot analysis with monoclonal antibodies 13C3 (top panel), 1D1 (middle panel) and 4G8 (bottom panel) against a series of overlapping 13 amino acid peptides as described in Example 5. Figure 5B illustrates amino acid sequence of $A\beta_{1-42}$ (SEQ ID NO:1), as well as the predicted epitopes of monoclonal antibodies 13C3, and 1D1.

Figure 6 shows the reactivity of monoclonal antibodies 13C3 (—■—) and 4G8 (—◆—) with SEC fractions from 7PA2 supernatant secreting $A\beta$ oligomers. Protofibril (PF) and low molecular weight (LMW) fractions are indicated on the x-axis as measured by optical density (OD) read at 450/650.

Figures 7A-C show micrographs from thin section immuno-electron microscopy showing the affinity of monoclonal antibody 13C3 to repeated structures on $A\beta$ fibrils (B, C). Control immuno-EM is IgG₁ (A).

Figure 8A-B show data from electron micrographs showing reduction in plaque numbers in a representative TgCRND8 transgenic mouse after administration of control IgG₁ (A) antibody in comparison to administration of 13C3 monoclonal antibodies (B).

Figure 9A-B show that treatment of TgCRND8 transgenic mice with 13C3 monoclonal antibodies on a once a week (A) or twice weekly (B) regime result in a reduction of senile plaque formation.

Figure 10 shows the nucleotide and amino acid sequence of the cloned light and heavy chains variable regions for mAb 13C3.

Figure 11 shows that the acute peripheral administration of 13c3 in APP transgenic mice does not lead

to an increase in plasma A β unlike reference antibody 3D6 administration.

Figure 12 shows that 13C3 recognizes human amyloid neuritic plaques (aggregated) in AD brains but not the
5 diffuse A β deposits unlike the reference 3D6 anti-A β antibody.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The amyloid precursor protein (APP) plays an important role in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD).
10 Proteolytic processing of APP by β - and γ -secretases generate A β peptides (A β) which normally range in the length from 39 to 43 amino acids in length. The onset of Alzheimer's disease is characterized by the accumulation of oligomeric or aggregated forms of A β in the brain. The immunological
15 compositions of the present invention are useful in treating or preventing Alzheimer's disease, for use as reagents in diagnostic assays, as well as for designing small molecule inhibitors of amyloid deposition. The 13C3-like antibodies of the present invention may be administered
20 prophylactically to the general population of a mammal, especially a human, in a contemplated pharmaceutically acceptable formulation in an amount and/or dosage regime sufficient to eliminate, reduce or delay onset of the disease. Methods of prophylactic treatment are especially
25 warranted with individuals known to be at a genetic or familiar risk of Alzheimer's disease. Numerous genetic markers of risk for Alzheimer's disease have been identified, including but not limited to APP mutations (e.g., the Indian mutation (Val717Phe), the Swedish
30 mutations (Lys670Asn, Met671Leu), the Hendricks mutation (Ala692Gly), the Dutch mutation (Glu693Gln), the Iranian

mutation (Thr714Ala), the German mutation (Val715Ala), and the Florida mutation (Ile716Val), to list a few. Additional mutations which may indicate an increased risk of Alzheimer's disease include mutations in the presenilin genes (PS1 and PS2) and ApoE4. The present invention also relates to therapeutic intervention via pharmaceutically acceptable compositions comprising a 13C3-like antibody for individuals presently suffering from Alzheimer's disease can be recognized from characteristic dementia, especially in the presence of risk factors described above or already suffering from such a disease in an amount sufficient to cure, or at least partially arrest, the Alzheimer's disease symptoms and complications. Either prophylactic- or therapeutic-based treatment methods contemplated herein may be used to address early or late onset Alzheimer's disease. In view of the importance of oligomeric forms of A β in the onset of Alzheimer's disease, the present invention relates to an isolated antibody that specifically interacts and shows a measured affinity to a repeating conformational epitope of a protofibril form of A β peptide. The monomer of wild type A β peptide (A β ₄₂; the 42 amino acid form) is known in the art and is shown herein as 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).

The isolated antibodies of the present invention will show affinity for a repeated conformational epitope of the larger molecular weight, oligomeric protofibrillar form of the A β peptide while showing minimal affinity for other forms of A β peptide, such as low molecular weight monomers and dimers.

The present invention also relates to an isolated antibody that interacts and shows a measurable affinity to a conformational epitope of a protofibril form of A β peptide, whereby the protofibril epitope is represented by an exposed region of a A β -protofibril form which comprises the amino terminal portion of an exposed portion of the A β peptide.

The present invention further relates to an isolated antibody that specifically interacts and shows a measurable affinity to a conformational epitope of a protofibril form of A β peptide, whereby the protofibril epitope is represented by an exposed region of a A β -protofibril form which comprises amino acids 1-20 (SEQ ID NO:2) of an exposed portion of the A β peptide, as follows: Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe (SEQ ID NO:2).

As exemplified herein, mouse monoclonal antibodies have been identified which specifically show specific affinity for the protofibril (PF) form of the A β peptide, while showing minimal affinity for low molecular weight species of the A β peptide. The dimer form of A β (~15 kDa) over time polymerizes to form a soluble PF form of A β , with a molecular weight of approximately 670 kDa. Mice were immunized with this higher molecular weight PF A β . Monoclonal antibodies were screened for specificity to the high molecular weight PF form of the A β peptide while showing minimal or no ability to bind lower molecular weight forms of A β . This portion of the present invention is exemplified by the screening, isolation and characterization of the 13C3 series of monoclonal antibodies raised against the ~670 kDa high molecular weight protofibril form of the A β peptide (i.e., 13C3, 1D1 and 19A6). This series of

monoclonal antibodies shows the intended specificity *in vitro* while also reducing Alzheimer's disease-associated plaque formation in a transgenic mouse Alzheimer's disease model. Thus, in a particular embodiment of the invention, 5 the isolated antibody specifically interacts and shows a measurable affinity to a conformational epitope of a protofibril form of A β peptide, whereby the protofibril epitope is represented by an exposed region of a A β -protofibril form which comprises amino acids 4-12 (SEQ ID 10 NO:3) and 9-20 (SEQ ID NO:4) of an exposed portion of the A β peptide: Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val (SEQ ID NO:3); Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe (SEQ ID NO:4).

One embodiment of the present invention relates to an 15 antibody which comprises a V_H (SEQ ID NO: 7) and/or V_L (SEQ ID NO: 5) region as disclosed for 13C3, so as to impart 13C3-like specificity to the PF versus LMW form of the A β peptide. An additional embodiment is a 13C3-like antibody or biologically relevant fragment thereof which show 20 specificity to the PF form over the LMW form of the A β peptide. Thus, the present invention also relates to biologically active fragments and/or mutants of the 13C3, 1D1, 19A6 or a 13C3-like antibody, including but not necessarily limited to amino acid substitutions (e.g., as a 25 directed form of affinity maturation of the V_H or V_L regions), deletions, additions, amino terminal truncations and carboxy-terminal truncations such that these mutations provide a basis for an antibody or antibody binding portion that results in a similar or improved version of a 13C3, 30 1D1, 19A6 or 13C3-like antibody binding protein. As noted herein, one embodiment of this portion of the invention

27

related to the V_E and/or V_L region of such an antibody comprising the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 7 and/or SEQ ID NO:5, respectively. The present invention notes the existence of codon redundancy which may

5 result in differing DNA molecules expressing an identical antibody or portion thereof (e.g., alternative nucleic acid molecules encoding an identical scFv or a V_H and/or V_L portion of an IgG). For purposes of this specification, a sequence bearing one or more replaced codons will be defined

10 as a degenerate variation. Another source of sequence variation may occur through RNA editing. Such RNA editing may result in another form of codon redundancy, wherein a change in the open reading frame does not result in an altered amino acid residue in the expressed protein. Also

15 included within the scope of this invention are mutations either in the DNA sequence or the translated antibody which improve the ultimate physical properties of the expressed antibody. To this end, the present invention relates to (i) affinity matured versions of a 13C3, 1D1, 19A6 or any other

20 such 13C3-like antibody, and/or (ii) mutated forms of 13C3, 1D1, 19A6 or any other such 13C3-like antibody, including but not limited to one or more mutations in the CDR1, CDR2 an/or CDR3 regions as generated through known affinity maturation methodology and recombinant DNA techniques known

25 for introducing site specific mutations. Thus, the isolated antibodies of the present invention are antibodies that specifically interact with a conformational epitope of a protofibril form of A β peptide. The isolated antibodies of the present invention will show affinity for such a

30 conformational epitope for the larger molecular weight protofibrillar form of the A β peptide while showing minimal affinity for other forms of A β peptide, such as fibrils,

sheet structures, and low molecular weight oligomers and monomers.

The present invention also relates to the isolated monoclonal antibody, 13C3. This portion of the invention
5 also relates to a hybridoma which produces the monoclonal antibody, 13C3. A hybridoma which produces the monoclonal antibody 13C3 is available under ATCC Accession No. PTA-8830.

The present invention also relates to the isolated
10 monoclonal antibody, 1D1. This portion of the invention also relates to a hybridoma which produces the monoclonal antibody, 1D1.

The present invention also relates to the isolated monoclonal antibody, 19A6. This portion of the invention
15 also relates to a hybridoma which produces the monoclonal antibody, 19A6.

The present invention also relates to methods of screening for and selecting compounds which may act as an inhibitor of fibril and/or senile plaque formation
20 associated with Alzheimer's disease. Such methodology comprises utilizing an antibody with 13C3-like affinity to the PF form of A β peptide in various antibody/peptide/test compound interaction assays in order to select a compound which modulates the process of fibril and/or plaque
25 formation. The compound may be a non-proteinaceous organic or inorganic molecule, a peptide (e.g., as a potential prophylactic or therapeutic peptide vaccine), a protein, DNA (single or double stranded) or RNA (such as siRNA or shrRNA). It will become evident upon review of the disclosure and
30 teachings of this specification that any such peptide or small molecule which effectively competes with a 13C3-like

antibody for binding to the PF form of A β peptide represents a possible lead compound relating to prophylactic or therapeutic treatment of Alzheimer's disease. To this end, interaction assays may be utilized for the purpose of high throughput screening to identify compounds that occupy or interact with the 13C3 epitopes of the PF form of A β peptide and displace the antibody.

Various antibody/antigen-based assays known in the art may be used which incorporate and rely on a 13C3-like antibody of the present invention as an essential reagent in screening for compounds useful in the prophylactic or therapeutic treatment of Alzheimer's disease (e. g., a small inorganic molecule or candidate peptide vaccine), including but not limited to an ELISA assay, a radioimmune assay, a Western blot analysis, any homogenous assay relying on a detectable biological interaction not requiring separation or wash steps (e.g., see AlphaScreen from PerkinElmer) and/or SPR-based technology (e.g., see BIACore)). Compounds and/or peptide vaccine candidates identified through use of a 13C3-like antibody may be detected by a variety of assays. The assay may be a simple "yes/no" assay to determine whether there is a change in the ability to form the known antibody/antigen complex, or may be made quantitative in nature by utilizing an assay such as an ELISA based assay, a homogenous assay, or an SPR-based assay. To this end, the present invention relates to any such assay, regardless of the known methodology employed, which measures the ability of a test compound to compete with 13C3-like antibody, to an appropriate peptide or protein mimetic of the amino terminal portion of a 13C3 epitope of the PF form of A β peptide.

The antibodies described herein may be used as the basic reagents in a number of different immunoassays to

20

determine the presence of a A β protofibril form in a tissue sample. Generally speaking, the antibodies can be employed in any type of immunoassay, whether qualitative or quantitative. This includes both the two-site sandwich

5 assay and the single site immunoassay of the non-competitive type, as well as in traditional competitive binding assays. One embodiment of interest, for ease of detection, and its quantitative nature, is the sandwich or double antibody

10 assay, of which a number of variations exist, all of which are intended to be encompassed by this portion of the present invention. For example, in a typical forward sandwich assay, unlabeled antibody is immobilized on a solid substrate, e.g., microtiter plate wells, and the sample to be tested is brought into contact with the bound molecule.

15 After a suitable period of incubation, for a period of time sufficient to allow formation of an antibody-antigen binary complex, a second antibody, labeled with a reporter molecule capable of inducing a detectable signal, is then added and incubation is continued allowing sufficient time for binding

20 with the antigen at a different site and the formation of a ternary complex of antibody-antigen-labeled antibody. Any unreacted material is washed away, and the presence of the antigen is determined by observation of a signal, which may be quantitated by comparison with a control sample

25 containing known amounts of antigen. Variations on the forward sandwich assay include the simultaneous assay, in which both sample and antibody are added simultaneously to the bound antibody, or a reverse sandwich assay in which the labeled antibody and sample to be tested are first combined,

30 incubated and added to the unlabelled surface bound antibody. These techniques are well known to those skilled in the art, and the possibility of minor variations will be

readily apparent. As used herein, "sandwich assay" is intended to encompass all variations on the basic two-site technique.

For the sandwich assays of the present invention, the only limiting factor is that both antibodies have different binding specificities for the A β protofibril form. Thus, a number of possible combinations are possible. As a more specific example, in a typical forward sandwich assay, a primary antibody is either covalently or passively bound to a solid support. The solid surface is usually glass or a polymer, the most commonly used polymers being cellulose, polyacrylamide, nylon, polystyrene, polyvinylchloride or polypropylene. The solid supports may be in the form of tubes, beads, discs or microplates, or any other surfaces suitable for conducting an immunoassay. The binding processes are well known in the art. Following binding, the solid phase-antibody complex is washed in preparation for the test sample. An aliquot of the body fluid containing a A β protofibril form to be tested is then added to the solid phase complex and incubated at 25°C for a period of time sufficient to allow binding of any A β protofibril form protein present to the antibody specific for the A β protofibril form. The second antibody is then added to the solid phase complex and incubated at 25°C for an additional period of time sufficient to allow the second antibody to bind to the primary antibody-antigen solid phase complex. The second antibody is linked to a reporter molecule, the visible signal of which is used to indicate the binding of the second antibody to any antigen in the sample. By "reporter molecule", as used in the present specification is meant a molecule which by its chemical nature, provides an analytically detectable signal which allows the detection of

antigen-bound antibody. Detection must be at least relatively quantifiable, to allow determination of the amount of antigen in the sample, this may be calculated in absolute terms, or may be done in comparison with a standard
5 (or series of standards) containing a known normal level of antigen.

The most commonly used reporter molecules in this type of assay are either enzymes or fluorophores. In the case of an enzyme immunoassay an enzyme is conjugated to the second
10 antibody, often by means of glutaraldehyde or periodate. As will be readily recognized, however, a wide variety of different conjugation techniques exist, which are well known to the skilled artisan. Commonly used enzymes include horseradish peroxidase, glucose oxidase, beta-galactosidase
15 and alkaline phosphatase, among others. The substrates to be used with the specific enzymes are generally chosen for the production, upon hydrolysis by the corresponding enzyme, of a detectable color change. For example, p-nitrophenyl phosphate is suitable for use with alkaline phosphatase
20 conjugates; for peroxidase conjugates, 1,2-phenylenediamine or toluidine are commonly used. It is also possible to employ fluorogenic substrates, which yield a fluorescent product rather than the chromogenic substrates noted above. In all cases, the enzyme-labeled antibody is added to the
25 first antibody- A β protofibril protein complex and allowed to bind to the complex, and then the excess reagent is washed away. A solution containing the appropriate substrate is then added to the tertiary complex of antibody-antigen-labeled antibody. The substrate reacts with the
30 enzyme linked to the second antibody, giving a qualitative visual signal, which may be further quantitated, usually

spectrophotometrically, to give an evaluation of the amount of antigen that is present in the serum sample.

Additionally, fluorescent compounds, such as fluorescein or rhodamine, may be chemically coupled to antibodies without altering their binding capacity. When activated by illumination with light of a particular wavelength, the fluorochrome-labeled antibody absorbs the light energy, inducing a state of excitability in the molecule, followed by emission of the light at a characteristic longer wavelength. The emission appears as a characteristic color visually detectable with a light microscope. As in the enzyme immunoassay (EIA), the fluorescent-labelled antibody is allowed to bind to the first antibody- A β protofibril form protein complex. After washing the unbound reagent, the remaining ternary complex is then exposed to light of the appropriate wavelength, and the fluorescence observed indicates the presence of the antigen. Immunofluorescence and EIA techniques are both very well established in the art and are particularly preferred for the present method. However, other reporter molecules, such as radioisotopes, chemiluminescent or bioluminescent molecules may also be employed. It will be readily apparent to the skilled artisan how to vary the procedure to suit the required use.

In another embodiment, the sample to be tested (e.g., human blood or spinal fluid containing a A β protofibril form) may be used in a single site immunoassay wherein it is adhered to a solid substrate either covalently or noncovalently. An unlabeled anti- A β protofibril protein antibody is brought into contact with the sample bound on the solid substrate. After a suitable period of incubation, for a period of time sufficient to allow formation of an

antibody-antigen binary complex a second antibody, labelled with a reporter molecule capable of inducing a detectable signal, is then added and incubation is continued allowing sufficient time for the formation of a ternary complex of antigen-antibody-labeled antibody. For the single site immunassay, the second antibody may be a general antibody (i.e., xenogeneic antibody to immunoglobulin, particularly anti-(IgM and IgG) linked to a reporter molecule) that is capable of binding an antibody that is specific for the A β protofibril protein form of interest.

A 13C3-like antibody may take one of numerous forms known in the art. Antibodies may take the form of any type of relevant antibody fragment, antibody binding portion, specific binding member, a non-protein synthetic mimic, or any other relevant terminology known in the art which refers to an entity which at least substantially retains the binding specificity/neutralization activity. Thus, the term "antibody" as used in any context within this specification is meant to include, but not be limited to, any specific binding member, immunoglobulin class and/or isotype (e.g., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgM, IgA, IgD, IgE and IgM); and biologically relevant fragment or specific binding member thereof, including but not limited to Fab, F(ab')₂, Fv, and scFv (single chain or related entity). Therefore, it is well known in the art, and is included as review only, that an "antibody" refers to a glycoprotein comprising at least two heavy (H) chains and two light (L) chains interconnected by disulfide bonds, or an antigen binding portion thereof. A heavy chain is comprised of a heavy chain variable region (VH) and a heavy chain constant region (CH1, CH2 and CH3). A light chain is comprised of a light chain variable region (VL) and a light chain constant region (CL).

25

The variable regions of both the heavy and light chains comprise framework regions (FWR) and complementarity determining regions (CDR). The four FWR regions are relatively conserved while CDR regions (CDR1, CDR2 and CDR3) represent hypervariable regions and are arranged from NH₂ terminus to the COOH terminus as follows: FWR1, CDR1, FWR2, CDR2, FWR3, CDR3, FWR4. The variable regions of the heavy and light chains contain a binding domain that interacts with an antigen while, depending of the isotype, the constant region(s) may mediate the binding of the immunoglobulin to host tissues or factors. That said, also included in the working definition of "antibody" are chimeric antibodies, humanized antibodies, a recombinant antibody, as human antibodies generated from a transgenic non-human animal, as well as antibodies selected from libraries using enrichment technologies available to the artisan. Antibody fragments are obtained using techniques readily known and available to those of ordinary skill in the art, as reviewed below. Therefore, an "antibody" is any such entity or specific binding member, which specifically binds the conformational epitope of the protofibril form of A β as described herein. Therefore, the term "antibody" describes an immunoglobulin, whether natural or partly or wholly synthetically produced; any polypeptide or protein having a binding domain which is, or is substantially homologous to, an antibody binding domain. These can be derived from natural sources, or they may be partly or wholly synthetically produced. Examples of antibodies are the immunoglobulin isotypes and their isotypic subclasses; fragments which comprise an antigen binding domain such as Fab, scFv, Fv, dAb, Fd and diabodies, as discussed without limitation, *infra*. It is known in the art that it is

possible to manipulate monoclonal and other antibodies and use techniques of recombinant DNA technology to produce other antibodies or chimeric molecules which retain the specificity of the original antibody. Such techniques may evolve introducing DNA encoding the immunoglobulin variable region, or the complementarity determining regions (CDRs), of an antibody to the constant regions, or constant regions plus framework regions, of a different immunoglobulin. A hybridoma or other cell producing an antibody may be subject to genetic mutation or other changes, which may or may not alter the binding specificity of antibodies produced. Antibodies can be modified in a number of ways, and the term "antibody" should be construed as covering any specific binding member or substance having a binding domain with the required specificity. Thus, this term covers antibody fragments, derivatives, functional equivalents and homologues of "antibody" including any polypeptide comprising an immunoglobulin binding domain, whether natural or wholly or partially synthetic. Such an entity may be a binding fragment encompassed within the term "antigen-binding portion" or "specific binding member" of an antibody including but not limited to (i) a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the VL, VH, CL and CH domains; (ii) a F(ab')₂ fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; (iii) a Fd fragment consisting of the VH and CH domains; (iv) a Fv fragment consisting of the VL and VH domains of a single arm of an antibody (v) a dAb fragment, which comprises a VH domain; (vi) an isolated complementarity determining region (CDR); (vii) a 'scAb', an antibody fragment containing VH and VL as well as either CL or CH; and (viii) artificial antibodies based upon protein

37

scaffolds, including but not limited to fibronectin type III polypeptide antibodies (e.g., see U.S. Patent No. 6,703,199, issued to Koide on March 9, 2004 and PCT International Application Publication No. WO 02/32925). Furthermore, 5 although the two domains of the Fv fragment, VL and VH, are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the VL and VH regions pair to form monovalent molecules (known as single 10 chain Fv (scFv)).

In one embodiment, the variable light (VL) region for the isolated 13C3 or 13C3-like antibodies of the present invention may comprise a 113 amino acid peptide sequence (SEQ ID NO: 5) which is encoded by a 339 base pair 15 nucleotide sequence (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
20 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
25 ATCTCTTGAGATCTGGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTATTTACATTGG
TACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTATACAGTTTCCAACCGATTT
TCTGGGGTCCCGGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGTCAGATTTCACTCAAGATC
AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAATACATTTGTTCTT
TGGACGTTCTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG (SEQ ID NO: 6)

30 In a further embodiment, the variable heavy (VH) region for the isolated 13C3 or 13C3-like antibodies of the present invention may comprise a 115 amino acid peptide sequence

38

(SEQ ID NO: 7) encoded by a 345 base pair nucleotide sequence (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
5 Asp Tyr Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu
Glu Trp Ile Gly Val Ile Ser Thr Lys Tyr Gly Lys Thr Asn Tyr
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp
Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Asp Gly Tyr Ser Trp
10 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO: 7);
CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGCCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGTCTCAGTGAAGATT
TCCTGCAAGGGTTCCGGCTACACATTCACTGATTATGCTATGCACTGGGTGAAGCAGAGT
CATGCAAAGAGTCTAGAGTGGATTGGAGTTATTAGTACTAAGTATGGTAAGACAACTAC
AACCAGAAGTTTAAAGGGCAAGGCCACAATGACTGTTGACAAATCCTCCAGCACAGCCTAT
15 ATGGAGCTTGCCAGATTGACATCTGAGGATTCTGCCATCTATTACTGTGCAAGAGGGGAC
GATGGTTATTCTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:
8).

In a further embodiment, the framework regions, FWR1, FWR2, FWR3, and FWR4, of the VL chain may be comprised of
20 amino acid set forth in SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, and SEQ ID NO:12, respectively, as follows:

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
25 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).

30 In a further embodiment, the complementarity determining regions, CDR1, CDR2, and CDR3, of the VL chain may be comprised of the amino acids set forth in SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, respectively, as follows:

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).

In a further embodiment, the framework regions, FWR1, FWR2, FWR3, and FWR4, of the VH chain may be comprised of the amino acids set forth in SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, and SEQ ID NO:19, respectively, as follows:

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).

