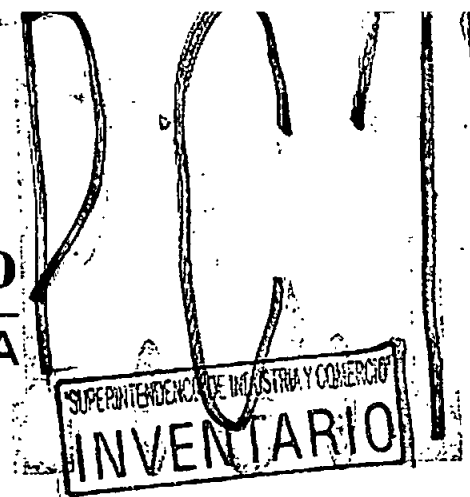


08



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



Organización y
Digitalización CSA Ltda

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

08-54164

21. EXPEDIENTE N°

54. TÍTULO "ANTICUERPO MONOCLONAL ESPECIFICO BETA 1-42 CON PROPIEDADES TERAPEUTICAS"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/395

71. SOLICITANTE AC IMMUNE SA

DOMICILIO LAUSANNE, SUIZA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P.53.215

22. BOGOTÁ,D.C. 28 MAYO 2008

611

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-054164- -00000-0000

Fecha: 2008-05-28 15:53:08 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eje: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 236

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

12 Julio 2008

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: AC IMMUNE SA

Dirección: EPFL-PSE Building B, CH-1015 Lausanne, Suiza.

Nacionalidad o Domicilio: Lausanne, Suiza.

Lugar de Constitución:

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlcco@lloredacamacho.com

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: GREFERATH, Ruth; HICKMAN, David; MUHS, Andreas; PFEIFER, Andrea y NICOLAU, Claude.

Dirección: Am Ziegelhof 2, 77694 Kehl; Cité St. Michel 12, CH-1635 La Tour de Trême; Avenue des Cerisiers 39b, CH-1009 Pully; Route de Fenil 16A, CH-1806 St-Légier y 166 Greenwood Street, Newton, MA 02459.

Nacionalidad o Domicilio: Alemania, Suiza y Estados Unidos de América.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2006/011862

Fecha: 08/12/06

Publicación Internacional No. WO 2007/068412 A3

Fecha: 21/06/07

⑥

Título (54) "ANTICUERPO MONOCLONAL ESPECIFICO BETA 1-42 CON PROPIEDADES TERAPÉUTICAS"

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 39/395

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

EP

12/12/05

05027092.5

EP

14/07/06

06014729.5

EP

02/10/06

06020766.9

⑨

Comprobante de Pago No. 08-33,095

Fecha: Abril 24 de 2008

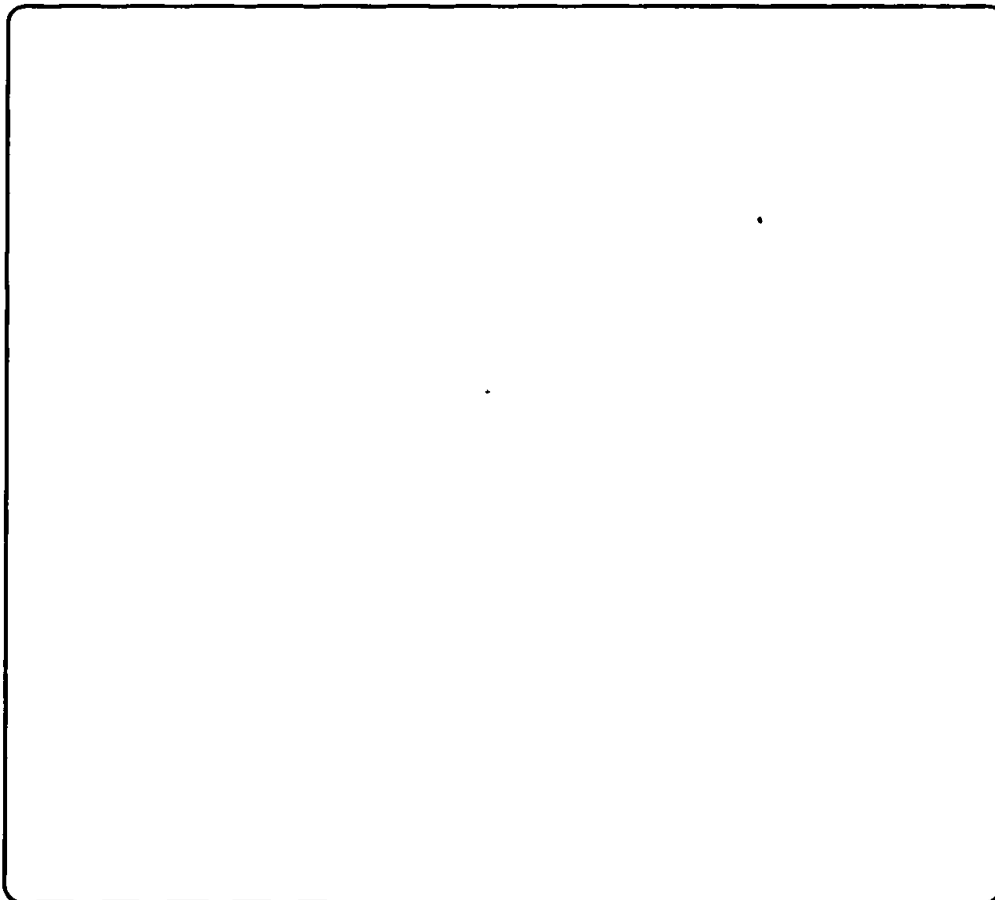
10

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.
- ☐ Documento de Representación Legal.
- ☐ 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 reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ 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.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Anexos al Reporte de Búsqueda Internacional, Publicación con su traducción y Listado de Secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquén T.P. 53.215

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-054164- -00000-0000

Fecha: 2008-05-28 15:53:08 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 236

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 33,095
FECHA : ABRIL 24 DE 2008

==== CONSIGNACION ====

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
REDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754397	773640	24/04/2008	5,991,000.00

==== CONCEPTO ====

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
	TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2006/011862

A. CLASIFICACION DE MATERIA

INV.. A61K39/395 C07K16/18 G01N33/577 A61P25/28

Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

C07K A61K

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

EPO-Interno, BIOSIS, EMBASE, WPI Dato, Búsqueda de Secuencia

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	US 2003/108551 A1 (NICOLAU YVES CLAUDE [US] ET AL) 12 de Junio de 2003 (2003-06-12) párrafo [0011] - párrafo [0018] párrafo [0077] - párrafo [0103] párrafo [0108] - párrafo [0115] reivindicaciones 1-26 -----	1-118
X	WO 01/18169 A (UNIV RAMOT [IL]; SOLOMON BEKA [IL]; FRENKEL DAN [IL]; HANAN EILAT [IL]) 15 de Marzo de 2001 (2001-03-15) página 43, línea 4 - página 68, línea 25 reivindicaciones 1-121 -----	1-118
X	WO 2005/105998 A (CHEMO SERO THERAPEUT RES INST [JP], SUGIMURA KAZUHISA [JP]; NAKASHIMA) 10 de Noviembre de 2005 (2005-11-10) El documento completo ---/----	1-118

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arruinar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'Z' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

26 de Abril de 2007

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

12/06/2007

Nombre y dirección de correo de ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040 Tx 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Ulbrecht, Matthias

Forma PCT ISA 210 (segunda hoja) (Abril 2005)

Extracto folio 3
Tarjetas folios 4 y 5

6/1

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2006/011862

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
E	-& EP 1 741 783 A (CHEMO SERO THERAPEUT RES INST [JP]) 10 de Enero de 2007 (2007-01-10) el documento completo -----	1-118
X	LIU RUITIAN ET AL: "Fragmentos variables de cadena sencilla contra beta-amiloide (Abeta) pueden inhibir neurotoxicidad inducida por Abeta" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA, US, Vol. 43, no. 22, 12 de Mayo de 2004 (2004-05-12), Páginas 6959-6967, XP002395890 ISSN: 0006-2960 Resumen Página 6960, columna a mano izquierda, párrafo 3 – Página 6961, columna a mano izquierda, párrafo 2 -----	1-118
X	SOLOMON B ET AL: "Anticuerpos monoclonales inhiben la agregación fibrilar in vitro del péptido beta-amiloide de Alzheimer" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, Vol. 93, Enero de 1996 (1996-01), páginas 452-455, XP002942850 ISSN: 0027-8424 El documento completo -----	1-118
X	WO 2004/071408 A (APPLIED MOLECULAR EVOLUTION IN (US); DAVIES JULIAN [US]; TANG YING [US] 26 de Agosto de 2004 (2004-08-26) Secuencias 1, 2 Reivindicaciones 22, 23 -----	21, 23, 24, 50-54, 76-85, 87-100, 111-118
X	US 2004/043418 A1 (HOLTZMAN DAVID M [US] ET AL) 4 de Marzo de 2004 (2004-03-04) Secuencia 12 Reivindicaciones 5, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 ----- -----/-----	21, 23, 24, 50, 52, 54, 76-85, 87-100, 111-118

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2006/011862

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	DATABASE EMBL [Online] 16 De Julio de 1988 (1988-07-16), "Gen de región-V de cadena kappa rearreglada V105 de Inmunoglobulina de ratón de mieloma C.AL20-TEPC-105, exones 1 y 2" XP002429773 Extraído del acceso EBI no. EMBL: M12183 Databasc acceso no. M12183 El documento completo -----	66, 70, 71
X	DATABASE Geneseq [Online] 15 de Abril de 1998 (1998-04-15), "Subunidad de cadena L de secuencia codificante de anticuerpo específico de Fas" XP002431264 Extraído del acceso EBI no. GSN: AAT88870 Databasc acceso no. AAT88870 El documento completo -----	67, 70, 71
X	DATABASE EMBL [Online] 8 de Febrero de 1999 (1999-02-08), "Anticuerpo mARN anti-fosforilcolina de baja afinidad de Mus musculus F5.20G3, cds parciales" XP002429775 Extraído del acceso EBI no. EMBL: AF044238 Databasc acceso no. AF044238 El documento completo -----	68, 70, 71
X	DATABASE Geneseq [Online] 22 de Abril de 2003 (2003-04-22), "ADN de ratón codificante de región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D8" XP002429776 Extraído del acceso EBI no. GSN: ABX16569 Databasc acceso no. ABX16569 El documento completo -----	69-71
A	WO 96/40731 A (SINAI SCHOOL MEDICINE [US] ; BONA CONSTANTIN [US]; BRUMEANU TEODOR DORU) 19 de Diciembre de 1996 (1996-12-19) Página 18, párrafo 3 – página 19, párrafo 3 -----	65, 86

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONALSolicitud Internacional No.
PCT/EP2006/011862**Casilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del Item 2 de la primera hoja)**

Este reporte de búsqueda internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.:
porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:

ver INFORMACIÓN ADICIONAL hoja PCT/ISA/210
2. ☐ Reivindicaciones Nos.:
porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:
3. ☐ Reivindicaciones No.:
porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Regla 6.4(a).

Casilla III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del Item 3 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

1. ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.
2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.
3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:
4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

Comentario sobre Protesta

- ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante.
- ☐ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.

Continuación de la Casilla II.1

Aunque las reivindicaciones 92-99, 112 y 113 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/composición.

Aunque las reivindicaciones 111 y 114-116 están dirigidas a un método de diagnóstico practicado en el cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/composición.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2006/011862

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 2003108551 A1	12-06-2003	NINGUNO	
WO 0118169 A	15-03-2001	AU 784568 B2	04-05-2006
		AU 6723200 A	10-04-2001
		CA 2349434 A1	15-03-2001
		EP 1180938 A2	27-02-2002
		JP 2003509020 Y	11-03-2003
		US 2003077252 A1	24-04-2003
		US 2002052311 A1	02-05-2002
		US 6919075 B1	19-07-2005
WO 2005105998 A	10-11-2005	EP 1741783 A1	10-01-2007
EP 1741783 A	10-01-2007	WO 2005105998 A1	10-11-2005
WO 2004071408 A	26-08-2004	EP 1596809 A2	23-11-2005
US 2004043418 A1	04-03-2004	AT 279442 T	15-10-2004
		AU 4178601 A	03-09-2001
		BR 0108676 A	07-01-2003
		CA 2400559 A1	30-08-2001
		CN 1426423 A	25-06-2003
		CZ 20022851 A3	17-09-2003
		DE 1257584 T1	28-05-2003
		DE 60106394 D1	18-11-2004
		DE 60106394 T2	09-03-2006
		EP 1257584 A2	20-11-2002
		ES 2184660 T1	16-04-2003
		HK 1048640 A1	01-04-2005
		HR 20020693 A2	31-12-2004
		HU 0204074 A2	28-03-2003
		JP 2003523764 T	12-08-2003
		MX PA02008145 A	05-04-2004
		NO 20023957 A	22-10-2002
		NZ 520800 A	30-04-2004
		PL 356798 A1	12-07-2004
		PT 1257584 T	31-01-2005
		SK 12212002 A3	07-10-2003
		TR 200202799 T3	21-03-2003
		WO 0162801 A2	30-08-2001
WO 9640731 A	19-12-1996	AU 6255096 A	30-12-1996

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/011862A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/395 C07K16/18 G01N33/577 A61P25/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/108551 A1 (NICOLAU YVES CLAUDE [US] ET AL) 12 June 2003 (2003-06-12) paragraph [0011] - paragraph [0018] paragraph [0077] - paragraph [0103] paragraph [0108] - paragraph [0115] claims 1-26	1-118
X	WO 01/18169 A (UNIV RAMOT [IL]; SOLOMON BEKA [IL]; FRENKEL DAN [IL]; HANAN EILAT [IL]) 15 March 2001 (2001-03-15) page 43, line 4 - page 68, line 25 claims 1-121	1-118
X	WO 2005/105998 A (CHEMO SERO THERAPEUT RES INST [JP]; SUGIMURA KAZUHISA [JP]; NAKASHIMA) 10 November 2005 (2005-11-10) the whole document -/-	1-118

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

S document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 April 2007

Date of mailing of the international search report

12/06/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.O. Box 5816 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3010

Authorized officer

Ulbrecht, Matthias

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2006/011862

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	-& EP 1 741 783 A (CHEMO SERO THERAPEUT RES INST [JP]) 10 January 2007 (2007-01-10) the whole document	1-118
X	LIU RUITIAN ET AL: "Single chain variable fragments against beta-amyloid (Abeta) can inhibit Abeta aggregation and prevent Abeta-induced neurotoxicity" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA, US, vol. 43, no. 22, 12 May 2004 (2004-05-12), pages 6959-6967, XP002395890 ISSN: 0006-2960 abstract page 6960, left-hand column, paragraph 3 - page 6961, left-hand column, paragraph 2	1-118
X	SOLOMON B ET AL: "MONOCLONAL ANTIBODIES INHIBIT IN VITRO FIBRILLAR AGGREGATION OF THE ALZHEIMER BETA-AMYLOID PEPTIDE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 93, January 1996 (1996-01), pages 452-455, XP002942850 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-118
X	WO 2004/071408 A (APPLIED MOLECULAR EVOLUTION IN [US]; DAVIES JULIAN [US]; TANG YING [US] 26 August 2004 (2004-08-26) sequences 1,2 claims 22,23	21,23, 24, 50-54, 76-85, 87-100, 111-118
X	US 2004/043418 A1 (HOLTZMAN DAVID N [US] ET AL) 4 March 2004 (2004-03-04) sequence 12 claims 5,29,31,33,35,37,39,41,43,45 -/-	21,23, 24,50, 52,54, 76-85, 87-100, 111-118

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2006/011862

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] 16 July 1988 (1988-07-16), "Mouse immunoglobulin rearranged kappa-chain V-region V105 gene from C.AL20-TEPC-105 myeloma, exons 1 and 2." XP002429773 retrieved from EBI accession no. EMBL:M12183 Database accession no. M12183 the whole document	66,70,71
X	DATABASE Geneseq [Online] 15 April 1998 (1998-04-15), "L chain subunit of Fas specific antibody coding sequence." XP002431264 retrieved from EBI accession no. GSN:AAT88870 Database accession no. AAT88870 the whole document	67,70,71
X	DATABASE EMBL [Online] 8 February 1999 (1999-02-08), "Mus musculus F5.2063 low-affinity anti-phosphorylcholine IgG antibody mRNA, partial cds." XP002429775 retrieved from EBI accession no. EMBL:AF044238 Database accession no. AF044238 the whole document	68,70,71
X	DATABASE Geneseq [Online] 22 April 2003 (2003-04-22), "Mouse DNA encoding antibody 3D8 heavy chain variable region." XP002429776 retrieved from EBI accession no. GSN:ABX16569 Database accession no. ABX16569 the whole document	69-71
A	WO 96/40731 A (SINAI SCHOOL MEDICINE [US]; BOMA CONSTANTIN [US]; BRUMEANU TEODOR DCRU) 19 December 1996 (1996-12-19) page 18, paragraph 3 - page 19, paragraph 3	65,86

Form: PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2006/011862

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 92-99, 112 and 113 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 111 and 114-116 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/011862

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003108551	A1	12-06-2003	NONE	
WO 0118169	A	15-03-2001	AU 784568 B2	04-05-2006
			AU 6723200 A	10-04-2001
			CA 2349434 A1	15-03-2001
			EP 1180938 A2	27-02-2002
			JP 2003509020 T	11-03-2003
			US 2003077252 A1	24-04-2003
			US 2002052311 A1	02-05-2002
			US 6919075 B1	19-07-2005
WO 2005105998	A	10-11-2005	EP 1741783 A1	10-01-2007
EP 1741783	A	10-01-2007	WO 2005105998 A1	10-11-2005
WO 2004071408	A	26-08-2004	EP 1596809 A2	23-11-2005
US 2004043418	A1	04-03-2004	AT 279442 T	15-10-2004
			AU 4178601 A	03-09-2001
			BR 0108676 A	07-01-2003
			CA 2400559 A1	30-08-2001
			CN 1426423 A	25-06-2003
			CZ 20022851 A3	17-09-2003
			DE 1257584 T1	28-05-2003
			DE 60106394 D1	18-11-2004
			DE 60106394 T2	09-03-2006
			EP 1257584 A2	20-11-2002
			ES 2184660 T1	16-04-2003
			HK 1048640 A1	01-04-2005
			HR 20020693 A2	31-12-2004
			HU 0204074 A2	28-03-2003
			JP 2003523764 T	12-08-2003
			MX PA02008145 A	05-04-2004
			NO 20023957 A	22-10-2002
			NZ 520800 A	30-04-2004
			PL 356798 A1	12-07-2004
			PT 1257584 T	31-01-2005
			SK 12212002 A3	07-10-2003
			TR 200202799 T3	21-03-2003
			WO 0162801 A2	30-08-2001
WO 9640731	A	19-12-1996	AU 6255096 A	30-12-1996

DOCUMENTOS ANEXOS AL REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

1. US 2003/108551 A1
2. WO 01/18169 A
3. WO 2005/105998 A
4. XP002395890
5. XP002942850
6. WO 2004/071408 A
7. US 2004/043418 A1
8. XP002429773
9. XP002431264
10. XP002429775
11. XP002429776



US 20030108551A1

(19) **United States**

(12) **Patent Application Publication**

Nicolau et al.

(10) Pub. No.: **US 2003/0108551 A1**

(43) Pub. Date: **Jun. 12, 2003**

(54) **METHODS AND COMPOSITIONS OF
MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC
FOR BETA-AMYLOID PROTEINS**

(76) Inventors: Yves Claude Nicolau, Newton, MA
(US); Ruth Greferath, Kehl (DE)

Correspondence Address:

**JOHN S. PRATT, ESQ
KILPATRICK STOCKTON, LLP
1100 PEACHTREE STREET
SUITE 2800
ATLANTA, GA 30309 (US)**

(21) Appl. No.: **10/288,557**

(22) Filed: **Nov. 4, 2002**

Related U.S. Application Data

(60) Provisional application No. 60/336,514, filed on Nov. 2, 2001.

Publication Classification

(51) Int. Cl.⁷ **A61K 39/395**

(52) U.S. Cl. **424/146.1**

(57) **ABSTRACT**

This invention provides methods and compositions for the detection, diagnosis and treatment of amyloid-associated diseases, in particular, diseases comprising deposition of amyloid assemblies, fibrils, filaments, tangles, or plaques. A preferred composition comprises monoclonal antibodies that specifically bind amyloid proteins, peptides or fragments and change the conformation.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 March 2001 (15.03.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/18169 A2

(51) International Patent Classification⁷: C12N

(21) International Application Number: PCT/IL00/00518

(22) International Filing Date: 31 August 2000 (31.08.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/152,417 3 September 1999 (03.09.1999) US
09/473,653 29 December 1999 (29.12.1999) US
09/629,971 31 July 2000 (31.07.2000) US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): RAMOT
UNIVERSITY AUTHORITY FOR APPLIED RE-
SEARCH & INDUSTRIAL DEVELOPMENT LTD.
[IL/IL]; 32 Haim Levanon Street, P.O. Box 39296, 61392
Tel Aviv (IL).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): SOLOMON, Beka
[IL/IL]; 120 Yitzhak Hanassi Street, 46399 Herzlia (IL).
FRENKEL, Dan [IL/IL]; 32 Gorodeski Street, 76227
Rehovot (IL). HANAN, Elliot [IL/IL]; 111 Moshe Dayan
Street, 67200 Tel Aviv (IL).

(74) Agent: G. E. EHRLICH (1995) LTD.; Gihor-Sport
Building, 17th Floor, 28 Bezalel Street, 52521 Ramat Gan
(IL).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— Without international search report and to be republished
upon receipt of that report.

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.*

(54) Title: AGENTS AND COMPOSITIONS AND METHODS UTILIZING SAME USEFUL IN DIAGNOSING AND/OR
TREATING OR PREVENTING PLAQUE FORMING DISEASES

(57) Abstract: A method of immunizing against plaque forming diseases using display technology is provided. The method utilizes novel agents, or pharmaceutical compositions for vaccination against plaque forming diseases which rely upon presentation of an antigen or epitope on a display vehicle. The method further includes agents, or pharmaceutical compositions for vaccination against plaque forming diseases, which rely upon presentation of an antibody, or an active portion thereof, on a display vehicle. Whether antigens or antibodies are employed, disaggregation of plaques results from the immunization.

WO 01/18169 A2

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 11 月 10 日 (10.11.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/105998 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/13, A61K
31/7088, 39/395, 48/00, A61P 25/28, C07K 16/18, C12N
1/15, 1/19, 1/21, 5/00, C12P 21/02, G01N 33/563

(74) 代理人: 河宮 浩, 外 (KAWAMIYA, Osamu et al.), 〒
5400001 大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号
IMP ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/007628

(22) 国際出願日: 2005 年 4 月 21 日 (21.04.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2004-131839 2004 年 4 月 27 日 (27.04.2004) JP
特願 2004-300590
2004 年 10 月 14 日 (14.10.2004) JP
特願 2004-343945
2004 年 11 月 29 日 (29.11.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財
団法人化学及血清療法研究所 (JURIDICAL FOUN-
DATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RE-
SEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒8608568 熊本県熊
本市大連一丁目 6 番 1 号 Kumamoto (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 杉村 和久 (SUG-
IMURA, Kazuhisa) [JP/JP]; 〒8910103 鹿児島県鹿児島
市皇徳寺台 5-20-5 Kagoshima (JP). 中島 敏
博 (NAKASHIMA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒8691298 熊本
県菊池市旭志川辺 1-3-4 番地 1 財団法人化学及血
清療法研究所 菊池研究所内 Kumamoto (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AU, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY,
NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別箇に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。



WO 2005/105998 A1

(54) Title: HUMAN ANTIAMYLOID β PEPTIDE ANTIBODY AND ANTIBODY FRAGMENT THEREOF

(54) 発明の名称: ヒト抗アミロイド β ペプチド抗体およびその抗体フラグメント

(57) Abstract: It is intended to provide a human amyloid β peptide (hereinafter referred to as A β) antibody which binds to A β and inhibits the aggregation of A β molecules, and its antibody fragment. The above-described antibody or its antibody fragment has the variable region of human anti-A β antibody and strongly reacts with A β to thereby exert an effect of inhibiting the aggregation thereof. The above antibody and its antibody fragment are usable as A β detection reagent, preventives/remedies for Alzheimer's disease or diagnostics therefor.

(57) 要約: アミロイド β ペプチド (以下、A β という) に結合し、A β 分子の凝集を阻害するヒト抗 A β 抗体および該抗体フラグメントを提供する。本発明の抗体および抗体フラグメントは、ヒト抗 A β 抗体の可変領域を有し、A β と強く反応して、その凝集の阻害作用を示す。本発明の抗体および抗体フラグメントは、A β の検出試薬、アルツハイマー痴呆症の予防・治療薬、または診断薬として使用することができる。

Single Chain Variable Fragments against β -Amyloid ($A\beta$) Can Inhibit $A\beta$ Aggregation and Prevent $A\beta$ -Induced Neurotoxicity[†]

Ruitian Liu,[†] Bin Yuan,[‡] Sharareh Emadi,[‡] Andleeb Zameer,[†] Philip Schulz,[‡] Chad McAllister,[§] Yuri Lyubchenko,[§] Gaddam Goud,^{||} and Michael R. Sierks^{*,†}

Department of Chemical and Materials Engineering and Department of Microbiology, Arizona State University, Tempe, Arizona 85287, and Department of Microbiology and Tropical Medicine, The George Washington University, Washington, D.C. 20037

Received January 8, 2004; Revised Manuscript Received March 29, 2004

ABSTRACT: β -Amyloid ($A\beta$) is a major pathological determinant of Alzheimer's disease (AD). Both active and passive immunization studies have shown that antibodies against $A\beta$ are effective in decreasing cerebral $A\beta$ levels, reducing $A\beta$ accumulation, and attenuating cognitive deficits in animal models of AD. However, the therapeutic potential of these antibodies in human AD patients is limited because of adverse inflammatory reactions and cerebral hemorrhaging associated with the treatments. Here, we show that single chain variable fragments (scFv's) represent an attractive alternative to more conventional antibody-based therapeutics to reduce $A\beta$ toxicity. The binding affinities and binding epitopes of two different scFv's to $A\beta$ were characterized using a surface plasmon resonance (SPR) biosensor. An scFv binding the 17–28 region of $A\beta$ effectively inhibited *in vitro* aggregation of $A\beta$ as determined by thioflavin T (ThT) fluorescence staining and atomic force microscopy (AFM) analysis, while an scFv binding the carboxyl-terminal region of $A\beta$ (residues 29–40) did not inhibit aggregation. The scFv to the 17–28 region when co-incubated with $A\beta$ not only decreased aggregation but also eliminated any toxic effects of aggregated $A\beta$ on the human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y. The ability of scFv's to inhibit both aggregation and cytotoxicity of $A\beta$ indicates that scFv's have potential therapeutic value for treating AD.

Alzheimer's disease (AD),¹ a widespread aging-related neurodegenerative disease, is characterized by neuronal loss and the presence of amyloid plaques and neurofibrillary tangles. A primary component of the amyloid plaques is β -amyloid, a short natively unfolded protein (40–42 amino acids), that can assemble into a number of different morphologies including soluble oligomers, protofibrils, and insoluble fibrils, all of which seem to be neurotoxic (1–4). It is not known what roles the various different morphologies play in the development of AD, although growing evidence suggests the soluble oligomers may be a critical component in AD pathology (5–8).

Potential therapeutic approaches for AD include reducing $A\beta$ synthesis by targeting the enzymes that process APP to $A\beta$ peptide (9–11), increasing the clearance of $A\beta$ peptides from brain (12, 13), inhibiting $A\beta$ aggregation (14, 15),

decreasing aggregate burden in the brain (13, 16), and reducing inflammation associated with $A\beta$ deposition (17, 18). Active immunization against aggregated $A\beta$ reduced the presence of existing fibrils and inhibited formation of new ones, reducing neurotoxicity (19, 20) and associated memory impairment (12, 20, 21). Passive immunization with antibodies against $A\beta$ also reduced amyloid deposition (22–24), cleared existing $A\beta$ plaques, reduced the concentration of soluble peptide (22), and reversed $A\beta$ -induced memory deficits (25–27). Antibodies can alter $A\beta$ aggregation through several different mechanisms including blocking nucleation sites, disrupting preexisting fibrils, or inhibiting fibrillogenesis (19). In addition, antibodies can influence $A\beta$ equilibrium between brain and plasma by binding plasma $A\beta$ (23, 28), indirectly drawing $A\beta$ from the brain (29, 30). Finally, since antibodies have been shown to cross from periphery to the brain, they can bind $A\beta$ aggregates in brain tissue and stimulate microglial phagocytosis of the bound $A\beta$ (13, 31–33). Because of these different potential methods of clearing $A\beta$, immunotherapy has great potential for treating or even preventing AD (34). Recent clinical trials testing active immunization of human AD patients were canceled due to occurrence of meningoencephalitis in 6% of patients (34–38). A recent study using intracerebroventricular (ICV) injection of anti- $A\beta$ antibody into the third ventricle reduced cerebral plaques, decreased inflammation, and did not trigger microhemorrhage in the brain (39), demonstrating the potential benefits of immunotherapy for AD patients providing the inflammatory response can be

[†]This work was supported in part by grants from the NIH (AG17984), American Health Assistance Foundation, and Alzheimer's Association (IIRG-01-2753).

* Corresponding author. Fax: 480-965-0037. Phone: 480-965-2828. E-mail: sierks@asu.edu.

[†] Department of Chemical and Materials Engineering, Arizona State University.

[‡] Department of Microbiology, Arizona State University.

[§] Department of Microbiology and Tropical Medicine, The George Washington University.

^{||} Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; $A\beta$, β -amyloid; scFv, single chain variable fragment; ThT, thioflavin T; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; AFM, atomic force microscopy; SPR, surface plasmon resonance; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

adequately controlled. Single chain variable domain antibody fragments (scFv's) represent a promising immunotherapeutic approach since they do not contain the antibody Fc region responsible for activating the complement response. In addition to a reduced risk of an inflammatory response, scFv's have a much lower molecular weight than a full antibody, potentially facilitating transfer into the brain.

Antibodies isolated against the amine terminal of A β were shown to assist in plaque clearance and reduction of neurotic pathology (22, 24, 40, 41) while antibodies against the central region of A β do not recognize amyloid plaques but can generally bind soluble A β and reduce plaque deposition (23). Here we show that scFv's isolated from phage display libraries may be useful alternatives to antibodies as therapeutics for AD. We isolated two scFv's to non-amino-terminal regions of A β and show that these scFv's, particularly the one binding the 17–28 region of A β , can be used to inhibit both A β aggregation and cytotoxicity.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Biopanning Using the ScFv Library. All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) unless otherwise indicated. A naive human single chain variable domain (scFv) phage library (42) was obtained from the Medical Research Council (Cambridge, England). Phage selection was performed using four rounds of panning with slight modifications to the procedure originally described by Marks (43). Amine-binding 96-well plates (Corning Inc., Corning, NY) were coated with either A β 1–28 or A β 1–40 at 10 μ g/mL in 50 mM carbonate–bicarbonate buffer, pH 9.6, overnight at 4 °C. The plates were then blocked with 3% milk powder in PBS (10 mM phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4). Aliquots of the phage library, 10¹² phage titer units, were incubated with the immobilized peptides for 2 h at room temperature. Bound phage were eluted with 7.18 M triethylamine and neutralized with 1 M Tris-HCl, pH 7.4. Phage titers were determined by infecting *Escherichia coli* cells and using serial dilution on agar plates containing ampicillin (100 μ g/mL). Eluted phage were subsequently amplified by infecting *E. coli* TG1 in the presence of helper phage VCSM13 (Stratagene, La Jolla, CA) as described (43). The phage were further purified using poly(ethylene glycol)/NaCl precipitation and resuspended in PBS also essentially as described (43).

Screening of Positive Clones by Phage ELISA. Individual clones obtained after the fourth round of panning were selected as described (www.mrc.cpe.cam.ac.uk). Amine-binding 96-well plates (Corning) were coated with A β 1–28 or A β 1–40 at 10 μ g/mL in PBS, pH 9.0, overnight at 4 °C. The plate wells were blocked with 3% milk powder in PBS, pH 7.4. Aliquots of the supernatant obtained from each clone (100 μ L/well) were added to individual wells and incubated at room temperature for 2 h. Bound phage were detected using an anti-M13 antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) at 1:5000 dilution. Substrate, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), was added, and the reaction was stopped after 30 min with 2 M H₂SO₄ (VWR, West Chester, PA). Absorbance was calculated as the difference between OD₆₃₀ and OD₄₅₀ values using a Wallac 1420 plate reader (Perkin-Elmer, Gaithersburg, MD).

Production of Soluble ScFv and ELISA. Plasmid DNA from the positive clones identified with phage ELISA was isolated and transformed into the nonsuppressor *E. coli* strain HB2151 (44) for production of soluble scFv. Following the procedure as described earlier (43), clones were grown, and scFv production was induced by addition of 1 mM isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Supernatant samples were obtained by centrifugation at 1500g, 30 min at 4 °C. Amine-binding 96-well plates (Corning) were coated with 10 μ g/mL of A β 1–28 or A β 1–40. Supernatant was added to the wells, and the samples were allowed to stand for 2 h at room temperature. Soluble scFv was detected by an anti-myc antibody conjugated to HRP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) at a 1:500 dilution.

The clone with the highest ELISA readings against A β 1–28 (H1) and another against A β 1–40 (C1) were selected for further study. The affinity of the H1 scFv to A β 1–40 was improved through affinity maturation by randomizing the CDR3 light chain region resulting in H1v2.

Production and Purification of scFv. Soluble scFv's from the two selected clones (H1v2, C1) were produced from 4 L culture volumes grown in four separate 1 L shake flasks as described above. The supernatant and periplasmic fractions from the culture were combined, passed through a 0.2 μ m filter (Whatman, Clifton, NJ), and concentrated in a tangential flow filter (Millipore, Bedford, MA) using a 10 kDa cutoff filter (Millipore, Bedford, MA). Concentrated samples were dialyzed overnight against 0.5 M NaCl–PBS and purified either using a HiTrap chelating HP column (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) charged with NiSO₄ or using a protein A column as described (45). Protein fractions from the NiSO₄ column were eluted with 10–25 mM imidazole and dialyzed overnight into PBS. The eluates were analyzed by SDS–PAGE on 15% polyacrylamide gels (Bio-Rad, Hercules, CA).

A β Fragments. A β 1–16, A β 1–28, and A β 20–29 were purchased from Bachem (Torrance, CA). A β 1–40, A β 17–28, A β 29–40, and A β 25–35 were from Biosource (Camarillo, CA). For aggregation experiments, A β 1–40 was dissolved in 100% 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) to 2 mg/mL, sonicated in a water bath for 10 min, aliquoted in microcentrifuge tubes, dried under vacuum, and stored at –20 °C. Immediately prior to use, the HFIP-treated A β 1–40 was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to 20 mg/mL and diluted with PBS to the proper concentration.

Epitope Mapping by Surface Plasmon Resonance (SPR). SPR binding studies were performed using a BIAcore X biosensor (BIAcore, Inc., Uppsala, Sweden). A CM5 sensor chip was activated as recommended by the manufacturer using an equimolar mix of NHS (*N*-hydroxysuccinimide) and EDC [*N*-ethyl-*N*-(dimethylaminopropyl)carbodiimide], coupled with 20 μ g/mL of A β 40 in pH 4.8 sodium acetate buffer, and then blocked with ethanolamine. Samples of A β 1–16, A β 17–28, and A β 29–40 were each immobilized onto separate CM5 sensor chips (BIAcore). H1v2, C1, and a control scFv against phosphorylase *b* (anti-plb) were diluted to 0.5 mg/mL in the HBS–EP running buffer [0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% (v/v) surfactant P20, pH 7.4] (BIAcore) and injected over the chips containing immobilized A β 1–16, A β 17–28, or A β 29–40 at a flow rate of 10 μ L/min. Guanidine hydrochloride (6 M) was used as a regeneration buffer. Data collected represent the value

of the observed response units (RU) obtained in the sample cells minus the RU obtained from a reference cell.

Binding Kinetics. Affinity measurements were performed using a BIAcore X biosensor (BIAcore). ScFv samples were prepared by dilution into HBS-EP buffer (BIAcore). The association and dissociation rate constants (k_a and k_d) were determined using different H1v2 concentrations (624, 832, 1248, 1663, 2494, 3325, and 4988 nM) and C1 concentrations (3977, 5170, 6465, 8167, 12931, and 17241 nM) with HBS-EP as a running buffer at a flow rate of 30 μ L/min. Samples of 45 μ L were injected. Dissociation data were collected while flowing running buffer for 120 s. Kinetic parameters were evaluated using BIAevaluation 3.1 software (BIAcore).

Thioflavin T (ThT) Fluorescence Assay. An aliquot of the A β 40 stock solution was diluted to 20 μ M in PBS, pH 7.4, and incubated at 37 $^{\circ}$ C without shaking in a 0.5 mL Eppendorf PCR tube. For initial studies with scFv mixtures, A β 40 was mixed with equimolar concentrations of each of the two different scFv's to a final A β 40 concentration of 20 μ M. Fluorescence emission of ThT is shifted when it binds to β -sheet aggregate structures such as amyloid fibrils (46). A β aggregation was measured by periodically removing 30 μ L aliquots from the incubation samples and adding them to 2 mL of 5 μ M ThT solution (50 mM phosphate buffer, pH 6.5). Fluorescence intensity was monitored at an excitation wavelength of 450 nm and an emission wavelength of 482 nm by a Shimadzu RF-3501PC spectrofluorophotometer using 1 cm light-path quartz cuvettes with both excitation and emission bandwidths of 5 nm. Readings were the results of the average of three values determined by a time scan after subtracting out the fluorescence contribution from free ThT. Each experiment was performed in triplicate. Standard errors were analyzed using Excel software.

Atomic Force Microscope (AFM) Imaging. 1-(3-Aminopropyl)silatrane- (APS-) modified mica was used as an AFM substrate (47, 48). Samples of 5 μ L were placed on APS-modified mica for 2 min, rinsed with deionized water, and dried with argon as described earlier (47, 48). Images were acquired in air using a MultiMode SPM NanoScope III system (Veeco/Digital Instruments, Santa Barbara, CA) operating in tapping mode using silicon probes (Olympus). To determine filament widths, either circular plasmid DNA was codeposited onto samples or circular plasmid DNA samples were imaged using a single tip immediately before and after imaging of protofibril samples. DNA is a convenient standard (2 nm wide filaments) to determine the filament diameter of other samples from AFM data. Width measurements were ascertained from the AFM images using Femtoscan software (Advanced Technologies Center, Moscow, Russia). The diameters of fibrils were retrieved from the AFM width data (W) using a simplified expression for W and the filament radii (R_1 and R_2 , respectively): $W^2 = 16R_1R_2$. This expression was a simplified version of the expression obtained in assuming a spherical shape of the AFM tip (49). Nanoscope software version 5.12 was used to determine the root mean square (rms) values for each of the images.

Cytotoxicity Assay. Human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) were maintained in medium with 40% minimal essential medium (MEM), 40% Ham's modification of F-12, 18% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine (3.6 mM),

and 1% penicillin/streptomycin antibiotics in 5% CO $_2$ at 37 $^{\circ}$ C. Cells were harvested from flasks and plated in 96-well polystyrene plates with approximately 1×10^4 cells per 100 μ L of medium per well. Plates were incubated at 37 $^{\circ}$ C for 24 h to allow cells to attach. A β 40 (20 μ M) alone and with equimolar concentrations of H1v2, C1, or control protein BSA were preincubated for 18 days before addition to cell cultures. A β samples were diluted with fresh medium to a final A β 40 concentration of 100 nM in the cell culture well. The same volume of medium was added to control cultures. Plates were then incubated for an additional 72 h at 37 $^{\circ}$ C. Cell viability was determined using an MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] toxicity assay with addition of 10 μ L of 5 mg/mL MTT to each well (51). After incubation for 3 h at 37 $^{\circ}$ C, the plates were centrifuged, and the medium was aspirated from each well. MTT dissolvent (100 μ L) (0.1 N HCl in 2-propanol) was added to each well. Plates were agitated at room temperature for 15 min to dissolve crystals. The absorbance was measured at 560 nm using a Victor Wallac multiwell assay plate reader (Gaithersburg, MD). Averages from six replicate wells were used for each sample and control, and each experiment was repeated three times. Cell viability was calculated by dividing the absorbance of wells containing samples (corrected for background) by the absorbance of wells containing medium alone (corrected for background).

RESULTS

Phage Selection Using the ScFv Library. Screening of scFv phage libraries was performed using A β 1-28 or A β 1-40. Titer units of the eluted phage generally show an increase from approximately 10^4 – 10^5 after the first round to 10^7 after the fourth round of panning. Phage eluted from the fourth round were used to infect *E. coli* TG1. The strongest binding clone against A β 40 (C1) as indicated by ELISA was used for further studies. H1v2 was selected on the basis of ELISA as the strongest binding clone generated after one round of affinity maturation of the parent H1.

Epitope Mapping. Both purified scFv's showed a single predominant 29 kDa band by SDS-PAGE (Figure 1A). To determine to which epitope of A β each of the scFv binds, we separately fixed A β 1-16, A β 17-28, and A β 29-40 to CM5 chips and then measured the association of the two different scFv samples to each of the peptides. The association curves clearly indicate that H1v2 binds A β 17-28 (Figure 1C) and C1 binds A β 29-40 (Figure 1D), while none of the scFv's bound to A β 1-16 (Figure 1B).

Binding Kinetics of scFv to Monomer A β 1-40. The association (k_a) and dissociation (k_d) rate constants and the dissociation constants ($K_D = k_d/k_a$) of H1v2 (Figure 2A) and C1 (Figure 2B) for A β 40 were determined (Table 1). The higher affinity of H1v2 [$K_D = (2.47 \pm 0.122) \times 10^{-7}$ M] compared to C1 [$K_D = (1.63 \pm 0.74) \times 10^{-6}$ M] is primarily due to differences in the association rate constant, k_a , rather than in the dissociation rate constant, k_d .

ScFv Inhibition of A β 1-40 Aggregation. We investigated the extent to which the scFv's could inhibit aggregation of A β using a ThT assay to monitor the A β aggregation rate and AFM analysis to follow A β aggregate morphology. ThT is a fluorescent dye that specifically binds to fibrillar structures (46). Incubation of A β 1-40 alone shows a time-

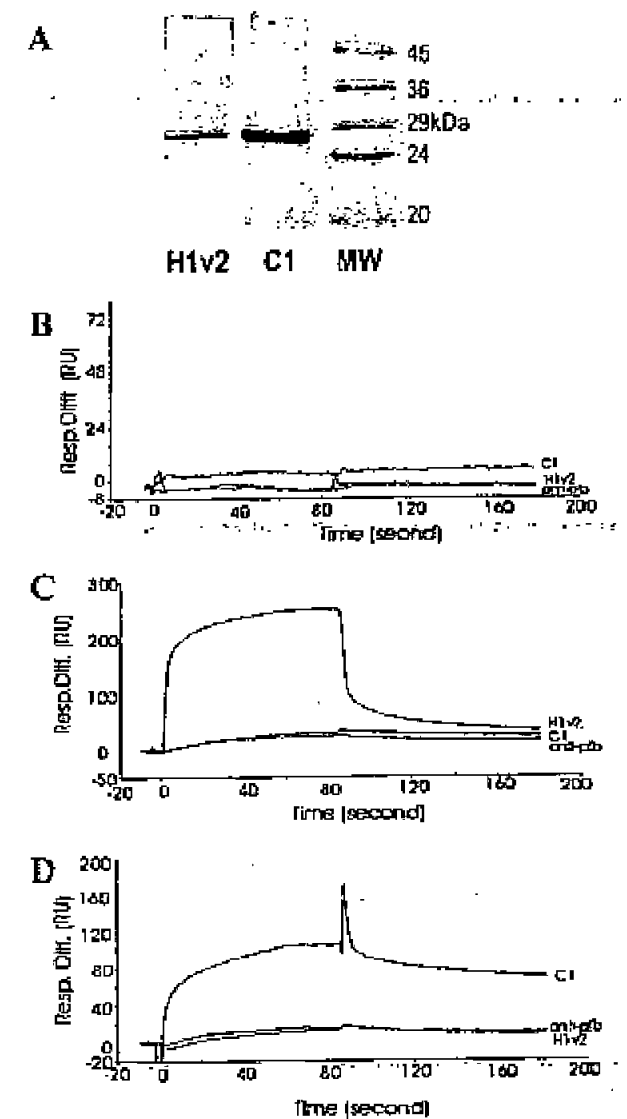


Figure 1: SDS-PAGE analysis of purified recombinant scFv antibody and epitope mapping by SPR for scFv. (A) SDS-PAGE analysis of purified recombinant scFv antibody. (B–D) Epitope mapping by SPR. Aβ1–16 (B), Aβ17–28 (C), and Aβ29–40 (D) were coupled to CM5 chips, respectively. H1v2, C1, and anti-plb scFv were passed over the surfaces of ligands at 10 μ L/min in HBS-EP running buffer. Data were collected from response units (RU) obtained in the sample cell minus RU from the reference cell.

dependent increase in fluorescence with a characteristic lag time as the Aβ40 begins to aggregate (Figure 3). Co-incubation of Aβ with equimolar concentrations of each of the two scFv's showed differential effects on aggregation, H1v2 inhibiting aggregation, while C1 had little effect on aggregation (Figure 3). Co-incubation of 20 μ M Aβ40 with equimolar concentrations of either a nonspecific control scFv or a nonspecific control protein (phosphorylase *b*) resulted in rapid precipitation of the protein mixtures, precluding determination of aggregation kinetics for these control samples by ThT staining (data not shown) or by AFM.

AFM images were also used to examine morphological differences in the Aβ samples. After incubation for 30 days, the sample containing 20 μ M Aβ40 alone formed oligomers

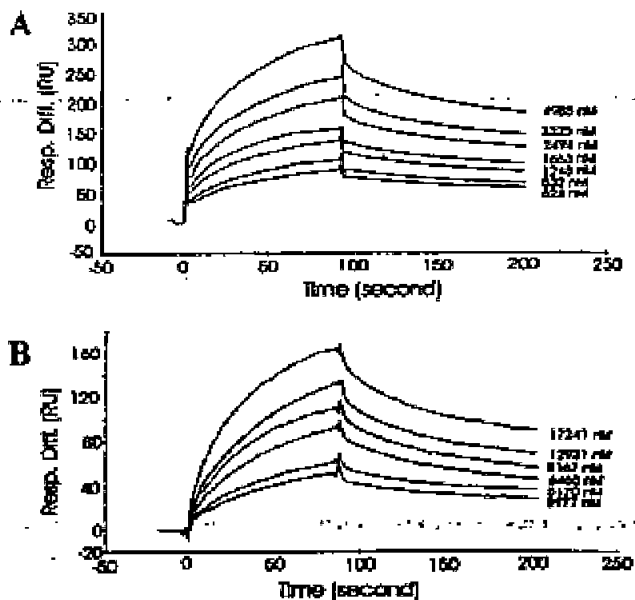


Figure 2: Binding kinetics of scFv to Aβ peptide. Binding of scFv to Aβ40 was determined by surface plasmon resonance using a BIAcore X biosensor. Each scFv was passed over a CM5 sensor chip to which Aβ40 had been coupled at a flow rate of 30 μ L/min at the following concentrations: H1v2 (4988, 3325, 2494, 1663, 1248, 832, 624 nM) (A); C1 (17241, 12931, 8167, 6465, 5170, 3977 nM) (B). The association and dissociation constants for the scFv were calculated by fitting the data to a single binding model.

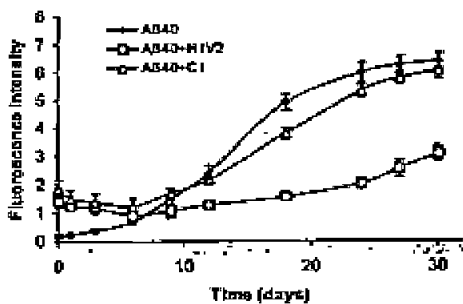


Figure 3: Effects of scFv on aggregation of Aβ40. The kinetics of Aβ1–40 (20 μ M) fibril formation was monitored by ThT fluorescence in the absence and presence of equimolar concentrations (20 μ M) of H1v2 and C1, respectively. The samples were incubated at 37 $^{\circ}$ C, and 30 μ L of the samples was removed periodically and added to 2 mL of 5 μ M ThT. Fluorescence intensity was measured at an excitation wavelength of 450 nm and emission wavelength of 482 nm. Readings were the results of the average of three values determined by a time scan after subtracting out the fluorescence contribution from free ThT. Each experiment was performed in triplicate.

	affinities		
	$k_a (\times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$k_d (\times 10^{-3} \text{ s}^{-1})$	$K_D (\times 10^{-6} \text{ M})$
H1v2	10.1 ± 4.61	2.15 ± 0.138	0.247 ± 0.122
C1	2.15 ± 1.08	3.51 ± 0.63	1.63 ± 0.74

and many thin protofibrils (Figure 4A), in agreement with numerous other studies; however, we did not detect the presence of significant amounts of fibrils, likely because of the lower concentrations and higher temperatures used here (52–57). When Aβ was co-incubated with either of the two

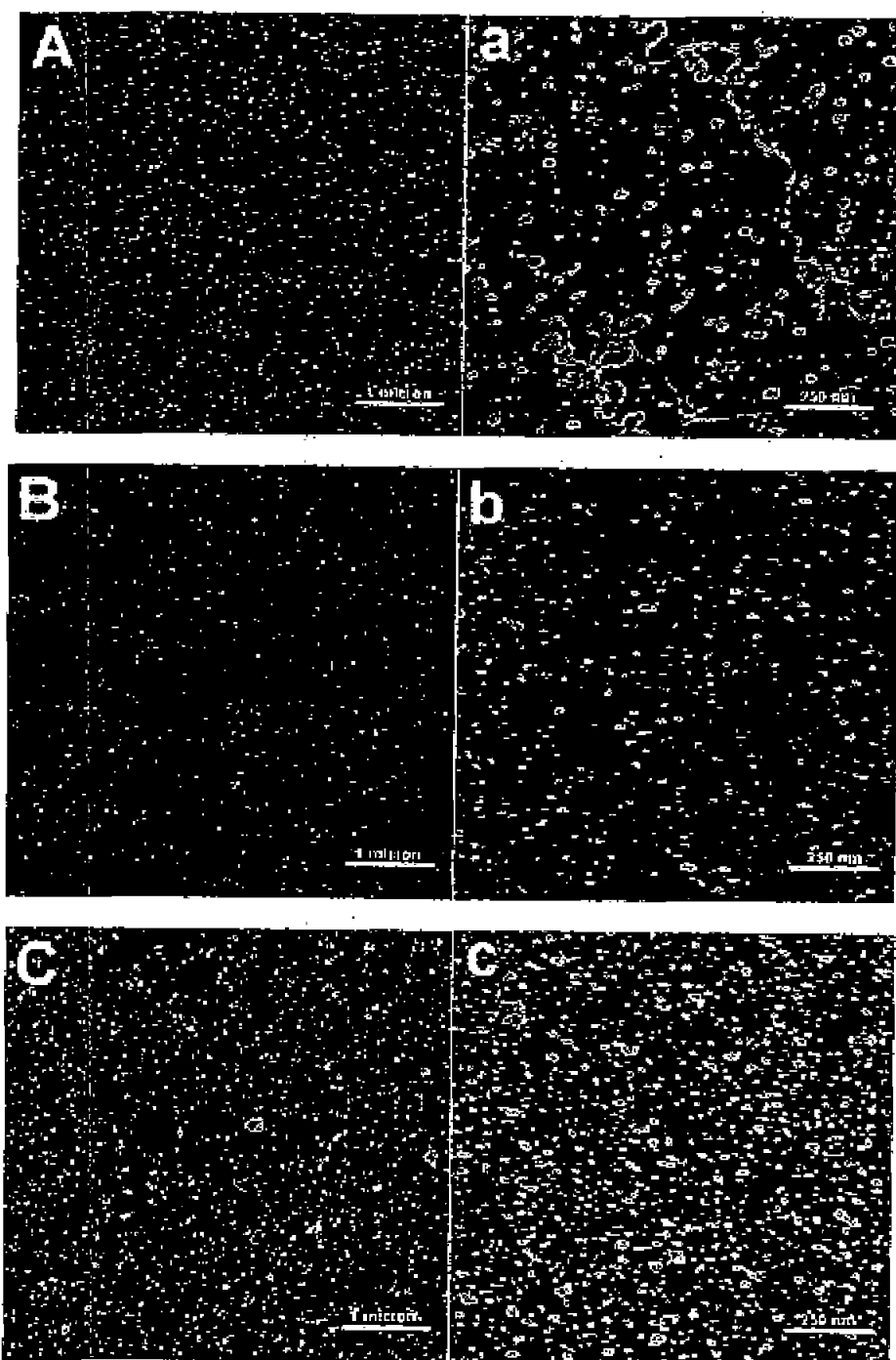


FIGURE 4: AFM images of A β 1–40 aggregation alone and with added scFv. AFM analysis of A β 40 incubated alone (A, a), with H1v2 (B, b), or with C1 (C, c) for 30 days at 37 °C. (A–C) Scale bars = 1 μ m. (a–c) Scale bars = 250 nm. Z-scale: 100 nm.

scFv's, we could not find evidence of any filaments after 30 days (Figure 4B,C). The aggregates formed in the A β 40 sample co-incubated with C1 were much larger than those formed in the A β 40 sample co-incubated with H1v2 (Table 2). Even though the total protein concentration in the A β /scFv mixtures was twice as high as that of A β 40, the total aggregate formation in the A β 40/scFv mixtures was less than that formed by A β 40 alone, confirming that binding of H1v2 to A β inhibits aggregation of both A β 40 and Hiv2.

Cytotoxicity of A β incubated with or without scFv. Cytotoxicity toward SH-SY5Y cells was measured using samples of A β 40 alone (20 μ M) and equimolar mixtures of A β 40 with each of the two scFv's after preincubation for 18 days at 37 °C to allow aggregates to form. The samples were diluted to a final A β 40 concentration of 100 μ M and incubated with SH-SY5Y cells for 72 h. The A β only aggregated sample showed around a 30% decrease in MTT activity compared to control cells, while the sample co-

Table 2: Height Distribution Analysis (in %) of Aggregates Obtained by AFM Images of Samples of 20 μ M A β 40 Alone and with Equimolar scFv after Incubation for 30 Days at 37 $^{\circ}$ C

	molecule height (nm)					
	<0.5	0.5–1.5	1.5–2.5	2.5–3.5	3.5–4.5	4.5–5.5
A β 40 alone	97.9	0.9	0.4	0.2	0.1	0.1
A β 40 with H1v2	82.2	14.7	2.0	0.6	0.2	0.1
A β 40 with C1	58.7	20.0	12.0	5.3	1.4	0.6

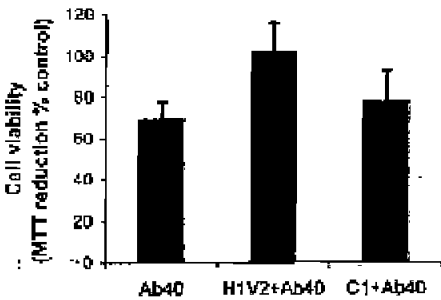


FIGURE 5. Comparison of toxicity of A β 40 and A β 40 co-incubated with H1v2 or C1. 20 μ M A β 40 with or without the same concentration of H1v2 or C1 was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 18 days. 10 μ L of the samples was added to plates with the final concentration of all samples being 100 nM. The absorbance of dissolved crystals was measured at 560 nm. Data shown are expressed as the percentage of control values from three independent experiments with each experimental value being the average of six trials.

incubated with H1v2 showed no reduction in MTT activity and the sample co-incubated with C1 showed a much smaller increase (~10%) in MTT activity compared to A β alone (Figure 5). These results indicate that the H1v2 scFv can provide protection from A β -induced toxicity while C1 can provide partial protection.

DISCUSSION

A number of different immunization strategies for clearing A β in the brains of AD patients have been proposed or studied (34) including active A β immunization by either A β peptide interval injection (16, 20, 21, 58, 59) or nasal administration with A β peptide or phage peptide (12, 40, 60) and passive immunization with monoclonal or polyclonal antibodies by intravenous or intracerebroventricular peritoneal injection (13, 23–25, 37, 39, 61). In general, administration of A β antibodies has decreased cerebral amyloid burden and A β levels and has also attenuated plaque deposition, neuritic dystrophy, astrogliosis, behavior deficits, and memory loss. However, immunization risks potentially serious side effects as evidenced by the clinical signs and symptoms of meningoencephalitis exhibited by a significant number of AD patients who received active immunization treatments (34, 62). In addition, post-mortem examinations after sustained systemic immunization in animal models of vascular amyloid showed perimicrovascular hemorrhages and inflammation (36–38), likely due to an autoimmune inflammatory response. Inflammatory reactions and cell lysis may be triggered by T-lymphocyte activation after active immunization (63, 64). In addition, anti-A β antibodies may bind epitopes on CNS neurons that can also induce autoimmune reactions (65). Finally, microglia activation and phagocytosis of insoluble aggregates may also result in inflammatory responses (66). Single chain variable domain antibody

fragments (scFv's) do not include the Fc portion of the antibody, and therefore these antibody fragments cannot initiate the complement cascade and limit the inflammatory response upon binding to A β peptide. Passive immunization with scFv's also should not stimulate T-lymphocyte activity, which can lyse cells that overproduce A β and trigger an inflammatory response (67), nor should it activate microglia cells, which could also result in a widespread inflammatory response. Here we demonstrate that scFv's can effectively inhibit A β aggregation and also prevent A β -induced neurotoxicity. The H1v2 scFv to the central section of A β (residues 17–28) inhibited the extent of aggregation of A β 40 as determined by ThT staining (Figure 3), while H1v2 and C1 (binding the C-terminal region of A β) both altered the morphology of the aggregates. Analysis of the images indicate that when A β 40 is incubated by itself for 30 days, it overwhelmingly formed long thin filaments (Figure 4) having diameters less than 0.5 nm (Table 2). However, when A β 40 is co-incubated with H1v2, no filaments are observed, and the roughly spherical aggregates formed were predominantly small with over 80% having diameters less than 0.5 nm and an additional 15% with diameters less than 1.5 nm. When A β 40 is co-incubated with C1, again no filaments are observed; however, the aggregates were substantially larger than observed when A β was incubated with H1v2. These results complement and extend a recent report that indicated that a monoclonal antibody directed against the central domain of A β (amino acid residues 12–28) appeared to completely prevent the formation of fibrils, while an antibody directed against an N-terminal domain of A β (amino acid residues 1–5) merely decreased the rate of fibril formation (68).