In a further embodiment, the complementarity determining regions, CDR1, CDR2, and CDR3, of the VH chain may be comprised of the amino acids set forth in SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, respectively, as follows:

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).

Polyclonal or monoclonal antibodies for use in the disclosed treatment methods may be raised by known techniques. Monospecific murine (mouse) antibodies showing specificity to a conformational epitope of a target of choice may be purified from mammalian antisera containing antibodies reactive against this region, or may be prepared as monoclonal antibodies using the technique of Kohler and Milstein (1975, *Nature* 256: 495-497). Monospecific antibody as used herein is defined as a single antibody species or

multiple antibody species with homogenous binding characteristics, such as the mouse monoclonal antibodies exemplified herein with the 13C3 series of monoclonal antibodies. Hybridoma cells are produced by mixing the
5 splenic lymphocytes with an appropriate fusion partner, preferably myeloma cells, under conditions which will allow the formation of stable hybridomas. The splenic antibody producing cells and myeloma cells are fused, selected, and screened for antibody production. Hybridoma cells from
10 antibody positive wells are cloned by a technique such as the soft agar technique of MacPherson (1973, *Soft Agar Techniques*, in *Tissue Culture Methods and Applications*, Kruse and Paterson, Eds, Academic Press). Monoclonal antibodies are produced *in vivo* by injecting respective
15 hybridoma cells into pristine primed mice, collecting ascite fluid after an interval of time, and prepared by techniques well known in the art.

Beyond species specific monoclonal antibodies described above, the antibodies of the present invention may also be
20 in the form of a "chimeric antibody", a monoclonal antibody constructed from the variable regions derived from say, the murine source, and constant regions derived from the intended host source (e.g., human; for a review, see Morrison and Oi, 1989, *Advances in Immunology*, 44: 65-92).
25 For example, the variable light and heavy DNA sequences (e.g. SEQ ID NO: 6 and 8, respectively) from the rodent (e.g., mouse) antibody may be cloned into a mammalian expression vector. These light and heavy "chimeric" expression vectors are cotransfected into a recipient cell
30 line and selected and expanded by known techniques. This cell line may then be subjected to known cell culture techniques, resulting in production of both the light chain

and heavy chain of a chimeric antibody. Such chimeric antibodies have historically been shown to have the antigen-binding capacity of the original rodent monoclonal while significantly reducing immunogenicity problems upon host administration.

A logical improvement to the chimeric antibody is the "humanized antibody," which arguably reduces the chance of the patient mounting an immune response against a therapeutic antibody when compared to use of a chimeric or full murine monoclonal antibody. The strategy of "humanizing" a murine Mab is based on replacing amino acid residues which differ from those in the human sequences by site directed mutagenesis of individual residues or by grafting of entire complementarity determining regions (Jones et al., 1986, *Nature* 321: 522-526). This technology is again now well known in the art and is represented by numerous strategies to improve on this technology; namely by implementing strategies including, but not limited to, "reshaping" (see Verhoeven, et al., 1988, *Science* 239: 1534-1536), "hyperchimerization" (see Queen, et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:2869-2873) or "veneering" (Mark, et al., 1994, *Derivation of Therapeutically Active Humanized and Veneered anti-CD18 Antibodies* Metcalf and Dalton, eds. *Cellular Adhesion: Molecular Definition to Therapeutic Potential*. New York: Plenum Press, 291-312). These strategies all involve to some degree sequence comparison between rodent and human sequences to determine whether specific amino acid substitutions from a rodent to human consensus is appropriate. Whatever the variations, the central theme involved in generating a humanized antibody relies on CDR grafting, where these three antigen binding sites from both the light and heavy chain are effectively

42

removed from the rodent expressing antibody clone and subcloned (or "grafted") into an expression vector coding for the framework region of the human antibody. For example, utilizing the above techniques a humanized antibody
5 may be expressed wherein the CDR1, CDR2, and CDR3 regions of the variable light chain are set forth in SEQ ID NOS: 13, 14 and 15, respectively, and the CDR1, CDR2, and CDR3 regions of the variable heavy chain are set forth in SEQ ID NOS 20, 21 and 22, respectively. Therefore, a "humanized antibody"
10 is effectively an antibody constructed with only murine CDRs (minus any additional improvements generated by incorporating one or more of the above mentioned strategies), with the remainder of the variable region and all of the constant region being derived from a human
15 source.

The present invention also relates to isolated nucleic acid molecules and associated amino acid sequences which relate to the V_H and/or V_L regions of the 13C3 antibody, and more specifically, an isolated nucleic acid molecule
20 (polynucleotide) encoding a biologically relevant portion of 13C3, or affinity matured version or otherwise mutated version of 13C3, 1D1, 19A6 or other 13C3-like antibody. These nucleic acids are substantially free from other nucleic acids. For most cloning purposes, DNA is a
25 preferred nucleic acid. These DNA molecules may be subcloned into an expression vector and subsequently transfected into a host cell of choice wherein the recombinant host cell provides a source for substantial levels of a relevant portion of the 13C3, 1D1, 19A6 or 13C3-
30 , 1D1-, or 19A6-like antibody, or affinity matured version thereof. Such procedures may be used for a variety of utilities, such as generating scFvs or for co-expressing

these V_H and V_L chains in a mammalian expression vector system which encodes human C_H and C_L regions, of say, an IgG antibody. The degeneracy of the genetic code is such that, for all but two amino acids, more than a single codon

5 encodes a particular amino acid. This allows for the construction of synthetic DNA that encodes an antibody of the present invention where the nucleotide sequence of the synthetic DNA differs significantly from the nucleotide sequences disclosed herein, but still encodes such an

10 antibody. Such synthetic DNAs are intended to be within the scope of the present invention. If it is desired to express such synthetic DNAs in a particular host cell or organism, the codon usage of such synthetic DNAs can be adjusted to reflect the codon usage of that particular host, thus

15 leading to higher levels of expression of the an antibody of the present invention. In other words, this redundancy in the various codons which code for specific amino acids is within the scope of the present invention. Therefore, this invention is also directed to those DNA sequences which

20 encode RNA comprising alternative codons which code for the eventual translation of the identical amino acid, as shown below: A=Ala=Alanine: codons GCA, GCC, GCG, GCU; C=Cys=Cysteine: codons UGC, UGU; D=Asp=Aspartic acid: codons GAC, GAU E=Glu=Glutamic acid: codons GAA, GAG;

25 F=Phe=Phenylalanine: codons UUC, UUU; G=Gly=Glycine: codons GGA, GGC, GGG, GGU; H=His =Histidine: codons CAC, CAU; I=Ile =Isoleucine: codons AUA, AUC; AUU; K=Lys=Lysine: codons AAA, AAG; L=Leu=Leucine: codons UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU; M=Met=Methionine: codon AUG; N=Asp=Asparagine: codons GAU,

30 GAC; P=Pro=Proline: codons CCA, CCC, CCG, CCU; Q=Gln=Glutamine: codons CAA, CAG; R=Arg=Arginine: codons AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU; S=Ser=Serine: codons AGC, AGU,

44

UCA, UCC, UCG, UCU; T=Thr=Threonine: codons ACA, ACC, ACG, ACU; V=Val=Valine: codons GUA, GUC, GUG, GUU; W=Trp=Tryptophan: codon UGG; Y=Tyr=Tyrosine: codons UAC, UAU. Such recombinant expression vectors may then be stably
5 or transiently transfected into an appropriate cell line for the generation of alternative antibody form.

The present invention notes the existence of codon redundancy which may result in differing DNA molecules expressing an identical antibody or portion thereof (e.g.,
10 alternative nucleic acid molecules encoding an identical scFv or a VH and/or VL portion of an IgG). For purposes of this specification, a sequence bearing one or more replaced codons will be defined as a degenerate variation. Another source of sequence variation may occur through RNA editing.
15 Such RNA editing may result in another form of codon redundancy, wherein a change in the open reading frame does not result in an altered amino acid residue in the expressed protein. Also included within the scope of this invention are mutations either in the DNA sequence or the translated
20 antibody which improve the ultimate physical properties of the expressed antibody. To this end, the present invention relates to (i) affinity matured versions of a 13C3-like antibody, including but not limited to 13C3, 19A6 and 1D1, and/or (ii) mutated forms of a 13C3-like antibody, including
25 but not limited to 13C3, 19A6 and/or 1D1, including but not limited to one or more mutations in the CDR1, CDR2 and/or CDR3 regions as generated through known affinity maturation methodology and recombinant DNA techniques known for introducing site specific mutation. Such isolated or
30 purified nucleic acid molecules will represent the VH and/or VL portions of a 13C3-like antibody. These nucleic acids are substantially free from other nucleic acids. For most

cloning purposes, DNA is a preferred nucleic acid. These DNA molecules may be subcloned into an expression vector and subsequently transfected into a host cell of choice wherein the recombinant host cell provides a source for substantial
5 levels of a relevant portion of a 13C3-like antibody, or affinity matured version thereof. Such procedures may be used for a variety of utilities, such as generating scFvs or for co-expressing these VH and VL chains in a mammalian expression vector system which encodes human CH and CL
10 regions, of say, an IgG antibody.

The present invention also relates to recombinant vectors and recombinant hosts, both prokaryotic and eukaryotic, which contain nucleic acid molecules encoding the respective heavy and/or light regions of a 13C3-like
15 antibody. These nucleic acid molecules, in whole or in part, can be linked with other DNA molecules (i.e., DNA molecules which encompass immunoglobulin genes used for generation of a recombinant human antibody) that are not naturally linked, to form "recombinant DNA molecules" which
20 encode a respective human recombinant antibody. These vectors may be comprised of DNA or RNA. For most cloning purposes DNA vectors are preferred. Typical vectors include plasmids, modified viruses, bacteriophage, cosmids, yeast artificial chromosomes, and other forms of episomal or
25 integrated DNA. It is within the purview of the skilled artisan to determine an appropriate vector for a particular gene transfer, generation of a recombinant human antibody or other use. Methods of subcloning nucleic acid molecules of interest into expression vectors, transforming or
30 transfecting host cells containing the vectors, and methods of making substantially pure protein comprising the steps of introducing the respective expression vector into a host

cell, and cultivating the host cell under appropriate conditions are well known. The antibody (such as an IgG recombinant human antibody) so produced may be harvested from the host cells in conventional ways. Any known
5 expression vector may be utilized to practice this portion of the invention, including any vector containing a suitable promoter and other appropriate transcription regulatory elements. The resulting expression construct is transferred into a prokaryotic or eukaryotic host cell to produce
10 recombinant protein. Expression vectors are defined herein as DNA sequences that are required for the transcription of cloned DNA and the translation of their rnrRNAs in an appropriate host. Such vectors can be used to express eukaryotic DNA in a variety of hosts such as bacteria, blue
15 green algae, plant cells, insect cells and animal cells. Specifically designed vectors allow the shuttling of DNA between hosts such as bacteria-yeast or bacteria-animal cells. An appropriately constructed expression vector should contain: an origin of replication for autonomous
20 replication in host cells, selectable markers, a limited number of useful restriction enzyme sites, a potential for high copy number, and active promoters. A promoter is defined as a DNA sequence that directs RNA polymerase to bind to DNA and initiate RNA synthesis. A strong promoter
25 is one which causes rnrRNAs to be initiated at high frequency. Techniques for such manipulations can be found described in Sambrook, et al. (1989, Molecular Cloning. A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) are well known and available to the
30 artisan of ordinary skill in the art. Expression vectors may include, but are not limited to, cloning vectors, modified cloning vectors, specifically designed plasmids or

247

viruses. Commercially available mammalian expression vectors which may be suitable, include but are not limited to, pcDNA3.neo (Invitrogen), pcDNA3.1 (Invitrogen), pCI-neo (Promega), pLITMUS28, pLITMUS29, pLITMUS38 and 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), and 12D35 (ATCC 37565). Also, a variety of bacterial expression vectors are available, including but not limited to pCR2.1 (Invitrogen), pET1 1a (Novagen), lambda gtl 1 (Invitrogen), and pKK223-3 (Pharmacia). In addition, a variety of fungal cell expression vectors may be used, including but not limited to pYES2 (Invitrogen) and Pichie expression vector (Invitrogen). Also, a variety of insect cell expression vectors may be used, including but are not limited to pBlueBacIII and pBlueBacHis2 (Invitrogen), and pAcG2T (Pharmingen).

Recombinant host cells may be prokaryotic or eukaryotic, including but not limited to, bacteria such as *E. coli*, fungal cells such as yeast, mammalian cells including, but not limited to, cell lines of bovine, porcine, monkey and rodent origin; and insect cells. Mammalian species which may be suitable, include but are not limited to, L cells L-M(TK-) (ATCC CCL1.3), L cells L-M (ATCC CCL 1.2), Saos-2 (ATCC HTB-85), 293 (ATCC CRL1573), 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) and CPAE (ATCC CCL 209).

Yet another improvement over re-engineered antibodies as reviewed above is the generation of fully human monoclonal antibodies. The first involves the use of genetically engineered mouse strains which possess an immune system whereby the mouse antibody genes have been inactivated and in turn replaced with a repertoire of functional human antibody genes, while leaving other components of the mouse immune system unchanged. Such genetically engineered mice allow for the natural *in vivo* immune response and affinity maturation process which results in high affinity, fully human monoclonal antibodies. This technology is again now well known in the art and is fully detailed in various publications, including but not limited to U.S. Patent Nos. 5,939, 598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 and related family members (assigned to Abgenix, disclosing their XenoMouse technology); as well as U.S. Patent Nos. 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; and 5,770,429 (assigned to GenPharm International and available through Medarex, under the umbrella of the "UltraMab Human Antibody Development System"). See also a review from Kellerman and Green (2002, *Curr. Opinion in Biotechnology* 13: 593-597).

Finally, techniques are available to the artisan for the selection of antibody fragments from libraries using enrichment technologies, including but not limited to phage display, ribosome display (Hanes and Pluckthun, 1997, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94: 4937-4942), bacterial display (Georgiou, et al., 1997, *Nature Biotechnology* 15: 29-34) and/or yeast display (Kieck, et al., 1997, *Protein Engineering* 10: 1303-

49

1310) may be utilized as alternatives to previously discussed technologies to select single chain antibodies which specifically bind to target cytokine. Single-chain antibodies are selected from a library of single chain

5 antibodies produced directly utilizing filamentous phage technology. Phage display technology is known in the art (e.g., see technology from Cambridge Antibody Technology (CAT)) as disclosed in U.S. Patent Nos. 5,565,332; 5,733,743; 5,871,907; 5,872,215; 5,885,793; 5,962,255;

10 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, as well as other U.S. family members, or applications which rely on priority filing GB 9206318, filed 24 May 1992; see also Vaughn, et al. 1996, *Nature Biotechnology* 14: 309-314).

15 Single chain antibodies may also be designed and constructed using available recombinant DNA technology, such as a DNA amplification method (e.g., PCR), or possibly by using a respective hybridoma cDNA as a template. Single-chain antibodies can be mono-or bispecific; bivalent or

20 tetraivalent. A nucleotide sequence encoding a single-chain antibody can be constructed using manual or automated nucleotide synthesis, cloned into an expression construct using standard recombinant DNA methods, and introduced into a cell to express the coding sequence, as described below.

25 The present invention further relates to an antibody-based pharmaceutical composition comprising an effective amount a 13C3-like antibody, or an affinity matured version, which provides a prophylactic or therapeutic treatment choice to inhibit fibril and/or senile plaque formation

30 associated with Alzheimer's disease. The antibody-based pharmaceutical composition of the present invention may be formulated by any number of strategies known in the art

80

(e.g., see McGoff and Scher, 2000, *Solution Formulation of Proteins/Peptides*: In McNally, E.J., ed. Protein Formulation and Delivery. New York, NY: Marcel Dekker; pp. 139-158; Akers and Defilippis, 2000, *Peptides and Proteins as Parenteral Solutions*. In: Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins. Philadelphia, PA: Talyor and Francis; pp. 145-177; Akers, et al., 2002, *Pharm. Biotechnol.* 14:47-127). A pharmaceutically acceptable composition suitable for patient administration will contain an effective amount of the antibody in a formulation which both retains biological activity while also promoting maximal stability during storage within an acceptable temperature range. The pharmaceutical compositions can also include, depending on the formulation desired, pharmaceutically acceptable diluents, pharmaceutically acceptable carriers and/or pharmaceutically acceptable excipients, or any such vehicle commonly used to formulate pharmaceutical compositions for animal or human administration. The diluent is selected so as not to affect the biological activity of the combination. Examples of such diluents are distilled water, physiological phosphate-buffered saline, Ringer's solutions, dextrose solution, and Hank's solution. The amount of an excipient that is useful in the pharmaceutical composition or formulation of this invention is an amount that serves to uniformly distribute the antibody throughout the composition so that it can be uniformly dispersed when it is to be delivered to a subject in need thereof. It may serve to dilute the antibody to a concentration which provides the desired beneficial palliative or curative results while at the same time minimizing any adverse side effects that might occur from too high a concentration. It may also have a preservative

57

effect. Thus, for the antibody having a high physiological activity, more of the excipient will be employed. On the other hand, for any active ingredient(s) that exhibit a lower physiological activity, a lesser quantity of the excipient will be employed. In general, the amount of excipient in the composition will be between about 50% weight (w) and 99.9% w. of the total composition. If the antibody exhibits a particularly low physiological activity, the amount of excipient could be as little as 1% w. On the other hand, for an antibody that has a particularly high physiological activity, the amount of excipient may be between about 98.0% and about 99.9% w. In addition, the antibody or antibodies may be administered in the form of a "chemical derivative" (a molecule that contains additional chemical moieties which are not normally a part of the base molecule). Such moieties may improve the solubility, half-life, absorption, etc. of the biological agent. Alternatively, these moieties may attenuate undesirable side effects of the antibody. Pharmaceutical compositions can also include large, slowly metabolized macromolecules such as proteins, polysaccharides, polylactic acids, polyglycolic acids and copolymers (such as latex functionalized sepharose, agarose, cellulose, and the like), polymeric amino acids, amino acid copolymers, and lipid aggregates (such as oil droplets or liposomes). Additionally, these carriers can function as immunostimulating agents (i. e., adjuvants). For parenteral administration, agents of the invention can be administered as injectable dosages of a solution or suspension of the substance in a physiologically acceptable diluent with a pharmaceutical carrier which can be a sterile liquid such as water oils, saline, glycerol, or ethanol. Additionally, auxiliary substances, such as

wetting or emulsifying agents, surfactants, pH buffering substances and the like can be present in compositions. Other components of pharmaceutical compositions are those of petroleum, animal, vegetable, or synthetic origin, for example, peanut oil, soybean oil, and mineral oil. In general, glycols such as propylene glycol or polyethylene glycol are preferred liquid carriers, particularly for injectable solutions.

The antibody formulation may be in liquid form or solid form. A solid formulation is generally lyophilized and brought into solution prior to administration for either single or multiple dosing. The formulations should not be exposed to extreme temperature or pH so as to avoid thermal denaturation. Thus, it is essential to formulate an antibody composition of the present invention within a biologically relevant pH range. A solution buffered to maintain a proper pH range during storage is indicated, especially for liquid formulations stored for longer periods of time between formulation and administration. To date, both liquid and solid formulations require storage at lower temperatures (usually 2-8°C) in order to retain stability for longer periods. Formulated antibody compositions, especially liquid formulations, may contain a bacteriostat to prevent or minimize proteolysis during storage, including but not limited to effective concentrations (usually <1% w/v) of benzyl alcohol, phenol, m-cresol, chlorobutanol, methylparaben, and/or propylparaben. A bacteriostat may be contraindicated for some patients. Therefore, a lyophilized formulation may be reconstituted in a solution either containing or not containing such a component. Additional components may be added to either a buffered liquid or solid antibody formulation, including but not limited to sugars as

a cryoprotectant (including but not necessarily limited to polyhydroxy hydrocarbons such as sorbitol, mannitol, glycerol and dulcitol and/or disaccharides such as sucrose, lactose, maltose or trehalose) and, in some instances, a
5 relevant salt (including but not limited to NaCl, KCl or LiCl). Such antibody formulations, especially liquid formulations slated for long term storage, will rely on a useful range of total osmolarity to both promote long term stability at temperature of 2-8°C, or higher, while also
10 making the formulation useful for parenteral injection. An effective range of total osmolarity (the total number of molecules in solution) is from about 200 mOs/L to about 800 mOs/L. It will be apparent that the amount of a cyroprotectant, such as sucrose or sorbitol, will depend
15 upon the amount of salt in the formulation in order for the total osmolarity of the solution to remain within an appropriate range. Therefore a salt free formulation may contain from about 5% to about 25% sucrose, with a preferred range of sucrose from about 7% to about 15%, with an
20 especially preferred sucrose concentration in a salt free formulation being from 10% to 12%. Alternatively, a salt free sorbitol-based formulation may contain sorbitol within a range from about 3% to about 12%, with a preferred range from about 4% to 7%, and an especially preferred range is
25 from about 5% to about 6% sorbitol in a salt-free formulation. Salt-free formulations will of course warrant increased ranges of the respective cryoprotectant in order to maintain effective osmolarity levels. These formulation may also contain a divalent cation (including but not
30 necessarily limited to MgCl₂, CaCl₂ and MnCl₂); and a non-ionic surfactant (including but not necessarily limited to Polysorbate-80 (Tween 80®), Polysorbate-60 (Tween 60®),

Polysorbate-40 (Tween 40®) and Polysorbate-20 (Tween 20®), polyoxyethylene alkyl ethers, including but not limited to Brij 58®, Brij 35®, as well as others such as Triton X-100®, Triton X 114®, NP40®, Span 85 and the Pluronic series of non-ionic surfactants (e.g., Pluronic 121)). Any combination of such components, including probable inclusion of a bacteriostat, may be useful to fill the antibody-containing formulations of the present invention. The antibody composition of the present invention may also be a "chemical derivative", which describes an antibody that contains additional chemical moieties which are not normally a part of the immunoglobulin molecule (e.g., pegylation). Such moieties may improve the solubility, half-life, absorption, etc. of the base molecule. Alternatively the moieties may attenuate undesirable side effects of the base molecule or decrease the toxicity of the base molecule.

Numerous examples of various carriers, diluents, excipients and the such are known in the art and are disclosed in references cited herein, as well as *Remington's Pharmaceutical Sciences* (18th ed.; Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990), the contents of which are incorporated herein by reference. Briefly, it will be appreciated that suitable carriers, excipients, and other agents may be incorporated to formulate the pharmaceutical compositions to provide improved transfer, delivery, tolerance, and the like. The methods of incorporating the biological agent and/or additional active ingredient(s) into the carrier are known to a person of ordinary skill in the art and depend on the nature of the biological agent and the nature of the carrier selected by a person practicing the current invention. Ionic binding, gel encapsulation or physical trapping inside the carrier, iontophoresis and soaking the

88

carrier in a solution of the biological agent are suitable examples contemplated in formulating a pharmaceutical composition to be used to practice of the disclosed treatment methods. Alternatively, the carrier may be little more than a diluent for the biological agent. These formulations may include for example, powders, pastes, ointments, jelly, waxes, oils, lipids, anhydrous absorption bases, oil-in-water or water-in-oil emulsions, emulsions carbowax (polyethylene glycols of a variety of molecular weights), semi-solid gels, and semi-solid mixtures containing carbowax. The dosage regimen utilizing the compounds of the present invention is selected in accordance with a variety of factors including type, species, age, weight, sex and medical condition of the patient; the severity of the condition to be treated; the route of administration; the renal, hepatic and cardiovascular function of the patient; and the particular biological agent thereof employed. A physician or veterinarian of ordinary skill can readily determine and prescribe the effective amount of the drug required to prevent, counter or arrest the progress of the condition. Optimal precision in achieving concentrations of drug within the range that yields efficacy without toxicity requires a regimen based on the kinetics of the drug's availability to target sites. This involves a consideration of the distribution, equilibrium, and elimination of a drug. Any of the foregoing formulations may be appropriate in treatments and therapies in accordance with the present invention, provided that the active ingredient in the formulation is not inactivated by the formulation and the formulation is physiologically compatible.

The pharmaceutical compositions of the present invention may be administered to the host in any manner, strategy and/or combination available in the art in amounts sufficient to offer a therapeutic treatment against

5 Alzheimer's disease. These compositions may be provided to the individual by a variety of routes known in the art, especially parenteral routes, including but in no way limited to parenteral routes such as intravenous (IV), intramuscular (IM); or subcutaneous (SC) administration,

10 with IV administration being the norm within the art of therapeutic antibody administration. These compositions may be administered as separate or multiple doses (i.e., administration of the antibody at staggered times by maintaining the sterile condition of the formulation through

15 the treatment regime). The dosage regimen utilizing the compounds of the present invention is selected in accordance with a variety of factors including type, species, age, weight, sex and medical condition of the patient (such as a human patient); the severity of the condition to be treated;

20 the route of administration; the renal, hepatic and cardiovascular function of the patient; and the particular antibody thereof employed. A physician or veterinarian of ordinary skill can readily determine and prescribe the effective therapeutic amount of the antibody. Optimal

25 precision in achieving concentrations of antibody within the range that yields efficacy without toxicity requires a regimen based on the kinetics of the drug's availability to target sites. This involves a consideration of the distribution, equilibrium, and elimination of a drug.

30 Antibodies described herein may be used alone at appropriate dosages. Alternatively, co-administration or sequential administration of other agents may be desirable. It will be

possible to present a therapeutic dosing regime for the antibodies of the present invention in conjunction with administration of alternative prophylactic or therapeutic regimes. An effective dosage regime will vary depending upon many different factors, including means of administration, target site, physiological state of the patient, whether the patient is human or an animal, other medications administered, and whether treatment is prophylactic or therapeutic. For administration of a 13C3-like antibody, the dosage ranges from about 0.0001 to 100 mg/kg, and more usually 0.01 to 5 mg/kg of the host body weight. In the case of Alzheimer's disease, amyloid deposits occur in the brain, agents of the invention can also be administered in conjunction with other agents that increase passage of the agents of the invention across the blood-brain barrier.

Another aspect regarding delivery and dosage regimes for a 13C3-like antibody composition of the present invention relates to drug delivery via parenteral routes, which may include non-injectable and injectable devices. Typically, injectable compositions are prepared as either liquid solutions or suspensions; solid forms suitable for solution in, or suspension in, liquid vehicles prior to injection can also be prepared. The preparation also can be emulsified or encapsulated in liposomes or microparticles such as polylactide, polyglycolide, or copolymer for enhanced adjuvant effect, as discussed above (see Langer, 1990, *Science* 249: 1527-1523; and Hanes, 1997, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28: 97-119). The agents of this invention can be administered in the form of a depot injection or implant preparation which can be formulated in such a manner

as to permit a sustained or pulsatile release of the active ingredient.

Specific embodiments include PLGA microspheres, as discussed herein and as further known in the art, as well as
5 polymer-based non-degradable vehicles comprising poly (ethylene-co-vinyl acetate; PEVAc). Additionally, controlled-release and localized delivery of antibody-based therapeutic products is reviewed in Grainger, et al., 2004, *Expert Opin. Biol. Ther.* 4(7): 1029-1044), hereby
10 incorporated by reference in its entirety. Suitable microcapsules capable of encapsulating the antibody may also include hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and polymethyl methacrylate microcapsules prepared by coacervation techniques or by interfacial polymerization.
15 See PCT publication WO 99/24061 entitled "Method for Producing IGF-1 Sustained-Release Formulations," wherein a protein is encapsulated in PLGA microspheres, this reference which is hereby incorporated herein by reference in its entirety. In addition, microemulsions or colloidal drug
20 delivery systems such as liposomes and albumin microspheres, may also be used. Other preferred sustained-release compositions employ a bioadhesive to retain the antibody at the site of administration. As noted above, the sustained-release formulation may comprise a biodegradable polymer
25 into which the antibody is disposed, which may provide for non-immediate release. Non-injectable devices may be described herein as an "implant", "pharmaceutical depot implant", "depot implant", "non-injectable depot" or some such similar term. Common depot implants may include, but
30 are not limited to, solid biodegradable and non-biodegradable polymer devices (such as an extended polymer or coaxial rod shaped device), as well as numerous pump

59

systems also known in the art. Injectable devices are split into bolus injections (release and dissipation of the drug subsequent to injection), and repository or depot injections, which provide a storage reservoir at the site of injection, allowing for sustained-release of the biological agent over time. A depot implant may be surgically tethered to the point of delivery so as to provide an adequate reservoir for the prolonged release of the antibody over time. Such a device will be capable of carrying the drug formulation in such quantities as therapeutically or prophylactically required for treatment over the pre-selected period. The depot implant may also provide protection to the formulation from degradation by body processes (such as proteases) for the duration of treatment. As known in the art, the term "sustained-release" refers to the gradual (continuous or discontinuous) release of such an agent from the block polymer matrix over an extended period of time. Regardless of the specific device, the sustained-release of the 13C3-like antibody composition will result in a local, biologically effective concentrations of the antibody. A sustained release of the biological agent(s) will be for a period of a single day, several days, a week or more; but most likely for a month or more, or up to about six months, depending on the formulation. Natural or synthetic polymers known in the art will be useful as a depot implant due to characteristics such as versatile degradation kinetics, safety, and biocompatibility. These copolymers can be manipulated to modify the pharmacokinetics of the active ingredient, shield the agent from enzymatic attack, as well as degrading over time at the site of attachment or injection. The artisan will understand that there are ample teachings in the art to manipulate the

properties of these copolymers, including the respective production process, catalysts used, and final molecular weight of the sustained-release depot implant or depot injection. Natural polymers include but are not limited to

5 proteins (e.g., collagen, albumin or gelatin); polysaccharides (cellulose, starch, alginates, chitin, chitosan, cyclodextrin, dextran, hyaluronic acid) and lipids. Biodegradable synthetic polymers may include but are not limited to various polyesters, copolymers of L-

10 glutamic acid and gamma ethyl-L-glutamate (Sidman et al., 1983, Biopolymers 22:547-556), polylactides ([PLA]; U.S. Pat. No. 3,773,919 and EP 058,481), polylactate polyglycolate (PLGA) such as polylactide-co-glycolide (see, for example, U.S. Pat. Nos. 4,767,628 and 5,654,008),

15 polyglycolide (PG), polyethylene glycol (PEG) conjugates of poly(α -hydroxy acids), polyorthoesters, polyaspirins, polyphosphagenes, vinylpyrrolidone, polyvinyl alcohol (PVA), PVA-g-PLGA, PEGT-PBT copolymer (polyactive), methacrylates, poly(N-isopropylacrylamide), PEO-PPO-PEO (pluronic), PEO-

20 PPO-PAA copolymers, PLGA-PEO-PLGA, polyorthoesters (POE), or any combinations thereof, as described above (see, for example, U.S. Pat. No. 6,991,654 and U.S. Pat. Appl. No. 20050187631, each of which is incorporated herein by reference in its entirety, hydrogels (see, for example,

25 Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277; Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105, non-degradable ethylene-vinyl acetate (e.g. ethylene vinyl acetate disks and poly(ethylene-co-vinyl acetate)), degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the Lupron Depot™,

30 poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid (EP 133,988), hyaluronic acid gels (see, for example, U.S. Pat. No. 4,636,524), alginic acid suspensions, polyorthoesters (POE), and the

like. Polylactide (PLA) and its copolymers with glycolide (PLGA) have been well known in the art since the commercialization of the Lupron Depot™, approved in 1989 as the first parenteral sustained-release formulation utilizing PLA polymers. Additional examples of products which utilize PLA and PLGA as excipients to achieve sustained-release of the active ingredient include Atridox (PLA; periodontal disease), Nutropin Depot (PLGA; with hGH), and the Trelstar Depot (PLGA; prostate cancer). Other synthetic polymers included but are not limited to poly(ϵ -caprolactone), poly3-hydroxybutyrate, poly(β -malic acid) and poly(dioxanone)]; polyanhydrides, polyurethane (see WO 2005/013936), polyamides, cyclodestrans, polyorthoesters, n-vinyl alcohol, polyethylene oxide/polyethylene terephthalate, polyphosphazene, polyphosphate, polyphosphonate, polyorthoester, polycyanoacrylate, polyethyleneglycol, polydihydropyran, and polyacetal. Non-biodegradable devices include but are not limited to various cellulose derivatives (carboxymethyl cellulose, cellulose acetate, cellulose acetate propionate, ethyl cellulose, hydroxypropyl methyl cellulose) silicon-based implants (polydimethylsiloxane), acrylic polymers, (polymethacrylate, polymethylmethacrylate, polyhydroxy(ethylmethacrylate), as well as polyethylene-co-(vinyl acetate), poloxamer, polyvinylpyrrolidone, poloxamine, polypropylene, polyamide, polyacetal, polyester, polyethylene-chlorotrifluoroethylene, polytetrafluoroethylene (PTFE or "Teflon™"), styrene butadiene rubber, polyethylene, polypropylene, polyphenylene oxide-polystyrene, poly-a-chloro-p-xylene, polymethylpentene, polysulfone and other related biostable polymers. Carriers suitable for sustained-release depot formulations include, but are not limited to, microspheres,

62

films, capsules, particles, gels, coatings, matrices, wafers, pills or other pharmaceutical delivery compositions. Examples of such sustained-release formulations are described above. See also U.S. Patent Nos. 6,953,593; 5 6,946,146; 6,656,508; 6,541,033; and 6,451,346, the contents of each which are incorporated herein by reference. The dosage form must be capable of carrying the drug formulation in such quantities and concentration as therapeutically required for treatment over the pre-selected period, and 10 must provide sufficient protection to the formulation from degradation by body processes for the duration of treatment. For example, the dosage form can be surrounded by an exterior made of a material that has properties to protect against degradation from metabolic processes and the risk 15 of, e.g., leakage, cracking, breakage, or distortion. This can prevent expelling of the dosage form contents in an uncontrolled manner under stresses it would be subjected to during use, e.g., due to physical forces exerted upon the drug release device as a result of normal joint articulation 20 and other movements by the subject or for example, in convective drug delivery devices, physical forces associated with pressure generated within the reservoir. The drug reservoir or other means for holding or containing the drug must also be of such material as to avoid unintended 25 reactions with the active agent formulation, and is preferably biocompatible (e.g., where the dosage form is implanted, it is substantially non-reactive with respect to a subject's body or body fluids). Generally, the respective biological agent(s) is administered to an individual for at 30 least 12 hours to at least a week, and most likely via an implant designed to deliver a drug for at least 10, 20, 30, 100 days or at least 4 months, or at least 6 months or more,

as required. The 13C3-like antibody can be delivered at such relatively low volume rates, e.g., from about 0.001 ml/day to 1 ml/day so as to minimize tissue disturbance or trauma near the site where the formulation is released. The formulation may be released at a rate of, depending on the specific biological agent(s), at a low dose, e.g., from about 0.01 µg/hr or 0.1 µg/hr, 0.25 µg/hr, 1 µg/hr, generally up to about 200 µg/hr, or the formulation is delivered at a low volume rate e.g., a volume rate of from about 0.001 ml/day to about 1 ml/day, for example, 0.01 micrograms per day up to about 20 milligrams per day. Dosage depends on a number of factors such as potency, bioavailability, and toxicity of the active ingredient (e.g., IgG antibody) used and the requirements of the subject.

These and other objects, advantages and features of the present invention will become apparent to those persons skilled in the art upon reading the details of the methodology and compositions as more fully set forth below.

20

EXAMPLES

EXAMPLE 1: PREPARING THE PROTOFIBRILLAR FORM OF AMYLOID BETA (Aβ₄₂)

Aβ₄₂ synthetic peptides (American Peptide Company, Inc., CA) were prepared according to the method described by Fezoui et al. (Fezoui, et al. Amyloid 7(3): 166-178. (2000)) Briefly, lyophilized Aβ₄₂ was dissolved in 2mM NaOH at a 1mg/ml concentration (pH~10.5) followed by sonication and lyophilization. NaOH-treated Aβ was dissolved in water at a concentration of 1mg/ml and filtered with a 0.22µm ULTRAFREE-MC filter (Millipore, MA). A 0.5mg/ml peptide solution was buffered at the final concentration of 50mM phosphate; 100mM sodium chloride and incubated for 4 hr. at

room temperature. To separate the protofibrillar form from the low-molecular weight proteins, the supernatant was fractionated using size-exclusion chromatography. Purified SEC fractions were then stored at 4C°.

5 Various forms of the A β 42 protein are represented as showing its ability as a monomer or dimer to associate together to form a high-molecular weight oligomer (protofibril) (Figure 1). Further aggregation of the soluble protofibrils creates an insoluble form of the
10 protein, whereas the protofibrils can disassociate back to a lower-molecular weight form.

To purify the protofibrillar form of A β from the low-molecular weight proteins, samples were fractionated with an AKTA chromatography system using a Superdex 75 size-
15 exclusion column. Figure 2A shows that without incubating the A β 42 synthetic peptides at room temperature, there is no aggregation of oligomers to form the protofibrils. Figure 2B illustrates that after a 4 hr. incubation of the A β 42 synthetic peptides, subsequent SEC purification shows a
20 definitive protofibril fraction.

EXAMPLE 2: GENERATING MONOCLONAL ANTIBODIES WITH SPECIFICITY FOR PROTOFIBRILLAR A β

The 13C3, 19A6, and 1D1 antibodies were created by immunizing Balb/c mice with the fibrillar A β protein using
25 a protocol known in the art. (Harlow, et al. Cold Spring Harbor Laboratory.(1988)) Spleens were removed and fused with SP2 myeloma cells in several 96 well plates. Fusion cultures were monitored for growth and supernatants were screened for their ability to bind the protofibrillar
30 fraction by antibody-capture immunoassays.

EXAMPLE 3: CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES WITH SPECIFICITY FOR PROTOFIBRILLAR A β

Antibody capture assays were used to further characterize the monoclonal antibodies produced from the hybridomas (13C3, 19A6, and 1D1). To microtiter plates, 50ul of a 2ug/ml protofibrillar A β 42 protein solution was added to each well and the plates were incubated at 4°C overnight. After incubation, the residual antigen solution was removed and washed with PBS solution. Serial dilutions of the hybridoma supernatants were added to the plates containing the bound antigen and incubated for 1 hour at room temperature. This primary antibody solution was removed and the wells were again washed with PBS solution. An enzyme-labeled secondary antibody was next added and incubated for 1 hour at room temperature. After removal of the secondary antibody solution, a chromogenic substrate specific for the conjugated enzyme, was added to the reaction and the detection of the captured antibody yielded quantitative results.

Additionally, changing the secondary reagent to isotype-specific anti-immunoglobulin antibodies, the particular immunoglobulin isotype of each monoclonal was identified. In these experiments, commercially available anti-A β 42 antibodies were used to compare the binding specificity of 13C3, 19A6, and 1D1 monoclonal antibodies.

Figures 3A and B illustrate the protofibrillar (PF) and the low-molecular weight (LMW) forms of the A β 42 peptide used to test the specificity of the 13C3 antibody in antibody capture immunoassays. Specifically, Figure 3A illustrates the plot generated from the ELISAs showing that the 13C3 antibody is specific for the protofibrillar form(PF) of A β 42 and does not recognize the low-molecular

weight(LMW) forms of the protein. Figure 3B illustrates the ELISA data with the commercially available 4G8 antibody, showing that it recognizes both the low-molecular weight and the protofibrillar forms of the A β 42 protein.

5 EXAMPLE 4: SPECIFICITY OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO THE
PROTOFIBRILLAR FORM OF A β 42 USING SURFACE PLASMON RESONANCE
(bIACORE).

The purified monoclonal antibodies listed in Table 1 (below), were immobilized to a BIAcore sensor chip in accordance with published protocols. (Nice, et al. BioEssays 21: 339-352 (1999)). The high sensitivity of the BIAcore optical response quantifies a change in reflectivity and a baseline response for the ligand alone is generated. The interaction analysis is performed as the analytes, the LMW form or the PF form of A β 42, are injected in solution over the sensor chip and the change in surface plasmon resonance generates a response identifying the specificity of each antibody's ability to bind LMW and PF A β 42. Both the 13C3 and the 19A6 antibodies all bound to the PF form of A β 42 with higher specificity than the LMW form. Of all the antibodies used in this experiment, the commercially-available antibodies showed higher specificity for the LMW A β 42 over the PF form of A β 42, as indicated the ratio of PF binding/ LMW binding.

25 Table 1

Name	Epitope	Isotype	Source	BIACORE Binding Analysis		
				LMW	PF	Ratio (PF/LMW)
1D1	structure	IgG1	Ravetch	23.2	122.3	5.3
13C3	structure	IgG1	Ravetch	25	124.8	5.0
19A6	structure	IgG3	Ravetch			
3D6	A β 1-5	IgG2b	Elan Pharmaceuticals	424.6	402.7	0.9
4G8	A β 17-22	IgG2b	Senetek Inc.	228.6	340.3	1.5
6E10	A β 3-8	IgG2b	Senetek Inc.	400.1	541.1	1.4
82E1	A β 1-17	IgG1	IBL	69.9	68.4	1.0

The Surface Plasmon Resonance Analysis shown by sensorgram that 13C3 (Figure 4B) does not bind the LMW forms

of A β 42 protein. However, the 438 (Figure 4A) shows a standard association/disassociation curve for the LMW A β 42 protein. The antibody isotype control IgG1 (Figure C) does not bind the LMW A β as well. Automated BIAcore systems, which use the detection principle of Surface Plasmon Resonance, were used in these experiments. The binding specificity data for the 19A6 antibody showed that 19A6 had a binding ratio of 5.8, which is similar to that of 13C3 at a ratio of 5.3.

10 EXAMPLE 5: EPITOPE MAPPING OF THE 13C3 ANTIBODY

Mapping the epitopes of 13C3, 1D1 and 19A6 was conducted using the RepliTope Microarrays system (JPT Peptide Technologies GmbH) according to published protocol. (Korth, et al. 390: 74 (1997)). Each spot on the microarray contains a 13 amino acid peptide of A β 42 where each shift in position on the microarray represents an amino acid shift (from N-term to C-term), i.e. SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24...SEQ ID NO: 51; and SEQ ID NO: 52. Listed below are the peptides and their exact amino acid sequence, corresponding to their position on the slide array. Once the peptides are fixed to the RepliTope Microarray, the samples are incubated with the 13C3 antibody and then subsequently labeled with a secondary that is conjugated to a chemiluminescence tag of choice. The spots that yield a signal represent the epitope binding sites on the protein by the antibody.

- 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)
 5 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)
 10 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)
 15 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)
 20 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)
 25 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)
 30 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)
 35 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)
 40 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)
 45 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)
 50

Figure 5A illustrates a dot blot from a RepliTope Microarray experiment identifying the epitopes of the antibodies, 13C3, 1D1 and 4G8 on the A β 1-42 peptide. The bound antibody is represented by a chemiluminescent signal.

5 Figures 5B illustrates the A β 1-42 amino acid sequence showing the polypeptide segments of the 13C3 epitopes as they occur in the sequence. The 1D1 antibody shows the same epitopes as the 13C3 whereas the commercial 4G8 antibody identifies a different epitope.

10 EXAMPLE 6: CHARACTERIZATION OF 13C3 SPECIFICITY

Figure 6 illustrates fractions from size-exclusion chromatography of the supernatants from the 7PA2 cell line, a secreting A β oligomer cell line. Antibody capture assays were used to further characterize the binding of the 13C3
15 antibody with the protofibrillar and low-molecular weight fractions from the SEC-purified 7PA2. To microtiter plates, 100ul of a 1:200 dilution of each fraction was added to each well and the plates were incubated at 4°C overnight. After incubation, the residual antigen solution was removed
20 and washed with PBS solution. Serial dilutions of the 13C3 supernatants were added to the plates containing the bound antigen and incubated for 1 hour at room temperature. This primary antibody solution was removed and the wells were again washed with PBS solution. An enzyme-labeled secondary
25 antibody was next added and incubated for 1 hour at room temperature. After removal of the secondary antibody solution, a chromogenic substrate specific for the conjugated enzyme, was added to the reaction and the detection of the captured antibody yielded quantitative
30 results. This assay identified that the 13C3 antibody specifically recognizes only the protofibrillar fraction whereas the 4G8 antibody recognizes all fractions. The 7PA2

70

cell line was provided by Dennis J. Selkoe, M.D. at Harvard Medical School.

EXAMPLE 7 CHARACTERIZATION OF 13C3 REACTIVITY BY EM.

The method of staining was performed using a standard
5 protocol. (Brenner, et al. Biochim. Biophys. Ada 34, 103-
110 (1959)). A small volume (10 microliters) of a 0.2mg/ml
protofibrillar solution was applied to carbon-coated formvar
grids (400 mesh) for 2 min. Then the grids were blocked in
1%BSA and incubated with the 13C3 antibody followed by a
10 subsequent incubation with a secondary antibody conjugated
to colloidal gold. The samples were negatively stained by
placing on 2 successive drops of 2% phosphotungstic acid for
30 sec each. Excess stain was drawn off with filter paper,
the grids were air dried, and observed on a JEOL 100CX
15 transmission electron microscope at 80kV. Images were
recorded on large format Kodak 4489 negatives and digitized
on a flat bed scanner.

IEM (Immuno-Electron Microscopy) images showing the
binding specificity of the anti-A β antibody clone 13C3 to
20 A β 42 fibers (Figures 7B and 7C), whereas the isotype control
antibody, IgG1 shows no binding (Figure 7A). The secondary
antibody is conjugated to a colloidal gold particle.

EXAMPLE 8: 13C3 TREATMENT OF A MOUSE MODEL OF HUMAN AD

The 13C3 monoclonal antibody was used to treat A β
25 plaques in an Alzheimer's Disease mouse model, TgCRND8. The
mouse contains the human APP695 cDNA transgene, which
accelerates the deposition of A β amyloid plaques in the
mouse brain, appearing within 1 month of age. A sample
group of 5 TgCRND8 mice five weeks in age were give
30 immunizations of the 13C3 monoclonal antibody at a
concentration of 10mg/ kg of mouse once a week for the
duration of seven weeks. A second group of 5 TgCRND8 mice,

were given the treatment course, however an isotype control IgG1 antibody was administered. Experiments were repeated with treatments at twice a week instead of once a week.

Both control and experimental animals were sacrificed
5 at 12 weeks of age. Histological preparations of the brains revealed reductions in A β plaques in 13C3 treated mice.

Serial sections of cryopreserved brains from TgCRND8 mice were treated with 13C3 or IgG1 monoclonal antibodies. Figures 8A and 8B illustrate differences in the number of A β
10 amyloid plaques between each respective antibody.

Statistical T-tests show that the 13C3 antibody treatment at once a week reduces A β amyloid plaques in the Alzheimer Disease model (Figure 9A). However, twice a week treatments (Figure 9B) show the same level of plaque
15 reduction.

All of the above TgCRND8 mice were obtained from Dr. David Westaway of the University of Toronto.

EXAMPLE 9: MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE VARIABLE REGIONS OF MAB 13C3

20 The IgG heavy chain variable region and the IgG Kappa light chain region were cloned from the 13C3 hybridoma. Both heavy and light chain sequences (Figure 10) were analyzed using VBASE2 (<http://www.vbase2.org>), a database of germ-line variable genes from the immunoglobulin loci of
25 human and mouse extracted from the EMBL-Bank and Ensembl data libraries. (Retter et al. Nucleic Acids Res. 33:D671-4 (2005)). Results for the analysis identified that both the heavy and light chain variable regions were from a newly
30 identified immunoglobulin but had 73% and 81% identity, respectively, to other immunoglobulin variable regions in the database. Also identified in these sequences against these databases were the Frame Work Regions (FWR) and the Complementarity Determining Regions (CDR). Results were

only slightly varied when sequences were analyzed against VBASE, KABAT, and IMGT/LIGM database.