Epitope mapping studies have traditionally employed immunoblot, ELISA, and immunoprecipitation assays (69). Here we show that surface plasmon resonance (SPR) based optical biosensors can be a effective method for epitope mapping, the results clearly showing that the H1v2 scFv specifically binds A β 17–28 while the C1 scFv specifically binds A β 29–40. Unlike typical ELISA protocols, SPR does not require a washing step to remove unbound material, and binding is monitored in the presence of unbound substrate, making it possible to characterize low-affinity and transient interactions (70).

Previous studies have indicated that regions 17–20 and 30–35 of A β play critical roles in the aggregation and cytotoxicity of A β (71–77). The results here provide further evidence for the importance of the 17–20 region, showing that H1v2 strongly inhibits aggregation and toxicity of A β . While C1 did not inhibit aggregation, in agreement with previous reports of antibodies to the C-terminal (13), binding in this region can still reduce A β induced toxicity. The majority of antibodies that reduce plaque burden and that have been isolated from patients in the immunization trials are directed toward the N-terminal residues of the peptide that are exposed and not involved in fibril structure (13, 22). However, a monoclonal antibody raised against A β 16–24 exhibits high affinity for soluble A β and decreases brain A β burden in mouse models (23), suggesting that the H1v2 scFv isolated here, which binds a similar epitope, may also be effective in clearing A β .

There is some controversy as to whether antibody-mediated clearance is dependent on the antibody Fc receptor.

While some studies have indicated Fe-dependent phagocytosis by microglial cells and/or macrophages as being important in clearance (16, 22), other reports indicate that a non-Fe-mediated disruption of plaque structure may also contribute to clearance (78, 79). In the latter studies F(ab)₂ fragments prepared from an anti-A β antibody reduced amyloid deposits as effectively as the intact antibody when applied topically to the cortex of transgenic mice through a craniotomy. A more recent report indicated that well-characterized FcR- γ chain knock-out mice (FcR γ ^{-/-}) immunized with A β 42 exhibited a reduction in A β accumulation equivalent to the reduction in deposition seen in A β 42-immunized, age-matched, FcR-sufficient Tg2576 mice, suggesting that anti-A β antibodies can reduce A β deposition independent of FcR-mediated phagocytic events (80). Further evidence for a mechanism other than FcR-mediated clearance of amyloid is provided by a recent study showing that peripheral administration of two A β binding agents, galatolin and GM-1 ganglioside, had a modest effect on A β deposition in transgenic mice (31).

Our results indicate that scFv fragments isolated against A β can inhibit A β aggregation and provide protection against A β -induced toxicity. There is strong precedent that the scFv's isolated here may have potential application for treating AD by decreasing amyloid burdens by themselves. In addition, however, these scFv fragments can be combined with a second scFv fragment to generate bispecific scFv's (81) that contain an scFv to bind A β and inhibit aggregation as shown here and a second scFv to promote clearance of this bound complex from the brain.

ACKNOWLEDGMENT

Cherie Parkhurst is acknowledged for technical assistance.

REFERENCES

- Klein, W. L., Krafft, G. A., and Finch, C. E. (2001) Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?, *Trends Neurosci.* 24, 219–224.
- Koo, E. H., Lansbury, P. T., Jr., and Kelly, J. W. (1999) Amyloid diseases: abnormal protein aggregation in neurodegeneration, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 9989–9990.
- Selkoe, D. J. (1999) Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease, *Nature* 399, A23–A31.
- Caughey, B., and Lansbury, P. T., Jr. (2003) Protofibrils, Pores, Fibrils, and Neurodegeneration: Separating the Responsible Protein Aggregates from the Innocent Bystanders, *Annu. Rev. Neurosci.*
- Walsh, D. M., Hartley, D. M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Selkoe, D. J., and Teplow, D. B. (1999) Amyloid beta-protein fibrillogenesis: Structure and biological activity of protofibrillar intermediates, *J. Biol. Chem.* 274, 25945–25952.
- Lashuel, H. A., Hartley, D., Petre, B. M., Walz, T., and Lansbury, P. T., Jr. (2002) Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations, *Nature* 418, 291.
- Nilsberth, C., Westlund-Danielsson, A., Eckman, C. B., Condron, M. M., Axelman, K., Forsell, C., Steinh, C., Luthman, J., Teplow, D. B., Younkin, S. G., Naslund, J., and Lannfelt, L. (2001) The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation, *Nat. Neurosci.* 4, 887–893.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., and Glabe, C. G. (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis, *Science* 300, 486–489.
- Eriksen, J. L., Sagt, S. A., Smith, T. E., Weggen, S., Das, P., McLendon, D. C., Ozols, V. V., Jessing, K. W., Zavitz, K. H., Koo, E. H., and Golde, T. E. (2003) NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target gamma-secretase and lower Abeta 42 in vivo, *J. Clin. Invest.* 112, 440–449.
- Esler, W. P., and Wolfe, M. S. (2001) A portrait of Alzheimer secretases—new features and familiar faces, *Science* 293, 1449–1454.
- Dewachter, I., and Van Leuven, F. (2002) Secretases as targets for the treatment of Alzheimer's disease: the prospects, *Lancet Neurol.* 1, 409–416.
- Lemere, C. A., Spooner, E. T., LaFrancis, J., Malesker, B., Mori, C., Leverone, J. F., Malsuoka, Y., Taylor, J. W., DeMattos, R. B., Holtzman, D. M., Clements, J. D., Selkoe, D. J., and Duff, K. E. (2003) Evidence for peripheral clearance of cerebral Abeta protein following chronic, active Abeta immunization in PSAPP mice, *Neurobiol. Dis.* 14, 10–18.
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R. L., Games, D., Grayda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberburg, I., Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., Welch, B., Seubert, P., Schenk, D., and Yednock, T. (2000) Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease, *Nat. Med.* 6, 916–919.
- LeVine, H. (2002) The challenge of inhibiting Abeta polymerization, *Curr. Med. Chem.* 9, 1121–1133.
- Du, Y., Wei, X., Dodel, R., Sommer, N., Hampel, H., Gao, P., Ma, Z., Zhao, L., Oertel, W. H., and Farlow, M. (2003) Human anti-beta-amyloid antibodies block beta-amyloid fibril formation and prevent beta-amyloid-induced neurotoxicity, *Brain* 126, 1935–1939.
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, P., Shopp, G., Vasquez, N., Vandever, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., and Seubert, P. (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse, *Nature* 400, 173–177.
- Jantzen, P. T., Connor, K. E., DiCarlo, G., Wenk, G. L., Wallace, J. L., Rojiani, A. M., Coppola, D., Morgan, D., and Gordon, M. N. (2002) Microglial activation and beta-amyloid deposit reduction caused by a nitric oxide-releasing nonsteroidal antiinflammatory drug in amyloid precursor protein plus presenilin-1 transgenic mice, *J. Neurosci.* 22, 2246–2254.
- Jick, H., Zornberg, G. L., Jick, S. S., Seshadri, S., and Drachman, D. A. (2000) Statins and the risk of dementia, *Lancet* 356, 1627–1631.
- Solomon, B., Koppel, R., Frankel, D., and Hanan-Aharon, E. (1997) Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site-directed mAb, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 4109–4112.
- Morgan, D., Diamond, D. M., Gottschall, P. E., Ugen, K. E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., Connor, K., Hatcher, J., Hope, C., Gordon, M., and Arendash, G. W. (2000) A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease, *Nature* 408, 982–985.
- Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P. M., Jiang, Y., Schmidt, S. D., Chishti, M. A., Horne, P., Heslin, D., French, J., Mount, H. T., Nixon, R. A., Mercken, M., Bergeron, C., Fraser, P. E., St. George-Hyslop, P., and Westaway, D. (2000) A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease, *Nature* 408, 979–982.
- Bard, F., Barbour, R., Cannon, C., Carretto, R., Fox, M., Games, D., Guido, T., Hoenow, K., Hu, K., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, C., Lee, M., Motter, R., Nguyen, M., Reed, A., Schenk, D., Tang, P., Vasquez, N., Seubert, P., and Yednock, T. (2003) Epitope and isotype specificities of antibodies to beta-amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 2023–2028.
- DeMattos, R. B., Bates, K. R., Cummins, D. J., Dodart, J. C., Paul, S. M., and Holtzman, D. M. (2001) Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 8850–8855.
- Wilcock, D. M., DiCarlo, G., Henderson, D., Jackson, J., Clarke, K., Ugen, K. E., Gordon, M. N., and Morgan, D. (2003) Intracranially administered anti-Abeta antibodies reduce beta-amyloid deposition by mechanisms both independent of and associated with microglial activation, *J. Neurosci.* 23, 3745–3751.

25. Dodart, J. C., Bales, K. R., Gannon, K. S., Greene, S. J., DeMattos, R. B., Mathis, C., DeLong, C. A., Wu, S., Wu, X., Holtzman, D. M., and Paul, S. M. (2002) Immunization reverses memory deficits without reducing brain A β burden in Alzheimer's disease model. *Nat. Neurosci.* 5, 452–457.
26. Kotilinek, L. A., Bacskai, B., Westerman, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L., Hyman, B. T., Younkin, S., and Ashe, K. H. (2002) Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 22, 6331–6335.
27. Hock, C., Konietzko, U., Streffer, J. R., Tracy, J., Signorelli, A., Muller-Tillmanns, B., Lemke, U., Henke, K., Moritz, E., Garcia, E., Wollmer, M. A., Uebachs, D., de Quervain, D. J., Hofmann, M., Muddalena, A., Papassotiropoulos, A., and Nitsch, R. M. (2003) Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron* 38, 547–554.
28. DeMattos, R. B., Bales, K. R., Cummins, D. J., Paul, S. M., and Holtzman, D. M. (2002) Brain to plasma amyloid-beta efflux: a measure of brain amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* 295, 2264–2267.
29. Lee, V. M. (2001) A β immunization: moving A β peptide from brain to blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 8931–8932.
30. Dodel, R., Hampel, H., Deynhoj, C., Lin, S., Gao, F., Schock, S., Jackel, S., Wei, X., Burger, K., Hoff, C., Hemmer, B., Moller, H. J., Farlow, M., Oertel, W. H., Sommer, N., and Du, Y. (2002) Human antibodies against amyloid beta peptide: a potential treatment for Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 52, 253–256.
31. Matsuo, Y., Saito, M., LaFrancis, J., Gaynor, K., Otm, V., Wang, L., Casey, E., Lu, Y., Shiran, C., Lemere, C., and Duff, K. (2003) Novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease by peripheral administration of agents with an affinity to beta-amyloid. *J. Neurosci.* 23, 29–33.
32. Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clements, J., Donaldson, T., Gillespie, P., et al. (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523–527.
33. Brazil, M. L., Chung, H., and Maxfield, F. R. (2000) Effects of incorporation of immunoglobulin G and complement component C1q on uptake and degradation of Alzheimer's disease amyloid fibrils by microglia. *J. Biol. Chem.* 275, 16941–16947.
34. Schenk, D. (2002) Amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 824–828.
35. Imbimbo, B. P. (2002) Toxicity of beta-amyloid vaccination in patients with Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 51, 794.
36. Nicoll, J. A., Wilkinson, D., Holmes, C., Stean, P., Markham, H., and Weller, R. O. (2003) Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat. Med.* 9, 448–452.
37. Pfeifer, M., Boncristiano, S., Bondolfi, L., Stalder, A., Deller, T., Staufenbiel, M., Mathews, P. M., and Jucker, M. (2002) Cerebral hemorrhage after passive anti-A β immunotherapy. *Science* 298, 1379.
38. Fortan, R., Brambilla, E., Sanvito, F., Roccatagliata, L., Olivieri, S., Bergami, A., Pluchino, S., Uccelli, A., Comi, G., and Martino, G. (2003) Vaccination with amyloid-beta peptide induces autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Brain* 126, 285–291.
39. Chauhan, N. B., and Siegel, G. J. (2003) Intracerebroventricular passive immunization with anti-A β antibody in Tg2576. *J. Neurosci. Res.* 74, 142–147.
40. Frenkel, D., Katz, O., and Solomon, B. (2000) Immunization against Alzheimer's beta-amyloid plaques via EPRH phage administration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 11455–11459.
41. Town, T., Tan, J., Sansone, N., Obregon, D., Klein, T., and Mullan, M. (2001) Characterization of murine immunoglobulin G antibodies against human amyloid-beta1–42. *Neurosci. Lett.* 307, 101–104.
42. Nissim, A., Hoogenboom, H. R., Tomlinson, I. M., Flynn, G., Midgley, C., Lane, D., and Winter, G. (1994) Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *EMBO J.* 13, 692–698.
43. Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonner, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D., and Winter, G. (1991) By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* 222, 581–597.
44. Carter, P., Bedouelle, H., and Winter, G. (1985) Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. *Nucleic Acids Res.* 13, 4431–4443.
45. Wu, H., Goud, G. N., and Sierks, M. R. (1998) Artificial antibodies for affinity chromatography of homologous proteins: application to blood clotting proteins. *Biotechnol. Prog.* 14, 496–499.
46. LeVine, H., III (1993) Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* 2, 404–410.
47. Shlyakhtenko, L. S., Milosavljevic, L., Potaman, V. N., Sinden, R. R., and Lyubchenko, Y. L. (2003) Intersegmental interactions in supercoiled DNA: atomic force microscope study. *Ultramicroscopy* 97, 263–270.
48. Shlyakhtenko, L. S., Potaman, V. N., Sinden, R. R., Gail, A. A., and Lyubchenko, Y. L. (2000) Structure and dynamics of three-way DNA junctions: atomic force microscopy studies. *Nucleic Acids Res.* 28, 3472–3477.
49. Bustamante, C., Vesenka, J., Tang, C. L., Rees, W., Guthold, M., and Keller, R. (1992) Circular DNA molecules imaged in air by scanning force microscopy. *Biochemistry* 31, 22–26.
50. Lee, H. C., Yin, P. H., Lu, C. Y., Chi, C. W., and Wei, Y. H. (2000) Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem. J.* 348 (Part 2), 425–432.
51. Shearman, M. S., Hawtin, S. R., and Taylor, V. J. (1995) The intracellular component of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction is specifically inhibited by beta-amyloid peptides. *J. Neurochem.* 65, 218–227.
52. Stine, W. B., Jr., Dahlgren, K. N., Kraft, G. A., and LaDu, M. J. (2003) In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* 278, 11612–11622.
53. Shimizu, T., Fukuda, H., Murayama, S., Izumiya, N., and Shimasawa, T. (2002) Isoaspartate formation at position 23 of amyloid beta peptide enhanced fibril formation and deposited onto senile plaques and vascular amyloids in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 70, 451–461.
54. Gorman, P. M., Yip, C. M., Fraser, P. E., and Chakrabarty, A. (2003) Alternate aggregation pathways of the Alzheimer beta-amyloid peptide: A β association kinetics at endosomal pH. *J. Mol. Biol.* 325, 743–757.
55. Harper, J. D., Wong, S. S., Lieber, C. M., and Lansbury, P. T. (1997) Observation of metastable A β amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem. Biol.* 4, 119–125.
56. Harper, J. D., Wong, S. S., Lieber, C. M., and Lansbury, P. T., Jr. (1999) Assembly of A β amyloid protofibrils: an in vitro model for a possible early event in Alzheimer's disease. *Biochemistry* 38, 8972–8980.
57. Nichols, M. R., Moss, M. A., Reed, D. K., Lin, W. L., Mukhopadhyay, R., Hoh, J. H., and Rosenberry, T. L. (2002) Growth of beta-amyloid(1–40) protofibrils by monomer elongation and lateral association. Characterization of distinct products by light scattering and atomic force microscopy. *Biochemistry* 41, 6115–6127.
58. Lambert, M. P., Viola, K. L., Chromy, B. A., Chang, L., Morgan, T. E., Yu, J., Venton, D. L., Kraft, G. A., Finch, C. E., and Klein, W. L. (2001) Vaccination with soluble A β oligomers generates toxicity-neutralizing antibodies. *J. Neurochem.* 79, 595–605.
59. Spooner, E. T., Desai, R. V., Mori, C., Leverone, J. F., and Lemere, C. A. (2002) The generation and characterization of potentially therapeutic A β antibodies in mice: differences according to strain and immunization protocol. *Vaccine* 21, 290–297.
60. Weiner, H. L., Lemere, C. A., Maron, R., Spooner, E. T., Grenfell, T. J., Mori, C., Issazadeh, S., Hancock, W. W., and Selkoe, D. J. (2000) Nasal administration of amyloid-beta peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 48, 567–579.
61. Mohajeri, M. H., Saini, K., Schultz, J. G., Wollmer, M. A., Hock, C., and Nitsch, R. M. (2002) Passive immunization against beta-amyloid peptide protects central nervous system (CNS) neurons from increased vulnerability associated with an Alzheimer's disease-causing mutation. *J. Biol. Chem.* 277, 33012–33017.
62. Senior, K. (2002) Dosing in phase II trial of Alzheimer's vaccine suspended. *Lancet Neurol.* 1, 3.
63. Gruber, Loeberstein, B., Blasko, I., Marx, F. K., and Trieb, I. (2000) Immunization with beta-amyloid: could T-cell activation have a harmful effect? *Trends Neurosci.* 23, 114.
64. Monsonego, A., Imiola, J., Zota, V., Dida, T., and Weiner, H. L. (2003) Microglia-mediated nitric oxide cytotoxicity of T cells

- following amyloid beta-peptide presentation to Th1 cells, *J. Immunol.* 171, 2216–2224.
65. Rohn, T. T., Ivins, K. J., Bahr, B. A., Cotman, C. W., and Cribbs, D. H. (2000) A monoclonal antibody to amyloid precursor protein induces neuronal apoptosis, *J. Neurochem.* 74, 2331–2342.
 66. Rogers, J., and Shen, Y. (2000) A perspective on inflammation in Alzheimer's disease, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 924, 132–135.
 67. Marx, P., Blasko, I., Zisterer, K., and Grubeck-Lobenstein, B. (1999) Transfected human B cells: a new model to study the functional and immunostimulatory consequences of APP production, *Exp. Gerontol.* 34, 783–795.
 68. Legleiter, J., Czilli, D. L., Gitter, B., DeMattos, R. B., Holtzman, D. M., and Kowalewski, T. (2004) Effect of Different Anti-A β Antibodies on A β Fibrillogenesis as Assessed by Atomic Force Microscopy, *J. Mol. Biol.* 335, 997–1006.
 69. Takeuchi, K., Turley, S. J., Tan, E. M., and Pollard, K. M. (1995) Analysis of the autoantibody response to fibrillarin in human disease and murine models of autoimmunity, *J. Immunol.* 154, 961–971.
 70. Rich, R. L., and Myszka, D. G. (2003) Spying on HIV with SPR, *Trends Microbiol.* 11, 124–133.
 71. Urani, A., Romieu, P., Roman, F. J., and Maurice, T. (2002) Enhanced antidepressant effect of sigma(1) (sigma(1)) receptor agonists in beta(25–35)-amyloid-peptide-treated mice, *Behav. Brain Res.* 134, 239–247.
 72. Pike, C. J., Walencewicz-Wasserman, A. J., Kosmoski, J., Cribbs, D. H., Glabe, C. G., and Cotman, C. W. (1995) Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25–35 region to aggregation and neurotoxicity, *J. Neurochem.* 64, 253–263.
 73. Balbach, J. J., Ishii, Y., Antzutkin, O. N., Leapman, R. D., Rizzo, N. W., Dyda, F., Reed, J., and Tycko, R. (2000) Amyloid fibril formation by A β 16–22, a seven-residue fragment of the Alzheimer's beta-amyloid peptide, and structural characterization by solid-state NMR, *Biochemistry* 39, 13748–13759.
 74. Ma, B., and Nussinov, R. (2002) Stabilities and conformations of Alzheimer's beta-amyloid peptide oligomers (A β 16–22, A β 16–35, and A β 10–35): Sequence effects, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 14126–14131.
 75. Soto, C. (2003) Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases, *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 49–60.
 76. Hiruma, H., Katakura, T., Takahashi, S., Ichikawa, T., and Kawakami, T. (2003) Glutamate and Amyloid (beta)-Protein Rapidly Inhibit Fast Axonal Transport in Cultured Rat Hippocampal Neurons by Different Mechanisms, *J. Neurosci.* 23, 8967–8977.
 77. George, J. M., Jin, H., Woods, W. S., and Clayton, D. F. (1995) Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song training in the zebra finch, *Neuron* 15, 361–372.
 78. Solomon, B. (2001) Immunotherapeutic strategies for prevention and treatment of Alzheimer's disease, *DNA Cell Biol.* 20, 697–703.
 79. Baskai, B. J., Kajdasz, S. T., McLellan, M. E., Games, D., Scubert, P., Schenk, D., and Hyman, B. T. (2002) Non-Fc-mediated mechanisms are involved in clearance of amyloid-beta in vivo by immunotherapy, *J. Neurosci.* 22, 7873–7878.
 80. Das, P., Howard, V., Loosbrock, N., Dickson, D., Murphy, M. P., and Golde, T. E. (2003) Amyloid-beta immunization effectively reduces amyloid deposition in Fc γ RIIa-/- knock-out mice, *J. Neurosci.* 23, 8532–8538.
 81. Hudson, P. J., and Koru, A. A. (1999) High avidity scFv multimers, diabodies and triabodies, *J. Immunol. Methods* 231, 177–189.

BI049933O

Monoclonal antibodies inhibit *in vitro* fibrillar aggregation of the Alzheimer β -amyloid peptide

BEKA SOLOMON*, RELA KOPPEL, EILAT HANAN, AND TAMAR KATZAV

Department of Molecular Microbiology and Biotechnology, George S. Wise Faculty of Life Sciences, Tel-Aviv University, Ramat Aviv 69978, Israel

Communicated by Ephraim Katchalski-Katzir, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel, October 2, 1995 (received for review June 15, 1995)

ABSTRACT The β -amyloid peptide, the hallmark of Alzheimer disease, forms fibrillar toxic aggregates in brain tissue that can be dissolved only by strong denaturing agents. To study β -amyloid formation and its inhibition, we prepared immune complexes with two monoclonal antibodies (mAbs), AMY-33 and 6F/3D, raised against β -amyloid fragments spanning amino acid residues 1–28 and 8–17 of the β -amyloid peptide chain, respectively. *In vitro* aggregation of β -amyloid peptide was induced by incubation for 3 h at 37°C and monitored by ELISA, negative staining electron microscopy, and fluorimetric studies. We found that the mAbs prevent the aggregation of β -amyloid peptide and that the inhibitory effect appears to be related to the localization of the antibody-binding sites and the nature of the aggregating agents. Preparation of mAbs against “aggregating epitopes,” defined as sequences related to the sites where protein aggregation is initiated, may lead to the understanding and prevention of protein aggregation. The results of this study may provide a foundation for using mAbs *in vivo* to prevent the β -amyloid peptide aggregation that is associated with Alzheimer disease.

Experimental evidence that β -amyloid peptide (β A4), the hallmark of Alzheimer disease (1, 2), has opposing neurite-promoting and neurotoxic properties that are related to peptide aggregation forms (3–5) has focused the development of appropriate therapeutic approaches toward reducing or eliminating the extent of amyloid fibrillar deposition in the brain (6–8). Amyloid insolubility has been one of the most insurmountable problems in the initial characterization of the constituent proteins of the isolated plaque cores from brains affected by Alzheimer disease. Strong denaturing conditions, such as high concentrations of urea, guanidine-HCl, or extreme pH, are required to break and dissolve such aggregates (2, 9).

Under physiological conditions, the synthetic β A4 adopts an aggregated form and also shows a change from a neurite-promoting to a neurotoxic effect on hippocampal neurons (3–5, 10). Aggregation of β A4 has been shown to depend on pH, peptide concentration, temperature, and time of incubation (11). The so-called pathological chaperones (12), as well as such metal ions as Zn^{2+} and Al^{3+} (13–15) that have been proposed as “risk factors” for Alzheimer disease, accelerate the β -amyloid cascade aggregation.

The availability of monoclonal antibodies (mAbs) that bind to a specific antigen at distinct, well-defined sites has led to a better understanding of how highly specific antigen-antibody interactions can affect antigen behavior. Like the ubiquitous chaperones (16), mAbs raised against specific native antigens assist in antigen refolding (17–19) by recognizing incompletely folded epitopes and inducing their native conformation. By appropriate selection, mAbs have been isolated that bind to predefined locations on certain protein or peptide molecules without inhibiting their biological activity (20, 21).

In this study, we investigated the ability of mAbs against β A4 to suppress the *in vitro* aggregation of β A4 via immunocomplexation. We used a sandwich ELISA method and fluorescence monitoring, as well as electron microscope studies, to characterize the effect of two different mAbs on β -amyloid formation.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies. Rabbit polyclonal antibodies raised against synthetic β A4-(1–40) were obtained from Boehringer Mannheim. Aggregation of β A4-(1–40)-peptide was monitored by using two commercially available mAbs raised against the respective peptides 8–17 and 1–28 of β A4 anti-human β -amyloid mAb 6F/3D (Accurate Chemicals) and mAb AMY-33 (Zymed).

β A4 Aggregation and Immunocomplexation. Synthetic β A4-(1–40) was obtained from Sigma. For *in vitro* induced aggregation, the reaction mixture tubes containing 200 μ l of an aqueous solution of β A4 (2.5×10^{-3} mM), heparan sulfate (50 nM), and/or chloride metal solutions (10^{-3} M at pH 6.5) or β A4 by itself were incubated for 3 h at 37°C. Aggregated β -amyloid samples were removed by centrifugation for 15 min at $15,000 \times g$. To determine the soluble β A4 the supernatants were then incubated for another 60 min with an excess of mAb AMY-33 and/or 6F/3D (as determined from the following set of experiments) to produce immunocomplexed β A4. In another set of experiments, mAb at equimolar antibody/antigen concentrations were added to the reaction mixtures before the first incubation period of 3 h at 37°C. The amount of β A4 left in solution under the various conditions employed can be determined from both sets of experiments.

β A4 aggregation was followed by three approaches:

(i) **ELISA.** The ELISA coating procedure, with Eupergit-C-containing epoxy groups (Rohm, Germany), using beads or paper as the solid phase, has been described (22, 23). In the present study, rabbit anti- β -amyloid-(1–40) antibody (100 ng/well) was covalently attached to epoxy-coated Microtiter plates for 16 h at 4°C. After the plates were washed with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.005% Tween 20, the residual epoxy groups were blocked by adding 1% fat low-fat milk. Before use, the plate was thrice washed with PBS/Tween 20 and then dried. The soluble immunocomplex of anti- β -amyloid/ β A4 obtained as described above was added to the plates for 1 h at 37°C, and bound mAb was measured by excess of horseradish peroxidase-labeled goat-anti-mouse antibody (Bio-Rad). Degradation of the *O*-phenylenediamine substrate by HRP was monitored at A_{495} according to manufacturer's instructions by using an ELISA reader. The amount of mAb bound was assumed to be proportional to the amount of soluble amyloid peptide that remains in the reaction tube after incubation at the various aggregation conditions specified. The data represent the mean of three replicates. The standard deviations of the intraassay and interassays were >5% in all cases.

Abbreviations: mAb, monoclonal antibody; β A4, β -amyloid peptide.
*To whom reprint requests should be addressed.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

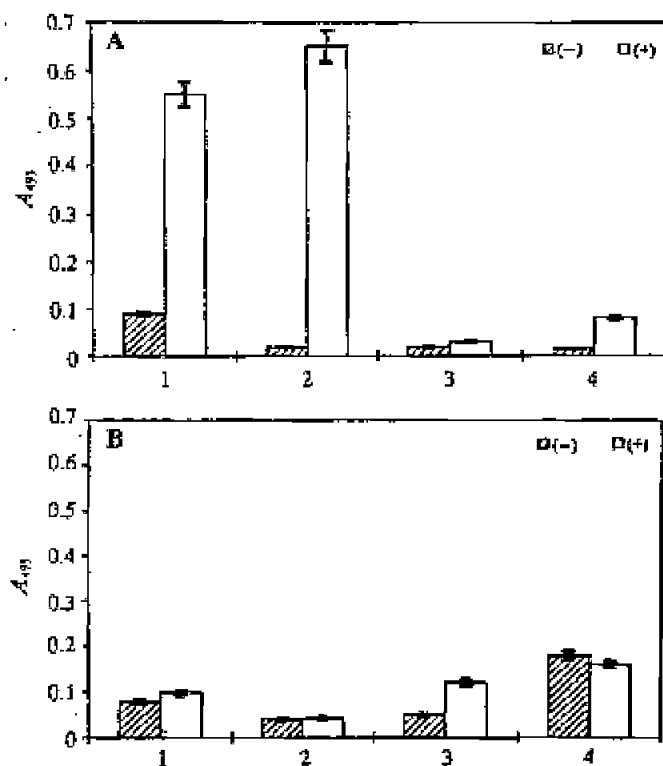


FIG. 1. Relative amounts of residual soluble BA4 (1-40) in the absence (-) or in the presence (+) of mAb AMY-33 (A) or 6F/3D (B), as measured by ELISA (as described in *Materials and Methods*). 1, BA4; 2, BA4 plus 50 nM heparan sulfate; 3, BA4 plus 10^{-3} M $AlCl_3$; 4, BA4 plus 10^{-3} M $ZnCl_2$.