EXAMPLE 10: ACUTE PERIPHERAL ADMINISTRATION OF 13C3 IN APP TRANSGENIC MICE DOES NOT LEAD TO AN INCREASE IN PLASMA A β UNLIKE REFERENCE ANTIBODY 3D6 ADMINISTRATION

APP transgenic mice (Thy APPSL, age 10-14 weeks) were injected intraperitoneally at the dose of 10 mg/kg (i.e., 300 μ g/mouse) with antibodies 13C3, a control IgG1 (DM4, not recognizing A β) and a reference anti-A β antibody 3D6 recognizing all conformers of A β . Plasma A β was quantified at time zero pre-injection, 6h, 24 h and 7days post injection in the same mice. Quantification of plasma A β was performed with an immunoassay using anti-A β antibody pairs not interfering with 13C3 or 3D6 binding to A β .

Administration of 3D6, an antibody against all conformers of A β , leads to a large increase in plasma A β , likely by protecting A β molecules from degradation. This effect was used to suggest the potential "peripheral sink" hypothesis as mechanism of action of anti-A β immunotherapy (Demattos et al., 2001, PNAS 17:8850). Unlike 3D6, 13C3 administration does not lead to any increase in plasma A β levels. This is consistent with the properties of 13C3, an antibody that is specific for the protofibrillar forms of A β and is not recognizing the soluble mono- or oligomeric forms of A β peptide. These forms are the likely ones present in plasma.

EXAMPLE 11: 13C3 RECOGNIZES HUMAN AMYLOID NEURITIC PLAQUES (AGGREGATED) IN AD BRAINS BUT NOT THE DIFFUSE A β DEPOSITS UNLIKE THE REFERENCE 3D6 ANTI-A β ANTIBODY

Immunohistochemistry studies were performed with 13C3 and 3D6 antibodies on human Alzheimer-diagnosed brain sections using standard techniques. Antibody immunostaining was detected with a DAB chromogen (Fig. 12). 13C3 labels amyloid deposits with a typical morphology of mature amyloid

73

neuritic plaques (also called dense plaques) with a very dense core surrounded by a lighter halo or for the larger plaques a very strong staining. In adjacent brain sections, 3D6 stains many more objects than 13C3 as seen at lower magnification (Fig. 12, left panels). Further characterization at higher magnification (Fig. 12, right panels) indicated that 3D6 labels the same mature amyloid neuritic plaques as 13C3 and, in addition, numerous diffuse amyloid deposits that have been classically described using anti-A β immunolabelling. The diffuse plaques are not of fibrillar nature as described in the literature as they cannot be detected by thioflavin S and other histological markers of fibrils (Mann, 1989, Ann. Med. 21:133). To rule out differences in sensitivity of the two antibodies, similar experiments were conducted with a higher concentration (20 μ g/ml) of 13C3 and again diffuse deposits could not be detected. This data is consistent with the properties of 13C3, an antibody that is specific for the protofibrillar forms of A β and is not recognizing the soluble mono- or oligomeric forms of A β peptide unlike 3D6.

INDUSTRIAL APPLICABILITY

The invention has applications in the treatment and diagnosis of Alzheimer's disease.

All publications cited in the specification, both patent publications and non-patent publications, are indicative of the level of skill of those skilled in the art to which this invention pertains. All these publications are herein fully incorporated by reference to the same extent as if each individual publication were specifically and individually indicated as being incorporated by reference.

74

Although the invention herein has been described with reference to particular embodiments, it is to be understood that these embodiments are merely illustrative of the principles and applications of the present invention. It is
5 therefore to be understood that numerous modifications may be made to the illustrative embodiments and that other arrangements may be devised without departing from the spirit and scope of the present invention as defined by the following claims.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated antibody that specifically interacts and shows a measurable affinity to a conformational epitope of a protofibril form of A β peptide, whereby the protofibril epitope is represented by an exposed region of a A β -protofibril form comprising the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2, wherein said antibody shows minimal or no affinity for monomer or dimer forms of A β peptide.
2. The antibody of claim 1 which is a monoclonal antibody.
3. The monoclonal antibody of claim 2 which is a humanized monoclonal antibody.
4. The monoclonal antibody of claim 2 which is a human monoclonal antibody.
5. An isolated antibody that specifically interacts and shows a measurable affinity to a conformational epitope of a protofibril form of A β peptide, whereby the protofibril epitope is represented by an exposed region of a A β -protofibril form comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:3 and SEQ ID NO:4, wherein said antibody shows minimal or no affinity for monomer or dimer forms of A β peptide.
6. The antibody of claim 5 which is a monoclonal antibody.
7. The monoclonal antibody of claim 6 which is designated 13C3.
8. The monoclonal antibody of claim 6 which is a humanized monoclonal antibody

9. The monoclonal antibody of claim 6 which is a human monoclonal antibody.

10. The antibody of claim 5 further comprising a variable light chain comprised of the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:5.

11. The antibody of claim 5 further comprising a variable heavy chain comprised of the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:7.

12. The antibody of claim 5 further comprising a variable light chain comprising a CDR1 region as set forth in SEQ ID NO:13, a CDR2 region as set forth in SEQ ID NO:14, and a CDR3 as set forth in SEQ ID NO:15.

13. The antibody of claim 5 further comprising a variable heavy chain comprised of a CDR1 region as set forth in SEQ ID NO:20, a CDR2 region as set forth in SEQ ID NO:21, and a CDR3 as set forth in SEQ ID NO:22.

14. A method of producing a monoclonal antibody which specifically binds *in vitro* to a repeating conformational epitope of a protofibril form of β -amyloid peptide while showing minimal affinity to low molecular weight forms of β -amyloid peptide, comprising:

(a) immunizing a mammal with the protofibril form of β -amyloid peptide;

(b) harvesting B-cells of said mammal;

(c) creating hybridomas from the harvested B-cells, wherein said hybridomas produce antibodies; and,

(d) selecting hybridomas which produce antibodies specifically binding to the protofibril form of β -amyloid

peptide while showing minimal affinity to monomer or dimer forms of β -amyloid peptide.

15. A method for quantifying the amount of a protofibril form of β -amyloid peptide in a tissue or fluid sample, comprising:

(a) obtaining the tissue or fluid sample from a subject;

(b) contacting the tissue or fluid sample with an antibody or fragment thereof that specifically binds to the protofibril form of β -amyloid peptide while showing minimal affinity to low molecular weight forms of β -amyloid peptide; and,

(c) quantifying the amount of protofibril form of β -amyloid peptide in the sample.

16. The method of claim 15 wherein the antibody is monoclonal antibody selected from the group consisting of 13C3, 1D1 and 19A6.

17. A kit for detecting protofibril form of β -amyloid peptide while showing minimal affinity to low molecular weight forms of β -amyloid peptide, comprising:

(a) an antibody or a fragment thereof, capable of specifically binding *in vitro* to a repeating conformational epitope of a protofibril form of β -amyloid peptide while showing minimal affinity to low molecular weight forms of β -amyloid peptide; and,

(b) a reagent that binds, directly, or indirectly, to said antibody or the fragment thereof.

18. The kit of claim 17 wherein the antibody is monoclonal antibody selected from the group consisting of 13C3, 1D1 and 19A6.

19. A method of treating or preventing deposition of
5 β -amyloid fiber plaques within a mammal which comprises administering to the mammal pharmaceutically effective amount of, at the minimum, variable region fragment which specifically interacts with the protofibril form of β -amyloid peptide so as to inhibit formation and deposition of
10 β -amyloid fiber plaques.

20. The method of claim 19 wherein the antibody is a monoclonal antibody.

21. The method of claim 20 wherein the monoclonal antibody is an antibody selected from the group consisting
15 of 13C3, 19A6 and 1D1.

22. The method of claim 20 wherein the monoclonal antibody is a humanized monoclonal antibody.

23. The method of claim 20 wherein the monoclonal antibody is a human monoclonal antibody.

20 24. A hybridoma which secretes an antibody selected from the group consisting of 13C3, 19A6 and 1D1.

25 25. An isolated nucleic acid molecule encoding a variable heavy chain fragment of monoclonal antibody 13C3 wherein the variable heavy chain fragment comprises the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:7.

26. An isolated nucleic acid molecule encoding a variable heavy chain fragment of monoclonal antibody 13C3 wherein the nucleic acid molecule comprises the nucleotide sequence as set for in SEQ ID NO:8.

27. An expression vector for the expression of a variable heavy chain fragment of monoclonal antibody 13C3 in a recombinant host cell wherein said expression vector contains the nucleic acid molecule of claim 26.

5 28. A host cell which expresses a variable heavy chain fragment of monoclonal antibody 13C3 wherein said host cell contains the expression vector of claim 27.

29. An isolated nucleic acid molecule encoding a variable light chain fragment of monoclonal antibody 13C3
10 wherein the variable light chain fragment comprises the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:5.

30. An isolated nucleic acid molecule encoding a variable light chain fragment of monoclonal antibody 13C3 wherein the nucleic acid molecule comprises the nucleotide
15 sequence as set for in SEQ ID NO:6.

31. An expression vector for the expression of a variable light chain fragment of monoclonal antibody 13C3 in a recombinant host cell wherein said expression vector contains the nucleic acid molecule of claim 30.

20 32. A host cell which expresses a variable light chain fragment of monoclonal antibody 13C3 wherein said host cell contains the expression vector of claim 31.

33. An isolated variable heavy chain fragment of monoclonal antibody 13C3 which comprises the amino acid
25 sequence set forth in SEQ ID NO:7.

34. An isolated variable light chain fragment of monoclonal antibody 13C3 which comprises the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:5.

Aβ fibrillogenesis

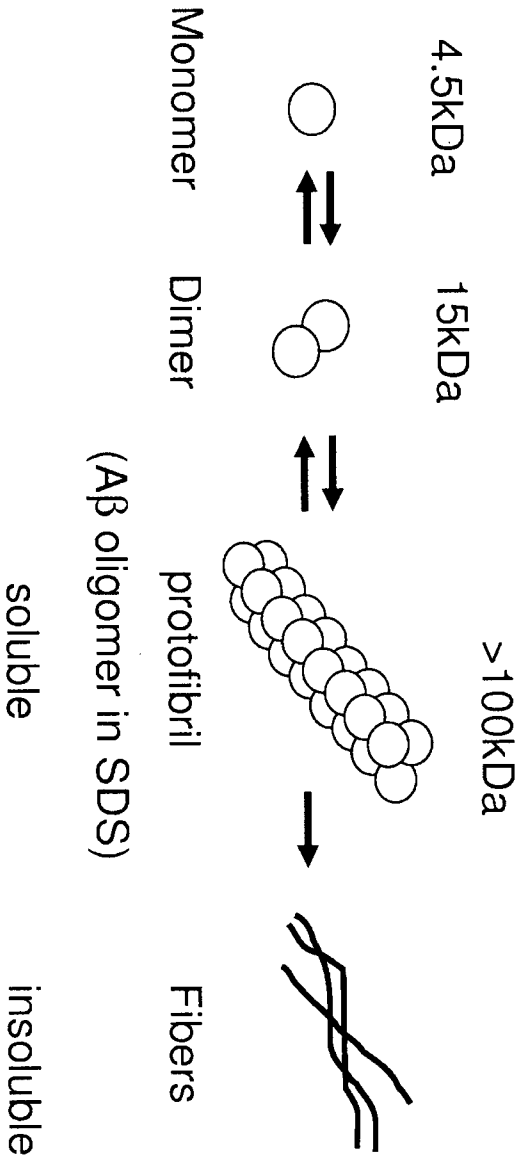


FIG. 1

2/12

A.

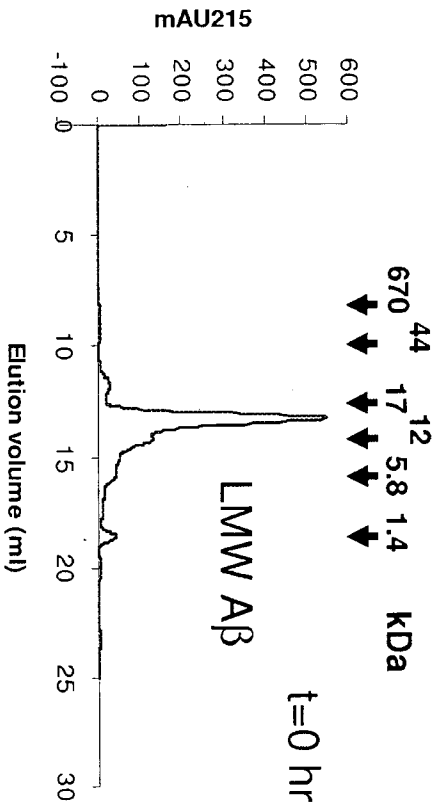
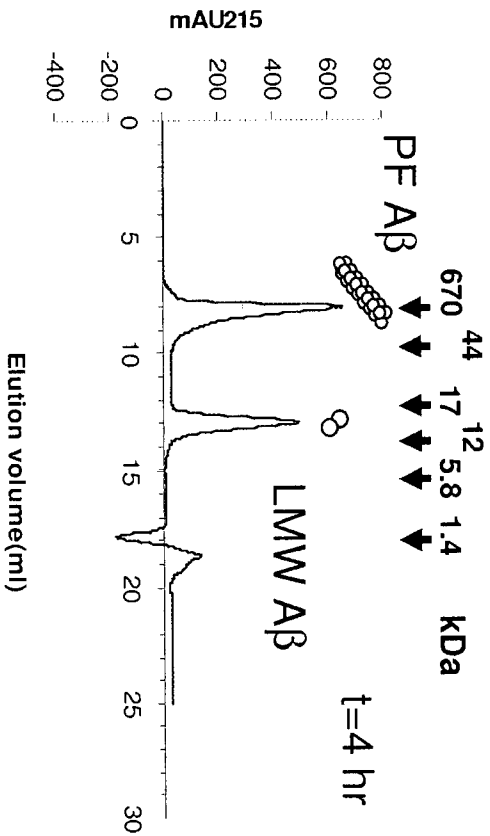


FIG. 2

B.



82

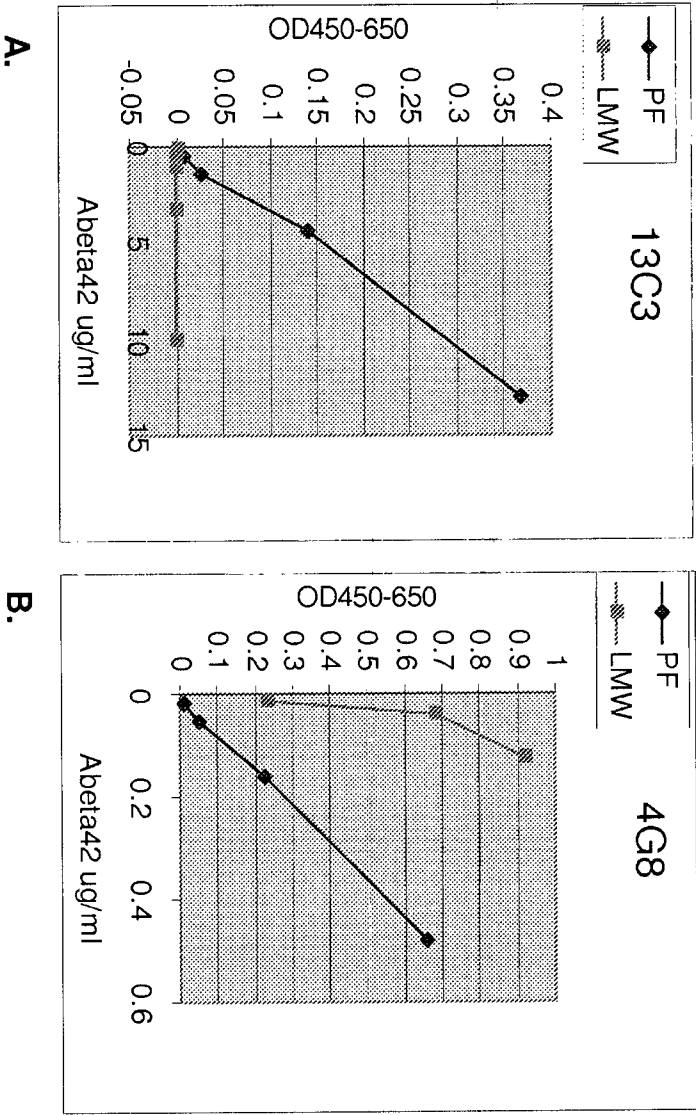


FIG. 3

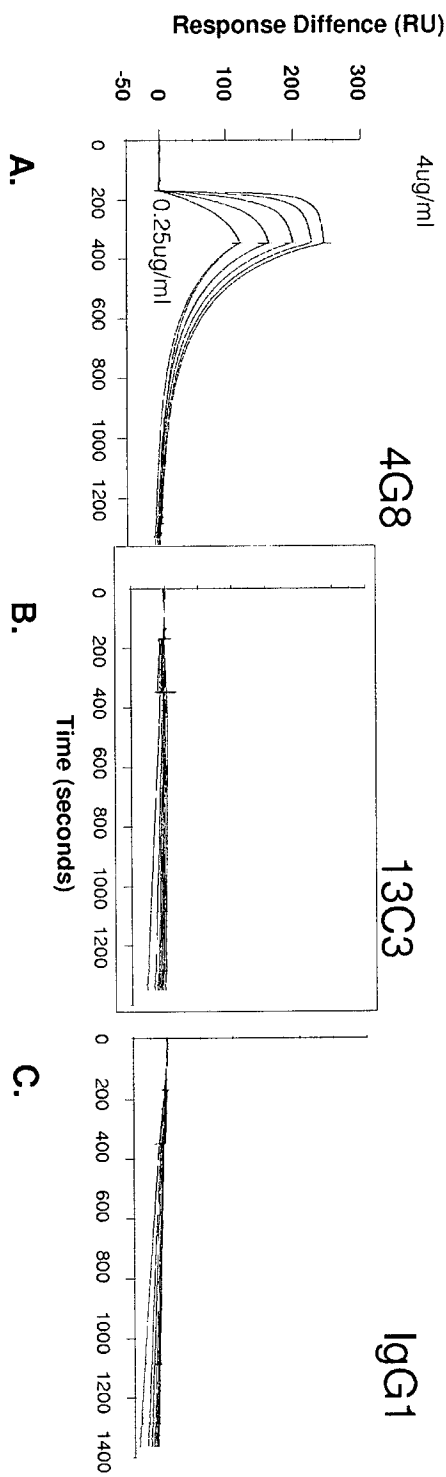
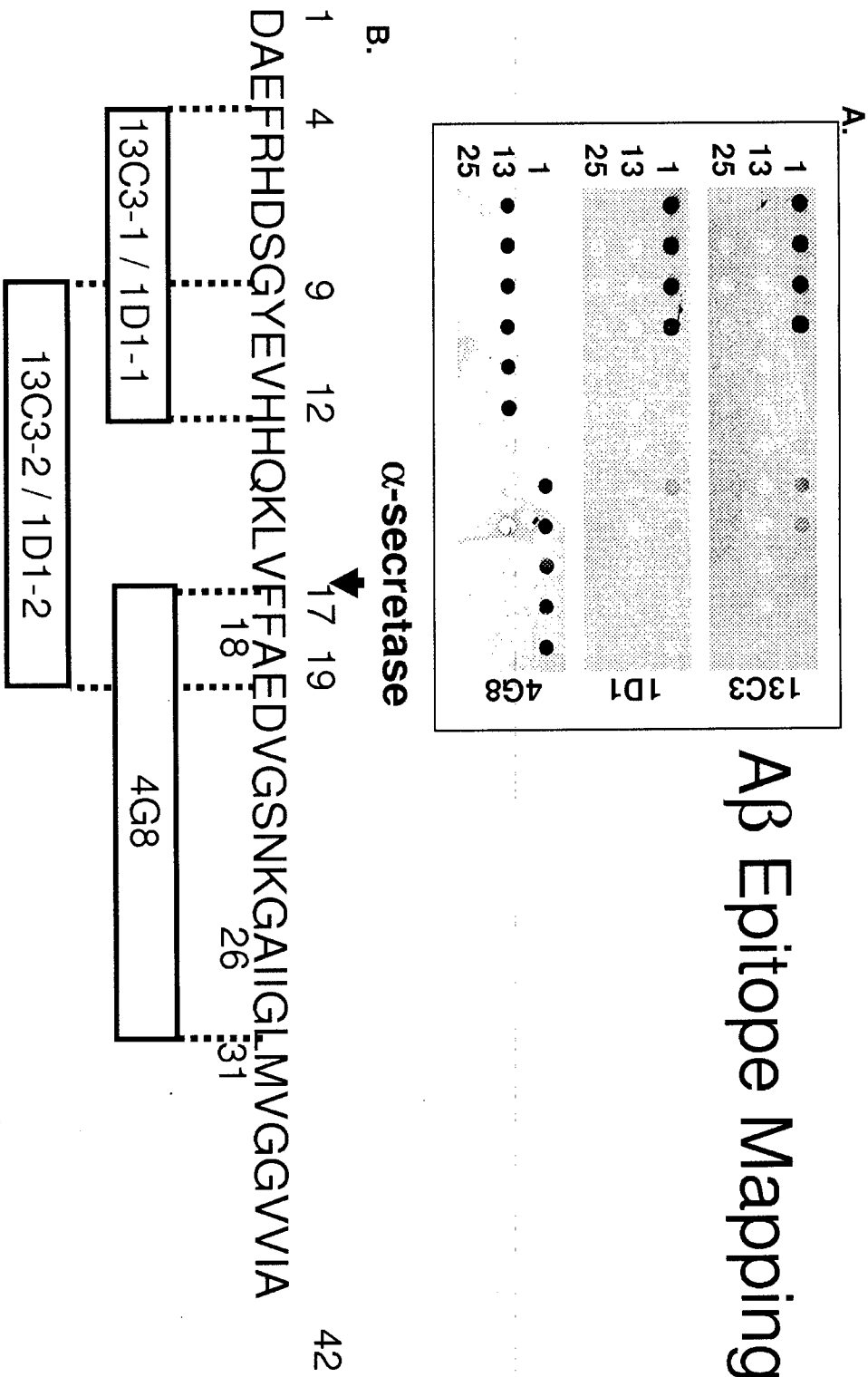