(ii) **Electron microscopy.** Negatively stained amyloid fibrils were prepared by floating carbon-coated grids on aqueous

peptide solutions (1-2 mg/ml) and air drying. Fibrils of β -amyloid, either alone or immunocomplexed to mAb AMY-33 (molar ratio of 4:1) for 3 h at 37°C, were negatively stained with aqueous (2% wt/vol) uranyl acetate and then visualized by using a JEOL model 1200 EX electron microscope operated at 80 kV with a magnification of 25,000.

(iii) **Fluorometry.** Fluorometric analysis of soluble β -amyloid peptide and the immunocomplex with AMY 33 (molar ratio of 4:1) stained with thioflavin T (Sigma) was performed by a standard method (24). Fluorescence was measured using a Perkin-Elmer model LS-50 fluorimeter at an excitation wavelength of 450 nm and an emission wavelength of 482 nm. The aggregation reaction was followed for 7 days at 37°C.

RESULTS

Effect of Immunocomplexation on the *in Vitro* Aggregation of BA4. mAbs were added to the reaction mixture before or after the incubation of synthetic BA4 under experimental aggregation conditions in the presence of heparan sulfate and/or such metal ions as Zn^{2+} and Al^{3+} at recommended concentrations (13-15, 25), as described in *Materials and Methods*. The results shown in Fig. 1A indicate that mAb AMY-33, which recognizes an epitope spanning amino acid residues 1-28 of BA4, inhibited the aggregation of peptide in the presence or absence of heparan sulfate. No inhibitory effect on metal-induced amyloid aggregation was seen under the same experimental conditions. The mAb 6F/3D, which recognizes an epitope located between residues 8 and 17 of BA4, slightly interfered with Zn^{2+} -induced aggregation but had no effect on the self-aggregation induced by other aggregation-inducing agents (Fig. 1B).

mAb-Induced Conversion of β -Amyloid from Fibrillar to Nonfibrillar Conformation. Electron microscopy of negatively stained β -amyloid and its immunocomplex with mAb AMY-33 (Fig. 2) revealed that even at a low peptide to antibody ratio,

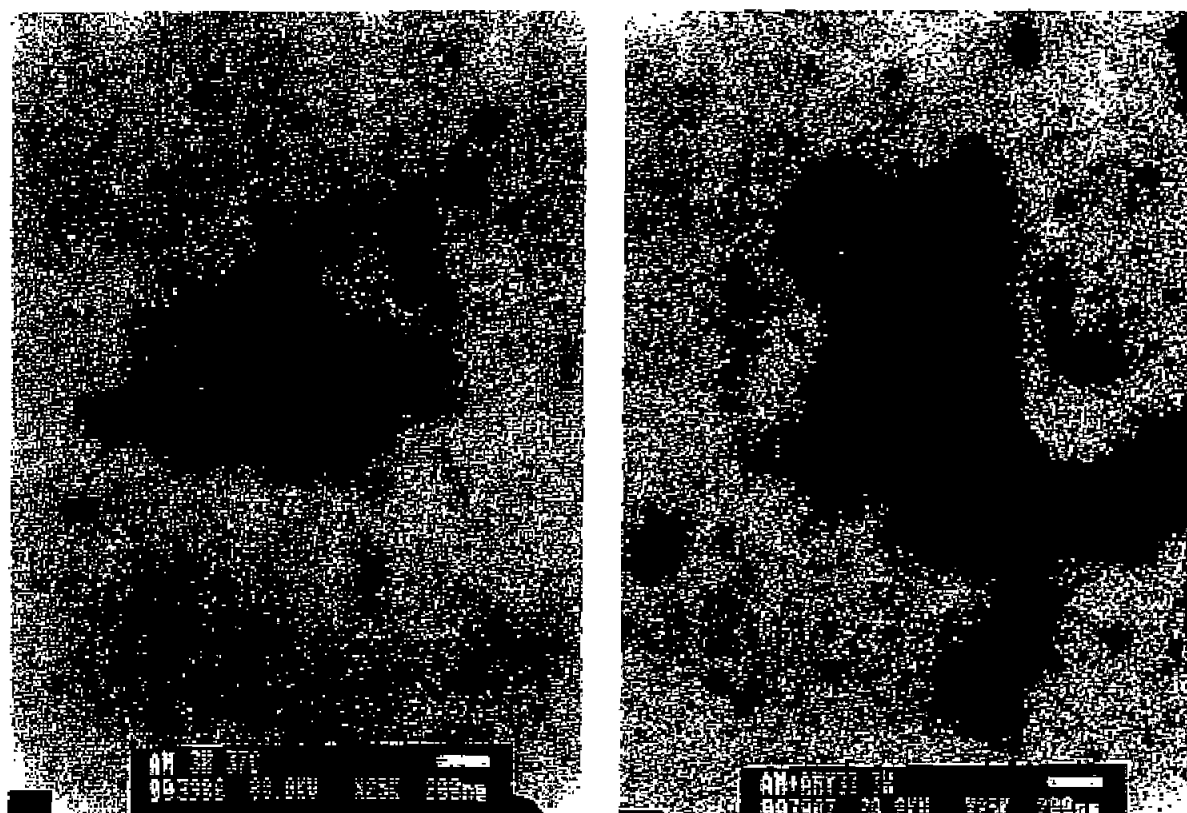


FIG. 2. Electron micrographs of β -amyloid aggregates in the absence (Left) or presence (Right) of mAb AMY-33. (Bars = 0.2 μ m.)

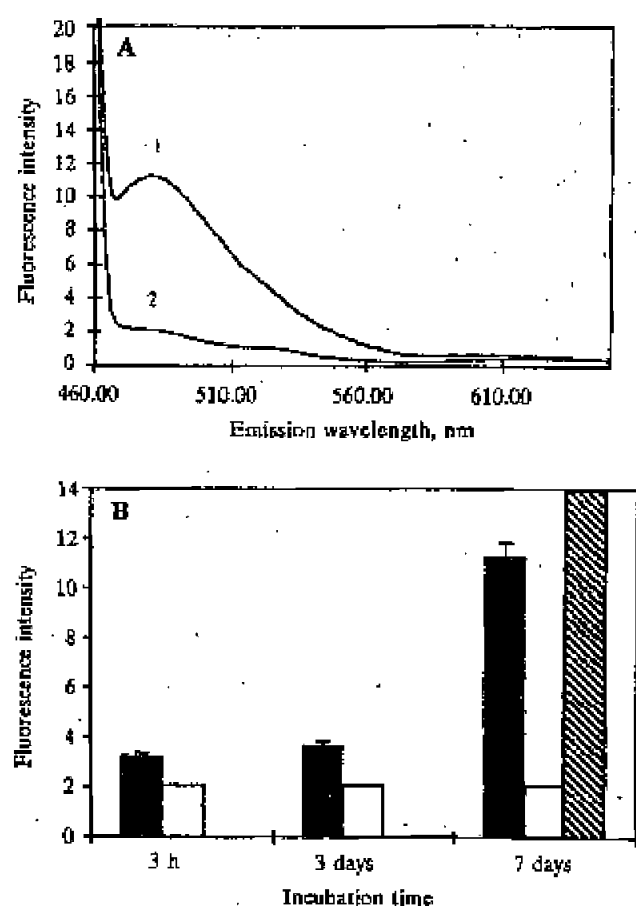


FIG. 3. Thioflavin T-based fluorometric assay of β -amyloid fibril formation. (A) Emission spectra of thioflavin T bound to fibrillar β A4 alone (curve 1), or in the presence of the immunocomplex of β A4 with antibody AMY-33 (curve 2). (B) Increase in thioflavin T fluorescence bound to β A4 (■) as a function of incubation time of the peptide measured after 3 h, 3 days, and 7 days. Immunocomplexation with mAb AMY-33 prevents the increase in thioflavin T fluorescence (□), while unrelated antibody did not interfere with its fluorescence (▨).

fibrillar β -amyloid was converted to an amorphous state. Thioflavin T, a suitable probe for detecting the fibrillar aggregation of β A4, confirmed the electron microscopy results. Dilution of the peptide directly from water into dye-containing buffer had no effect on dye fluorescence. In the presence of aggregated β A4(1–40), however, a change occurred in the excitation spectrum of thioflavin T, manifested as a new peak at 450 nm that was not seen with the free dye (see Fig. 3A for a representative emission spectrum). Aggregated β A4 enhances the fluorescence emission of thioflavin T at 482 nm as a function of incubation time. Adding mAb AMY-33 (at a ratio of 4:1) to the β A4(1–40) solution before exposure to 37°C prevented the increase in fluorescence at 482 nm, whereas the addition of unrelated antibody did not interfere with the fluorescence peaks (Fig. 3B).

DISCUSSION

In suppressing β -amyloid aggregation, mAbs AMY-33 and 6F/3D, which recognize different epitopes of the β A4 chain, exhibited a selective chaperone-like activity. The immunocomplex of mAb AMY-33 and β A4 not only prevented self-aggregation of β A4 but also the aggregation that was induced in the presence of heparan sulfate, which is thought to affect only the aggregation of preexisting amyloid fibers (26). The inhibitory effect was related to the localization of the antibody-binding sites and to the nature of the aggregating agents. The

results of negative-staining electron microscopy revealed that even at low concentrations of mAb AMY-33 only amorphous aggregates are formed. The ELISA measurements indicated that increasing the concentration of mAb AMY-33 to equimolar antigen/antibody ratios maintained β A4 solubility. The diffuse and amorphous conglomerates of β A4 deposits that were not detectable by thioflavin T fluorometry or Congo red staining are not supposed to be associated with neuritic pathology (24).

The mAb AMY-33 did not exhibit a similar inhibitory effect on metal-induced amyloid aggregation. The slight interference with Zn^{2+} -induced β A4 aggregation that occurred using mAb 6F/3D may be due to the partial solvation effect of already aggregated β A4. Aluminum-induced aggregation of β A4 is distinguished from that induced by zinc in terms of its role, extent, pH, and temperature dependence (13). Although the precise site of metal-ion interaction with β A4 has not yet been determined, several residues in the β A4 chain are candidates for metal binding. The β A4 residues His¹³ and His¹⁴ may be implicated in fibril formation, and, conceivably, His¹⁴ might remain available for intermolecular electrostatic interactions between antiparallel chains (25). The site defined by Val¹²-His¹³-His¹⁴-Glu¹⁵-Lys¹⁶-Leu¹⁷ is thought to provide the cationic binding sites that are exposed on the same face of the peptide β -sheet (25).

Because β A4 has been shown to be physiologically produced in a soluble form in normal individuals (27, 28), the aggregation of soluble β A4 into insoluble amyloid fibrils is believed to be a crucial step in the pathogenesis of Alzheimer disease. Therefore, to reduce or eliminate the extent of pathological protein depositions in the brain, much effort has been focused on developing potent and selective inhibitors of β -amyloid aggregation (6–8). Preparing mAbs against “aggregating epitopes,” identified as sequences related to the sites where protein aggregation is initiated, may provide a tool for preventing the phenomenon of protein aggregation. In previous studies, we showed that appropriate mAbs interact at strategic protein-folding-initiation sites, leading to a considerable refolding effect of the already clustered epitopes (19).

The ability of mAbs and their respective genetically engineered antibody fragments to suppress *in vivo* aggregation of β A4 in cultured PC-12 neural cells is under investigation.

Recent advances in antibody engineering have enabled not only the manipulation of antibody genes but also the reshaping and designing of antibody molecules for intracellular expression (29, 30). The observation that active antibodies can be targeted to specific subcellular compartments by linkage to the appropriate signal sequences raises the additional possibility that single-chain antibodies can find targets inside the cell, providing a different class of active molecules for gene therapy. Recent success in producing conophilic amyloid deposits in rat brains (31) and the murine Alzheimer model system (32) provide the rationale to study the effects of such antibodies against β -amyloid in brain tissue. These models can provide the foundation for potential therapeutic approaches targeted at the fibrillar β -amyloid accumulation in Alzheimer disease.

We thank I. Ofir for electron microscopy pictures, and F. Margolin and Dr. V. Buchner for editing and styling the paper.

1. Selkoe, D. J. (1991) *Neuron* 6, 487–498.
2. Fraser, P. E., Levesque, L., & McLachlan, D. R. (1993) *Clin. Biochem.* 26, 339–349.
3. Pike, C. J., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G., & Cotman, C. W. (1991) *Brain Res.* 563, 311–314.
4. Koo, E. H., Park, L., & Selkoe, D. J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4748–4752.
5. Pike, C. J., Walencewicz, A. J., & Glabe, C. G. (1991) *Eur. J. Pharmacol.* 207, 367–368.

6. Snyder, S. W., Lador, U. S., Wade, W. S., Wang, G. T., Barret, L. W., Matayoshi, E. D., Huffaker, H. J., Krafft, G. A. & Holzman, T. F. (1994) *Biophys. J.* 67, 1216-1229.
7. Tomiyama, T., Asano, S., Suwa, Y., Morita, T., Kataoka, K., Mori, H. & Endo, N. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 76-83.
8. Schwarzman, A. L., Gregori, L., Vitek, M. P., Lyubski, S., Strittmatter, W. J., Enghilde, J. J., Bhasin, R., Silverman, J., Weisgraber, K. H., Coyle, P. K., Zagorski, M. G., Talafous, J., Eisenberg, M., Saunders, A. M., Roses, A. D. & Goldgaber, D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8368-8372.
9. Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L. & Beyreuther, K. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4245-4249.
10. Pike, C. J., Burdick, D., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G. & Cotman, C. W. (1993) *J. Neurosci.* 13, 1676-1687.
11. Burdick, D., Soreghan, B., Kwon, M., Kosmoski, J., Knauer, M., Hensch, A., Yates, J., Cotman, C. & Glabe, C. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 546-554.
12. Wisniewski, T., Golabek, A., Matsubara, E., Ghiso, J. & Frangione, B. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 359-365.
13. Maniych, P. W., Ghilardi, J. R., Rogers, S., DeMaster, E., Allen, C. J., Stimson, E. R. & Maggio, J. E. (1993) *J. Neurochem.* 61, 1171-1173.
14. Frederickson, C. J. (1989) *Int. Rev. Neurobiol.* 31, 145-238.
15. McLachlan, D. R. C., Dalton, A. J., Kruck, T. P. A., Bell, M. Y., Smith, W. L., Kalow, W. & Andrews, D. F. (1991) *Lancet* 337, 1304-1308.
16. Elms, R. J. & van der Vies, S. M. (1991) *Annu. Rev. Biochem.* 60, 321-349.
17. Blond, S. & Goldberg, M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1147-1151.
18. Carlson, J. D. & Yarmush, M. L. (1992) *Bio/Technology* 10, 86-91.
19. Solomon, B. & Schwartz, F. (1995) *J. Mol. Recog.* 8, 72-76.
20. Solomon, B., Moav, N., Pines, G. & Katchalski-Katzir, E. (1984) *Mol. Immunol.* 21, 1-11.
21. Solomon, B., Koppel, R., Kenett, D. & Fleminger, G. (1989) *Biochemistry* 28, 1235-1241.
22. Solomon, B., Fleminger, G., Schwartz, F., Doolman, R. & Sela, B.-A. (1992) *Diabetes Care* 15, 1451-1454.
23. Solomon, B., Schmitt, S., Schwartz, F., Levi, A. & Fleminger, G. (1993) *J. Immunol. Methods* 157, 209-215.
24. LeVine, H., III (1993) *Protein Sci.* 2, 404-410.
25. Fraser, P. E., Nguyen, J. T., Chin, D. T. & Kirschner, D. A. (1992) *J. Neurochem.* 59, 1531-1540.
26. Talafous, J., Marciniowski, K. J., Klopman, G. & Zagorski, M. G. (1994) *Biochemistry* 33, 7788-7796.
27. Scubert, P., Vigo-Pellrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindelhurst, C., McCormack, R., Wolfert, R., Selkoe, D., Lieberburg, I. & Schenk, D. (1992) *Nature (London)* 359, 325-327.
28. Shoji, M., Golde, T. E., Ghiso, J. U., Cheung, T. T., Estus, S., Shaffer, L. M., Cai, X.-D., McKay, D. M., Tintner, R., Frangione, B. & Youn, S. G. (1992) *Science* 258, 126-129.
29. Travis, J. (1993) *Science* 261, 1114.
30. Morasco, W. A., Haseltine, W. A. & Chen, S. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7889-7893.
31. Snow, A. D., Sekiguchi, R., Nohtin, D., Fraser, P., Kimata, K., Mizutani, A., Arai, M., Schreier, W. A. & Morgan, D. G. (1994) *Neuron* 12, 219-234.
32. Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., et al. (1995) *Nature (London)* 373, 523-527.

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
26 August 2004 (26.08.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/071408 A2

(51) International Patent Classification²: A61K
(21) International Application Number:
PCT/US2004/002004

GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR, UA, AM (BE, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(22) International Filing Date: 6 February 2004 (06.02.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/446,380 10 February 2003 (10.02.2003) US

(71) Applicant (for all designated States except US): AP-
PLIED MOLECULAR EVOLUTION, INC. [US/US];
3520 Dunhill Street, San Diego, CA 92121 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DAVIES, Julian
[GB/US]; 10382 Water Ridge Circle, Unit 346 San Diego,
CA 92121 (US). TANG, Ying [CNA/US]; 7179 Park Village
Road, San Diego, CA 92129 (US). WATKINS, Jeffrey,
Dean [US/US]; 3442 Fortuna Ranch Road, Encinitas, CA
92024 (US).

(74) Agents: LAGRANDEUR, Thomas, E. et al.; Eli Lilly
and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, IN 46206-6288
(US)

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Euro-
pean (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,

Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted
a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM,
PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW. ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG)

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted
a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM,
PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW. ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (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

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: A β BINDING MOLECULES

(57) Abstract: The present invention encompasses isolated antibodies, or fragments thereof, that are humanized variants of murine antibody 266 which employ complementarity determining regions derived from murine antibody 266. The variant antibodies are useful for treatment or prevention of conditions and diseases associated with A β , including Alzheimer's disease, Down's syndrome, cerebral amyloid angiopathy, mild cognitive impairment, and the like.

WO 2004/071408 A2



US 20040043418A1

(19) **United States**

(12) **Patent Application Publication**

(10) Pub. No.: **US 2004/0043418 A1**

Holtzman et al.

(43) Pub. Date: **Mar. 4, 2004**

(54) **HUMANIZED ANTIBODIES THAT
SEQUESTER ABETA PEPTIDE**

(22) Filed: **Aug. 21, 2002**

Publication Classification

(76) Inventors: **David M. Holtzman**, St. Louis, MO
(US); **Ronald DeMattos**, Noblesville,
IN (US); **Kelly R. Bales**, Indianapolis,
IN (US); **Steven M. Paul**, Carmel, IN
(US); **Naoya Tsurushita**, Palo Alto, CA
(US); **Maximiliano Vasquez**, Palo Alto,
CA (US)

(51) Int. Cl.⁷ **A61K 39/395; G01N 33/53;**
C07K 16/44
(52) U.S. Cl. **435/7.1, 530/388.15, 424/133.1**

(57) **ABSTRACT**

Correspondence Address:
BRINKS HOFER GILSON & LJONE
P.O. BOX 10395
CHICAGO, IL 60611 (US)

A method to treat conditions characterized by formation of amyloid plaques both prophylactically and therapeutically is described. The method employs humanized antibodies which sequester soluble A β peptide from human biological fluids or which preferably specifically bind an epitope contained within position 13-28 of the amyloid beta peptide A β .

(21) Appl. No.: **10/226,435**

ID M12183; SV 1; linear; genomic DNA; STD; MUS; 1117 bp.
XX
AC M12183;
XX
DT 16-JUL-1988 (Rel. 16, Created)
DT 14-NOV-2006 (Rel. 89, Last updated, Version 9)
XX
DE Mouse immunoglobulin rearranged kappa-chain V-region V105 gene from
DE C.AL20-TEPC-105 myeloma, exons 1 and 2.
XX
KW C-region; immunoglobulin light chain; immunoglobulin-kappa; V-region.
XX
OS Mus musculus (house mouse)
OC Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia;
OC Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Sciurognathi; Muroidea;
OC Muridae; Murinae; Mus.
XX
RN [1]
RP 1-1117
RA Moynot D., MacLean S.J., Ng K.H., Anctil D., Gibson D.M.;
RT "Polymorphism of kappa variable region (V-kappa-1) genes in inbred mice:
RT Relationship to the Ig-kappa-Ef2 serum light chain marker";
RL J. Immunol. 135:727-732(1985).
XX
DR IMG/LLGM; M12183; M12183.
XX
FH Key Location/Qualifiers
FH
FT source 1..1117
FT /organism="Mus musculus"
FT /mol_type="genomic DNA"
FT /db_xref="taxon:10090"
FT exon <340..385
FT /number=1
FT /note="kappa-chain V-region"
FT CDS join(340..385,768..>1117)
FT /codon_start=1
FT /note="kappa-chain V-region"
FT /protein_id="AAA38850.1"
FT /translation="MKLPVRLVLMFWIPASSSDVVMQTPLSLPVSLGQASISCRSS
FT QSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA
FT EDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIKR"
FT exon 768..>1117
FT /number=2
FT /note="kappa-chain V-region"
XX
SQ Sequence 1117 BP; 307 A; 225 C; 265 G; 320 T; 0 other;
aagcttaccac ggttattaac aaaatccact cgcaatcgtc tgggtgaaaa ataaatatac 60
atttccttta ttgaggagac agccctgtgt gagtcatatt cctggatatc cgggtgctta 120
tctgtgaaca ctctacagca tagaagaggt ttgtgtcac ttttaaaatc ttaactagtc 180
tatataactc ttctctctat actgcaacac taaagggagc ttttgcatat tgctccccag 240
ggagggccca cccttactag tctgagataa aagctcagct gtcttgtttc agtgactgat 300
cagtcctctc aggcctgtctc ctcaaggttc ctctcaaaa tgaagttgcc tgttaggctg 360
ttggtgctga tgttctggat tcctgggtgag gagagaggga agtgaggag gagaatggac 420
agggagcagg agcactgaat ccattgtctc attccatgta ttctgccatg ggtgagaaga 480
tgggtcttat cctccagcat ggggcctctg ggggtgaatac ttgttagagg gaggttccag 540
atgggaacat gtgctataat gaagattatg aaatggatgc ctgggatggc ctaagtattg 600
cctagaagtg actagacact tgcaattcac ttttttttgtt aagaagagaa ttttaggata 660
taaaaaaatg gtatgtaaaa ataaacatca cagttgaaat aaaaaaaaaa cataaggatg 720
ttcatgaatt ttgtgtgtta ctatgtattt ctctctcatt gtttcagctt ccagcagtga 780
tgtttgtgat acccaaaact cactctccct gcctgtcagt cttggagatc aagcctccat 840
ctcttgaga tctagtcaga gccttgtaca cagtaattga aacacctatt tacattggta 900
cctgcagaag ccaggccagt ctccaaagct cctgatctac aaagtttcca accgatcttc 960
tggggtccca gacaggttca gtggcagtg atcagggaca gatttcacac tcaagatcag 1020
cagagtggag gctgaggatc tgggagttta tttctgctct caaagtacac atgttccgtg 1080
gacgttcggg ggagggccca agctggaaat caaacgt 1117

//

10 AAT88870 standard; DNA; 717 BP.
XX
AC AAT88870;
XX
DT 15-APR-1998 (first entry)
XX
DE L chain subunit of Fas specific antibody coding sequence.
XX
KW Fas; antibody; human; immunoglobulin; variable region; rheumatism;
KW autoimmune disease; rheumatoid arthritis; therapy; CDR; light chain.
KW complementarity determining region; ss.
XX
OS Mus musculus.
XX
FH Key Location/Qualifiers
FT CDS 1..717
FT /*tag= a
FT sig_peptide 1..57
FT /*tag= b
FT mat_peptide 58..714
FT /*tag= c
XX
IN EF799891-A1
XX
PD 08-OCT-1997.
XX
DE 27-MAR-1997; 97EP-00302415.
XX
PR 01-APR-1996; 96JP-00078570.
XX
PA (SANYI SANKYO CO LTD.
XX
I Serizawa N, Ichikawa K, Nakahara K, Yonehara S;
XX
DR WPI: 1997-482673/45.
DR P-ESDB, AAW31752.
XX
PT Anti-Fas recombinant antibodies - useful for treating auto-immune
PT diseases, especially rheumatoid arthritis.
XX
PS Claim 22: Page 34-35: 72pp, English.
XX
CC This sequence represents the coding sequence for the light chain of the
CC protein of the invention. The protein of the invention is a recombinant
CC protein (A), that comprises at least one region corresponding to an
CC immunoglobulin (Ig) variable region which enables the protein to
CC recognise and specifically bind to an antigen, preferably human Fas, and
CC has substantially no more immunogenicity in a human patient than a human
CC antibody. The proteins are useful for treating autoimmune diseases,
CC especially rheumatism (rheumatoid arthritis). (A) is based on a murine
CC monoclonal antibody. As the protein lacks the constant region, it has
CC substantially no more immunogenicity in the human patient than a human
CC antibody
XX
SQ Sequence 717 BP; 194 A; 180 C; 171 G; 172 T; 0 U; 0 Other.
atgaagttgc ctgttaagct gttggtgctg atgttcttga ttctctcttc cagcagtgat 60
gtttgtgatga cccaaagtc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
tcttgcagat ctagttaagag ccttgtaaac agtaattgaa acaactatct acattggatc 180
ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgaltatca aagtttccaa ccgattttct 240
ggggtcccaag acaggttccg tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc 300
agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttctctcc 360
gcgttccggtg gaggaaccaa gctggaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc 420
atcttccccc catccagtga gcagttaaca tctggaggta cctcagtcgt gtgcttcttg 480
aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtggaaag ttgatggcag tgaacgacaa 540
aatggcgctc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaaag acagcaccta cagcatgagc 600
agcaccctca cgttgaccaa ggaatggatg gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc 660
actcacaaga catcaacttc acccattgtc aagagcttca acaggaatga gtgttag 717

//

ID AF044238; SV 1; linear; mRNA; STD, MUS; 325 BP.
XX
AC AF044238;
XX
DT 08-FEB-1999 (Rel. 58, Created;
DT 06-JAN-2000 (Rel. 62, Last updated, Version 2)
XX
DE Mus musculus F5.20G3 low-affinity anti-phosphorylcholine IgG antibody mRNA,
DE partial cds.
XX
KW
XX
OS Mus musculus [house mouse]
OC Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia;
OC Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Sciurognathi; Muridea,
OC Muridae; Murinae; Mus.
XX
RN [1]
RP 1-325
RX DOI: 10.1016/S0161-5890(99)00052-8
RX PUBMED: 10449099.
RA Kuo P., Bynoe M., Diamond B.;
RT "Crossreactive B cells are present during a primary but not secondary
RT response in BALB/c mice expressing a bcl-2 transgene";
RL Mol. Immunol. 36(7):471-479(1999).
XX
RN [2]
RP 1-325
RA Kuo P., Diamond B.;
RT
RL Submitted (23-JAN-1998) to the EMBL/GenBank/DBJ databases.
RL Microbiology and Immunology and Medicine, Albert Einstein College of
RL Medicine, 1300 Morris Park Ave., Bronx, NY 10461, USA
XX
DR IMGT/LIGM; AF044238; AF044238.
DR VBASE2: musIGHV165.
XX
FH Key Location/Qualifiers
FH
FT source 1..325
FT /organism="Mus musculus"
FT /strain="BALB/c"
FT /mol_type="mRNA"
FT /clone="F5.20G3"
FT /note="V7183 family"
FT /db_xref="taxon:10090"
FT CDS <1..>325
FT /codon_start=2
FT /product="low-affinity anti-phosphorylcholine IgG antibody"
FT /protein_id="AADI3134.1"
FT /translation="SGGGLVQFGGSLKLSCAASGFTPSSEYGSWVRQTPDKRLSLVATI
FT NSNGGSTYYPDVVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSI;KSEPTAMYYCARDYGPYWGQGTSTV
FT TVSS"
XX
SQ Sequence 325 BP; 79 A; 83 C; 87 G; 76 T; 0 other;
gtctggggga ggcttagtgc agcctggagg gtcctgaaa ctctctgtg cagcctctgg 60
attcacttbc agtagctatg gcctgtcttg ggttcgcag actccagaca agaggctgga 120
gttggtcgca accattcata gtaatgggtg tagcacctat tatccagaca gtgtgaaggg 180
ccgattcacc atctccagag acaatgccaa gaaacacctg tacctgcaaa tgagcagtc 240
gaagtctgag gacacagcaa tgtattactg tgcaggagac tatggtccct actggggtca 300
aggaacctca gtcactgtct cctca 325
//

ID ABX16569 standard; DNA: 682 BP.
XX
AC ABX16569;
XX
DT 22-APR-2003 (first entry)
XX
DE Mouse DNA encoding antibody 3D8 heavy chain variable region.
XX
KW ds; T-cell receptor; gene; cytostatic; dermatological; neuroprotective;
KW immunostimulant; GD3; ganglioside antigen; MB3.6; PSMA; tumour; 3D8; 4D4;
KW 3E11; prostate-specific membrane antigen; zeta signalling chain;
KW CD8alpha hinge; cancer; melanoma; neuroendocrine tumour; prostate cancer;
KW small cell lung cancer; heavy chain variable region; mouse.
XX
OS Mus sp.
XX
FH Key Location/Qualifiers
FT CDS 20..418
FT /*tag= a
FT /product= "3D8 heavy chain variable region"
FT /partial
FT /note= "No stop codon shown"
XX
PN US2002132983-A1.
XX
PD 19-SEP-2002.
XX
PF 10-DEC-2001; 2001US-00006773.
XX
PR 30-NOV-2000; 2000US-0250087P.
PR 30-NOV-2000; 2000US-0250089P.
XX
A (JUNG/) JUNGHANS R P.
XX
PI Junghans RP;
XX
DR WPI; 2003-208946/20.
DR P-PSDB; ABG74243.
XX
PT New chimeric molecule useful in treating patients with disorders, such as
PT melanoma, neuroendocrine disorders, prostate and small cell lung cancer
PT comprises GD3 and/or PSMA binding domains of antibody.
XX
PS Claim 2: Fig 4D: 35pp; English.
XX
CC The invention relates to a chimaeric molecule comprising the GD3
CC (ganglioside antigen) binding domain of antibody MB3.6, with any of 3
CC variable gene sequences, or the PSMA (prostate-specific membrane antigen)
CC binding domain of antibody 3D8, 4D4 and 3E11, with variable gene
CC sequences, the zeta signalling chain of the T cell receptor and an
CC intervening CD8alpha hinge in which cysteine residues have been mutated.
CC The chimaeric molecules expressed in T cells or NK cells or other
CC effector cells are useful in treating patients with cancers expressing
CC the GD3 (MB3.6 derivatives) or PSMA antigen (3D8, 4D4, 3E11 derivatives),
CC and/or together with each other or with heterologous constructs to engage
CC additional stimulatory and functional properties of the effector cells to
CC enhance the antitumour therapeutic efficacy (claimed). They are
CC particularly useful in disorders including melanoma, neuroendocrine
CC tumours and prostate and small cell lung cancer. The present sequence
CC encodes the mouse antibody 3D8 heavy chain variable region
XX
SQ Sequence 682 BP; 153 A; 184 C; 173 G; 172 T; 0 U; 0 Other;
tgaacacgga ccctcacca tgaacttcgg gtcagcttg atttccttg tccttgttt 60
aaaagggtgc cagtgtgaag tgaagggtgt ggagtcctgg ggaggcttag tgaagcctgg 120
agcgtctctg aaactctcct gtgcagcctc tggattcact ttcagtaact atggcatgtc 180
ttgggttcgc cagacttcag acaagaggct ggagtggtgc gcatccatta gtagtggtgg 240
tgatagcacc ttctatgcag acaatgtaaa gggccgattc accatctcca gagagaatgc 300
caagaacacc ctgtacctgc aaatgagtag tctgaagtct gaggacacgg ccttgatta 360
ctgtgcaaga gacgatctat ttaactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcatcagc 420
caaaacaaca gcccatcctg tctatccact ggccctctgt tgtggagata caattggctc 480
ctcggtgact ttaggatgcc tgggtcaagg ttatttcctt gagccagtga ccttgacctg 540
gaactctgga tccctgtcca gtggtgtgca catcttccca gctgtcttgc agtctgacct 600
ctacaccctc agcagctcag tgaactgtaac ctcgagcacc tggeccagcc agtccatcac 660
ttgcaatgtg gccaccccg ca 682

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación

21 de Junio de 2007 (21.06.2007)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional

WO 2007/068412 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(74) Agente: VOSSIUS & PARTNER; Siebertstrasse 4, 81675 Munich (DE).

(21) Número de Solicitud Internacional:

PCT/EP2006/011862

(22) Fecha de Registro Internacional:

8 de Diciembre de 2006 (08.12.2006)

(81) Estados Designados (A menos que se indique lo contrario para cada tipo de protección nacional disponible): AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, LV, LY, MA, MD, 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, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Idioma de registro:

Inglés

(26) Idioma de Publicación:

Inglés

(84) Estados Designados (A menos que se indique lo contrario para cada tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasíatica (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) Información de Prioridad:

05027092.5

12 de Diciembre de 2005 (12.12.2005)

EP

06014729.5

14 de Julio de 2006 (14.07.2006)

EP

06020766.9

2 de Octubre de 2006 (02.10.2006)

EP

Publicado:

- con reporte de búsqueda internacional
- antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser publicada de nuevo en el caso de recibo de modificaciones

(71) Solicitante: (Para todos los Estados designados excepto Estados Unidos de América): AC IMMUNE SA [CH/CH]; EPFL-PSE Building B, CH-1015 Lausanne (CH).

(88) Fecha de publicación del reporte de búsqueda Internacional

9 de Agosto de 2007

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos de América solamente): GREFFERATH, Ruth [DE/DE]; Am Ziegelhof 2, 77694 Kehl (DE). HICKMAN, David [GB/CH]; Cité St. Michel 12, CH-1635 La Tour de Tréme (CH). MUHS, Andreas [DE/CH]; Avenue des Cerisiers 39b, CH-1009 Pully (CH). PFEIFER, Andrea [DE/CH]; Route de Fenil 16A, CH-1806 St-Légier (CH). NICOLAU, Claude [FR/US]; 166 Greenwood Street, Newton, MA 02459 (US).

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas Gúlas sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: "ANTICUERPO MONOCLONAL ESPECIFICO BETA 1-42 CON PROPIEDADES TERAPÉUTICAS"

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con métodos y composiciones para uso terapéutico y diagnóstico en el tratamiento de enfermedades y trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide que incluyen la amiloidosis, un grupo de trastornos y anomalías asociados con la proteína amiloide tales como la enfermedad de Alzheimer. La presente invención proporciona nuevos métodos y composiciones que comprenden anticuerpos altamente específicos y altamente efectivos que tienen la capacidad de reconocer específicamente y unirse a los epitopes específicos de una gama de proteínas β -amiloides. Los anticuerpos habilitados por la enseñanza de la presente invención son particularmente útiles para el tratamiento de enfermedades y trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide que incluyen la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas amiloides que incluyen amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (AD).

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
21 June 2007 (21.06.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/068412 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 39/325 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

(74) Agent: VOSSIUS & PARTNER; Siebertstrasse 4, 81675 Munich (DE).

(21) International Application Number:
PCT/EP2006/011862

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KB, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LV, LY, MA, MD, 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, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date:
8 December 2006 (08.12.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
05027092.5 12 December 2005 (12.12.2005) EP
06014729.5 14 July 2006 (14.07.2006) EP
06020766.9 2 October 2006 (02.10.2006) EP

(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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, 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) Applicant (for all designated States except US): AC IMMUNE SA [CH/CH]; EPFL-PSE Building B, CH-1015 Lausanne (CH).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): GREFERATH, Ruth [DE/DE]; Am Ziegelhof 2, 77694 Kehl (DE). HICKMAN, David [GB/CH]; Cité St.Michel 12, CH-1635 La Tour de Tréme (CH). MUHS, Andreas [DE/CH]; Avenue des Cerisiers 39b, CH-1009 Pully (CH). PFEIFER, Andreu [DE/CH]; Route de Fenil 16A, CH-1806 St-Légier (CH). NICOLAU, Claude [FR/US]; 166 Greenwood Street, Newton, MA 02459 (US).

(88) Date of publication of the international search report:
9 August 2007

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: A BETA 1-42 SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES WITH THERAPEUTIC PROPERTIES

(57) Abstract: The present invention is related to methods and compositions for the therapeutic and diagnostic use in the treatment of diseases and disorders which are caused by or associated with amyloid or amyloid-like proteins including amyloidosis, a group of disorders and abnormalities associated with amyloid protein such as Alzheimer's disease. The present invention provides novel methods and compositions comprising highly specific and highly effective antibodies having the ability to specifically recognize and bind to specific epitopes from a range of β -amyloid proteins. The antibodies enabled by the teaching of the present invention are particularly useful for the treatment of diseases and disorders which are caused by or associated with amyloid or amyloid-like proteins including amyloidosis, a group of diseases and disorders associated with amyloid plaque formation including secondary amyloidosis and age-related amyloidosis including, but not limited to, neurological disorders such as Alzheimer's Disease (AD).

WO 2007/068412 A3

ANTICUERPO MONOCLONAL ESPECIFICO BETA 1-42 CON PROPIEDADES TERAPÉUTICAS

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con métodos y composiciones para uso terapéutico y diagnóstico en el tratamiento de enfermedades y trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide que incluyen la amiloidosis, un grupo de trastornos y anomalías asociados con la proteína amiloide tales como la enfermedad de Alzheimer.

La presente invención proporciona nuevos métodos y composiciones que comprenden anticuerpos altamente específicos y altamente efectivos que tienen la capacidad de reconocer específicamente y unirse a los epitopes específicos de una gama de proteínas β -amiloides. Los anticuerpos habilitados por la enseñanza de la presente invención son particularmente útiles para el tratamiento de enfermedades y trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide que incluyen la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas amiloides que incluyen amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (AD).

ANTICUERPO MONOCLONAL ESPECIFICO BETA 1-42 CON PROPIEDADES TERAPÉUTICAS

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para uso terapéutico y diagnóstico en el tratamiento de las enfermedades y trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide que incluyen la amiloidosis, un grupo de enfermedades y anormalidades asociadas con la proteína amiloide tales como la enfermedad de Alzheimer.

La amiloidosis no es una entidad de enfermedad única sino más bien un grupo diverso de procesos de enfermedades progresivas caracterizados por depósitos en el tejido extracelular de una proteína cerosa semejante a almidón llamada amiloide, que se acumula en uno o más órganos o sistemas corporales. Una vez que se forman los depósitos de amiloide, comienzan a interferir en la función normal del órgano o sistema corporal. Existen por lo menos 15 tipos diferentes de amiloidosis. Las formas principales son la amiloidosis primaria sin antecedentes conocidos, la amiloidosis secundaria después de alguna otra afección y la amiloidosis hereditaria.

La amiloidosis secundaria se produce en gente que tiene una infección crónica o enfermedad inflamatoria, tal como tuberculosis, una infección bacteriana llamada fiebre Mediterránea familiar, infecciones óseas (osteomielitis), artritis reumatoide, inflamación del intestino delgado (ileítis granulomatosa), enfermedad de Hodgkin y lepra.

Los depósitos de amiloide típicamente contienen tres componentes. Las fibrillas de la proteína amiloide, que representan aproximadamente el 90% del material amiloide, comprenden uno de varios tipos diferentes de proteínas. Estas proteínas se pueden plegar en las llamadas fibrillas de hojas "beta-plegadas", una configuración proteica única que exhibe sitios de unión para el rojo Congo que producen las propiedades de tinción únicas de la proteína amiloide. Además, los depósitos de amiloide está estrechamente asociados con el componente amiloide

C. 215550
D. P. G.

P (pentagonal) (AP), una glicoproteína relacionada con el amiloide P sérico normal P (SAP), y con glicosaminoglicanos sulfatados (GAG), carbohidratos complejos del tejido conectivo.

Muchas enfermedades del envejecimiento se basan en o están asociadas con proteínas de tipo amiloide y se caracterizan, en parte, por la formación de depósitos extracelulares de material amiloide o de tipo amiloide que contribuyen a la patogénesis, además del avance de la enfermedad. Estas enfermedades incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (AD), que incluyen enfermedades o afecciones caracterizadas por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam. Otras enfermedades que se basan o asocian con proteínas de tipo amiloide son la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), miositis con cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de comienzo adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos y otros que incluyen degeneración macular.

Si bien la patogénesis de estas enfermedades puede ser diversa, sus depósitos característicos con frecuencia contienen muchos constituyentes moleculares compartidos. En gran medida, esto se puede atribuir a la activación local de las vías pro-inflamatorias que de este modo producen la deposición concurrente de los componentes del complemento activado, reactantes de fase aguda, moduladores inmunes y otros mediadores inflamatorios (McGeer et al., 1994).

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno neurológico que se considera que está causado principalmente por las placas amiloides, una

acumulación de depósito anormal de proteínas en el cerebro. El tipo de amiloide hallado con mayor frecuencia en el cerebro de los individuos afectados está compuesto principalmente de fibrillas A β . Las evidencias científicas demuestran que un aumento de la producción y acumulación de proteína beta-amiloide en las placas conduce a la muerte de la célula nerviosa; lo que contribuye al desarrollo y avance de la AD. La pérdida de células nerviosas en áreas cerebrales estratégicas, su vez, causa la reducción de los neurotransmisores y el deterioro de la memoria. Las proteínas principalmente responsables de la formación de la placa incluyen la proteína precursora de amiloide (APP) y dos presenilinas (presenilina I y presenilina II). La escisión secuencial de la proteína precursora de amiloide (APP), que se expresa en forma constitutiva y es catabolizada en la mayoría de las células por las enzimas β y γ secretasa conduce a la liberación de un péptido A β de 39 a 43 aminoácidos. La degradación de las APP probablemente aumenta su propensión a agregarse en placas. El fragmento de A β (1-42) es el que tiene principalmente una alta propensión a formar agregados debido a dos residuos de aminoácidos muy hidrofóbicos en su extremo C-terminal. El fragmento A β (1-42) por consiguiente se considera que está principalmente involucrado y es el responsable de la iniciación de la formación de la placa neurítica en la AD y tiene, en consecuencia, un alto potencial patológico. Por lo tanto, se necesitan anticuerpos específicos que puedan localizar y dispersar la formación de placa amiloide.

Los síntomas de AD se manifiestan lentamente y el primer síntoma puede ser sólo olvido leve. En esta etapa, los individuos pueden olvidar eventos recientes, actividades, los nombres de gente o cosas familiares y pueden no ser capaces de resolver problemas de matemática simples. Debido a que la enfermedad avanza, los síntomas se advierten más fácilmente y se convierten en suficientemente graves y origina que la gente con AD o los miembros de su

familia busquen ayuda médica. Los síntomas del estadio medio de AD incluyen el olvido de cómo realizar tareas simples tales como el arreglo personal y desarrollo de problemas con el lenguaje, comprensión, lectura o escritura. En el estadio tardío de la AD los pacientes se pueden volver ansiosos o agresivos, pueden alejarse del hogar y finalmente necesitan atención total.

En la actualidad, la única manera definida para diagnosticar AD es identificar las placas y ovillos en el tejido cerebral en una autopsia después de la autopsia del individuo. En consecuencia, los médicos sólo pueden hacer un diagnóstico de AD "posible" o "probable" mientras la persona está todavía viva. Mediante los métodos actuales, los médicos pueden diagnosticar AD en forma correcta hasta el 90 por ciento de las veces empleando diversas herramientas para diagnosticar AD "probable". Los médicos realizan preguntas acerca de la salud general de la persona, problemas médicos del pasado y los antecedentes de cualquier dificultad de la persona para llevar a cabo las actividades diarias. Las pruebas conductuales de memoria, resolución de problemas, atención, cálculo y lenguaje proporcionan información sobre la degeneración cognitiva y pruebas médicas tales como exámenes de sangre, orina o líquido espinal y barridos cerebrales pueden proporcionar alguna información adicional.

El manejo de la AD consiste en tratamientos basados en medicación y no medicación. Los tratamientos destinados a cambiar el curso subyacente de la enfermedad (retardar o revertir el avance) han sido hasta el momento en gran parte infructuosos. Los medicamentos que restauran el déficit (defecto), o mal funcionamiento, de los mensajeros químicos de las células nerviosas (neurotransmisores), en particular los inhibidores de colinesterasa (ChEI) tales como tacrina y rivastigmina, han demostrado mejorar los síntomas. Los ChEI impiden la degradación enzimática de los neurotransmisores, de este modo

aumenta la cantidad de mensajeros químicos disponibles para transmitir las señales nerviosas en el cerebro.

Para algunas personas en los estadios temprano y medio de la enfermedad, los fármacos tacrina (COGNEX®, Morris Plains, NJ), donepezil (ARICEPT®, Tokyo, JP), rivastigmina (EXELON®, East Hanover, NJ), o galantamina (REMINYL®, New Brunswick, NJ) pueden ayudar a prevenir algunos síntomas del empeoramiento durante un tiempo limitado. Otro fármaco, la memantina (NAMENDA®, New York, NY), ha sido aprobado para el tratamiento de la AD de moderada a severa. Las medicaciones están también disponibles para tratar las manifestaciones psiquiátricas de la AD. También, algunas medicinas pueden ayudar a controlar los síntomas conductuales de la AD tal como insomnio, agitación, deambulación errática, ansiedad y depresión. El tratamiento de estos síntomas con frecuencia brinda mayor comodidad a los pacientes y hace más fácil la atención a sus cuidadores. Desafortunadamente, a pesar de que los significativos avances del tratamiento con esta clase de agentes muestran que este es regularmente mejor que un placebo, la enfermedad continúa su avance y el efecto promedio en el funcionamiento mental solo ha sido modesto. Muchos de estos fármacos usados en la medicación de la AD tal como, por ejemplo, los ChEI también tienen efectos secundarios que incluyen disfunción gastrointestinal, toxicidad hepática y pérdida de peso.

Otras enfermedades que se basan o asocian con la acumulación y depósito de proteína de tipo amiloide son deterioro cognitivo leve, demencia de cuerpos de Lewy (LBD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), miositis con cuerpos de inclusión (IBM) y degeneración macular, en particular degeneración macular relacionada con la edad (AMD).

El deterioro cognitivo leve (MCI) es un término general definido más comúnmente como un trastorno de la memoria sutil pero medible. Una persona

con MCI experimenta más problemas de memoria que los que normalmente esperados en el envejecimiento, pero no muestra otros síntomas de demencia, tal como juicio o razonamiento deteriorado. El MCI es una afección que con frecuencia refleja un estadio preclínico de la AD.

Se considera que el depósito de β -amiloide en la corteza entorhinal (EC) cumple un papel clave en el desarrollo del deterioro cognitivo leve (MCI) en las personas de edad avanzada. Esto está en línea con la observación de que los niveles de CSF-A- $A\beta(1-42)$ se declinan significativamente una vez que la AD se vuelve clínicamente manifiesta. En contraste con los niveles de CSF-A- $A\beta(1-42)$, los de CSF-tau están significativamente aumentados en el estadio MCI y estos valores continúan elevados a partir de ese momento, lo que indica que los niveles de CSF-tau aumentados pueden ayudar a detectar sujetos con MCI a los que se pronostica el desarrollo de la AD.

La demencia de los cuerpos de Lewy (LBD) es un trastorno neurodegenerativo que se puede producir en personas mayores de 65 años, que generalmente causa síntomas de deterioro cognitivo (pensamiento) y cambios conductuales anormales. Los síntomas pueden incluir deterioro cognitivo, signos neurológicos, trastornos del sueño y falla autonómica. El deterioro cognitivo es el rasgo característico de la LBD en la mayoría de los casos. Los pacientes tienen episodios recurrentes de confusión que empeoran progresivamente. La fluctuación de la capacidad cognitiva con frecuencia se asocia con cambios en el grado de atención y estado de alerta. El deterioro cognitivo y las fluctuaciones del pensamiento pueden variar durante minutos, horas o días.

Los cuerpos de Lewy se forman a partir de las proteínas fosforiladas y no fosforiladas de los neurofilamentos; estos contienen la proteína sináptica alfa-sinucleína además de ubiquitina, la cual está involucrada en la eliminación de las proteínas dañadas o anormales. Además de los cuerpos de Lewy, las neuritas de

Lewy, que son cuerpos de inclusión en los procesos celulares de las células nerviosas, también pueden estar presentes. Las placas amiloides se pueden formar en los cerebros de los pacientes afectados con DLB, sin embargo tienden a ser menores en número que los que se observan en pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Los ovillos neurofibrilares, la otra marca distintiva micropatológica de la AD, no son una característica principal de la DLB pero con frecuencia están presentes además de las placas amiloides.

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

La miositis con cuerpos de inclusión (IBM) es una enfermedad invalidante que se halla usualmente en gente de más 50 años, en la cual las fibras musculares desarrollan inflamación y comienzan atrofiarse —pero en la cual el cerebro está conservado y los pacientes mantienen su intelecto completo. Se hallaron dos enzimas comprometidas en la producción de la proteína β -amiloide aumentadas en el interior de las células musculares de los pacientes con esta enfermedad muscular progresiva más común en personas de edad avanzada, en la cual la β -amiloide también está aumentada.

Otra enfermedad que se basa o está asociada con la acumulación y depósito de la proteína de tipo amiloide es la degeneración macular.

La degeneración macular es una enfermedad ocular común que causa deterioro de la mácula, que es el área central de la retina (el tejido delgado como un papel en la parte posterior del ojo donde las células sensibles a la luz envían señales visuales al cerebro). La visión 'frontal' clara, aguda está procesada por la

mácula. El daño en la mácula produce el desarrollo de puntos ciegos y visión distorsionada o borrosa. La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es una causa principal de deterioro visual en los Estados Unidos y para gente de mayor de 65 años es la causa principal de ceguera legal entre los caucásicos. Aproximadamente 1,8 millones de americanos de 40 años y mayores tienen AMD avanzada, y otros 7,3 millones de personas con AMD intermedia tienen riesgo sustancial de pérdida de visión. El gobierno estima que para 2020 habrá 2,9 millones de personas con AMD avanzado. Las víctimas de AMD con frecuencia se sorprenden y frustran al descubrir cuan poco se sabe acerca de las causas y tratamiento de esta afección cegadora.

Existen dos formas de degeneración macular: degeneración macular seca y degeneración macular húmeda. La forma seca, en la cual las células de la mácula comienzan a alterarse lentamente se diagnostica en el 85 por ciento de los casos de degeneración macular. Usualmente ambos ojos está afectados por la AMD seca, si bien un ojo puede perder visión mientras que el otro ojo permanece sin afectar. Los drusen, que son depósitos amarillos bajo la retina, son signos comunes tempranos de la AMD seca. El riesgo de desarrollar AMD seca avanzada o AMD húmeda aumenta a mediado que aumenta el número o tamaño de los drusen. Es posible que la AMD seca avance y cause pérdida de visión sin transformarse en la forma húmeda de la enfermedad, también es posible que la AMD seca en estadio temprano cambie de repente a la forma húmeda.

La forma húmeda, aunque solo representa el 15 por ciento de los casos causa el 90 por ciento de las cegueras y se la considera AMD avanzada (no hay estadio temprano ni intermedio de la AMD húmeda). La AMD húmeda es siempre precedida por la forma seca de la enfermedad. A medida que la forma seca empeora, algunas personas comienzan a tener un crecimiento anormal de los vasos sanguíneos detrás de la mácula. Estos vasos son muy frágiles y filtrarán

líquido y sangre (de aquí degeneración macular 'húmeda'), lo que provoca un daño rápido a la mácula.

La forma seca de la AMD con frecuencia causará inicialmente visión ligeramente borrosa. El centro de la visión en particular luego se convierte en borrosa y esta región crece más a medida que la enfermedad avanza. So se pueden advertir síntomas si solo un ojo está afectado. En la AMD húmeda, las líneas rectas pueden parecer onduladas y se puede producir rápidamente la pérdida visión central.

El diagnóstico de la degeneración macular generalmente incluye un examen de ojo dilatado, prueba de agudeza visual y un examen de la parte posterior fondo de ojo mediante un procedimiento llamado examen de fondo de ojo para ayudar a diagnosticar la AMD, y —si se sospecha AMD húmeda— también se puede realizar angiografía con fluoresceína. Si la AMD seca llega a los estadios avanzados, actualmente no existe un tratamiento para impedir la pérdida de visión. Sin embargo, una fórmula de dosis altas de antioxidantes específicos y zinc puede retrasar o impedir que la AMD intermedia evolucione al estado avanzado. El Macugen® (inyección de pegaptanib sódica), fotocoagulación láser y la terapia fotodinámica pueden controlar el crecimiento de los vasos sanguíneos y el sangrado en la mácula, lo cual es útil para algunas de las personas que tienen AMD húmeda; sin embargo, la visión que ya se ha perdido no se recuperará con estas técnicas. Si la visión ya está perdida, existen auxiliares de la visión baja que pueden ayudar a mejorar la calidad de vida.

Uno de los signos más tempranos de la degeneración macular relacionado con la edad (AMD) es la acumulación de depósitos extracelulares conocidos como drusen entre la lámina basal del epitelio pigmentado retiniano (RPE) y la membrana de Bruch (BM). Estudios recientes realizados por Anderson et al. A

han confirmado que el drusen contiene beta amiloide. (Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256).

La investigación en curso continúa con los estudios que exploran los factores ambientales, genéticos y dietarios que pueden contribuir a la AMD. También se están explorando nuevas estrategias de tratamiento, que incluyen trasplantes de células de la retina, fármacos que evitarán o disminuirán el avance de la enfermedad, terapia con radiación, terapias génicas, Un chip de computadora implantado en la retina que puede ayudar a estimular la visión y agentes que evitarán el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos bajo la mácula.

Un factor importante para considerar cuando se desarrollan nuevos fármacos es la facilidad de uso para los pacientes seleccionados. La administración oral, -específicamente comprimidos, cápsulas y geles blandos -, representa el 70% de todas las formas de dosificación consumidas debido a conveniencia del paciente. Los desarrolladores de fármacos concuerdan en que los pacientes prefieren la administración oral más que someterse a inyecciones u otras formas más invasivas de administración medicinal. Las formulaciones que dan como resultado intervalos de dosificación menores (es decir, una vez al día o liberación sostenida) son también preferibles. La facilidad de administrar antibióticos en formas de dosificación orales produce un aumento del cumplimiento del paciente durante el tratamiento.

Se necesitan métodos y composiciones efectivas para la generación de anticuerpos altamente específicos y altamente efectivos, este es un prerrequisito si los anticuerpos son para ser proporcionados en una forma de dosis oral. Con preferencia tales anticuerpos deberán reconocer epitopes específicos en diversos antígenos tal como proteína amiloide.

También se requieren en consecuencia, composiciones y métodos efectivos para referirse a las complicaciones asociadas con enfermedades y

trastornos causados o asociados con la proteína amiloide o de tipo amiloide que incluyen la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide que incluye la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tal como enfermedades que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tal como enfermedad de Alzheimer (AD) que incluyen enfermedades o afecciones caracterizadas por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam; además de otras enfermedades que se basan o asocian con proteínas de tipo amiloide tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionado con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), miositis con cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de comienzo adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos que incluyen degeneración macular. En particular se necesitan anticuerpos especializados y altamente efectivos capaces de contrarrestar las manifestaciones fisiológicas de la enfermedad tales como la formación de placas asociadas con la agregación de fibras del péptido amiloide o de tipo amiloide.

Se ha demostrado que los anticuerpos antiamiloides estimulados por la inoculación de A β ₁₋₄₂ mezclado con adyuvante de Freund completo o incompleto son capaces de reducir la sobrecarga en ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (Schenk et al., 1999).

La inoculación intraperitoneal de A β ₁₋₁₆ tetrapalmitoilado reconstituido en liposomas en ratones transgénicos NORBA estimuló títulos significativos de anticuerpos anti-amiloides, que también demostró poder solubilizar fibras y placas amiloides *in vitro* e *in vivo*. (Nicolau et al., 2002).

Un mecanismo posible por el cual se produce la disolución de las placas amiloides fue sugerida primero por Bard et al., (2000), quien propuso la conclusión, sobre la base de sus datos, de que los anticuerpos opsonizaron las placas, que posteriormente fueron destruidas por los macrófagos de la microglia. De Mattos et al., (2001) indicaron que un MAb dirigido contra el dominio central del β -amiloide fue capaz de unir y secuestrar completamente el plasma amiloide. Estos sostuvieron que la presencia de estos mAb en circulación modificó el equilibrio de A β entre cerebro y plasma, lo cual favorece la depuración periférica y el catabolismo en vez del depósito dentro del cerebro.

La presente invención proporciona nuevos métodos y composiciones que comprenden anticuerpos altamente específicos y altamente efectivos que tienen la capacidad de reconocer y unirse específicamente a los epitopes específicos a partir de una variedad de antígenos β -amiloides. Los anticuerpos permitidos por las descripciones de la presente invención son particularmente útiles para el tratamiento de las enfermedades y trastornos causados por o asociados con la proteína amiloide o de tipo amiloide que incluyen la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide que incluye la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tal como enfermedades que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tal como enfermedad de Alzheimer (AD) que incluyen enfermedades o afecciones caracterizadas por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam; además de otras enfermedades que se basan o asocian con proteínas de tipo amiloide tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionado con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica),

miositis con cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de comienzo adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos que incluyen degeneración macular, por nombrar solo unos pocos.

Además, la presente invención proporciona nuevos métodos y composiciones para retener o aumentar la capacidad de memoria cognitiva en un mamífero que presenta una enfermedad o afección asociada con el amiloide que comprende la administración a un animal, particularmente un mamífero, más particularmente a un ser humano que requiere tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE FIGURAS Y SECUENCIAS

Figura 1: Péptidos derivados de las secuencias 1-15, 1-16 y 1-16(Δ 14), 22-35 y 29-40 de A β

Figura 2: Unión del anticuerpo monoclonal mACI-01-Ab7 C2 a las especies amiloides en una transferencia Western y transferencia en mancha

Figura 3: Unión del anticuerpo monoclonal mACI-01-Ab7 C2 a las fibras amiloides por microscopía electrónica de transmisión.

Figura 4: Resultados de un experimento comparativo entre el ensayo de Th-T fluorescente y RMN en estado sólido del péptido 1-42 β -amiloide marcado con U- ^{13} C Tyr10 y Val12.