FIG. 4



Abeta Epitope Mapping

FIG. 5

85

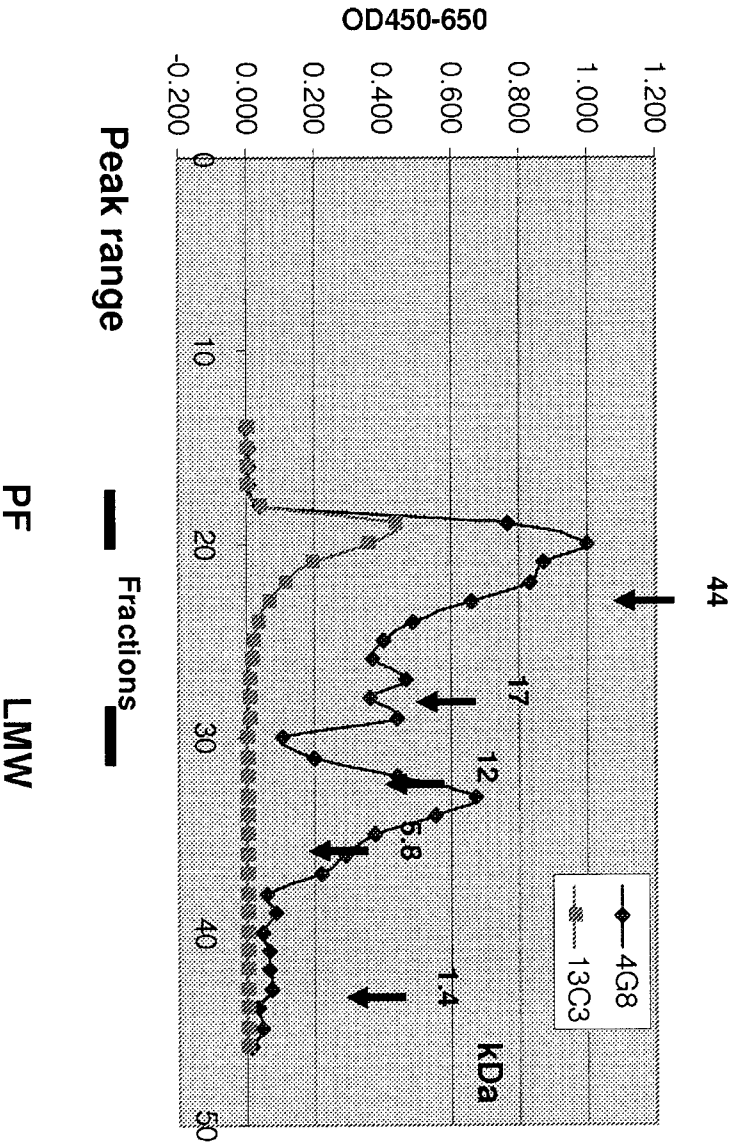
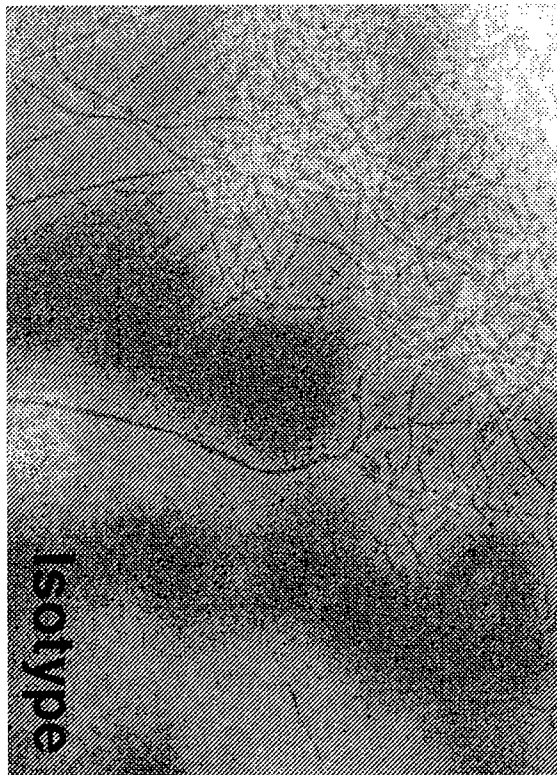
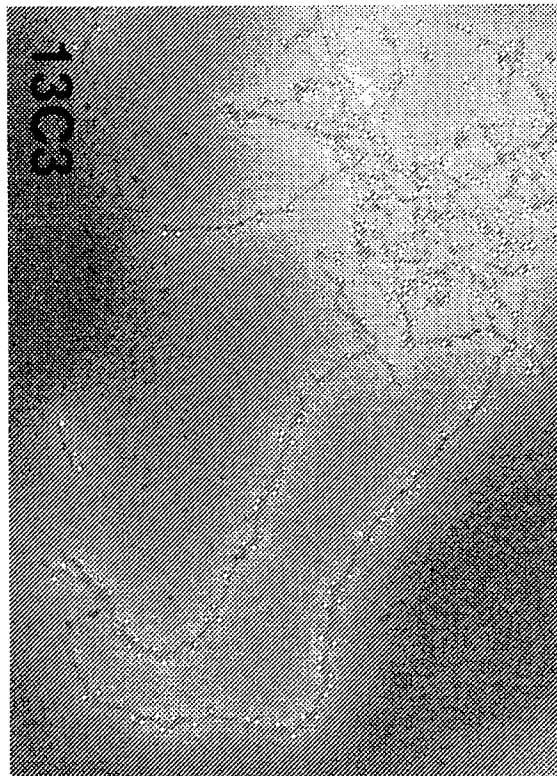


FIG. 6

A.



B.



C.

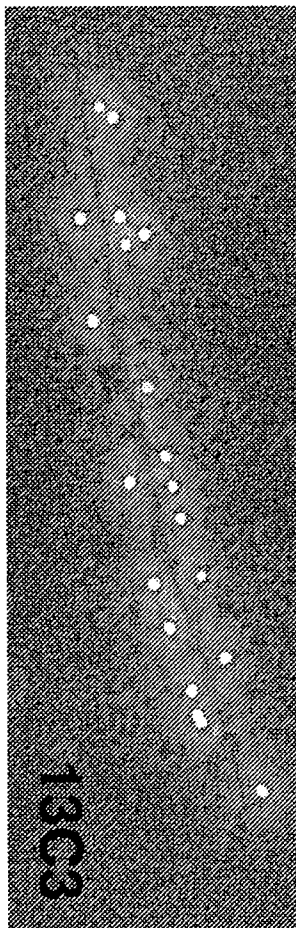


FIG. 7

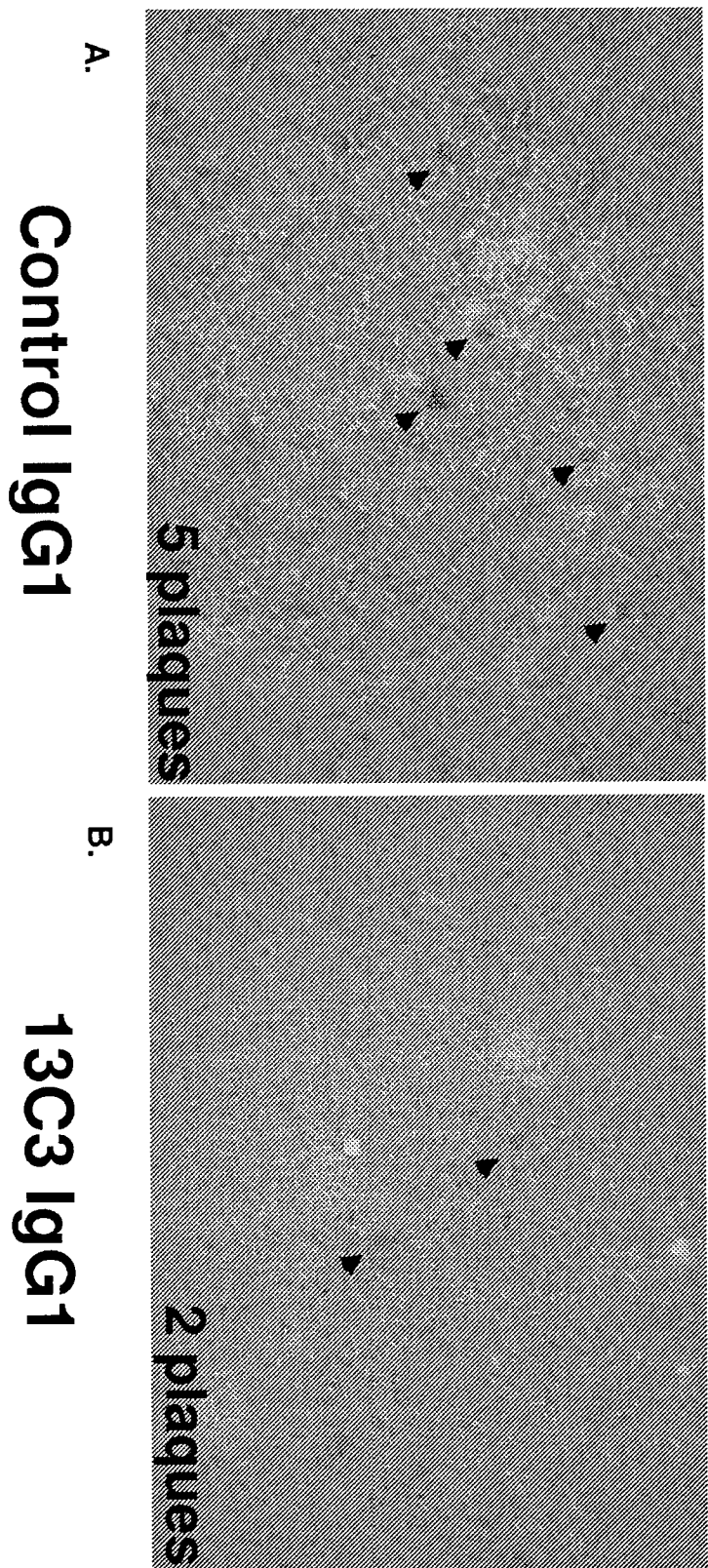


FIG. 8

9/12

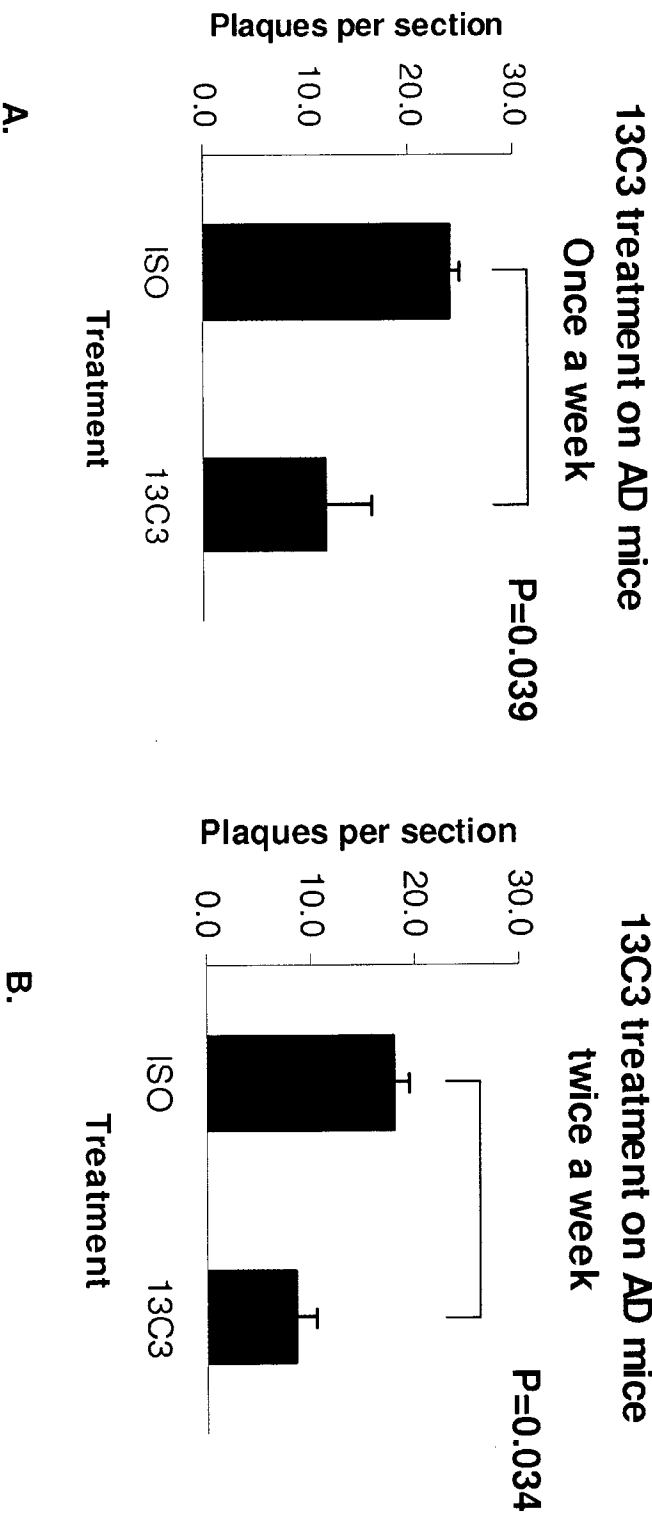
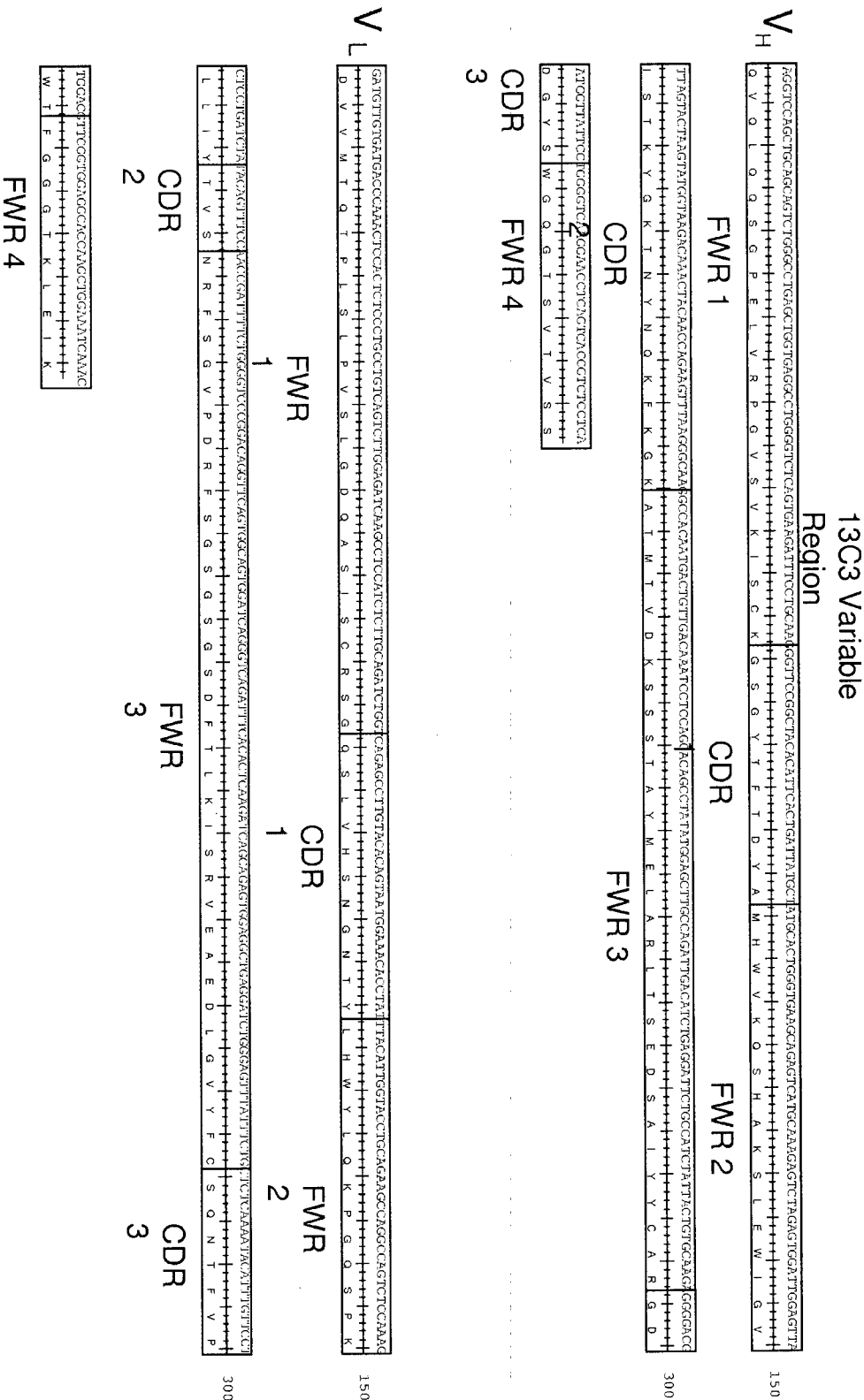


FIG. 9



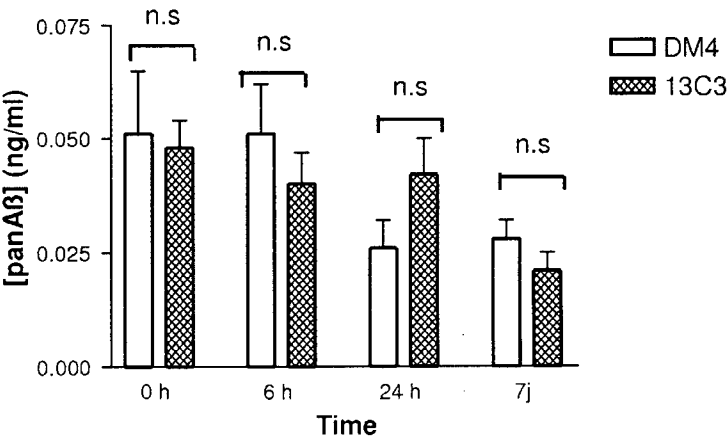


FIG. 11A

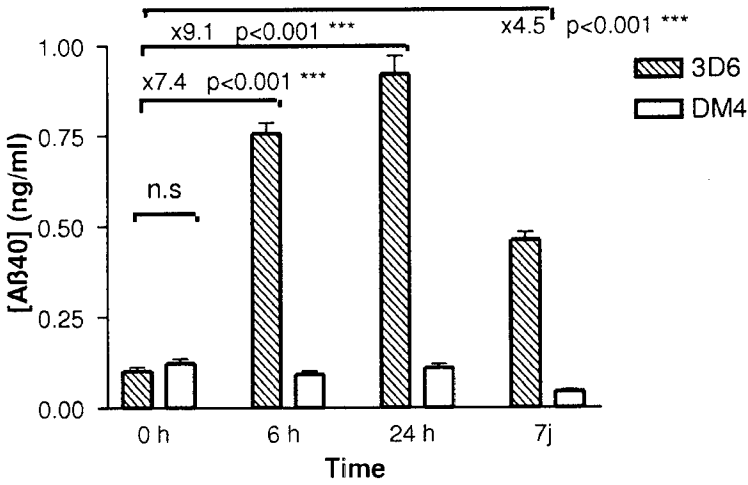


FIG. 11B

12/12

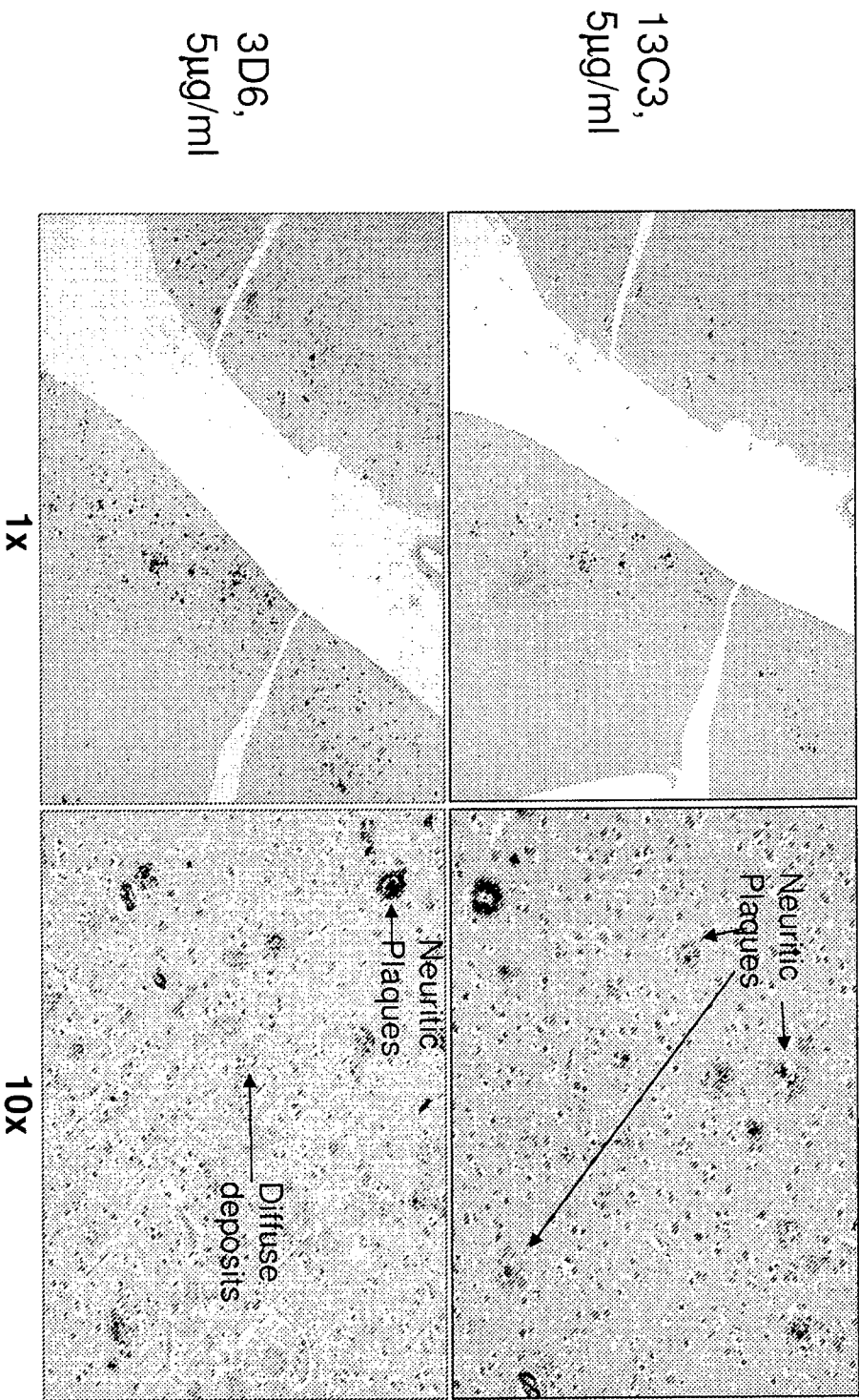


FIG. 12

PCTSEQUENCE
SEQUENCE LISTING

<110> The Rockefeller University

<120> Antibodies Specific for the Protofibril form of Beta-Amyloid Protein

<130> 70413.00057/RU812

<140> N/A

<141> 2008-11-14

<150> 60/988,481

<151> 2007-11-16

<150> 61/019,747

<151> 2008-01-08

<160> 52

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

Leu Val Phe Phe
20

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

PCTSEQUENCE

Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val
1 5

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

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

<210> 5
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 6
<211> 339
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 6
gatgttgatga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctggatga gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta ttacattgg 120

PCTSEQUENCE

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct atacagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cggacagggt cagtggcagt ggatcagggt cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaaatac atttgttcct 300
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgg 339

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

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Val Ile Ser Thr Lys Tyr Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Asp Asp Gly Tyr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 345
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 8

caggtccagc tgcagcagtc tgggcctgag ctggtgaggc ctgggggtctc agtgaagatt 60
tcctgcaagg gttccggcta cacattcact gattatgcta tgcactgggt gaagcagagt 120
catgcaaaga gtctagagtg gattggagtt attagtacta agtatggtaa gacaaactac 180
aaccagaagt ttaagggcaa ggccacaatg actgttgaca aatcctccag cacagcctat 240

95

PCTSEQUENCE

atggagcttg ccagattgac atctgaggat tctgccatct attactgtgc aagaggggac 300
gatgggttatt cctgggggtca aggaacctca gtcaccgtct cctca 345

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

<400> 9

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Gly
20 25

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10

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

Tyr

<210> 11
<211> 36
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 11

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

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

Val Tyr Phe Cys
35

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

<400> 12

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

PCTSEQUENCE

<210> 18

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> a variable heavy region for the isolated 13C3 or 13C3-like antibodies

<400> 18

Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu

1 5 10 15

Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala

1 5 10

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Ile Ser Thr Lys Tyr Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly

1 5 10 15

Lys

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

PCTSEQUENCE

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

<400> 13

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

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

<400> 14

Thr Val Ser
 1

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

<400> 15

Ser Gln Asn Thr Phe Val Pro Trp Thr
 1 5

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

<400> 16

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys
 20

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

<400> 17

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

Val

PCTSEQUENCE

<400> 22

Gly Asp Asp Gly Tyr Ser
1 5

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

<400> 23

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

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

<400> 24

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

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

<400> 25

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

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

<400> 26

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

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

<400> 27

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

<210> 28
<211> 13

PCTSEQUENCE

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 28

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

<210> 29
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29

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

<210> 30
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 30

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

<210> 31
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 31

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

<210> 32
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 32

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

<210> 33
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 33

Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
 1 5 10

PCTSEQUENCE

<210> 34
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
 1 5 10

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

<400> 35

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

<210> 36
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36

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

<210> 37
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37

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

<210> 38
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38

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

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

<400> 39

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

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

<400> 40

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

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

<400> 41

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

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

<400> 42

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

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

<400> 43

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

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

<400> 44

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

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

PCTSEQUENCE

```

<400> 45
Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met
1          5          10

<210> 46
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46
Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val
1          5          10

<210> 47
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47
Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly
1          5          10

<210> 48
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48
Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly
1          5          10

<210> 49
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49
Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val
1          5          10

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

<400> 50
Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
1          5          10

<210> 51

```

PCTSEQUENCE

<211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51

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

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

<400> 52

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

(12) SOLICITUD DE PATENTE INTERNACIONAL PUBLICADA CONFORME AL
TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación
Internacional

PCT

(10) Publicación
Internacional Número
WO 2009/065054 A2

22 de mayo de 2009 (19-05-2009)

(51) Clasificación de Patente Internacional ⁷ : GN1 33/53 (2006.01)	protecciones nacionales existentes): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW
(21) Solicitud de Patente Internacional Número: PCT/US2008/083659	
(22) Fecha de Presentación Internacional: 14 de noviembre de 2008 (14-11-2008)	
(25) Idioma de Presentación: Inglés	
(26) Idioma de Publicación: Inglés	
(30) Datos de la Prioridad: 60/988.481 16 de noviembre de 2007 (16-11-2007) US 61/019.747 8 de enero de 2008 (8-01-2008) US	(84) Estados Designados (a menos que se indique de otro modo, para todas las clases de protecciones regionales existentes): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasia (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto Estados Unidos): THE ROCKEFELLER UNIVERSITY [US/US], 1230 York Avenue, New York, NY 10021-6399 (US)	
(72) Inventores; e	
(75) Inventores/Solicitantes (solamente para Estados Unidos): RAVETCH, Jeffrey [US/US], 500 Park Avenue, New York, NY 10022 (US); FUKUYAMA, Hidehiro [JP/FR], Estrasburgo (FR).	Publicada: --Sin informe de búsqueda internacional y se republicará cuando se reciba ese informe. --con parte de la memoria descriptiva de listado de secuencias publicado por separado en forma electrónica y disponible a pedido a la Oficina Internacional
(74) Agente: NORTON, Gerard, P. et al.; Fox Rothschild LLP, 997 Lenox Drive, Bldg. #3, Lawrenceville, NJ 08648 (US).	
(81) Estados Designados (a menos que se indique de otro modo, para todos los tipos de	

(54) **Título:** ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA LA FORMA DE PROTOFIBRILLAS DE LA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE

(57) **Resumen de la Invención:** Se han caracterizado anticuerpos aislados que presentan afinidad específica a un epítipo 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.

**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 epítoto 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 epítoto 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

biólogicamente 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

epítoto 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 epítopo. 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 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 Aβ, 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 Aβ.

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 Aβ de 0,25 g/ml de Aβ de LMW a 4,0 µg/ml de Aβ de LMW.

Las Figuras 5A-B muestran datos que identifican los epítopes reconocidos por los anticuerpos anti-Aβ 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 Aβ₁₋₄₂ (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 inmunoeléctrico de corte delgado que muestra la afinidad del anticuerpo monoclonal 13C3 a estructuras repetidas en las fibrillas de A β (B, C). El microscopio inmunoeléctrico 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 epítopo conformacional de una forma de protofibrilla de péptido A β , por lo cual el epítopo 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 proteinosa, 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 epítoto 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 $A\beta$. 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 $A\beta$) 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- $A\beta$ 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)

GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCC
 ATCTCTTGCAGATCTGGTCAGAGCCTTGACACAGTAATGGAAACACCTATTTACATTGG
 TACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTATACAGTTTCCAAACCGATTT
 TCTGGGGTCCCGGACAGGTTTCACTGGCAGTGGATCAGGGTCAGATTTCACTCAAGATC
 AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAATACATTTGTTCT
 TGGACGTTTGGTGGAGGCCAACGCTGGAAATCAAACGG (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 Glu Asp
 Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Asp Gly Tyr Ser Trp
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO: 7);
 CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGCCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGTCTCAGTGAAGATT
 TCCTGCAAGGGTTCCGGCTACACATTCAGTATGCTATGCACITGGGTGAAGCAGAGT
 CATGCAAGAGTCTAGAGTGGATTGGAGTTATTAGTACTAAGTATGGTAAGACAACTAC
 AACAGAGTTTAAGGGCAAGGCCACAATGACTGTTGACAAATCCTCCAGCACAGCCTAT
 ATGGAGCTTGCCAGATTGACAICTGAGGATTCTGCCATCTATTACTGTGCAAGAGGGGAC
 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 Verhoeyen, 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 maduras 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 maduras 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 12D35 (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 (Pharmingén).

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 (pluronic), 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 tale 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 alginico, 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)]; polianhidridos, poliuretano (véase WO 2005/013936), poliamidas, ciclodestranos, 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 $\mu\text{g/h}$ o 0,1 $\mu\text{g/h}$, 0,25 $\mu\text{g/h}$, 1 $\mu\text{g/h}$, generalmente hasta 200 $\mu\text{g/h}$, 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 ($\text{A}\beta 42$)

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	Epitope	Isotipo	Origen	Análisis de Unión de BIACORE		
				LMW	PF	Relación (PF/LMW)
1D1	estructura	IgG1	Ravetch	23.2	122.3	5.3
13C3	estructura	IgG1	Ravetch	25	124.8	5.0
19A6	estructura	IgG3	Ravetch			
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 epítopo 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 epítipo 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

1. Un anticuerpo aislado que interactúa específicamente y presenta una afinidad medible a un epítoto conformacional de una forma de protofibrilla de péptido de 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 secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO 2, en donde dicho anticuerpo presenta mínima a ninguna afinidad para formas monoméricas o diméricas de péptido de A β .
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, que es un anticuerpo monoclonal.
3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, que es un anticuerpo monoclonal humanizado.
4. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, que es un anticuerpo monoclonal humano.
5. Un anticuerpo aislado que interactúa específicamente y presenta una afinidad medible a un epítoto de una forma de protofibrilla de péptido de 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 una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4, en donde dicho anticuerpo presenta mínima o ninguna afinidad para formas monoméricas o diméricas de péptido de A β .

6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, que es un anticuerpo monoclonal.
7. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 6, que se designa 13C3.
8. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 6, que es un anticuerpo monoclonal humanizado.
9. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 6, que es un anticuerpo monoclonal humano.
10. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, que además comprende una cadena liviana variable compuesta por la secuencia de aminoácido expuesta en SEQ ID NO 5.

11. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, que además comprende una cadena pesada variable compuesta por la secuencia de aminoácido expuesta en SEQ ID NO 7.
12. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, que además comprende una cadena liviana variable que comprende una región de CDR1 expuesta en SEQ ID NO 13, una región de CDR2 expuesta en SEQ ID NO 14 y una CDR3 expuesta en SEQ ID NO 15.
13. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, que además comprende una cadena pesada variable compuesta de una región de CDR1 expuesta en SEQ ID NO 20, una región de CDR2 expuesta en SEQ ID NO 21, y una región de CDR3 expuesta en SEQ ID NO 22.
14. Un método para producir un anticuerpo monoclonal que se une específicamente in Vitro a un epítipo conformacional de una forma de protofibrilla de péptido β -amiloide mientras que presenta mínima afinidad a las formas de bajo peso molecular de péptido β -amiloide, que comprende:
 - (a) inmunizar a un mamífero con la forma de protofibrilla de péptido β -amiloide;
 - (b) cultivar células B de dicho mamífero;

- (c) crear hibridomas desde las células B cultivadas, en donde dichos hibridomas producen anticuerpos; y
 - (d) seleccionar hibridomas que producen anticuerpos que se unen específicamente a la forma de protofibrilla de péptido β -amiloide mientras que presenta mínima afinidad a formas monoméricas o diméricas de péptido β -amiloide.
15. Un método para cuantificar la cantidad de una forma de protofibrilla de péptido β -amiloide en una muestra de tejido o de fluido, que comprende:
- (a) obtener la muestra de tejido o de fluido de un sujeto;
 - (b) poner a la muestra de tejido o de fluido en contacto con un anticuerpo o un fragmento de él que se une específicamente a la forma de protofibrilla de péptido β -amiloide mientras que presenta afinidad mínima a las formas de bajo peso molecular de péptido β -amiloide; y
 - (c) cuantificar la cantidad de la forma de protofibrilla de péptido β -amiloide en la muestra.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo formado por 13C3, 1D1 y 19A6.

17. 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, que comprende:

- (a) un anticuerpo o un fragmento de él, capaz de unirse específicamente in Vitro a un epítipo conformacional repetido de una forma de protofibrilla de péptido β -amiloide mientras que presenta mínima afinidad a las formas de bajo peso molecular de péptido β -amiloide; y
- (b) un reactivo que se une, directa o indirectamente, al anticuerpo mencionado o al fragmento de él.

18. El estuche de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo formado por 13C3, 1D1 y 19A6.

19. Un método para tratar o prevenir la deposición de placas de fibras de β -amiloide dentro de un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad

farmacéuticamente eficaz de, como mínimo, un fragmento de región variable que interactúa específicamente con la forma de protofibrilla de péptido β -amiloide de manera tal que inhiba la formación y la deposición de placas de fibras de β -amiloide.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

21. El método de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo seleccionado del grupo formado por 13C3, 1D1 y 19A6.

22. El método de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal humanizado.

23. El método de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal humano.

24. Un hibridoma que segrega un anticuerpo seleccionado del grupo formado por 13C3, 1D1 y 19A6.

25. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un fragmento de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 13C3 en donde el fragmento de cadena pesada variable comprende la secuencia de aminoácido expuesta en SEQ ID NO 7.
26. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un fragmento de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 13C3 en donde la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótido expuesta en SEQ ID NO 8.
27. Un vector de expresión para la expresión de un fragmento de cadena pesada variable de anticuerpo monoclonal 13C3 en una célula huésped recombinante en donde dicho vector de expresión comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 26.
28. Una célula huésped que expresa un fragmento de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 13C3 en donde dicha célula huésped contiene el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 27.
29. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un fragmento de cadena liviana variable del anticuerpo

monoclonal 13C3 en donde el fragmento de cadena liviana variable comprende la secuencia de aminoácido expuesta en SEQ ID NO 5.

30. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un fragmento de cadena liviana variable del anticuerpo monoclonal 13C3 en donde la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótido expuesta en SEQ ID NO 6.

31. Un vector de expresión para la expresión de un fragmento de cadena liviana variable del anticuerpo monoclonal 13C3 en una célula huésped recombinante en donde el vector de expresión mencionado contiene la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 30.

32. Una célula huésped que expresa un fragmento de cadena liviana variable del anticuerpo monoclonal 13C3 en donde dicha célula huésped contiene el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 31.

33. Un fragmento de cadena pesada variable aislado del anticuerpo monoclonal 13C3 que comprende la secuencia de aminoácido expuesta en SEQ ID NO 7.

34. Un fragmento de cadena liviana variable aislado del anticuerpo monoclonal 13C3 que comprende la secuencia de aminoácido expuesta en SEQ ID NO 5.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se han caracterizado anticuerpos aislados que presentan afinidad específica a un epítopo 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.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Rockefeller University

<120> ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA LA FORMA DE PROTOFIBRILLAS DE LA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE

<130> 70413.00057/RU812

<140> N/A

<141> 14-11-2008

<150> 60/988.481

<151> 16-11-2007

<150> 61/019.747

<151> 8-01-2008

<160> 52

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

Leu Val Phe Phe
20

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val
1 5

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

<210> 5

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 6

<211> 339
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 6
gatgttgatga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgagaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctgggtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta ttacattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct atacagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cggacagggt cagtggcagt ggatcagggt cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaatac atttgttcct 300
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgg 339

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

<400> 7
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Val Ile Ser Thr Lys Tyr Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Asp Asp Gly Tyr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 345

<212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 8
 caggtccagc tgcagcagtc tgggcctgag ctggtgaggc ctgggggtctc agtgaagatt 60
 tcctgcaagg gttccggcta cacattcact gattatgcta tgcactgggt gaagcagagt 120
 catgcaaaga gtctagagtg gattggagtt attagtacta agtatggtaa gacaaactac 180
 aaccagaagt ttaagggcaa ggccacaatg actggtgaca aatcctccag cacagcctat 240
 atggagcttg ccagattgac atctgaggat tctgccatct attactgtgc aagaggggac 300
 gatggttatt cctgggggtca aggaacctca gtcaccgtct cctca 345

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

<400> 9

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Gly
 20 25

<210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 10

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

Tyr

<210> 11
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 11

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

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

Val Tyr Phe Cys
35

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

<400> 12

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

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

<400> 13

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

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

<400> 14

Thr Val Ser
1

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

<400> 15

Ser Gln Asn Thr Phe Val Pro Trp Thr
1 5

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

<400> 16

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys
20

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

<400> 17

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

Val

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

<220>
<223> una región pesada variable para los anticuerpos 13C3 o similares a 13C3
aislados

<400> 18

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

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

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

<400> 19

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

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

<400> 20

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

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

<400> 21

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

Lys

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

<400> 22

Gly Asp Asp Gly Tyr Ser
 1 5

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

<400> 23

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

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

<400> 24

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

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

<400> 25

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

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

<400> 26

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

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

<400> 27

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

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

<400> 28

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

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

<400> 29

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

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

<400> 30

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

<210> 31
<211> 13
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

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

<210> 33

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
1 5 10

<210> 34

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
1 5 10

<210> 35

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

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

<210> 36

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

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

<210> 37
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37

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

<210> 38
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38

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

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

<400> 39

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

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

<400> 40

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

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

<400> 41

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

<210> 42
 <211> 13

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

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

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

<400> 43

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

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

<400> 44

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

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

<400> 45

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

<210> 46
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val
1 5 10

<210> 47
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 47

Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly
 1 5 10

<210> 48
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48

Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly
 1 5 10

<210> 49
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49

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

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

<400> 50

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

<210> 51
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51

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

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

<400> 52

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

Fibrillogénesis de A β

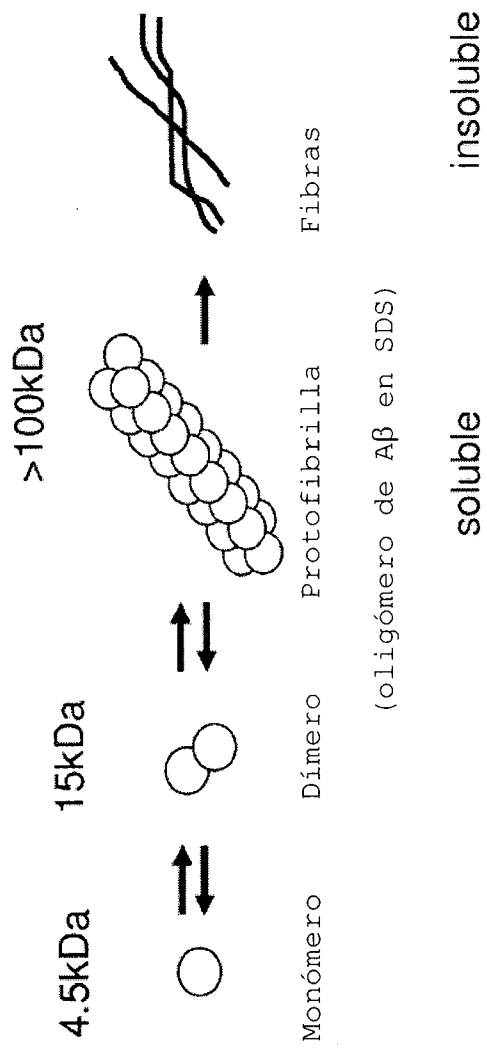


FIG. 1

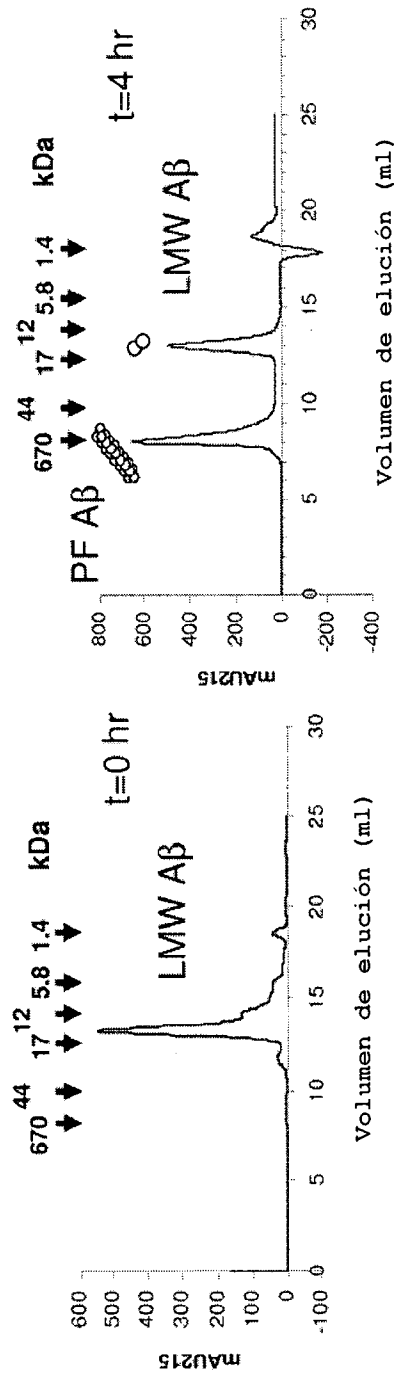
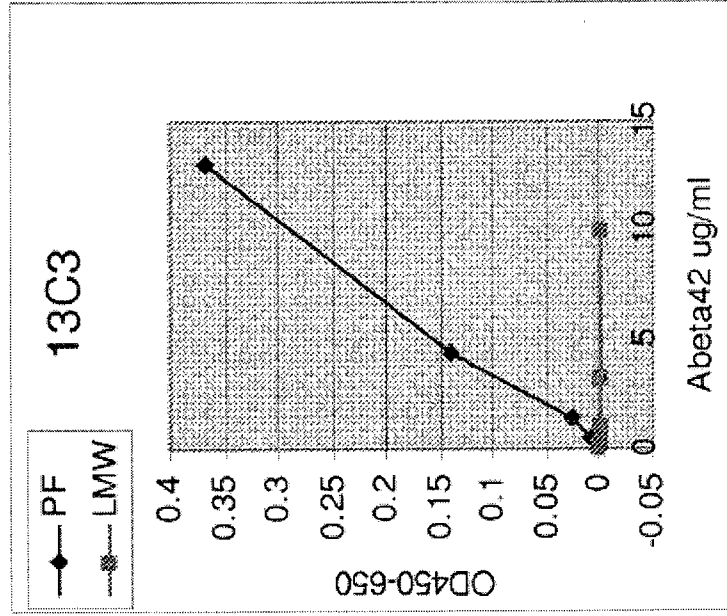
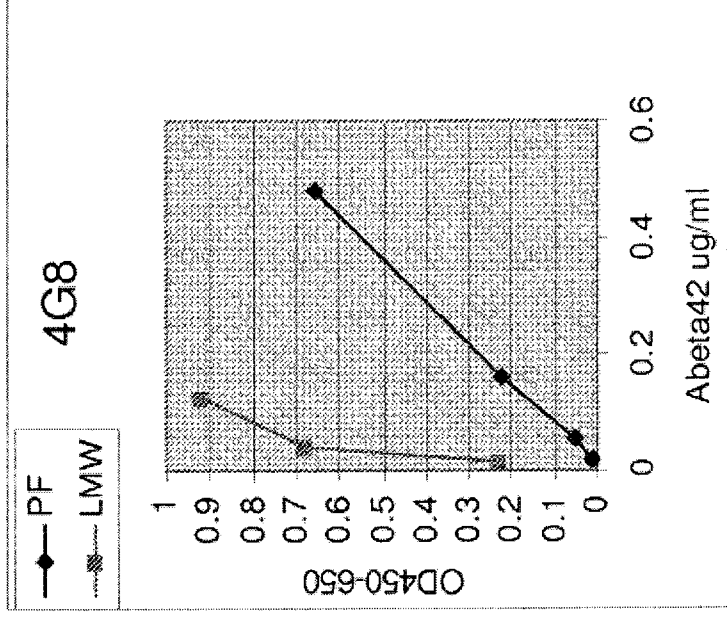


FIG. 2



A.



B.