SEC ID NO: 1:	Péptido antigénico A β 1-15
SEC ID NO: 2:	Péptido antigénico A β 1-16
SEC ID NO: 3:	Péptido antigénico A β 1-16(Δ 14)
SEC ID NO: 4:	Péptido antigénico A β 22-35
SEC ID NO: 5:	Péptido antigénico A β 29-40
SEC ID NO: 6:	Péptido antigénico A β 1-17

SEC ID NO: 7: Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana C2 de ratón

SEC ID NO: 8: Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada C2 de ratón

SEC ID NO: 9: Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana C2 de ratón

SEC ID NO: 10: Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena liviana C2 de ratón que incluye las secuencias señal

SEC ID NO: 11: Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada C2 de ratón

SEC ID NO: 12: Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de ratón que incluye las secuencias señal

SEC ID NO: 13-20: Variantes de secuencia de aminoácidos de la región epitópica del péptido A β

SEC ID NO: 21: Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana C2 de ratón

SEC ID NO: 22: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada C2 de ratón

La presente invención hace uso de las presentaciones de antígenos que producen la exposición y estabilización aumentada de una conformación antigénica preferida, que finalmente origina anticuerpos con propiedades únicas.

En una realización de la invención se proporciona un anticuerpo que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo o más particularmente, un anticuerpo monoclonal que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que ha sido originado contra una construcción antigénica supramolecular que comprende un péptido antigénico correspondiente a la secuencia de aminoácidos del péptido

β -amiloide, particularmente del péptido β amiloide $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-16}$ y $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$, modificado con un residuo hidrofóbico tal como, por ejemplo, ácido palmítico o un residuo hidrofílico tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o una combinación de ambos donde dicho residuo hidrofóbico e hidrofílico, respectivamente, está unido en forma covalente con cada uno de estos términos del péptido antigénico mediante por lo menos uno, particularmente uno o dos aminoácidos tal como, por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisterna o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado capaz de actuar como dispositivo conector para acoplar los residuos hidrofóbico e hidrofílico al fragmento del péptido. Cuando se usa PEG como residuo hidrofílico, los términos de PEG libres están unidos en forma covalente con fosfatidiletanolamina o cualquier otro compuesto adecuado para funcionar como elemento de anclaje, por ejemplo, para insertar la construcción antigénica en la bicapa del liposoma.

En otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, el cual reconoció la conformación nativa del amiloide ya que se une en forma específica a oligómeros y fibras amiloides, pero no a las especies de amiloide lineal.

En una realización adicional de la invención, se proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con la presente invención y como se describió antes en la presente memoria, tal anticuerpo o fragmento se une a un monómero $A\beta$ con afinidad de unión de por lo menos aproximadamente 1×10^{-6} a por lo menos aproximadamente 1×10^{-8} , particularmente de por lo menos aproximadamente 1×10^{-6} a por lo menos aproximadamente 1×10^{-7} , más particularmente de por lo menos aproximadamente 1×10^{-7} a por lo menos aproximadamente 1×10^{-8} , aún más

particularmente de por lo menos aproximadamente 1×10^{-7} a por lo menos aproximadamente 4×10^{-7} pero, con preferencia no muestra ninguna reactividad cruzada con la proteína precursora del amiloide (APP).

En otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con la presente invención y como se describió antes en la presente memoria, tal anticuerpo o fragmento se une a una fibra, fibrilla o filamento de A β con una afinidad de por lo menos aproximadamente 1×10^{-7} a por lo menos aproximadamente 1×10^{-9} , particularmente de por lo menos aproximadamente 1×10^{-7} a por lo menos aproximadamente 1×10^{-8} , más particularmente de por lo menos aproximadamente 1×10^{-8} a por lo menos aproximadamente 1×10^{-9} , aún más particularmente de por lo menos aproximadamente 1×10^{-8} a por lo menos aproximadamente 5×10^{-8} , pero, con preferencia no muestra ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora del amiloide (APP).

En otra realización, el anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con la presente invención y como se describió antes en la presente memoria exhibe una afinidad de unión con una fibra, fibrilla o filamento de A β que es por lo menos 5 veces, particularmente por lo menos 10 veces, más particularmente por lo menos 15 veces, superior a la afinidad de unión con un monómero de A β .

Los anticuerpos de acuerdo con la invención son capaces de inhibir, *in vitro* e *in vivo*, la agregación de péptidos monoméricos amiloidogénicos, específicamente péptidos β amiloides monoméricos tal como, por ejemplo, los péptidos A β monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente

péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$ en fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular.

En una realización específica de la invención un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo después de la co-incubación con péptidos amiloides monoméricos, particularmente péptidos β amiloides monoméricos tal como, por ejemplo, los péptidos $A\beta$ monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente los péptidos $A\beta_{1-42}$ monoméricos, inhibe la agregación de los monómeros de $A\beta$ en fibrillas poliméricas de alto peso molecular.

En una realización adicional de la invención se proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo después de la co-incubación, particularmente la co-incubación en una relación de concentraciones molares de hasta 1:100, más particularmente en una relación de concentraciones molares entre 1:30 y 1:100, pero especialmente en una relación de concentraciones molares de 1:100, con los péptidos amiloides monoméricos, particularmente los péptidos β amiloides monoméricos tal como, por ejemplo, péptidos $A\beta$ monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 o 1-43, pero especialmente los péptidos $A\beta_{1-42}$ monoméricos, inhibe la agregación de los monómeros de $A\beta$ en fibrillas poliméricas de alto peso molecular. En particular, dicha inhibición llega a por lo menos 50%, particularmente a por lo menos 65%, más particularmente a por lo menos 75%, aun más particularmente a por lo menos 80%, pero especialmente a por lo menos 85%-90%, o más en comparación con los monómeros del péptido amiloide respectivo incubado en buffer (control).

En particular, la co-incubación del anticuerpo de acuerdo con la invención con los péptidos amiloides monoméricos se lleva a cabo durante 24 horas a 60

horas, particularmente durante 30 horas a 50 horas, más particularmente durante 48 horas a una temperatura entre 28°C y 40°C, particularmente entre 32°C y 38°C, más particularmente a 37°C.

En otra realización la presente invención proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo después de la co-incubación durante 48 horas a 37°C con una relación de concentraciones molares de 1:100 con un péptido amiloide monomérico, específicamente un péptido β -amiloide monomérico tal como, por ejemplo, el péptido A β monomérico 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 o 1-43, pero especialmente un péptido A β ₁₋₄₂ monomérico, es capaz de inhibir la agregación de los monómeros amiloides, particularmente la agregación de los péptidos β amiloides monoméricos tal como, por ejemplo, péptidos A β monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 o 1-43, pero especialmente del péptido A β ₁₋₄₂ monomérico en fibrillas o filamentos poliméricos de alto peso molecular en por lo menos 85%, particularmente en por lo menos 89% y más particularmente en por lo menos 95% en comparación con los monómeros del péptido amiloide incubado en buffer (control).

En una realización específica, la invención proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que exhibe alta especificidad con los péptidos monoméricos A β ₁₋₄₂ pero muestra esencialmente ninguna o sólo mínima reactividad cruzada con los péptidos monoméricos A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₄₀, y/o A β ₁₋₄₁, particularmente un anticuerpo, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo es hasta 100 veces, particularmente 50 a 100 veces, más particularmente 80 a 100 veces, pero especialmente 100 veces más sensible con el péptido amiloide A β ₁₋₄₂ en

comparación con $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$ y hasta 1000 veces, particularmente 500 a 1000 veces, más particularmente 800 a 1000 veces, pero especialmente 1000 veces más sensible al péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ en comparación con $A\beta_{1-38}$, y de este modo capaz de inhibir, *in vitro* e *in vivo*, la agregación de péptidos monoméricos amiloidogénicos, pero especialmente del péptido amiloide $A\beta_{1-42}$.

En otra realización específica de la invención un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que tiene una alta sensibilidad de unión al péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ y es capaz de detectar fibras de $A\beta_{1-42}$ en una concentración de debajo de por lo menos 0,001 μg , pero particularmente en un rango de concentración de entre 0,5 μg y 0,001 μg , más particularmente entre 0,1 μg y 0,001 μg , pero especialmente en una concentración de 0,001 μg .

En una realización muy específica de la invención se proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo es capaz de detectar una cantidad de fibras de $A\beta_{1-42}$ por debajo de una concentración mínima de 0,001 μg y fibras de $A\beta_{1-40}$ por debajo de una concentración mínima de 0,1 μg y fibras de $A\beta_{1-38}$ por debajo de una concentración mínima de 1 μg de fibras.

La unión de los anticuerpos de acuerdo con la invención y como se describió antes en la presente memoria a los péptidos monoméricos amiloidogénicos pero, particularmente, a la forma amiloide (1-42) conduce a la inhibición de la agregación de los péptidos monoméricos amiloidogénicos a las fibrillas o filamentos de alto peso molecular. Mediante la inhibición de la agregación de los péptidos monoméricos amiloidogénicos los anticuerpos de acuerdo con la presente invención son capaces de impedir o disminuir la

formación de placas amiloides, particularmente la forma amiloide (1-42), la cual se sabe que se torna insoluble por el cambio de la conformación secundaria y constituye la mayor parte de las placas amiloides en los cerebros de los animales o seres humanos enfermos.

La potencial inhibición de la agregación del anticuerpo de acuerdo con la invención se puede determinar por cualquier método adecuado conocido en el arte, particularmente por ultracentrifugación por gradiente de densidad seguida por el análisis por sedimentación SDS-PAGE con un gradiente preestablecido y/o por un ensayo de tioflavina T (Th-T) fluorescente.

La presente invención además proporciona anticuerpos, que después de la co-incubación con fibrillas o filamentos preformados poliméricos de alto peso molecular por la agregación de los péptidos amiloides monoméricos, específicamente péptidos β amiloides monoméricos tales como, por ejemplo, péptidos $A\beta$ monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 o 1-43, pero especialmente los péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$ es capaz de desagregar dichas fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular.

En otra realización de la invención se proporciona un anticuerpo, pero especialmente un anticuerpo monoclonal que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo después de la co-incubación con una relación de concentraciones molares de hasta 1:100, más particularmente con una relación de concentraciones molares entre 1:30 y 1:100, pero especialmente con una relación de concentraciones molares de 1:100, con fibrillas o filamentos preformados poliméricos de alto peso molecular formados por la agregación de péptidos amiloides monoméricos, particularmente péptidos β amiloides monoméricos tal como, por ejemplo, los péptidos $A\beta$ monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 o 1-43, pero especialmente los péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$ es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos

poliméricos preformados en por lo menos 35%, particularmente en por lo menos 40%, más particularmente en por lo menos 50%, aún más particularmente en por lo menos 60%, pero especialmente en por lo menos 70% o más.

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

En una realización específica, la invención proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo después de la co-incubación durante 24 horas a 37°C con una relación de concentraciones molares de 1:100 con las fibrillas o filamentos preformados poliméricos de alto peso molecular formados por la agregación de péptidos amiloides monoméricos, particularmente péptidos β amiloides monoméricos tal como, por ejemplo, péptidos A β monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente los péptidos monoméricos A β ₁₋₄₂ es capaz de desagregar dichas fibrillas o filamentos poliméricos de alto peso molecular preformados en por lo menos 35%, particularmente en por lo menos 40%, más particularmente en por lo menos 50%, aún más particularmente en por lo menos 60%, pero especialmente en por lo menos 70% o más en comparación con las respectivas fibrillas o filamentos amiloides poliméricos preformados incubados con un vehículo control (amiloide sola) (control).

La desagregación potencial del anticuerpo de acuerdo con la invención se puede determinar por cualquier método adecuado conocido en el arte, particularmente por ultracentrifugación con gradiente de densidad seguida del

análisis por sedimentación SDS-PAGE con un gradiente preestablecido y/o por un ensayo de tioflavina T (Th-T) fluorescente.

La presente invención además proporciona anticuerpos o partes funcionales del mismo que son sensibles desde el punto de vista de la conformación.

En una realización adicional de la invención se proporciona un anticuerpo, pero especialmente un anticuerpo monoclonal que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo después de la co-incubación con fibrillas o filamentos preformados poliméricos de alto peso molecular formados por la agregación de péptidos amiloides monoméricos, particularmente los péptidos β amiloides monoméricos tal como, por ejemplo, los péptidos $A\beta$ monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 o 1-43, pero especialmente los péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$, es capaz de inducir una transición de la conformación de la lámina β hacia una conformación α -hélice y/o de arrollamiento al azar, pero particularmente una conformación de arrollamiento al azar, aún más particularmente una conformación de arrollamiento al azar en una localización dada en la molécula, especialmente en el ambiente de Val12 de la proteína $A\beta$, que conduce a un aumento de la conformación de arrollamiento al azar a expensas de la conformación β -hoja y una solubilización mejorada de las fibrillas o filamentos preformados poliméricos de alto peso molecular. En particular la disminución de la conformación de la lámina β llega a por lo menos 30%, particularmente a por lo menos 35%, y más particularmente a por lo menos 40% y más en comparación con las respectivas fibrillas o filamentos amiloides poliméricos preformados incubados en buffer (control).

En particular, el anticuerpo de acuerdo con la invención está co-incubado con fibrillas o filamentos preformados poliméricos de alto peso molecular durante 12 horas a 36 horas, particularmente durante 18 horas a 30 horas, más

particularmente durante 24 horas a una temperatura entre 28°C y 40°C, particularmente entre 32°C y 38°C, más particularmente a 37°C.

En particular, la presente invención proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo después de la co-incubación durante 24 horas a 37°C con una relación de concentraciones molares de 1:100 con las fibrillas o filamentos preformados poliméricos de alto peso molecular formados por la agregación de péptidos amiloides monoméricos, particularmente los péptidos β amiloides monoméricos tal como, por ejemplo, los péptidos A β monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente los péptidos monoméricos A β_{1-42} , es capaz de inducir una transición de la conformación de la lámina β hacia una conformación α -hélice y/o de arrollamiento al azar, pero particularmente una conformación de arrollamiento al azar, aún más particularmente una conformación de arrollamiento al azar a una azar en una localización dada en la molécula, especialmente en el ambiente de Val12 de la proteína A β , que conduce a un aumento de la conformación de arrollamiento al azar a expensas de la conformación β -hoja, con la última reducida en por lo menos 30%, particularmente en por lo menos 35%, y más particularmente en por lo menos 40% y más en comparación con las respectivas fibrillas o filamentos amiloides poliméricos preformados incubados en buffer (control).

El potencial del anticuerpo para inducir una transición de conformación se puede determinar por cualquier método adecuado conocido en el arte, particularmente por espectroscopia RMN 13C de estado sólido pero en particular, por la medición de las intensidades integrales de las conformaciones de Val 12 C β en el péptido A β , particularmente los péptidos A β 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente en el péptido monomérico A β_{1-42} .

Mediante la desagregación de las fibrillas o filamentos poliméricos amiloidogénicos los anticuerpos de acuerdo con la presente invención son capaces de impedir o disminuir la formación de placas amiloides que conducen a un alivio de los síntomas asociados con la enfermedad y un retraso o reversión de su avance.

Por consiguiente, esta es una realización adicional de la invención para proporcionar un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describió anteriormente en la presente memoria, tal anticuerpo es capaz de disminuir la cantidad total de A β en el cerebro de un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece de una enfermedad o afección que conduce a una concentración aumentada de A β en el cerebro.

En otra realización de la invención se proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describió anteriormente en la presente memoria, tal anticuerpo es capaz de alterar las placas de este modo disminuye la carga de placas en el cerebro de un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que sufre de una enfermedad o afección que conduce a una carga de placas aumentada en el cerebro. El anticuerpo de acuerdo con la invención que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo disminuye la carga de placa en el cerebro en por lo menos 20 %, particularmente en por lo menos 25%, más particularmente en por lo menos 30%, aún más particularmente más de 30%.

En aún otra realización de la invención se proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticu rpo

funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se describió anteriormente en la presente memoria, tal anticuerpo es capaz de solubilizar placas que conducen a una reducción de la proporción de placas el cerebro de un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que sufre de una enfermedad o afección que conduce a una carga de placas aumentada en el cerebro. El anticuerpo de acuerdo con la invención que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo reduce la proporción de placas en el cerebro en por lo menos 10%, particularmente en por lo menos 15%, más particularmente en por lo menos 20%.

Se considera que el anticuerpo de acuerdo con la invención puede exhibir uno, dos o más de las propiedades específicas descritas anteriormente en la presente memoria en diversas combinaciones.

Por ejemplo, en una realización la presente invención proporciona anticuerpos, pero especialmente anticuerpos monoclonales que incluyen a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tales anticuerpos son bifuncionales o sea que ellos exhiben una propiedad de inhibición de la agregación además de la propiedad de desagregación como se definió anteriormente en la presente memoria, particularmente apareado con un alto grado de sensibilidad conformacional.

En otra realización aún de la invención se proporciona un anticuerpo bifuncional que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, pero especialmente un anticuerpo bifuncional monoclonal que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo después de la co-incubación con péptidos amiloides monoméricos, particularmente los péptidos β amiloides monoméricos, tal como, por ejemplo, los péptidos A β monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente los péptidos A β ₁₋₄₂ monoméricos, inhibe la agregación de

los monómeros de A β en fibrillas o filamentos poliméricos de alto peso molecular y además, después de la co-incubación con fibrillas o filamentos preformados poliméricos de alto peso molecular formados por la agregación de péptidos amiloides monoméricos, particularmente los péptidos β amiloides monoméricos tal como, por ejemplo, los péptidos A β monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente los péptidos A β ₁₋₄₂ monoméricos, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos amiloides poliméricos preformados.

En una realización específica de la invención la co-incubación del anticuerpo bifuncional de acuerdo con la invención, pero especialmente del anticuerpo monoclonal bifuncional de acuerdo con la invención con péptidos amiloides monoméricos y fibrillas o filamentos preformados poliméricos de alto peso molecular, respectivamente, tiene lugar con una relación de concentraciones molares de hasta 1:100, particularmente en una relación entre 1:30 y 1:100, y más particularmente en una relación de 1:100.

En particular, la co-incubación del anticuerpo de acuerdo con la invención con péptidos amiloides monoméricos se lleva a cabo durante 24 horas a 60 horas, particularmente durante 30 horas a 50 horas, más particularmente durante 48 horas a una temperatura entre 28°C y 40°C, particularmente entre 32°C y 38°C, más particularmente a 37°C, mientras que la co-incubación con fibrillas o filamentos preformados poliméricos de alto peso molecular se lleva a cabo durante 12 horas a 36 horas, particularmente durante 18 horas a 30 horas, más particularmente durante 24 horas a una temperatura entre 28°C y 40°C, particularmente entre 32°C y 38°C, más particularmente a 37°C.

En otra realización específica aún de la invención, el anticuerpo bifuncional de acuerdo con la invención, particularmente el anticuerpo monoclonal bifuncional de acuerdo con la invención, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, es capaz de desagregar las fibrillas o

filamentos poliméricos preformados en por lo menos 10%, particularmente en por lo menos 25%, más particularmente en por lo menos 35%, aún más particularmente en por lo menos 50%, pero especialmente en por lo menos 60 - 70% o más.

En otra realización específica aún de la invención, el anticuerpo bifuncional de acuerdo con la invención, particularmente el anticuerpo monoclonal bifuncional de acuerdo con la invención, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, inhibe la agregación de los péptidos amiloides monoméricos, particularmente los péptidos β amiloides monoméricos tal como, por ejemplo, péptidos $A\beta$ monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 o 1-43, pero especialmente los péptidos $A\beta_{1-42}$ monoméricos, en por lo menos 50%, particularmente en por lo menos 65%, más particularmente en por lo menos 75%, aún más particularmente en por lo menos 80%, pero especialmente en por lo menos 85-90%, o más en comparación con los respectivos monómeros del péptido amiloide incubado en buffer (control).

En particular, la presente invención proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, particularmente un anticuerpo monoclonal bifuncional, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo media la inhibición de la polimerización de los péptidos amiloides monoméricos, específicamente los péptidos β amiloides monoméricos tales como, por ejemplo, los péptidos $A\beta$ monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente los péptidos $A\beta_{1-42}$ monoméricos, y/o induce la solubilización de las fibrillas o filamentos preformados poliméricos de alto peso molecular formados por la agregación de los péptidos amiloides monoméricos, particularmente péptidos β amiloides monoméricos tal como, por ejemplo, los péptidos $A\beta$ monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente los péptidos

$A\beta_{1-42}$ monoméricos mediante la unión específica y directa del anticuerpo a las fibras de $A\beta$, que conduce a una transición de la conformación secundaria.

La presente invención además proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, particularmente un anticuerpo monoclonal bifuncional, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo se une en forma directa y específica a las fibras β -amilloide tal como, por ejemplo, fibras que comprende péptidos $A\beta$ monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente a fibra que comprende los péptidos $A\beta_{1-42}$ monoméricos y/o induce la solubilización de las fibrillas o filamentos preformados poliméricos de alto peso molecular formados por la agregación de los péptidos amiloides monoméricos, particularmente los péptidos β amiloides monoméricos tal como, por ejemplo, los péptidos $A\beta$ monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente los péptidos $A\beta_{1-42}$ monoméricos, por la localización y específicamente la unión de un epitope en una región epitópica de la proteína β -amilloide, particularmente una región epitópica del polipéptido de $A\beta$ limitado por los residuos de aminoácidos aa_n - aa_m con n como un número entero entre 2 y 16, particularmente entre 5 y 16, más particularmente entre 8 y 16, aún más particularmente entre 10 y 16 y m es un número entero entre 3 y 25, particularmente entre 3 y 23, particularmente entre 3 y 20, particularmente entre 3 y 17, particularmente entre 6 y 17, más particularmente entre 9 y 17, aún más particularmente entre 11 y 17, donde n y m no pueden ser números idénticos y n siempre debe ser un número más pequeño que m , con la diferencia entre n y $m \geq 2$.

En una realización específica de la invención, n es un número entero entre 13 y 15, pero especialmente 14 y m es un número entero entre 22 y 24, pero especialmente 23.

La unión del anticuerpo de acuerdo con la invención puede inducir una transición conformacional de dicha proteína, particularmente una transición de la conformación de la lámina β hacia una conformación α -hélice y/o de arrollamiento al azar, pero particularmente una conformación de arrollamiento al azar, aún más particularmente una conformación de arrollamiento al azar en una localización dada en la molécula, particularmente en el ambiente de Val12 de la proteína A β .

En una realización adicional, la invención proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo incorpora por lo menos una de las propiedades mencionadas anteriormente en la presente memoria y seleccionadas del grupo que consiste en inhibición de la agregación, desagregación, inducción de la transición conformacional, reconocimiento de y unión directa a un epítipo, particularmente un epítipo discontinuo conformacional en la región 14-23, particularmente en 14-20, que impide o disminuye la formación de placas amiloides, disminuye la proporción total de A β soluble en el cerebro, disminuye la carga de placa en el cerebro, reduce la proporción de las placas en el cerebro, retiene o aumenta la capacidad de la memoria cognitiva, pero especialmente una combinación de dos o más de dichas propiedades.

En una realización específica, la invención se refiere a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo incorpora por lo menos 2, particularmente por lo menos 3, más particularmente por lo menos 4, aún más particularmente por lo menos 5, 6, 7 u 8, pero especialmente todas las propiedades anteriormente mencionadas.

En una realización específica, la invención proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo

monoclonal, particularmente un anticuerpo bifuncional monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que exhibe alta especificidad con los péptidos $A\beta_{1-42}$ monoméricos pero muestra esencialmente ninguna o solo mínima reactividad cruzada con los péptidos monoméricos $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, y/o $A\beta_{1-41}$, particularmente un anticuerpo, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo es hasta 100 veces, particularmente 50 a 100 veces, más particularmente 80 a 100 veces, pero especialmente 100 veces más sensible al péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ en comparación con $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$ y hasta 1000 veces, particularmente 500 a 1000 veces, más particularmente 800 a 1000 veces, pero especialmente 1000 veces más sensible al péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ en comparación con $A\beta_{1-38}$, y de este modo capaz de inhibir, *in vitro* e *in vivo*, la agregación de péptidos monoméricos amiloidogénicos, pero especialmente del péptido amiloide $A\beta_{1-42}$.

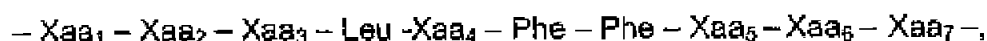
En otra realización específica de la invención un anticuerpo, particularmente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, particularmente un anticuerpo bifuncional monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que tiene una alta afinidad de unión con el péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ y es capaz de detectar fibras de $A\beta_{1-42}$ en una concentración por debajo de por lo menos 0,001 μg , pero particularmente en un rango de concentración entre 0,5 μg y 0,001 μg , más particularmente entre 0,1 μg y 0,001 μg , pero especialmente en una concentración de 0,001 μg .

En una realización muy específica de la invención se proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, particularmente un anticuerpo bifuncional monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes

funcionales del mismo, tal anticuerpo es capaz de detectar las fibras de $A\beta_{1-42}$ por debajo de una concentración mínima de 0,001 μg y fibras de $A\beta_{1-40}$ por debajo de una concentración mínima de 0,1 μg y fibras $A\beta_{1-38}$ por debajo de una concentración mínima de 1 μg de fibras.

En un aspecto específico, la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento del mismo, que reconoce y se une por lo menos a un sitio de unión distinto, particularmente a por lo menos dos sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide.

En una realización específica, la invención se refiere a un anticuerpo que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo reconoce y une a por lo menos un sitio de unión distinto, particularmente a por lo menos dos sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide donde dicho por lo menos uno o dichos por lo menos dos sitios de unión distintos comprenden por lo menos un residuo de aminoácido y por lo menos dos residuos de aminoácidos, respectivamente predominantemente involucrado en la unión del anticuerpo, donde en una realización específica de la invención, el por lo menos un residuo que comprende el primer sitio de unión distinto es Leu y los por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, que comprenden el segundo sitio de unión distinto, son -Phe-Phe- incluidos en el centro de la siguiente secuencia nuclear :



donde

Xaa_1 es un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que comprende His, Asn, Gln Lys, y Arg;

Xaa_2 es un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que comprende Asn y Gln;

Xaa₃ es un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que comprende Lys, His, Asn, Gln y Arg

Xaa₄ es un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que comprende Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe e Ile;

Xaa₅ es un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que comprende Ala, Val, Leu, Ser e Ile;

Xaa₆ es un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp,

Xaa₇ es un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp.

En particular, se proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo, que reconoce y se une por lo menos un sitio de unión distinto, particularmente a por lo menos dos sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide donde el dicho por lo menos uno o dichos por lo menos dos sitios de unión distintos comprenden por lo menos un residuo de aminoácido y por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, respectivamente, predominantemente involucrado en la unión del anticuerpo donde, en una realización específica de la invención, el por lo menos un residuo que constituye el primer sitio de unión distinto es Leu y los por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, que constituyen el segundo sitio de unión distinto, son -Phe-Phe- incluidos en la siguiente secuencia nuclear :

- Xaa₁ - Xaa₂ - Xaa₃ - Leu - Xaa₄ - Phe - Phe - Xaa₅ - Xaa₆ - Xaa₇ -

donde

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

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

Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Lys, His, Asn, Gln y Arg

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

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

Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp,

Xaa₇ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp.

En otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo, donde

Xaa₁ is His o Arg, pero particularmente His;

Xaa₂ is Gln o Asn, pero particularmente Gln;

Xaa₃ is Lys o Arg, pero particularmente Lys

Xaa₄ is Val o Leu, pero particularmente Val;

Xaa₅ is Ala o Val, pero particularmente Ala;

Xaa₆ is Glu o Asp, pero particularmente Glu; y

Xaa₇ is Asp o Glu, pero particularmente Asp.

En otro aspecto la invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a por lo menos un sitio de unión distinto, particularmente a por lo menos dos sitios de unión distintos, más particularmente a por lo menos tres sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide, donde dicho uno o por lo menos dos o por lo menos tres sitios de unión distintos, cada uno comprende por lo menos uno, particularmente por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos predominantemente involucrados en la unión del anticuerpo.

En particular, el anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la invención se une a por lo menos dos sitios de unión distintos en la proteína β -amiloides, donde dichos por lo menos dos sitios de unión distintos comprenden cada uno por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos involucrados predominantemente en la unión del anticuerpo, donde dichos por lo menos dos sitios de unión distintos están localizados en estrecha proximidad entre sí en el antígeno, separados por lo menos por un residuo de aminoácido no involucrado en la unión del anticuerpo o en una medida significativamente menor en comparación con dichos por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, de este modo se forma un epítopo discontinuo conformacional.

En otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con la invención, que reconoce y se une a por lo menos un sitio de unión distinto, particularmente a por lo menos dos sitios de unión distintos, más particularmente a por lo menos tres sitios de unión distintos en la proteína β -amiloides donde dicho sitio de unión comprende por lo menos uno y por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos respectivamente, involucrados predominantemente en la unión del anticuerpo, donde por lo menos uno y por lo menos los dos aminoácidos consecutivos, que están separados por lo menos por un residuo de aminoácido no involucrado en la unión del anticuerpo o en una medida significativamente menor en comparación con los residuos de aminoácidos involucrados predominantemente en la unión del anticuerpo son -His- y -Lys-Leu-, respectivamente, incluidos dentro de la siguiente secuencia del núcleo:

- His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃- Xaa₄- Xaa₅-Xaa₆- - Xaa₇ - Xaa₈ -

la presente memoria

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

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

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

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

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

Xaa₇ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp,

Xaa₈ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp

menor en comparación con el sitio de unión de unión de -His- y -Lys-Leu-.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a por lo menos un sitio de unión distinto, particularmente a por lo menos dos sitios de unión distintos, más particularmente a por lo menos tres sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide donde dichos sitios de unión distintos comprenden por lo menos uno y por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos respectivamente, involucrados predominantemente en la unión del anticuerpo, donde por lo menos los dos residuos de aminoácidos consecutivos que representan un primer sitio de unión son -Phe-Phe- y por lo menos un residuo de aminoácido está -His- incluido dentro de la secuencia nuclear :

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

donde

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

Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Asn y Gln

Xaa₄ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende His, Asn, Gln, Lys y Arg

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

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

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

Xaa₈ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp,

Xaa₉ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp, y donde dichos residuos de aminoácidos Xaa₁, Xaa₃, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈ y Xaa₉, no están involucrados en la unión del anticuerpo o en una medida significativamente menor en comparación con el sitio de unión de His y -Phe-Phe-.