FIG. 3

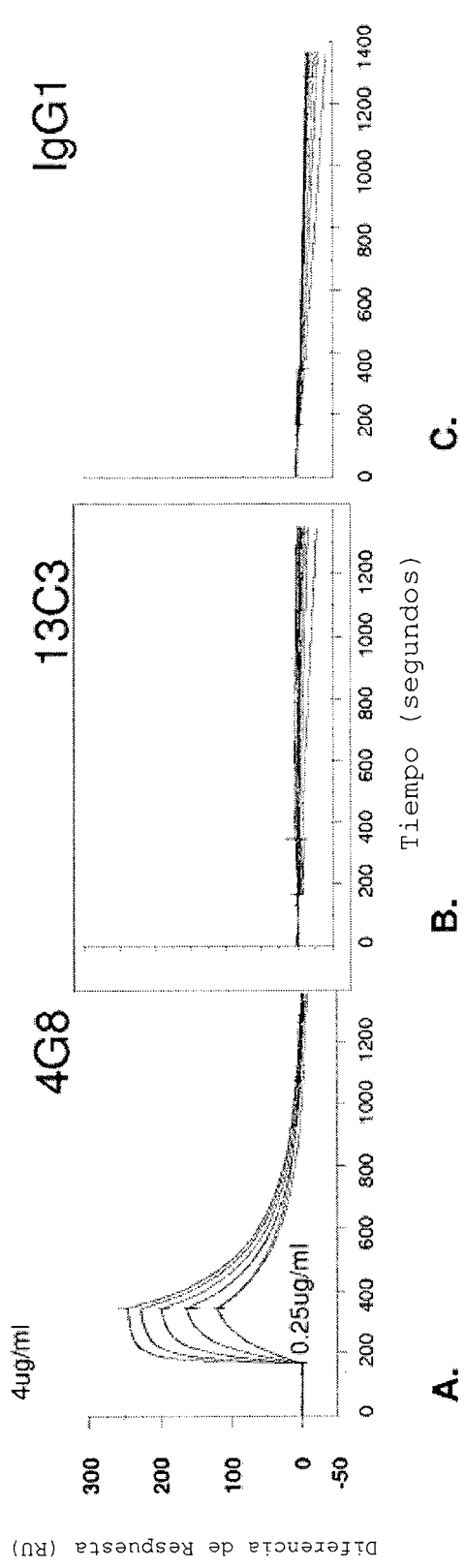


FIG. 4

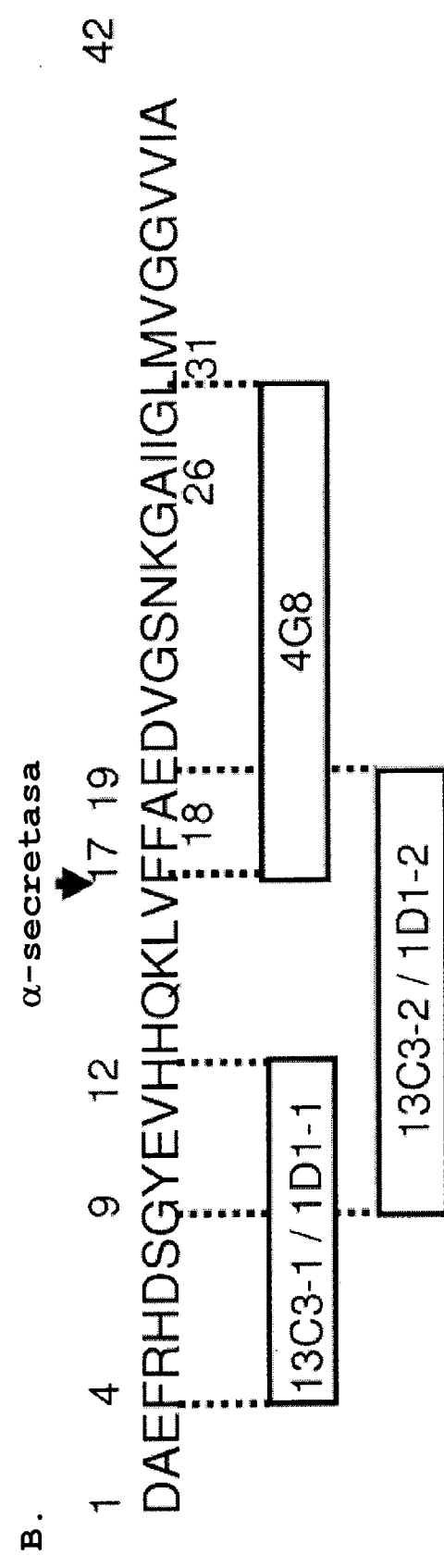
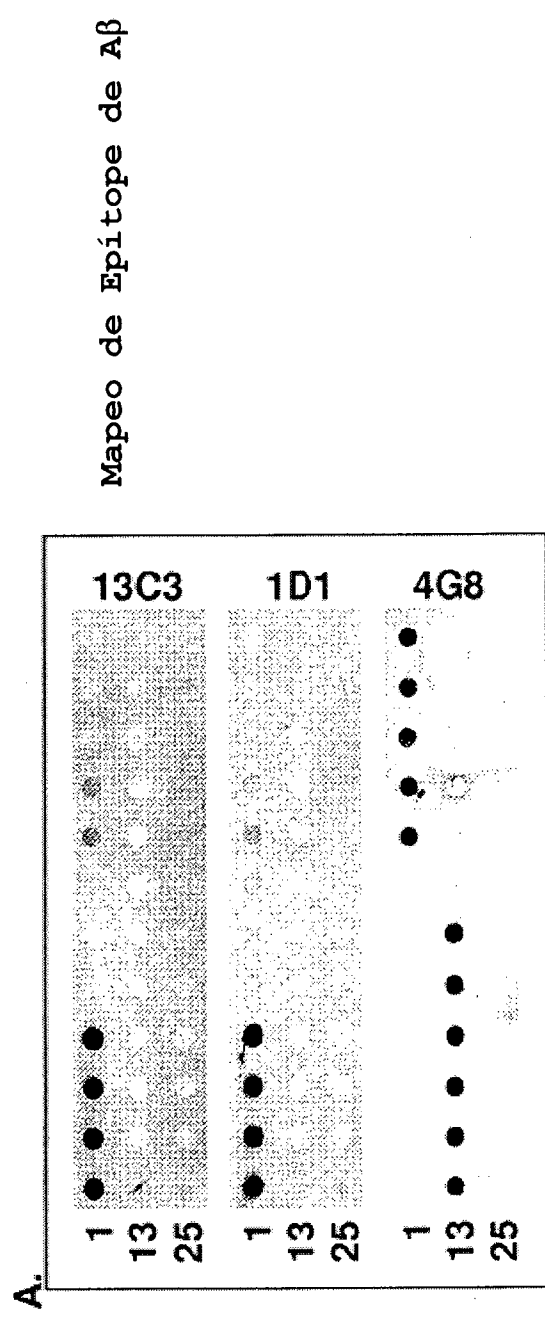


FIG. 5

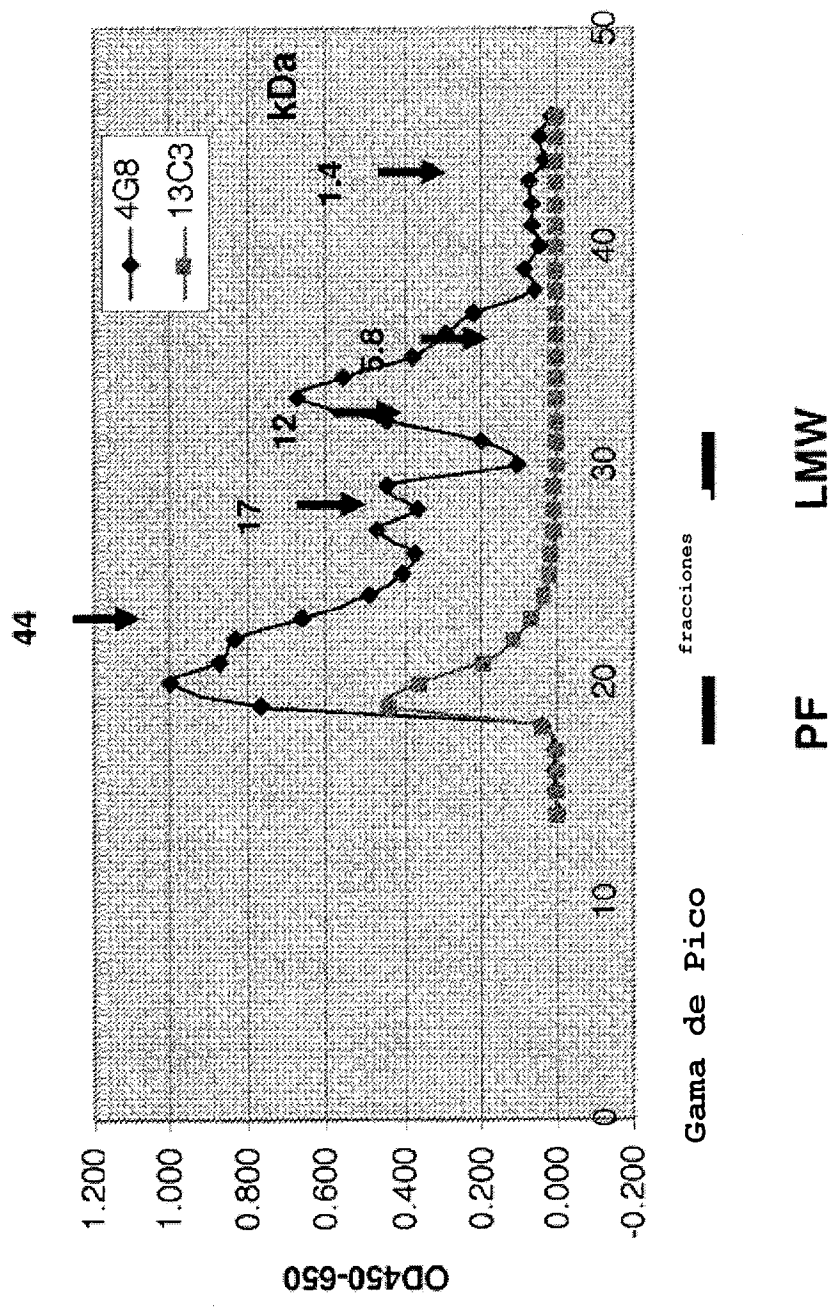
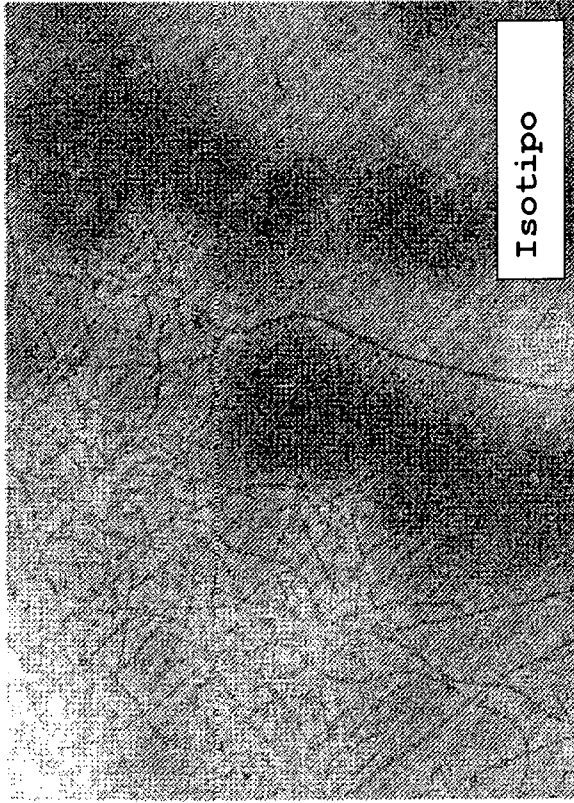
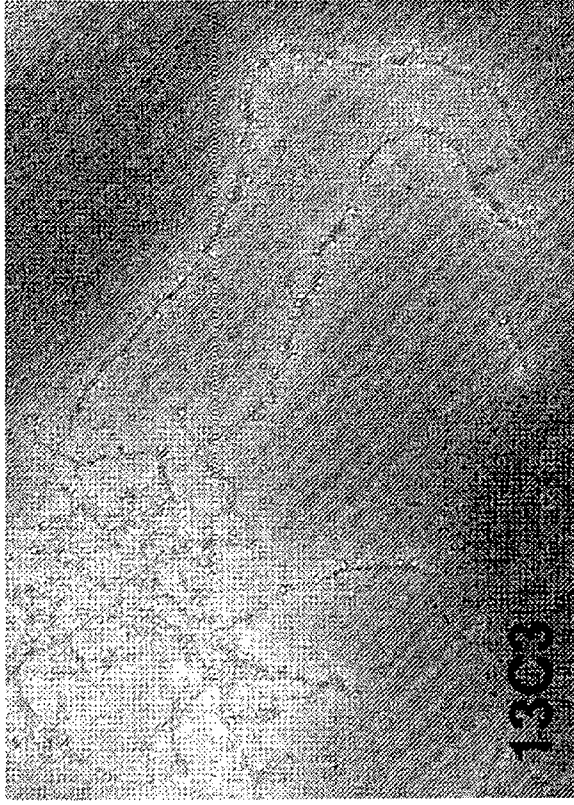


FIG. 6

A.



B.



C.

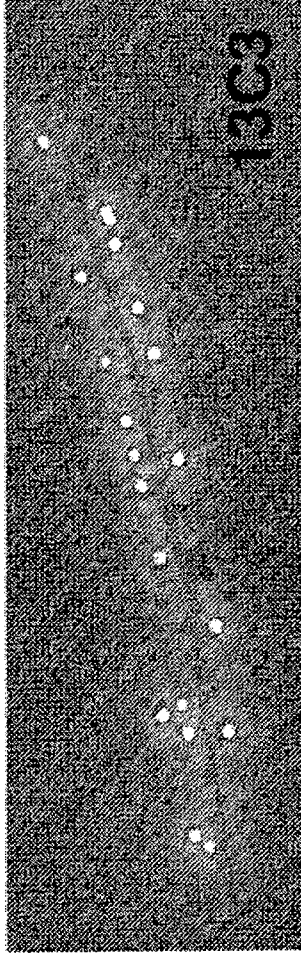
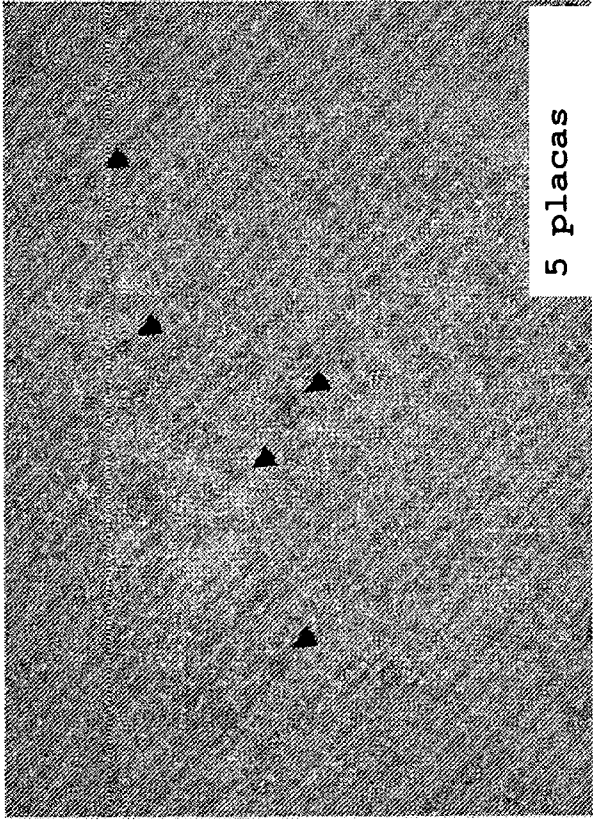
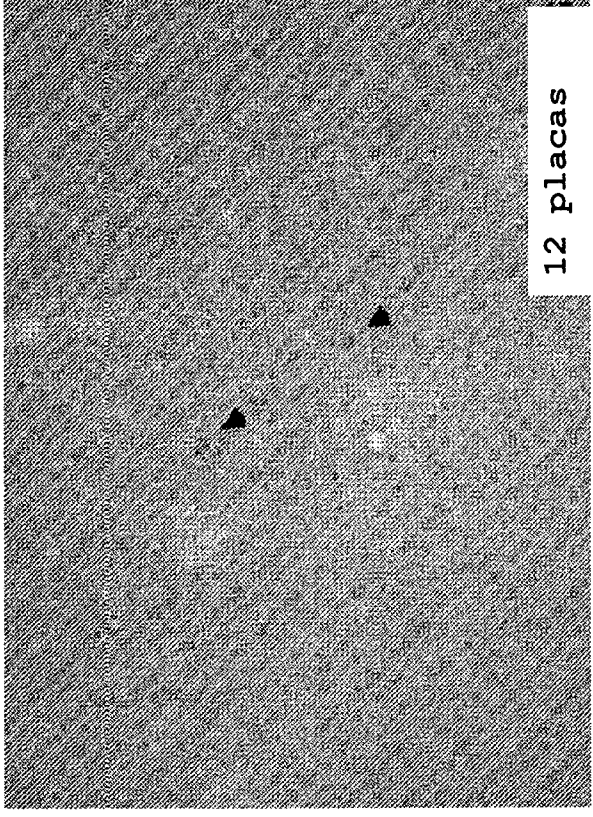


FIG. 7



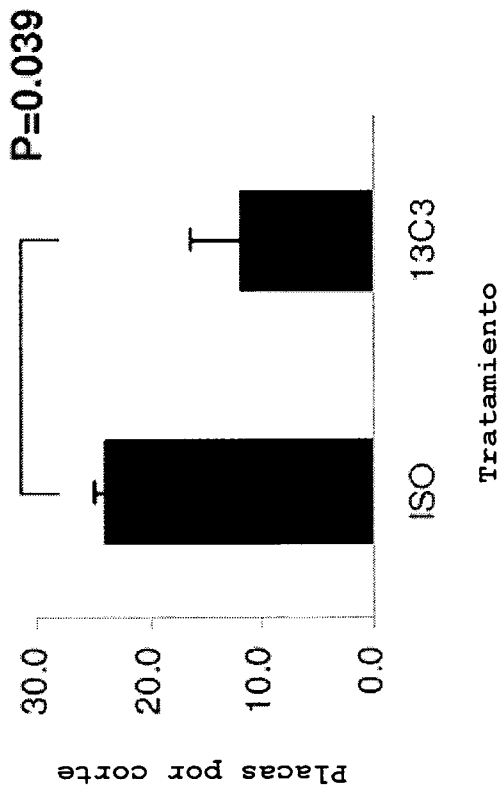
A. Control IgG1



B. 13C3 IgG1

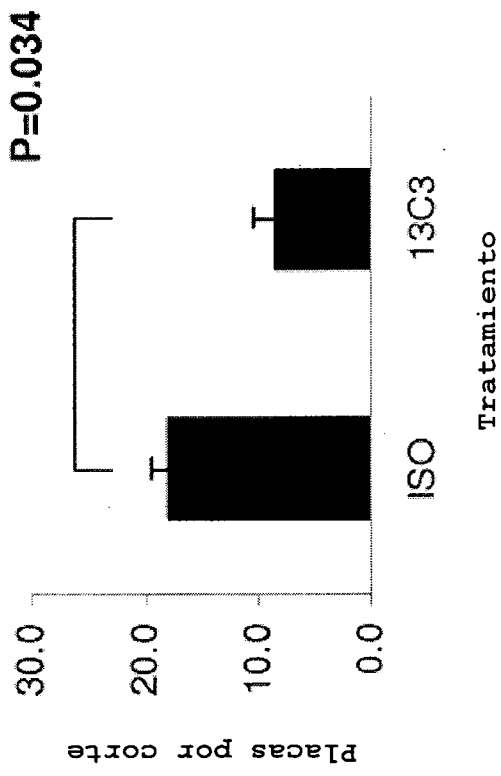
FIG. 8

Tratamiento de 13C3 en ratones
con enfermedad de Alzheimer
Una vez por semana



A.

Tratamiento de 13C3 en ratones
con enfermedad de Alzheimer
Dos veces por semana



B.