En una realización específica de la invención, el primero de por lo menos los dos residuos de aminoácidos consecutivos involucrados predominantemente en la unión del anticuerpo incluyen a -Lys- y -Leu-, y el segundo de por lo menos los dos residuos de aminoácidos consecutivos involucra a -Phe-Phe- incluidos dentro de la secuencia nuclear ::

- Xaa₁ - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₄ - Phe - Phe - Xaa₅ - Xaa₆ - Xaa₇ -,
donde

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

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

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

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

Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp,

Xaa₇ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp, y donde dichos residuos de aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇ no están involucrados en la unión del anticuerpo o en una medida significativamente menor en comparación con el sitio de -Lys-Leu y -Phe-Phe-.

En otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo, donde

Xaa₁ es His o Arg, pero particularmente His;

Xaa₂ es Gln o Asn, pero particularmente Gln;

Xaa₄ es Val o Leu, pero particularmente Val;

Xaa₅ es Ala o Val, pero particularmente Ala;

Xaa₆ es Glu o Asp, pero particularmente Glu; y

Xaa₇ es Asp o Glu, pero particularmente Asp.

En una realización adicional de la invención, el anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la invención se une a por lo menos tres sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide donde dichos por lo menos tres sitios de unión distintos comprende por lo menos un residuo de aminoácido y por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, respectivamente tales residuos están

involucrados predominantemente en la unión del anticuerpo, donde dichos por lo menos tres sitios de unión distintos están localizados en estrecha proximidad entre sí en el antígeno, separado en por lo menos un residuo de aminoácido no involucrados en la unión del anticuerpo o en una medida significativamente menor en comparación con dicho por lo menos un residuo de aminoácido y dicho por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos respectivamente, de este modo se forma un epítopo discontinuo conformacional.

En una realización específica de la invención, el primero de por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos involucrados predominantemente en la unión del anticuerpo incluye -Lys-Leu- y el segundo de por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos incluye -Phe-Phe-, y el tercer por lo menos un residuo de aminoácido incluye -His- incluido dentro de la secuencia nuclear :

-His - Xaa₂ - Lys - Leu -Xaa₄ - Phe - Phe - Xaa₅-Xaa₆- Xaa₇ -,

donde

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

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

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

Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp,

Xaa₇ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp, y donde dichos residuos de aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇ no están involucrados en la unión del anticuerpo o en una medida significativamente menor en comparación con el sitio de unión de -His-, the -Lys-Leu, y -Phe-Phe-.

En otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo, donde

Xaa₂ es Gln o Asn, pero particularmente Gln;

Xaa₄ es Val o Leu, pero particularmente Val;

Xaa₅ es Ala o Val, pero particularmente Ala;

Xaa₆ es Glu o Asp, pero particularmente Glu; y

Xaa₇ es Glu o Asp, pero particularmente Asp;

En una realización específica de la invención, el primero de por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos involucrados predominantemente en la unión del anticuerpo incluyen -Lys-Leu-, y el segundo de por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos incluyen -Phe-Phe-, y el tercer por lo menos un residuo de aminoácido -Asp- incluido dentro de la secuencia nuclear:

- Xaa₁ - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₄ - Phe - Phe - Xaa₅ - Xaa₆ - Asp -,

donde

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

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

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

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

Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp, y donde dichos residuos de aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇ no están involucrados en la unión del anticuerpo o en una medida significativamente menor en comparación con el sitio de unión -Asp-, -Lys-Leu, y -Phe -Phe-.

En otra realización de la invención se proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo, donde

Xaa₁ es His o Arg, pero particularmente His;

Xaa₂ es Gln o Asn, pero particularmente Gln;

Xaa₄ es Val o Leu, pero particularmente Val;

Xaa₅ es Ala o Val, pero particularmente Ala; y

Xaa₆ es Glu o Asp, pero particularmente Glu.

En una realización específica adicional de la invención, se proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con la invención, que se une a 4 sitios de unión distintos de la proteína β -amilolide donde dichos 4 sitios de unión distintos comprende un residuo de aminoácido y dos residuos de aminoácidos consecutivos respectivamente, tales residuos están involucrados predominantemente en la unión del anticuerpo, donde dichos 4 sitios de unión distintos están localizados en estrecha proximidad entre sí en el antígeno, separado en por lo menos un residuo de aminoácido no involucrado en la unión del anticuerpo o en una medida significativamente menor en comparación con dicho residuo de aminoácido y dichos dos residuos de aminoácidos consecutivos de los 4 sitios de unión distintos de este modo se forma un epítopo discontinuo conformacional.

En particular, el primero de los dos residuos de aminoácidos consecutivos involucrados predominantemente en la unión del anticuerpo es -Lys-Leu-, y el segundo de los por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos son -Phe-Phe-, el primero de los residuos de aminoácido único es -His- y el segundo de los residuos de aminoácido único es -Asp- incluido dentro de la secuencia nuclear:

- His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₄ - Phe - Phe - Xaa₅ - Xaa₆ - Asp - ,

donde

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

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

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

Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp, y donde dichos residuos de aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇ no están involucrados en la unión del anticuerpo o en una medida significativamente menor en comparación con el sitio de unión -His-, -Asp-, -Lys-Leu, y -Phe-Phe-.

En una realización específica de la invención, los sitios de reconocimiento y unión como se definió anteriormente en la presente memoria están formando un epítopo discontinuo conformacional localizado en una región de la proteína β -amiloide entre el residuo de aminoácido 12 a 24, particularmente entre los residuos 14 a 23, más particularmente entre los residuos de aminoácidos 14 y 20, donde los tres sitios de reconocimiento y unión que comprenden 1 y 2 residuos de aminoácidos, respectivamente están localizados en la posición 16, 17, y en la posición 19 y 20, y en la posición 14, respectivamente, tales residuos están predominantemente involucrados en la unión de la proteína β -amiloide y donde dichos tres sitios de reconocimiento y unión están separados por un residuo de aminoácido localizado en la posición 15 y 18, respectivamente, tales aminoácidos no están involucrados en la unión del antígeno o por lo menos en un grado sustancialmente menor.

En una realización específica, dichos residuos de aminoácidos consecutivos, particularmente -Lys-Leu- en la posición 16 y 17 y -Phe-Phe- en

las posiciones 19 y 20, los cuales están predominantemente involucrados en la unión de la proteína β -amiloide, están incluidos en la siguiente región del núcleo:

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

En una realización específica, dichos residuos de aminoácidos consecutivos, particularmente -Lys- en la posición 16, -Leu- en la posición 17 y -Phe-Phe- en las posiciones 19 y 20, e -His- en la posición 14, los cuales están predominantemente involucrados en la unión de la proteína β -amiloide, están incluidos en la siguiente región del núcleo:

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

En una realización específica de la invención, el anticuerpo de acuerdo con la invención se origina contra un fragmento del antígeno que no contiene dicho sitio de unión distinto.

Este cambio en al región epitópica puede haber sido causado por lo menos parcialmente por el uso de una construcción antigénica supramolecular que comprende un péptido antigénico correspondiente a la secuencia de aminoácidos del péptido β -amiloide, particularmente del péptido β amiloide $A\beta_{1-16}$, modificado con un residuo hidrofílico tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), donde dicho residuo hidrofílico está unido en forma covalente a cada uno de los términos del péptido antigénico mediante por lo menos uno, particularmente uno o dos aminoácidos tal como, por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisteína o cualquier otro aminoácido o análogo del aminoácido capaz de servir como un dispositivo conector para acoplar el residuo hidrofílico al fragmento del péptido como se describe en la presente memoria a continuación en el proceso de inmunización.

Cuando se usa PEG como residuo hidrofílico, los términos de PEG libres están unidos en forma covalente a fosfatidiletanolamina o cualquier otro compuesto adecuado para funcionar como elemento de anclaje, por ejemplo, para incluir la construcción antigénica en la bicapa de un liposoma como se describe en la presente memoria.

Asimismo el uso del lípido A como parte del protocolo de inmunización puede haber contribuido al cambio en la región epitópica.

En una realización específica de la invención se proporciona un anticuerpo que comprende la región variable de cadena liviana (LCVR) de la SEC ID NO: 7.

En otra realización específica, la invención se refiere a la región variable de cadena liviana (LCVR) de la SEC ID NO: 7.

En otra realización específica aun de la invención, se proporciona un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada (HCVR) de la SEC ID NO: 8.

En una realización específica adicional, la invención se refiere a la región variable de cadena pesada (HCVR) de la SEC ID NO: 8.

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo que comprende tanto la región variable de la cadena pesada de la SEC ID NO: 8 y la región variable de la cadena liviana de la SEC ID NO: 7.

Asimismo parte de la invención es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena liviana (LCVR) o región variable de cadena pesada (HCVR) o ambas, una región variable de cadena liviana (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR) que es homóloga a cualquier a de los péptidos proporcionados en las SEC ID NO: 7 y 8, respectivamente.

En particular, la invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con la presente invención y como se describió antes en la presente memoria, donde la región variable de cadena liviana (LCVR) tiene una

secuencia de aminoácido que es 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia dada en la SEC ID NO: 7.

Además, la invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo, de acuerdo con la presente invención y como se describió antes en la presente memoria donde la región variable de cadena pesada (HCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia dada en la SEC ID NO: 8.

Además, la invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo, de acuerdo con la presente invención y como se describió antes en la presente memoria donde la región variable de cadena liviana (LCVR) y la región variable de cadena pesada (HCVR) juntas tienen una secuencia de aminoácidos que es 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia dada en las SEC ID NOs: 7 y 8.

En otra realización específica la invención se refiere a región variable de cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos que es 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia dada en la SEC ID NO: 7.

En una realización específica adicional, la invención se refiere a la región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia dada en la SEC ID NO: 8.

En otra realización de la invención, se proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de acuerdo con la invención como se describió anteriormente en la presente memoria.

En particular, la invención se refiere a un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de acuerdo con la invención que comprende

a) por lo menos la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena liviana de la SEC ID NO: 9

b) una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos (a) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético

c) la secuencia complementaria con (a) y (b) o

d) un fragmento de una secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c) que comprende una extensión contigua de nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en por lo menos 20 nucleótidos contiguos, por lo menos 25 nucleótidos contiguos, por lo menos 30 nucleótidos contiguos, por lo menos 35 nucleótidos contiguos, por lo menos 40 nucleótidos contiguos, por lo menos 45 nucleótidos contiguos y por lo menos 50 nucleótidos contiguos.

En otra realización, la invención se refiere a un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de acuerdo con la invención que comprende

a) por lo menos la secuencia de nucleótidos de la cadena liviana de la SEC ID NO: 10

b) una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos of (a) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético

c) la secuencia complementaria con (a) y (b) o

d) un fragmento de una secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c) que comprende una extensión contigua de nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en por lo menos 20 nucleótidos contiguos, por lo menos 25 nucleótidos contiguos, por lo menos 30 nucleótidos contiguos, por lo menos 35 nucleótidos contiguos, por lo menos 40 nucleótidos contiguos, por lo menos 45 nucleótidos contiguos y por lo menos 50 nucleótidos contiguos .

En otra realización aún, la invención se refiere a un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de acuerdo con la invención que comprende

a) por lo menos la secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada de la SEC ID NO: 11.

b) una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos de la (a) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético

c) la secuencia complementaria con (a) y (b) o

d) un fragmento de una secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c) que comprende una extensión contigua de nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en por lo menos 20 nucleótidos contiguos, por lo menos 25 nucleótidos contiguos, por lo menos 30 nucleótidos contiguos, por lo menos 35 nucleótidos contiguos, por lo menos 40 nucleótidos contiguos, por lo menos 45 nucleótidos contiguos y por lo menos 50 nucleótidos contiguos.

En otra realización aún, la invención se refiere a un polinucleótido que comprende secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de acuerdo con la invención que comprende

a) por lo menos la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de la SEC ID NO: 12 o la secuencia complementaria

b) una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos de la (a) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético

c) la secuencia complementaria con (a) y (b) o

d) un fragmento de una secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c) que comprende una extensión contigua de nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en por lo menos 20 nucleótidos contiguos, por lo menos 25 nucleótidos

contiguos, por lo menos 30 nucleótidos contiguos, por lo menos 35 nucleótidos contiguos, por lo menos 40 nucleótidos contiguos, por lo menos 45 nucleótidos contiguos y por lo menos 50 nucleótidos contiguos.

También está comprendido por la invención un polinucleótido que comprende

a) la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 9 que codifica la región variable de la cadena liviana

b) una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos de la (a) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético

c) la secuencia complementaria con (a) y (b) o

d) un fragmento de una secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c) que comprende una extensión contigua de nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en por lo menos 20 nucleótidos contiguos, por lo menos 25 nucleótidos contiguos, por lo menos 30 nucleótidos contiguos, por lo menos 35 nucleótidos contiguos, por lo menos 40 nucleótidos contiguos, por lo menos 45 nucleótidos contiguos y por lo menos 50 nucleótidos contiguos.

También está comprendido por la invención un polinucleótido que comprende

a) la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 10 que codifica la cadena liviana.

b) una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos de la (a) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético

c) la secuencia complementaria con (a) y (b) o

d) un fragmento de una secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c) que comprende una extensión contigua de nucleótidos seleccionados del grupo que

consiste en por lo menos 20 nucleótidos contiguos, por lo menos 25 nucleótidos contiguos, por lo menos 30 nucleótidos contiguos, por lo menos 35 nucleótidos contiguos, por lo menos 40 nucleótidos contiguos, por lo menos 45 nucleótidos contiguos y por lo menos 50 nucleótidos contiguos.

También está comprendido por la invención un polinucleótido que comprende

a) la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 11 que codifica la región variable de cadena pesada

b) una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos de la (a) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético

c) la secuencia complementaria con (a) y (b) o

d) un fragmento de una secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c) que comprende una extensión contigua de nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en por lo menos 20 nucleótidos contiguos, por lo menos 25 nucleótidos contiguos, por lo menos 30 nucleótidos contiguos, por lo menos 35 nucleótidos contiguos, por lo menos 40 nucleótidos contiguos, por lo menos 45 nucleótidos contiguos y por lo menos 50 nucleótidos contiguos.

También está comprendido por la invención un polinucleótido que comprende

a) la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 12 que codifica la cadena pesada

b) una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos de la (a) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético

c) la secuencia complementaria con (a) y (b) o

d) un fragmento de una secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c) que comprende una extensión contigua de nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en por lo menos 20 nucleótidos contiguos, por lo menos 25 nucleótidos contiguos, por lo menos 30 nucleótidos contiguos, por lo menos 35 nucleótidos contiguos, por lo menos 40 nucleótidos contiguos, por lo menos 45 nucleótidos contiguos y por lo menos 50 nucleótidos contiguos.

En una realización adicional, la invención se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos que hibridiza a

a. una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención y como la dada en las SEC ID NOs: 9, 10, 11 y 12, respectivamente ,

b. una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos de la (a) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético

c. la secuencia complementaria con (a) y (b) o

d. un fragmento de una secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c) que comprende una extensión contigua de nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en por lo menos 20 nucleótidos contiguos, por lo menos 25 nucleótidos contiguos, por lo menos 30 nucleótidos contiguos, por lo menos 35 nucleótidos contiguos, por lo menos 40 nucleótidos contiguos, por lo menos 45 nucleótidos contiguos y por lo menos 50 nucleótidos contiguos.

En particular, la invención se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos que hibridiza en condiciones de hibridación convencional, particularmente en condiciones de hibridación rigurosas, a una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención y como la dada en las SEC ID NOs: 9, 10, 11 y 12, respectivamente, particularmente a la cadena complementaria de la misma.

En una realización adicional, la invención se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos que hibridiza a una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la

presente invención y como la dada en las SEC ID NOs: 9, 10, 11 y 12, respectivamente, particularmente a la cadena complementaria de la misma, en condiciones de hibridación convencional en las cuales se usa SSPE 5x, SDS 1% , solución de Denhardt 1x como solución y/o temperaturas de hibridación entre 35°C y 70°C, con preferencia 65°C. Después de la hibridación, el lavado se realiza con preferencia primero con SSC 2x, SDS 1% y posteriormente con SSC 0,2x a temperaturas entre 35°C y 70°C, con preferencia a 65°C (con respecto a la definición de SSPE, SSC y solución de Denhardt (ver Sambrook et al. loc. cit.).

En particular, la invención se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos que hibridiza a una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención y como la dada en SEC ID NOs: 9, 10, 11 y 12, respectivamente, particularmente a la cadena complementaria de la misma, en condiciones de hibridación rigurosas como por ejemplo se describen en Sambrook et al, supra, más particularmente en condiciones de hibridación rigurosas donde la hibridación y lavado se producen a 65°C como se indicó anteriormente.

En una realización específica la presente invención proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, particularmente un anticuerpo bifuncional monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por una línea celular del hibridoma seleccionada del grupo que consiste en FP 12H3, FP 12H3-C2, y FP 12H3-G2 depositadas el 1 de diciembre de 2005 y el 9 de diciembre de 2005, respectivamente, como DSM ACC2752, DSM ACC 2750 y DSM ACC2751, respectivamente .

Más particularmente, la invención se refiere a un anticuerpo que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo producido por la línea celular del hibridoma FP 12H3, depositados el 1 de

diciembre de 2005 y el 9 de diciembre de 2005, respectivamente como DSM ACC2752.

Más particularmente, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo producido por la línea celular del hibridoma FP 12H3-C2, depositados el 1 de diciembre de 2005 y el 9 de diciembre de 2005, respectivamente como DSM ACC2750.

Más particularmente, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo producido por la línea celular del hibridoma FP 12H3-G2, depositados el 1 de diciembre de 2005 y el 9 de diciembre de 2005, respectivamente como DSM ACC2751.

En otra realización específica la presente invención proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente a anticuerpo monoclonal, particularmente un anticuerpo bifuncional monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular del hibridoma ET 7E3 depositado el 8 de diciembre de 2005 como DSM ACC2755.

Más particularmente, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo producido por la línea celular del hibridoma ET 7E3, depositado el 8 de diciembre de 2005 como DSM ACC2755.

En otra realización específica, la presente invención proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, particularmente un anticuerpo bifuncional monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes

funcionales del mismo, tal anticuerpo tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular del hibridoma EJ 7H3 depositado el 8 de diciembre de 2005 como DSM ACC2756.

Más particularmente, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo producido por la línea celular del hibridoma EJ 7H3, depositado el 8 de diciembre de 2005 como DSM ACC2756.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar métodos y composiciones que comprenden un anticuerpo de acuerdo con la invención y como se describió antes en la presente memoria para la prevención y/o tratamiento terapéutico y/o alivio de los efectos de enfermedades y trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o proteínas de tipo amiloide que incluyen amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide que incluye la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tal como enfermedades que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tal como enfermedad de Alzheimer (AD) que incluyen enfermedades o afecciones caracterizadas por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam; además de otras enfermedades que se basan o asocian con proteínas de tipo amiloide tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionado con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), miositis con cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de comienzo adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos que incluyen degeneración macular, por ejemplo, por inmunización

pasiva de un ser humano o animal con un anticuerpo de acuerdo con la invención y como se describió anteriormente en la presente memoria .

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método de usar un anticuerpo monoclonal y/o una parte funcional del mismo de acuerdo con la invención y composiciones que comprenden un anticuerpo de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente memoria para la intervención en el diagnóstico y terapéutica de las enfermedades y trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o proteínas de tipo amiloide que incluyen amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide que incluye la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tales como enfermedades que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tal como enfermedad de Alzheimer (AD) que incluyen enfermedades o afecciones caracterizadas por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam; además de otras enfermedades que se basan o asocian con proteínas de tipo amiloide tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionado con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), miositis con cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de comienzo adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos y otros que incluyen degeneración macular,

En particular, un objeto de la presente invención es proporcionar un método de uso de un anticuerpo monoclonal y/o una parte funcional del mismo de acuerdo con la invención y composiciones que comprenden un anticuerpo, particularmente un anticuerpo biespecífico y bi-efectivo pero especialmente un anticuerpo monoclonal biespecífico y bi-efectivo de acuerdo con la invención y

como se describió antes en la presente memoria para reducir y prevenir la aparición de trastornos neurológicos, que incluyen pero sin limitación la enfermedad de Alzheimer.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención comprenden un anticuerpo, particularmente un anticuerpo biespecífico y bi-efectivo de acuerdo con la invención y como se describió antes en la presente memoria que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, particularmente en una cantidad terapéuticamente efectiva o, más particularmente, un anticuerpo monoclonal, especialmente un anticuerpo monoclonal biespecífico y bi-efectivo, de acuerdo con la invención y como se describió antes en la presente memoria, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, particularmente en una cantidad terapéuticamente efectiva y opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

Particularmente, la composición de acuerdo con la presente invención comprende un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo es capaz de inhibir la agregación de los péptidos amiloides monoméricos, específicamente los péptidos β amiloides monoméricos tal como, por ejemplo, los péptidos $A\beta$ monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente los péptidos $A\beta_{1-42}$ monoméricos, en fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular y opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

En una realización adicional de la invención se proporciona una composición que comprende un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo, después de la co-incubación,

particularmente después de la co-incubación con una relación de concentraciones molares de hasta 1:100, más particularmente con una relación de concentraciones molares de entre 1:30 y 1:100, pero especialmente con una relación de concentraciones molares de 1:100, con péptidos amiloides monoméricos, particularmente los péptidos β amiloides monoméricos tal como, por ejemplo, los péptidos $A\beta$ monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente los péptidos $A\beta_{1-42}$ monoméricos, inhibe la agregación de los monómeros de $A\beta$ en fibrillas o filamentos poliméricos de alto peso molecular. En particular, dicha inhibición llega a por lo menos 50%, particularmente a por lo menos 65%, más particularmente a por lo menos 75%, aún más particularmente a por lo menos 80%, pero especialmente a por lo menos 85%-90%, o más en comparación con los monómeros del péptido amiloide respectivo incubado en buffer (control) y, opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

En particular, la co-incubación del anticuerpo de acuerdo con la invención con los péptidos amiloides monoméricos se lleva a cabo durante 48 horas a una temperatura de 37°C.

La inhibición de la agregación potencial del anticuerpo de acuerdo con la invención se puede determinar por ultracentrifugación por gradiente de densidad seguida por el análisis por sedimentación SDS-PAGE con un gradiente preestablecido y/o por un ensayo de tioflavina T (Th-T) fluorescente.

La presente invención además proporciona una composición que comprende un anticuerpo que es capaz de desagregar fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular formados por la agregación de los péptidos amiloides monoméricos, específicamente los péptidos β amiloides monoméricos tal como, por ejemplo, los péptidos $A\beta$ monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente los péptidos $A\beta_{1-42}$ monoméricos y,

opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

Mediante la desagregación de las fibrillas o filamentos poliméricos amiloidogénicos, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención son capaces de prevenir o disminuir la formación de placas amiloides que conducen a un alivio de los síntomas asociados con la enfermedad y un retraso o reversión de su avance.

En otra realización de la invención se proporciona una composición que comprende un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo después de la co-incubación con una relación de concentraciones molares de entre 1:30 y 1:100, particularmente con una relación de 1:100, con las h fibrillas o filamentos preformados poliméricos de alto peso molecular formados por la agregación de péptidos amiloides monoméricos, particularmente los péptidos β amiloides monoméricos tal como, por ejemplo, los péptidos A β monoméricos 1-39, 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente los péptidos A β ₁₋₄₂ monoméricos, particularmente después de la co-incubación durante 24 horas a una temperatura de 37°C, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en por lo menos 35%, particularmente en por lo menos 40%, más particularmente en por lo menos 50%, aún más particularmente en por lo menos 60%, pero especialmente en por lo menos 70% o más y opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

La desagregación potencial del anticuerpo de acuerdo con la invención se puede determinar por ultracentrifugación por gradiente de densidad seguida por el análisis por sedimentación SDS-PAGE con un gradiente preestablecido y/o por un ensayo de tioflavina T (Th-T) fluorescente.

La presente invención además proporciona una composición que comprende un anticuerpo o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo es sensible desde el punto de vista de la conformación, particularmente en una cantidad efectiva, más particularmente en una cantidad terapéuticamente efectiva.

En una realización adicional de la invención se proporciona una composición que comprende un anticuerpo, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo después de la co-incubación con fibrillas o filamentos preformados poliméricos de alto peso molecular formados por la agregación de los péptidos amiloides monoméricos, particularmente los péptidos β amiloides monoméricos tal como, por ejemplo, los péptidos $A\beta$ monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente los péptidos $A\beta_{1-42}$ monoméricos, particularmente después de la co-incubación durante 24 horas a una temperatura de 37°C, es capaz de inducir una transición de la conformación lámina β hacia una conformación de α -hélice y/o de arrollamiento al azar, pero particularmente una conformación de arrollamiento al azar, aún más particularmente una conformación de arrollamiento al azar en una localización dada en la molécula, especialmente en el ambiente de Val12 de la proteína $A\beta$, que conduce a un aumento de la conformación de arrollamiento al azar a expensas de la conformación lámina β y una solubilización mejorada de las fibrillas o filamentos preformados poliméricos de alto peso molecular y opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico. En particular, la disminución de la conformación lámina β llega a por lo menos 30%, particularmente a por lo menos 35%, y más particularmente a por lo menos 40% y más en comparación con las fibrillas o filamentos amiloides poliméricos preformados respectivos incubados en buffer (control).

El potencial del anticuerpo para inducir una transición de la estructura secundaria se determina por espectroscopia RMN ^{13}C en estado sólido pero, en particular, por la medición de las intensidades integrales de las conformaciones de Val 12 C β del péptido A β_{1-42} .

La presente invención además proporciona una composición que comprende un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, particularmente en una cantidad terapéuticamente efectiva, tal anticuerpo es bifuncional o sea que exhibe tanto una propiedad de inhibición de la agregación además de una propiedad de desagregación como se definió anteriormente en la presente memoria, con preferencia apareado con un alto grado de sensibilidad conformacional y opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

En otra realización aún de la invención se proporciona una composición que comprende un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo bifuncional monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo después de la co-incubación con péptidos amiloides monoméricos, particularmente los péptidos β amiloides monoméricos tal como, por ejemplo, los péptidos A β monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente los péptidos A β_{1-42} monoméricos, inhibe la agregación de los monómeros de A β en fibrillas poliméricas de alto peso molecular y ,además, después de la co-incubación con fibrillas o filamentos preformados poliméricos de alto peso molecular formado por la agregación de péptidos amiloides monoméricos, particularmente los péptidos β amiloides monoméricos tal como, por ejemplo, los péptidos A β monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente los péptidos A β_{1-42} monoméricos, es capaz

de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados y opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

En una realización específica de la invención la co-incubación del anticuerpo del anticuerpo bifuncional de acuerdo con la invención, pero especialmente del anticuerpo bifuncional monoclonal de acuerdo con la invención con péptidos amiloides monoméricos y fibrillas o filamentos preformados poliméricos de alto peso molecular, respectivamente se produce con una relación de concentraciones molares de hasta 1:100, particularmente con una relación entre 1:30 y 1:100, y más particularmente con una relación de 1:100.

En una realización específica adicional de la invención la co-incubación con péptidos amiloides monoméricos y fibrillas o filamentos preformados poliméricos de alto peso molecular se realiza durante 48 horas y 24 horas, respectivamente a una temperatura de 37°C.