FIG. 9

Región Variable
de 13C3

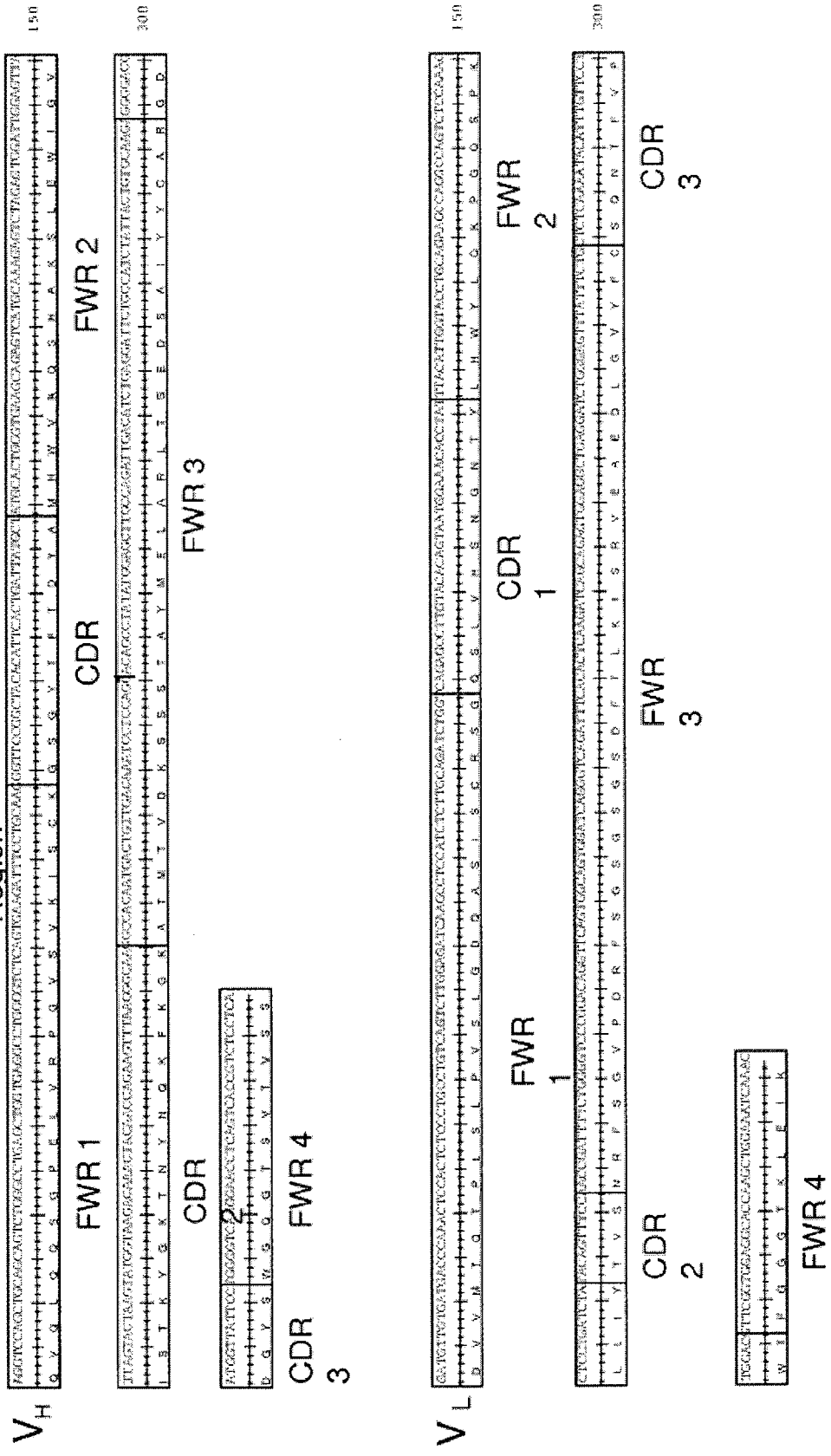


FIG. 10

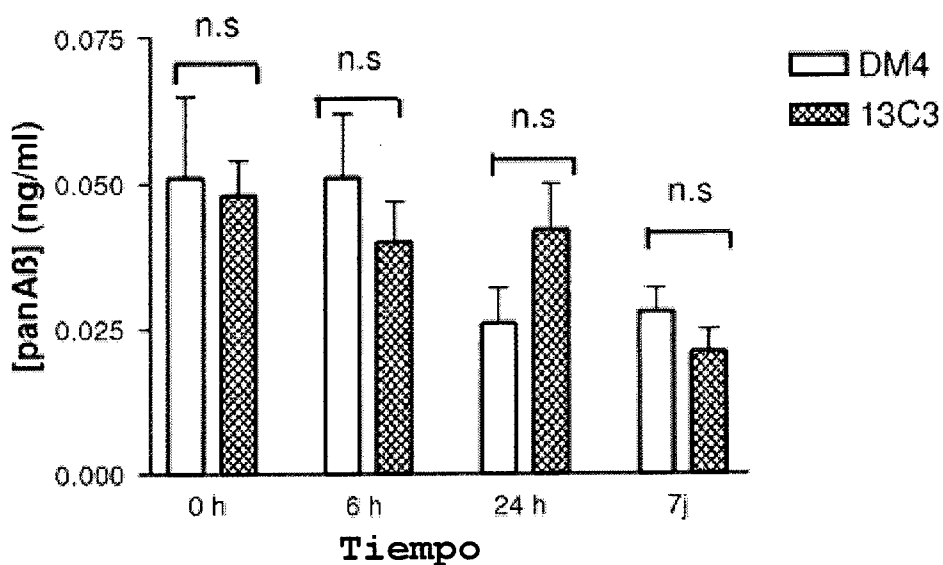


Figura 11A

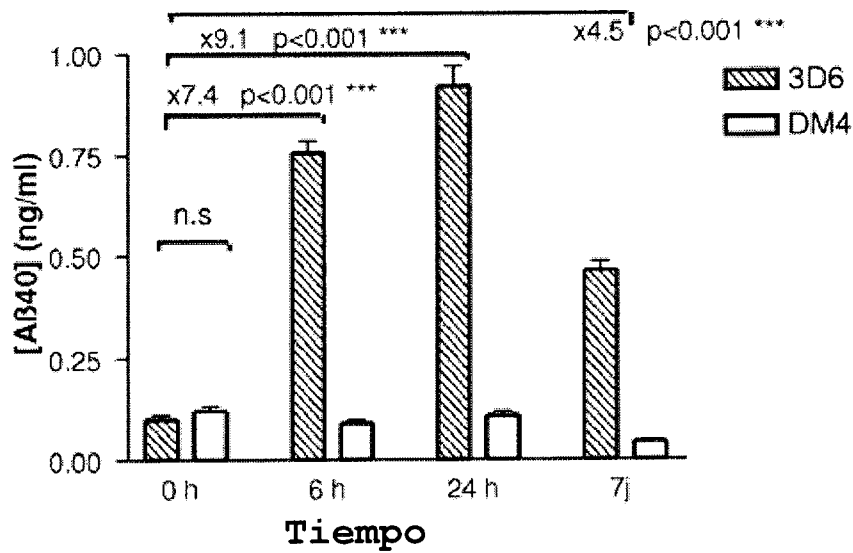


Figura 11B

13C3,
5µg/ml

3D6,
5µg/ml

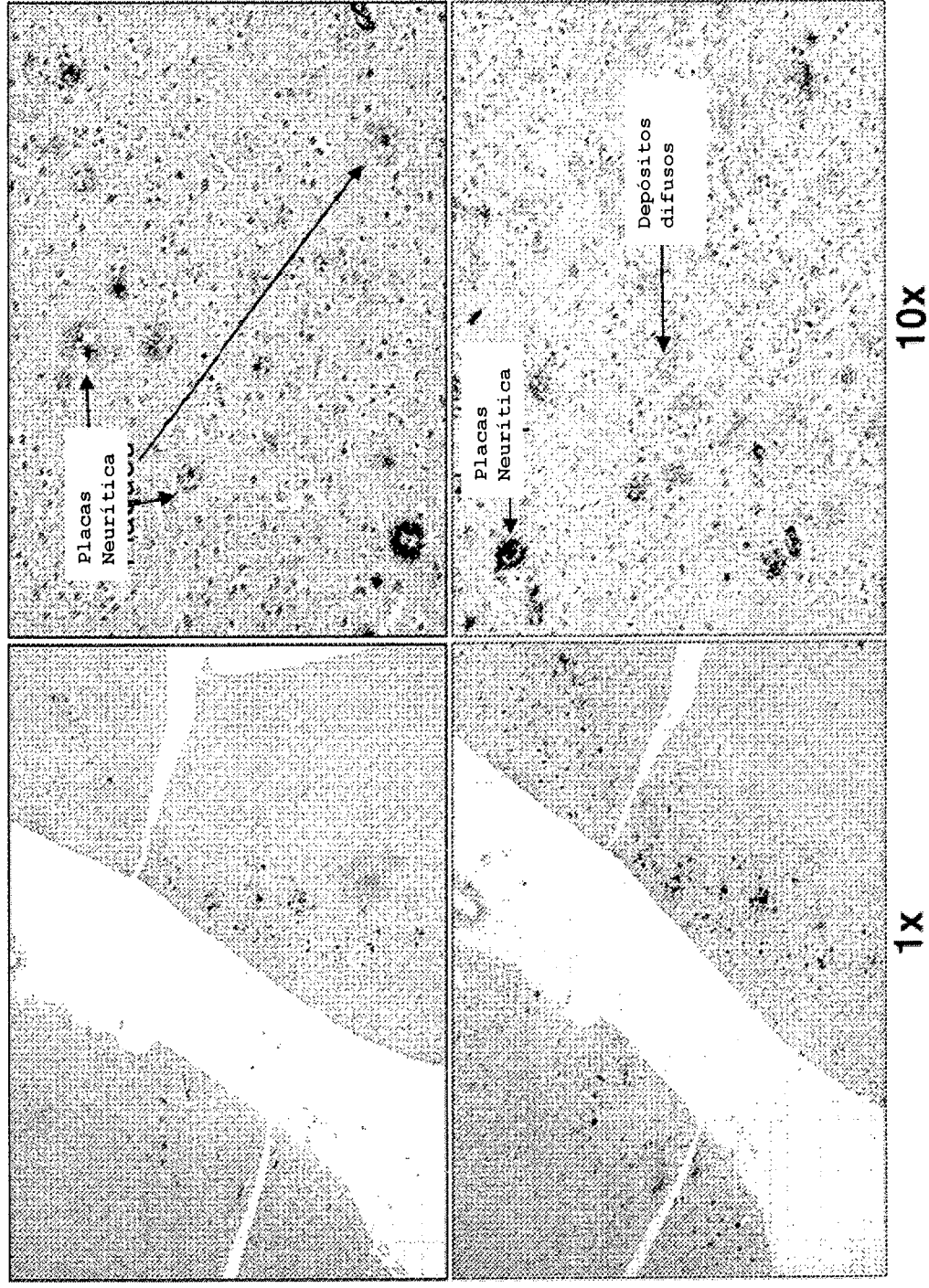


FIG. 12

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: 07-04-2010 (30) Prioridad (31) No. Priodidad 32) Fecha (33) País SI 60/988,481 16/11/2007 US SI 61/019,747 08/01/2008 US		(51) Int Cl: (71)Solicitante(s) THE ROCKEFELLER UNIVERSITY (72) Inventor(es) 1.- RAVETCH, Jeffrey V 2.- FUKUYAMA, Hidehiro (74) Apoderado: CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 14-11-2008 No. de solicitud PCT/US2008/083659		(87) Publicación internacional Fecha: 22-05-2009 N° publicación: WO 2009/065054 A2	
(54) Título: ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA LA FORMA DE PROTOFIBRILLAS DE LA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE			

Reivindicación(es):

Fibrillogénesis de Aβ

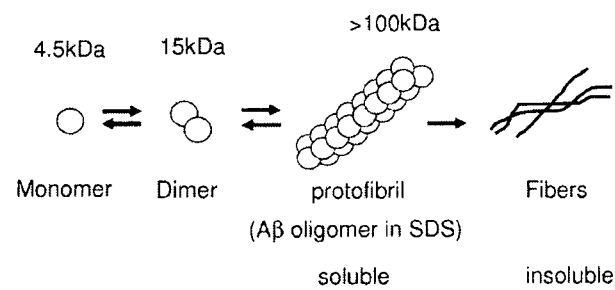
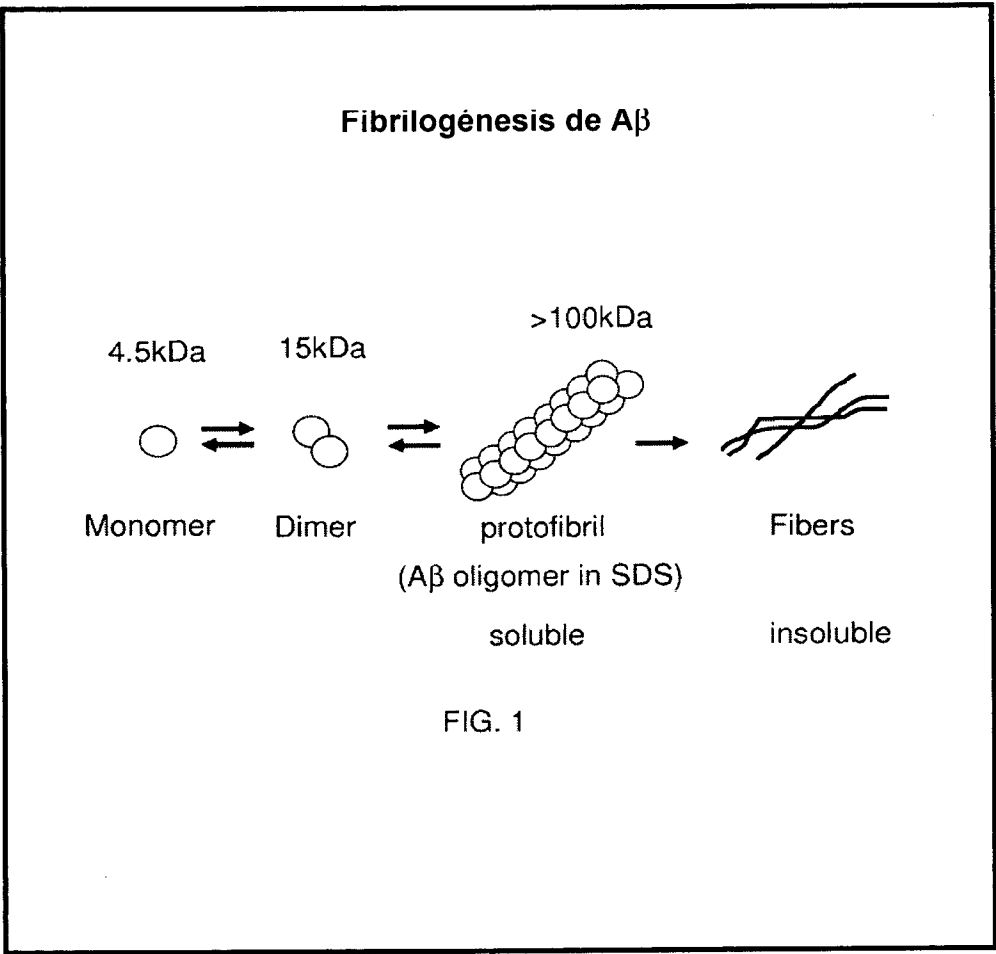


FIG. 1

1. Un anticuerpo aislado que interactúa específicamente y presenta una afinidad medible a un epítipo conformacional de una forma de protofibrilla de péptido de Aβ, por lo cual el epítipo de protofibrilla está representado por una región expuesta de una forma de protofibrilla de Aβ que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO 2, en donde dicho anticuerpo presenta mínima a ninguna afinidad para formas monoméricas o diméricas de péptido de Aβ.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, que es un anticuerpo monoclonal.
3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, que es un anticuerpo monoclonal humanizado o un anticuerpo monoclonal humano.





No. 10-039830- -00000-0000

Fecha: 2010-04-07 17:06:58 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 235

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Descripción de la invención
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
 - ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
 - ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-039830- -00001-0000

Fecha: 2010-04-07 17:09:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 379 FASENACIONALII
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 15

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

1. SOLICITUD DE:

☐ Corrección de Error Material

☒ Modificación a una Solicitud

SOLICITANTE

Nombre:

THE ROCKEFELLER UNIVERSITY

Dirección: :

1230 York Avenue, New York, NY 10021-6399

Nacionalidad o Domicilio:

New York, New York USA.

Lugar de Constitución:

Teléfono

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C.

NIT

C.E.

Otro

Cual

Número:

3.

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS ORLANDO MAYA
RODRIGUEZ

Dirección: Cr. 13 A No 28-38, Mz 2

Bufete 230. Parque Central Bavaria

Teléfono

3419841

Fax:

2-435423

E-mail: carlos.tamayo@tmtamayo.net

IDENTIFICACION

C.C.

NIT

C.E.

Otro

Cual

Número: 17.117.818 TP: 17.402

4. Número de expediente:

10- 39830

5.

Descripción de la corrección o modificación solicitada: EN CUANTO A MODIFICACION:

A LAS REIVINDICACIONES, SIN EXCEDER EL NIVEL INVENTIVO NI LO

EXPUESTO EN LA MEMORIA DESCRIPTIVA.

SE ANEXAN 29 NUEVAS REIVINDICACIONES

CON EL FIN DE QUE SEAN ESTAS LAS ANALIZADAS PARA EL EXAMEN

DE PATENTABILIDAD.

6.

Comprobante de pago No.

10-25,738 Y 10-25,740

Fecha

ABRIL 07 DE 2010

7. Anexos

☒ Comprobante de pago de la tasa: (ANEXO RECIBO DE PAGO POR EXCEDENTE EN REIVINDICACIONES) ✓

☐ Poderes, si fuere el caso

☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas

8.

NOMBRE:

CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ

FIRMA:

C.C.

17.117.818 TP

17.402

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 25,738
FECHA : ABRIL 7 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-039830- -00001-0000

Fecha: 2010-04-07 17:09:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 15

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CARLOS TAMAYO Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	97745863	07/04/2010	1,245,000.00

**** CONCEPTO ****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
12		MARCAS Y LENAS COMERCIALES	114,000.00
TOTAL :			\$ 114,000.00

SON: CIENTO CATORCE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 25,740
FECHA : ABRIL 7 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-039830- -00001-0000

Fecha: 2010-04-07 17:09:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 15

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CARLOS TAMAYO Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	97745863	07/04/2010	1,245,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
19	50005-01-01	SOLICITUDES	
		*** REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL	494,000.00
		TOTAL :	\$ 494,000.00

SON: CUATROCIENTOS NOVENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated antibody that specifically interacts and shows a measurable affinity to a conformational epitope of a protofibril form of A β peptide, whereby the protofibril epitope is represented by an exposed region of a A β -protofibril form comprising the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2, wherein said antibody shows minimal or no affinity for monomer or dimer forms of A β peptide.
2. The antibody of claim 1 which is a monoclonal antibody.
3. The monoclonal antibody of claim 2 which is a humanized monoclonal antibody or a human monoclonal antibody.
4. An isolated antibody that specifically interacts and shows a measurable affinity to a conformational epitope of a protofibril form of A β peptide, whereby the protofibril epitope is represented by an exposed region of a A β -protofibril form comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:3 and SEQ ID NO:4, wherein said antibody shows minimal or no affinity for monomer or dimer forms of A β peptide.
5. The antibody of claim 4 which is a monoclonal antibody.
6. The monoclonal antibody of claim 5 which is designated 13C3.
7. The monoclonal antibody of claim 5 which is a humanized monoclonal antibody or a human monoclonal antibody.
8. The antibody of claim 4 further comprising a variable light chain comprised of the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:5, or a variable heavy chain comprised of the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:7.
9. The antibody of claim 4 further comprising a variable light chain comprising a CDR1 region as set forth in SEQ ID NO:13, a CDR2 region as set forth in SEQ ID NO:14, and a CDR3 as set forth in SEQ ID NO:15, or a variable heavy chain comprised of a CDR1 region as set forth in SEQ ID NO:20, a CDR2 region as set forth in SEQ ID NO:21, and a CDR3 as set forth in SEQ ID NO:22.

5

10. A method of producing a monoclonal antibody which specifically binds *in vitro* to a repeating conformational epitope of a protofibril form of β -amyloid peptide while showing greater affinity to a protofibril form of β -amyloid peptide than to a low molecular weight form of β -amyloid peptide, comprising:

- 5 (a) immunizing a mammal with the protofibril form of β -amyloid peptide;
- (b) harvesting B-cells of said mammal;
- (c) creating hybridomas from the harvested B-cells, wherein said hybridomas produce antibodies; and,
- (d) selecting hybridomas which produce antibodies specifically binding to the
- 10 protofibril form of β -amyloid peptide while showing minimal affinity to monomer or dimer forms of β -amyloid peptide.

11. A method for quantifying the amount of a protofibril form of β -amyloid peptide in a tissue or fluid sample, comprising:

- (a) obtaining the tissue or fluid sample from a subject;
- 15 (b) contacting the tissue or fluid sample with an antibody or fragment thereof that specifically binds to the protofibril form of β -amyloid peptide while showing minimal affinity to low molecular weight forms of β -amyloid peptide; and,
- (c) quantifying the amount of protofibril form of β -amyloid peptide in the sample.

12. The method of claim 11 wherein the antibody is monoclonal antibody

20 selected from the group consisting of 13C3, 1D1 and 19A6.

13. A kit for detecting protofibril form of β -amyloid peptide while showing greater affinity to a protofibril form of β -amyloid peptide than to a low molecular weight form of β -amyloid peptide, comprising:

- (a) an antibody or a fragment thereof, capable of specifically binding *in vitro* to a
- 25 repeating conformational epitope of a protofibril form of β -amyloid peptide while showing minimal affinity to low molecular weight forms of β -amyloid peptide; and,

6

(b) a reagent that binds, directly, or indirectly, to said antibody or the fragment thereof.

14. The kit of claim 13 wherein the antibody is monoclonal antibody selected from the group consisting of 13C3, 1D1 and 19A6.

5 15. A pharmaceutical composition comprising a variable region fragment which specifically interacts with the protofibrillar form of b-amyloid, wherein said specific interaction is characterized by a ratio of the affinity of said variable region fragment for the protofibrillar Ab form to the affinity for other Ab forms greater than about 2.

10 16. The method of claim 15 wherein the antibody is a monoclonal antibody.

17. The method of claim 16 wherein the monoclonal antibody is an antibody selected from the group consisting of 13C3, 19A6 and 1D1.

18. The method of claim 16 wherein the monoclonal antibody is a humanized monoclonal antibody or a human monoclonal antibody.

15 19. A hybridoma which secretes an antibody selected from the group consisting of 13C3, 19A6 and 1D1.

20. An isolated nucleic acid molecule encoding a variable heavy chain fragment of monoclonal antibody 13C3 wherein the variable heavy chain fragment comprises the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:7.

20 21. An isolated nucleic acid molecule encoding a variable heavy chain fragment of monoclonal antibody 13C3 wherein the nucleic acid molecule comprises the nucleotide sequence as set for in SEQ ID NO:8.

22. An expression vector for the expression of a variable heavy chain fragment of monoclonal antibody 13C3 in a recombinant host cell wherein said expression vector
25 contains the nucleic acid molecule of claim 21.

23. A host cell which expresses a variable heavy chain fragment of monoclonal antibody 13C3 wherein said host cell contains the expression vector of claim 22.

24. An isolated nucleic acid molecule encoding a variable light chain fragment of monoclonal antibody 13C3 wherein the variable light chain fragment comprises the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:5.

5 25. An isolated nucleic acid molecule encoding a variable light chain fragment of monoclonal antibody 13C3 wherein the nucleic acid molecule comprises the nucleotide sequence as set for in SEQ ID NO:6.

26. An expression vector for the expression of a variable light chain fragment of monoclonal antibody 13C3 in a recombinant host cell wherein said expression vector contains the nucleic acid molecule of claim 25.

10 27. A host cell which expresses a variable light chain fragment of monoclonal antibody 13C3 wherein said host cell contains the expression vector of claim 26.

28. An isolated variable heavy chain fragment of monoclonal antibody 13C3 which comprises the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:7.

15 29. An isolated variable light chain fragment of monoclonal antibody 13C3 which comprises the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:5.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que interactúa específicamente y presenta una afinidad medible a un epítoto conformacional de una forma de protofibrilla de péptido de 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 secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO 2, en donde dicho anticuerpo presenta mínima a ninguna afinidad para formas monoméricas o diméricas de péptido de A β .
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, que es un anticuerpo monoclonal.
3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, que es un anticuerpo monoclonal humanizado o un anticuerpo monoclonal humano.
4. Un anticuerpo aislado que interactúa específicamente y presenta una afinidad medible a un epítoto de una forma de protofibrilla de péptido de 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 una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4, en donde dicho anticuerpo presenta mínima o ninguna afinidad para formas monoméricas o diméricas de péptido de A β .

5. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, que es un anticuerpo monoclonal.
6. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 5, que se designa 13C3.
7. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 5, que es un anticuerpo monoclonal humanizado o un anticuerpo monoclonal humano.
8. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, que además comprende una cadena liviana variable compuesta por la secuencia de aminoácido expuesta en SEQ ID NO 5 o una cadena pesada variable compuesta por la secuencia de aminoácido expuesta en SEQ ID NO 7.
9. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, que además comprende una cadena liviana variable que comprende una región de CDR1 expuesta en SEQ IDNO 13, una región de CDR2 expuesta en SEQ ID NO 14 y una CDR3

expuesta en SEQ ID NO 15, o cadena pesada variable compuesta de una región de CDR1 expuesta en SEQ ID NO 20, una región de CDR2 expuesta en SEQ ID NO 21, y una región de CDR3 expuesta en SEQ ID NO 22.

10. Un método para producir un anticuerpo monoclonal que se une específicamente in Vitro a un epítipo conformacional de una forma de protofibrilla de péptido β -amiloide mientras que presenta mínima afinidad a las formas de bajo peso molecular de péptido β -amiloide, que comprende:

- (a) inmunizar a un mamífero con la forma de protofibrilla de péptido β -amiloide;
- (b) cultivar células B de dicho mamífero;
- (c) crear hibridomas desde las células B cultivadas, en donde dichos hibridomas producen anticuerpos; y
- (d) seleccionar hibridomas que producen anticuerpos que se unen específicamente a la forma de protofibrilla de péptido β -amiloide mientras que presenta mínima afinidad a formas monoméricas o diméricas de péptido β -amiloide.

11. Un método para cuantificar la cantidad de una forma de protofibrilla de péptido β -amiloide en una muestra de tejido o de fluido, que comprende:

- (a) obtener la muestra de tejido o de fluido de un sujeto;
- (b) poner a la muestra de tejido o de fluido en contacto con un anticuerpo o un fragmento de él que se une específicamente a la forma de protofibrilla de péptido β -amiloide mientras que presenta afinidad mínima a las formas de bajo peso molecular de péptido β -amiloide; y
- (c) cuantificar la cantidad de la forma de protofibrilla de péptido β -amiloide en la muestra.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo formado por 13C3, 1D1 y 19A6.

13. 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, que comprende:

- (a) un anticuerpo o un fragmento de él, capaz de unirse específicamente in Vitro a un epítipo conformacional repetido de una forma de protofibrilla de péptido β -amiloide mientras que presenta mínima afinidad a las formas de bajo peso molecular de péptido β -amiloide; y
 - (b) un reactivo que se une, directa o indirectamente, al anticuerpo mencionado o al fragmento de él.
14. El estuche de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo formado por 13C3, 1D1 y 19A6.
15. Una composición farmacéutica que comprende un fragmento de región variable que interactúa específicamente con la forma de protofibrilla de β -amiloide, en donde la interacción específica mencionada se caracteriza por una relación de la afinidad del fragmento de región variable mencionado para la forma de protofibrilla de $A\beta$ a la afinidad para otras formas de $A\beta$ mayor que 2.
16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo seleccionado del grupo formado por 13C3, 1D1 y 19A6.
18. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal humanizado o un anticuerpo monoclonal humano.
19. Un hibridoma que segrega un anticuerpo seleccionado del grupo formado por 13C3, 1D1 y 19A6.
20. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un fragmento de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 13C3 en donde el fragmento de cadena pesada variable comprende la secuencia de aminoácido expuesta en SEQ ID NO 7.
21. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un fragmento de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 13C3 en donde la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótido expuesta en SEQ ID NO 8.
22. Un vector de expresión para la expresión de un fragmento de cadena pesada variable de anticuerpo monoclonal 13C3.

en una célula huésped recombinante en donde dicho vector de expresión comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 21.

23. Una célula huésped que expresa un fragmento de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 13C3 en donde dicha célula huésped contiene el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 22.

24. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un fragmento de cadena liviana variable del anticuerpo monoclonal 13C3 en donde el fragmento de cadena liviana variable comprende la secuencia de aminoácido expuesta en SEQ ID NO 5.

25. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un fragmento de cadena liviana variable del anticuerpo monoclonal 13C3 en donde la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótido expuesta en SEQ ID NO 6.

26. Un vector de expresión para la expresión de un fragmento de cadena liviana variable del anticuerpo monoclonal 13C3 en una célula huésped recombinante en donde el

vector de expresión mencionado contiene la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 25.

27. Una célula huésped que expresa un fragmento de cadena liviana variable del anticuerpo monoclonal 13C3 en donde dicha célula huésped contiene el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 26.

28. Un fragmento de cadena pesada variable aislado del anticuerpo monoclonal 13C3 que comprende la secuencia de aminoácido expuesta en SEQ ID NO 7.

29. Un fragmento de cadena liviana variable aislado del anticuerpo monoclonal 13C3 que comprende la secuencia de aminoácido expuesta en SEQ ID NO 5.