En otra realización específica aún de la invención se proporciona una composición que comprende un anticuerpo bifuncional de acuerdo con la invención, pero especialmente un anticuerpo bifuncional monoclonal de acuerdo con la invención que es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en por lo menos 10%, particularmente en por lo menos 25%, más particularmente en por lo menos 35%, aún más particularmente en por lo menos 50%, pero especialmente en por lo menos 60-70% o más y opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

En otra realización específica aún de la invención se proporciona una composición que comprende un anticuerpo bifuncional de acuerdo con la invención, pero especialmente un anticuerpo bifuncional monoclonal de acuerdo con la invención, inhibe la agregación de péptidos amiloides monoméricos particularmente los péptidos β amiloides monoméricos tal como, por ejemplo, los péptidos A β monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente los

péptidos A β ₁₋₄₂ monoméricos en por lo menos 50%, particularmente en por lo menos 65%, más particularmente en por lo menos 75%, aún más particularmente en por lo menos 80%, pero especialmente en por lo menos 85-90%, o más en comparación con los monómeros del péptido amiloide respectivo incubado en buffer (control) y opcionalmente un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

En particular, la presente invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo media la inhibición de la polimerización de los péptidos amiloides monoméricos, específicamente los péptidos β amiloides monoméricos tal como, por ejemplo, los péptidos A β monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente los péptidos A β ₁₋₄₂ monoméricos y/o induce la solubilización de fibrillas o filamentos preformados poliméricos de alto peso molecular formado por la agregación de péptidos amiloides monoméricos, particularmente péptidos β amiloides monoméricos tal como, por ejemplo, los péptidos A β monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente los péptidos A β ₁₋₄₂ monoméricos, mediante la unión específica y directa del anticuerpo a las fibras A β , que conduce a una transición de la conformación secundaria y opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

La presente invención además proporciona una composición que comprende un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluya a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo se une directa y específicamente a las fibras β -amiloides tal como, por ejemplo, fibras que comprenden péptidos A β monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente a fibras que comprenden los péptidos A β ₁₋

42 monoméricos y/o induce la solubilización de las fibrillas o filamentos preformados poliméricos de alto peso molecular que se forman por la agregación de péptidos amiloides monoméricos, particularmente los péptidos β amiloides monoméricos tal como, por ejemplo, los péptidos $A\beta$ monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente los péptidos $A\beta_{1-42}$ monoméricos por la localización y específicamente la unión a una región epitópica de la proteína β -amiloide, particularmente una región epitópica del polipéptido $A\beta$ limitado por los residuos de aminoácidos aa_n - aa_m con n como un número entero entre 2 y 15, particularmente entre 5 y 15, más particularmente entre 8 y 1, aún más particularmente entre 10 y 15 y m como un número entero entre 3 y 17, particularmente entre 6 y 17, más particularmente entre 9 y 17, aún más particularmente entre 11 y 17, donde n y m no pueden ser números idénticos y n siempre debe ser un número más pequeño que m , con la diferencia entre n y m ≥ 2 y , opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

La unión del anticuerpo de acuerdo con la invención puede inducir una transición de conformación en dicha proteína, particularmente una transición de la conformación lámina β hacia una conformación α -hélice y/o de enrollamiento al azar, pero particularmente una conformación de enrollamiento al azar, aún más particularmente una conformación de enrollamiento al azar en una localización dada en la molécula, especialmente en el ambiente de la Val12 de la proteína $A\beta$.

En una realización adicional, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo incorpora por lo menos una de las propiedades mencionadas anteriormente en la presente memoria, o sea inhibición de la agregación, desagregación, inducción de la transición de conformación,

reconocimiento de y unión directa a la región epitópica 4-16 y/o la 14 a 23, pero particularmente la 14 a 20, pero especialmente una combinación de dos o más de dichas propiedades, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

En una realización específica, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo particularmente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, particularmente un anticuerpo bifuncional monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que exhibe alta especificidad a los péptidos $A\beta_{1-42}$ monoméricos pero muestra esencialmente ninguno o solo una mínima reactividad cruzada con péptidos monoméricos $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, y/o $A\beta_{1-41}$, particularmente un anticuerpo, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo es hasta 100 veces, particularmente 50 a 100 veces, más particularmente 80 a 100 veces, pero especialmente 100 veces más sensible al péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ en comparación con $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$ y hasta 1000 veces, particularmente 500 a 1000 veces, más particularmente 800 a 1000 veces, pero especialmente 1000 veces más sensible al péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ en comparación con $A\beta_{1-38}$, y de este modo capaz de inhibir, *in vitro* e *in vivo*, la agregación de péptidos monoméricos amiloidogénicos, pero especialmente del péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ y opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

En otra realización específica de la invención se proporciona una composición que comprende un anticuerpo, particularmente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, particularmente un anticuerpo bifuncional monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que tiene una alta

sensibilidad de unión al péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ y es capaz de detectar fibras de $A\beta_{1-42}$ en una concentración por debajo de por lo menos 0,001 μg , pero particularmente en una rango de concentración de 0,5 μg y 0,001 μg , más particularmente entre 0,1 μg y 0,001 μg , pero especialmente en una concentración de 0,001 μg y opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

En una realización muy específica de la invención se proporciona una composición que comprende un anticuerpo, particularmente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, particularmente un anticuerpo bifuncional monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo es capaz de detectar fibras de $A\beta_{1-42}$ en una cantidad de fibras por debajo de una concentración mínima de 0,001 μg y fibras de $A\beta_{1-40}$ por debajo de una concentración mínima de 0,1 μg y fibras de $A\beta_{1-38}$ por debajo de una concentración mínima de 1 μg y, opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico, y donde dichos residuos de aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, no están involucrados en la unión del anticuerpo o en una medida significativamente

En una realización específica la presente invención se refiere a una composición que comprende un anticuerpo monoclonal que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo tal anticuerpo tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por una línea celular del híbrido seleccionado del grupo que consiste en FP 12H3, FP 12H3-C2, y FP 12H3-G2 depositados el 1 de diciembre de 2005 y el 9 de diciembre de 2005 respectivamente, como DSM ACC2752, DSM ACC2750 y DSM ACC2751, y opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

Más particularmente, la invención se refiere a una composición que comprende un anticuerpo monoclonal que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo producido por la línea celular del hibridoma FP 12H3, depositado el 1 de diciembre de 2005 y el 9 de diciembre de 2005 respectivamente como DSM ACC2752 y opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

Más particularmente, la invención se refiere a una composición que comprende un anticuerpo monoclonal que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo producido por la línea celular del hibridoma FP 12H3-G2, depositado el 1 de diciembre de 2005 y el 9 de diciembre de 2005 respectivamente como DSM ACC2750 y , opcionalmente un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

La invención además se refiere a una composición que comprende un anticuerpo monoclonal que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo producido por la línea celular del hibridoma FP 12H3-G2, depositado el 1 de diciembre de 2005 y el 9 de diciembre de 2005 respectivamente como DSM ACC2751 y opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

En otra realización específica, la presente invención se refiere a una composición que comprende un anticuerpo monoclonal que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular del hibridoma ET 7E3 depositado el 8 de diciembre de 2005 como DSM ACC2755 y opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

La invención además se refiere a una composición que comprende un anticuerpo monoclonal que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente

equivalente o partes funcionales del mismo producido por la línea celular del hibridoma ET 7E3, depositado el 8 de diciembre de 2005 como DSM ACC2755 y , opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

En otra realización específica, la presente invención se refiere a una composición que comprende un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, tal anticuerpo tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular del hibridoma EJ 7H3 depositado el 8 de diciembre de 2005 como DSM ACC2756 y opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

La invención además se refiere a una composición que comprende un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo producido por la línea celular del hibridoma EJ 7H3, depositado el 8 de diciembre de 2005 como DSM ACC2756 y opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

El anticuerpo, particularmente el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo se puede administrar en combinación con otras sustancias biológicamente activas y procedimientos para el tratamiento de las enfermedades. Las otras sustancias biológicamente activas pueden ser parte de la misma composición que ya comprende el anticuerpo de acuerdo con la invención, en forma de una mezcla, donde el anticuerpo y la otra sustancia biológicamente activa se entremezclan o con el mismo solvente y/o vehículo aceptable para uso farmacéutico o se puede proporcionar en forma, separada como parte de una

composición separada, que se puede ofrecer en forma separada o conjunta en forma de partes de un kit.

El anticuerpo, particularmente el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo se puede administrar al mismo tiempo con la otra sustancia o sustancias biológicamente activas, en forma intermitente o secuencial. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo se puede administrar simultáneamente con una primer sustancia biológicamente activa o en forma secuencial después o antes de la administración del anticuerpo. Si se elige un esquema de aplicación en el que se administra más de sustancia biológicamente activa adicional junto con por lo menos un anticuerpo de acuerdo con la invención, se pueden administrar parcialmente los compuestos o sustancias en forma simultánea, parcialmente en forma secuencial en diversas combinaciones.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar mezclas de anticuerpos que comprenden por lo menos un anticuerpo de acuerdo con la presente invención y opcionalmente, uno o más sustancias biológicamente activas adicionales, además de los métodos de usar anticuerpos individuales, o mezclas de los mismos que incluyen composiciones que comprenden dichos anticuerpos o mezclas de anticuerpos para la prevención y/o tratamiento terapéutico y/o alivio de los efectos de las enfermedades y trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o proteínas de tipo amiloide que incluyen amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide que incluye la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tal como enfermedades que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tal como enfermedad de Alzheimer (AD) que incluyen enfermedades

o afecciones caracterizadas por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam; además de otras enfermedades que se basan o asocian con proteínas de tipo amiloide tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionado con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), miositis con cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de comienzo adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos y otros que incluyen degeneración macular.

Las mezclas de acuerdo con la invención pueden comprender, además a un anticuerpo de acuerdo con la invención, una sustancia biológicamente activa tal como, por ejemplo, compuestos conocidos usados en la medicación de enfermedades y trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide que incluye amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con proteína amiloide o de tipo amiloide tal como la proteína A β involucrada en la enfermedad de Alzheimer.

En otra realización de la invención, la otra sustancia o compuesto biológicamente activo también puede ser un agente terapéutico que se puede usar en el tratamiento de las enfermedades y y trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide que incluye amiloidosis causada por β -amiloide se puede usar en la medicación de otros trastornos neurológicos.

La otra sustancia o compuesto biológicamente activo puede ejercer su efecto biológico por un mecanismo igual o similar al del anticuerpo de acuerdo con la invención o por un mecanismo de acción no relacionado o por una multiplicidad de mecanismos de acción relacionados y/o no relacionados.

Generalmente, el otro compuesto biológicamente activo puede incluir potenciadores de la transmisión neurónica, fármacos psicoterapéuticos, inhibidores de acetilcolina esterasa, bloqueantes de los canales de calcio, aminos biogénicas, tranquilizantes benzodiazepinas, potenciadores de la síntesis, conservación o liberación de acetilcolina, agonistas del receptor post-sináptica de acetilcolina, inhibidores de monoamina oxidasa A o B, antagonistas del receptor de N-metil-D-aspartato glutamato, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, antioxidantes y antagonistas del receptor serotoninérgico.

En particular, la mezcla de acuerdo con la invención pueden comprender por lo menos un compuesto biológicamente activo diferente seleccionado del grupo que consiste en los compuestos contra el estrés oxidativo, compuestos anti-apoptóticos, quelantes de metales, inhibidores de la reparación de ADN tal como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propansulfónico (3APS), 1,3-propandisulfonato (1,3PDS), activadores de secretasa, β - y γ -inhibidores de secretasa, proteínas tau, neurotransmisores, agentes anti-cholesterol β , moléculas antiinflamatorias o inhibidores de colinesterasa (ChEI) tal como tacrina, rivastigmina, donepezil, y/o galantamina y otros fármacos y suplementos nutritivos, junto con un anticuerpo de acuerdo con la presente invención y opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o un excipiente aceptable para uso farmacéutico.

En una realización adicional, la mezclas de acuerdo con la invención pueden comprender niacina o memantina junto con un anticuerpo de acuerdo con la presente invención y, opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

En otra realización aún de la invención se proporcionan las mezclas que comprenden "antipsicóticos atípicos" tal como, por ejemplo clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina para el tratamiento de los síntomas

psicóticos positivos y negativos que incluyen alucinaciones, delirios, trastornos del pensamiento (manifestado por incoherencia marcada, descarrilamiento, tangencialidad), y conducta extraña o desorganizada, además de anhedonia, bloqueo afectivo, apatía y aislamiento social junto con un anticuerpo de acuerdo con la invención y, opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

En una realización específica de la invención, las composiciones y mezclas de acuerdo con la invención y como se describió antes en la presente memoria comprenden el anticuerpo y la sustancia biológicamente activa, respectivamente, en una cantidad terapéuticamente efectiva.

Otros compuestos que se pueden usar en forma adecuada en mezclas en combinación con el anticuerpo de acuerdo con la presente invención están, por ejemplo, descritas en WO 2004/058258 (ver especialmente las páginas 16 y 17) que incluyen blancos de fármacos terapéuticos (página 36-39), ácidos alcanosulfónicos y ácido alcanosulfúrico (páginas 39-51), inhibidores de colinesterasa (páginas 51-56), antagonistas del receptor de NMDA (páginas 56-58), estrógenos (páginas 58-59), fármacos anti-inflamatorios no esteroides (páginas 60-61), antioxidantes (páginas 61-62), agonistas del receptor activado por los proliferadores de peroxisoma (PPAR) (páginas 63-67), agentes reductores de colesterol (páginas 68-75); inhibidores de amiloide (páginas 75-77), inhibidores de la formación de amiloide (páginas 77-78), quelantes de metal (páginas 78-79), anti-psicóticos y anti-depresivos (páginas 80-82), suplementos nutricionales (páginas 83-89) y compuestos que aumentan la disponibilidad de las sustancias biológicamente activas del cerebro (ver páginas 89-93) y profármacos (páginas 93 y 94), tales documentos están incorporados en la presente memoria como referencias.

Además se proporciona un método para producir un anticuerpo, particularmente un método para producir un anticuerpo monoclonal, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con la invención, tal método comprende originar compuestos pero particularmente anticuerpos monoclonales contra una construcción antigénica supramolecular que comprende un péptido antigénico correspondiente a la secuencia de aminoácidos del péptido β -amiloide, particularmente del péptido β amiloide $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-16}$ y $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$, modificado con residuos hidrofóbicos tal como, por ejemplo, ácido palmítico o un residuo hidrofílico tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o una combinación de ambos, donde dicho residuo hidrofóbico e hidrofílico, respectivamente, está unido en forma covalente a cada término mediante por lo menos uno, particularmente uno o dos aminoácidos tal como, por ejemplo, lisina o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado capaz de actuar como dispositivo de acoplamiento o molécula ligadora para el acoplamiento de dicho residuo hidrofóbico e hidrofílico tal como, por ejemplo, ácido glutámico o cisterna.

También es parte de la invención el uso de un anticuerpo monoclonal y/o una parte funcional del mismo de acuerdo con la invención y como se describió antes en la presente memoria y/o una composición farmacéutica o una mezcla que comprende dicho anticuerpo, para la preparación de un medicamento para tratar o aliviar los efectos de las enfermedades y trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o proteínas de tipo amiloide que incluyen amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide que incluye la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tal como enfermedades que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tal como enfermedad de Alzheimer (AD) que incluyen enfermedades o afecciones caracterizadas por la pérdida de la capacidad de

memoria cognitiva tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam; además de otras enfermedades que se basan o asocian con proteínas de tipo amiloide tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionado con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), miositis con cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de comienzo adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos y otros que incluyen degeneración macular.

En otra realización de la presente invención se proporciona un método para la preparación de una composición farmacéutica que emplea un anticuerpo de acuerdo con la invención y/o una parte funcional del mismo pero especialmente un anticuerpo monoclonal y/o una parte funcional del mismo o un anticuerpos funcionalmente equivalente para usar para tratar o aliviar los efectos de las enfermedades y trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o proteínas de tipo amiloide que incluyen amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide que incluye la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tal como enfermedades que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tal como enfermedad de Alzheimer (AD) que incluyen enfermedades o afecciones caracterizadas por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam; además de otras enfermedades que se basan o asocian con proteínas de tipo amiloide tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionado con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica),

miositis con cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de comienzo adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos y otros que incluyen degeneración macular que comprende la formulación de un anticuerpo de acuerdo con la invención en una forma aceptable para uso farmacéutico.

Los anticuerpos y/o las partes funcionales de los mismos pero especialmente los anticuerpos monoclonales y/o partes funcionales de los mismos o un anticuerpos funcionalmente equivalente y las composiciones y mezclas que comprenden dicho anticuerpo de acuerdo con la presente invención se puede usar para la preparación de un medicamento para prevenir, tratar o aliviar los efectos los efectos de las enfermedades y trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o proteínas de tipo amiloide que incluyen amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide que incluye la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tal como enfermedades que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tal como enfermedad de Alzheimer (AD) que incluyen enfermedades o afecciones caracterizadas por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam; además de otras enfermedades que se basan o asocian con proteínas de tipo amiloide tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionado con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), miositis con cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de comienzo adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos y otros que incluyen degeneración macular.

En una realización adicional de la invención se proporciona un método para reducir la carga de placa en el cerebro de un animal, particularmente un

mamífero, pero especialmente un ser humano que sufre de una enfermedad o afección que conduce a una carga de placa aumentada en el cerebro que comprende la administración a un animal, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que requiere tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo y/o una parte funcional del mismo pero especialmente del anticuerpo monoclonal y/o una parte funcional del mismo o de un anticuerpo de acuerdo con la invención funcionalmente equivalente y como se describió anteriormente en la presente memoria o una composición o una mezcla que comprende dicho anticuerpo.

En particular, la carga de placa se reduce en por lo menos 20 %, particularmente en por lo menos 25%, más particularmente en por lo menos 30%, aún más particularmente en más del 30%.

En una realización adicional de la invención un método para reducir la proporción de placas en el cerebro de un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que sufre de una enfermedad o afección que conduce a una carga de placa aumentada en el cerebro que comprende administrar a un animal, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que requiere tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo y/o una parte funcional del mismo pero especialmente del anticuerpo monoclonal y/o una parte funcional del mismo o de un anticuerpo funcionalmente equivalente de acuerdo con la invención y como se describió anteriormente en la presente memoria o una composición o una mezcla que comprende dicho anticuerpo.

En particular, la proporción de placas del cerebro se reduce en por lo menos 10 %, particularmente en por lo menos 15%, más particularmente en más del 15%..

En otra realización aún de la invención un método para disminuir la proporción total de A β soluble en el cerebro de un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que sufre de una enfermedad o afección que conduce a las concentraciones aumentadas de A β soluble en el cerebro que comprende administrar a un animal, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que requiere tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo y/o una parte funcional del mismo pero especialmente del anticuerpo monoclonal y/o una parte funcional del mismo o de un anticuerpo funcionalmente equivalente de acuerdo con la invención y como se describió anteriormente en la presente memoria o una composición o una mezcla que comprende dicho anticuerpo.

Es objeto de la presente invención proporcionar un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de las enfermedades y trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o proteínas de tipo amiloide que incluyen amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide que incluye la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tal como enfermedades que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tal como enfermedad de Alzheimer (AD) que incluyen enfermedades o afecciones caracterizadas por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam; además de otras enfermedades que se basan o asocian con proteínas de tipo amiloide tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionado con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), miositis con cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de comienzo adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos y otros que

incluyen degeneración macular, por la administración de un anticuerpo, pero particularmente un anticuerpo monoclonal o una composición o mezcla que comprende tal anticuerpo de acuerdo con la invención a un animal o a ser humano afectado por tal trastorno que comprende la administración a un animal, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que requiere tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo y/o una parte funcional del mismo pero especialmente del anticuerpo monoclonal y/o una parte funcional del mismo o de un anticuerpo funcionalmente equivalente de acuerdo con la invención y como se describió anteriormente en la presente memoria o una composición o una mezcla que comprende dicho anticuerpo

En una realización específica la invención proporciona un método de para retener o aumentar la capacidad de memoria cognitiva de un animal, particularmente un mamífero o un ser humano que padece de deterioro de la memoria por la administración a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano que requiere tal tratamiento, un anticuerpo, pero particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención o una composición o mezcla que comprende tal anticuerpo de acuerdo con la invención tal como se describió anteriormente en la presente memoria.

En otra realización de la presente invención se proporciona un método para la preparación de una composición farmacéutica que usa un anticuerpo de acuerdo con la invención y/o una parte funcional del mismo pero especialmente un anticuerpo monoclonal y/o una parte funcional del mismo o un anticuerpo funcionalmente equivalente para prevenir, tratar o aliviar los efectos de las enfermedades y trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o proteínas de tipo amiloide que incluyen amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide que incluye la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tal como

enfermedades que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tal como enfermedad de Alzheimer (AD) que incluyen enfermedades o afecciones caracterizadas por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam; además de otras enfermedades que se basan o asocian con proteínas de tipo amiloide tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionado con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), miositis con cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de comienzo adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos y otros que incluyen degeneración macular.

En una realización específica la invención proporciona un método para la preparación de una composición farmacéutica que usa un anticuerpo de acuerdo con la invención y/o una parte funcional del mismo pero especialmente un anticuerpo monoclonal y/o una parte funcional del mismo o un anticuerpo funcionalmente equivalente para retener o aumentar la capacidad cognitiva de un animal, particularmente un mamífero o un ser humano que padece de deterioro de la memoria por la administración a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano un anticuerpo, pero particularmente un anticuerpo monoclonal o una composición o mezcla que comprende tal anticuerpo de acuerdo con la invención, tal como se describió anteriormente en la presente memoria .

Estos y otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes después de una revisión de la siguiente descripción detallada de la realización descrita y las reivindicaciones anexas.

Los términos "polipéptido", "péptido", y "proteína", como se usan en la presente memoria, son indistintos y se definen como una biomolécula compuestas de aminoácidos unidos por un enlace peptídico.

Los términos "un", "una" y "el" como se usan en la presente memoria se definen como "uno o más " e incluyen el plural a menos que el contexto fuera inapropiado.

Los términos "detección" o "detectado" como se usan en la presente memoria significan el uso de técnicas conocidas para la detección de moléculas biológicas tal como métodos inmunoquímicos o histológicos y se refieren a la determinación en forma cualitativa o cuantitativa de la presencia o concentración de la biomolécula en investigación.

" β amiloide, $A\beta$ o β -amiloide" es un término reconocido en el arte y se refiere a las proteínas y péptidos β amiloides, a la proteína precursora de la β amiloide (APP), además de las modificaciones, fragmentos y cualquiera de los equivalentes funcionales de los mismos. En particular, por β amiloide, como se usa en la presente memoria, se entiende cualquier fragmento producido por la escisión proteolítica de APP pero especialmente los fragmentos que están involucrados o asociados con las patologías amiloides, que incluyen, pero sin limitación, $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$, $A\beta_{1-42}$ y $A\beta_{1-43}$.

La estructura y secuencias de los péptidos β amiloides como se mencionó anteriormente son bien conocidas por los expertos en el arte y los métodos para producir dichos péptidos o extraerlos del cerebro y otros tejidos se describen, por ejemplo, en Glenner y Wong, Biochem Biophys Res Comm 129, 885-890 (1984). Además, los péptidos β amiloides están disponibles en el comercio en varias formas.

"Fibrilla $A\beta$ " o "filamento $A\beta$ " o "fibrillas amiloides" son formas poliméricas de proteínas monoméricas que forman fibras en manojos o individuales con un diámetro de fibra constante que son insolubles en medio acuoso y contienen grandes cantidades de una estructura β cruzada en su núcleo; en su mayor parte con cadenas beta perpendiculares al eje 1,2,3 de la fibrilla)

114

"A β monomérica" o "monómero A β " son proteína β amiloide completamente solubilizada sin complejos agregados en medio acuoso.

"Amiloide soluble polimérico" y "A β oligomérico" y "oligómero A β " se refieren a monómeros agregados múltiples de péptidos amiloides o de péptidos tipo amiloide, o de péptidos amiloides truncados o modificados o de otros derivados de los péptidos amiloides, que forman estructuras oligoméricas o poliméricas que son solubles tanto *in vitro* en medio acuoso como *in vivo* en el cuerpo de mamíferos o seres humanos, más particularmente en el cerebro, pero particularmente monómeros agregados múltiples de β amiloide (A β) o de péptidos β amiloide modificados o truncados (A β) o de derivados de los mismos, que son solubles en el cuerpo de mamíferos o seres humanos, más particularmente en el cerebro, respectivamente.

Por "aislada" se entiende una molécula biológica libre de por lo menos alguno de los compuestos con que se produce en forma natural.

Los términos "anticuerpo" o "anticuerpos" como se usan en la presente memoria son términos reconocidos en el arte y se entiende que se refieren a las moléculas o fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos, particularmente a moléculas de inmunoglobulinas y a porciones inmunológicamente activas de las moléculas de inmunoglobulinas, es decir moléculas que contienen un sitio de unión que se une inmunoespecíficamente a un antígeno. La inmunoglobulina de acuerdo con la invención puede ser de cualquier tipo (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA y IgY) o clase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclases de molécula de inmunoglobulina.

Se entiende que "anticuerpos" dentro del alcance de la presente invención incluye anticuerpos monoclonales, policlonales, quiméricos, de cadena única, biespecíficos o bi-efectivos, simianizados, humanos y humanizados además de los fragmentos activos del mismo. Los ejemplos de fragmentos activos de las

moléculas que se unen a antígenos conocidos incluye los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ que incluyen los productos de una genoteca de expresión de inmunoglobulina Fab y los fragmentos de unión con el epítopo de cualquiera de los anticuerpos y fragmentos mencionados anteriormente.

Estos fragmentos activos se pueden derivar de un anticuerpo de la presente invención por varias técnicas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales purificados se pueden escindir con una enzima, tal como pepsina, y someter a filtración con gel de HPLC. La fracción apropiada que contiene los fragmentos Fab luego se pueden recoger y concentrar por filtración de membranas y similares. Para la descripción adicional de las técnicas generales para aislamiento de los fragmentos activos de los anticuerpos, ver por ejemplo, Khaw, B. A. et al. *J. Nucl. Med.* 23:1011-1019 (1982); Rousseaux et al. *Methods Enzymology*, 121:663-69, Academic Press, 1986.

Un "anticuerpos humanizado" se refiere a un tipo de anticuerpo manipulado genéticamente que tiene sus CDR derivados de una inmunoglobulina dadora no humana, las partes de la molécula derivadas de la inmunoglobulina restante deriva de una (o más) inmunoglobulina(s) humana(s). Además, los residuos del soporte de la estructura se pueden alterar para conservar la afinidad de unión. Los métodos de obtener "anticuerpos humanizados" son bien conocidos por los expertos en el arte. (ver, por ej., Queen et al., *Proc. Natl Acad Sci USA*, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al., *Bio/Technology*, 9:421 (1991)).

Un "anticuerpos humanizado" también se puede obtener por un nuevo método de ingeniería genética que permite la producción de anticuerpos policlonales similares a los humanos de afinidad madura en animales grandes tales como, por ejemplo, conejos (<http://www.rctech.com/bioventures/therapeutic.php>).

El término "anticuerpo monoclonal" también es bien conocido en el arte y se refiere a un anticuerpo producido en masa en el laboratorio a partir de un clon único y que reconoce solo un antígeno. Los anticuerpos monoclonales se preparan típicamente por fusión de una célula B productora de anticuerpos, normalmente de vida corta, a un célula de crecimiento rápido, tal como una célula cancerosa (algunas veces denominada célula "inmortal"). La célula híbrida resultante, o hibridoma, se multiplica rápidamente, crea un clon que produce grandes cantidades del anticuerpo.

Para el propósito de la presente invención, se entiende también que "anticuerpo monoclonal" comprenden a los anticuerpos producidos por un clon madre que no ha alcanzado la monoclonalidad completa.

Se entiende dentro del alcance de la presente invención que "anticuerpo funcionalmente equivalente" se refiere a un anticuerpo que comparte sustancialmente por lo menos una propiedad funcional principal con un anticuerpo mencionado anteriormente y descrito en la presente memoria que comprende: la especificidad de unión con la proteína β -amiloide, particularmente con la proteína $A\beta_{1-42}$ y más particularmente con la región epitópica 4-16 de la proteína $A\beta_{1-42}$, inmunoreactividad *in vitro*, inhibición de la agregación de los monómeros de $A\beta_{1-42}$ en fibrillas poliméricas de alto peso molecular y/o desagregación de fibrillas poliméricas $A\beta_{1-42}$ preformadas y/o una propiedad anti-lámina β y aliviar los efectos de las enfermedades y trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o proteínas de tipo amiloide que incluyen amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide que incluye la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tal como enfermedades que incluyen, pero sin limitación, trastornos neurológicos tal como enfermedad de Alzheimer (AD) que incluyen enfermedades o afecciones caracterizadas por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tal como, por

ejemplo, deterioro cognitivo leve), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam; además de otras enfermedades que se basan o asocian con proteínas de tipo amiloide tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionado con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), miositis con cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de comienzo adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos y otros que incluyen degeneración macular, cuando se administra en forma profiláctica o terapéutica. Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase tal como IgG, IgM, o IgA, etc o cualquier subclase tal como IgG1, IgG2a, etc y otras subclases mencionadas anteriormente en la presente memoria o conocidas en el arte pero particularmente de la clase IgG2. Además, los anticuerpos se pueden producir por cualquier método tal como despliegue en fagos, o producido en cualquier organismo o línea celular, que incluye bacterias, insecto, mamífero u otro tipo de células o línea celular que produce anticuerpos con características deseadas, tal como los anticuerpos humanizados. Los anticuerpos también se pueden formar por la combinación de una porción Fab y una región Fc de diferentes especies.

El término "biespecífico" o "bifuncional" y "bi-efectivo" se usan como sinónimos dentro del alcance de esta solicitud para caracterizar un anticuerpo que exhibe tanto una propiedad de inhibición de formación de la fibra amiloide o de tipo amiloide además de la propiedad de desagregación la fibra amiloide o de tipo amiloide.

El término "antígeno" se refiere a una entidad o fragmento del mismo que puede inducir una respuesta inmune en un organismo, particularmente un animal, más particularmente un mamífero que incluye un ser humano. El término incluye a

los inmunógenos y regiones responsables para antigenicidad o determinantes antigénicos.

Como se usa en la presente memoria, el término "soluble" significa parcialmente o completamente disuelto en una solución acuosa.

También como se usa en la presente memoria, el término "inmunogénico" se refiere a las sustancias que estimulan o aumentan la producción de anticuerpos, células T y otras células inmunes reactivas dirigidas contra un agente inmunogénico y contribuye a una respuesta inmune en seres humanos y animales.

Una respuesta inmune se produce cuando un individuo produce suficientes anticuerpos, células T y otras células inmunes reactivas contra composiciones inmunogénicas administradas en la presente invención para moderar o aliviar el trastorno tratado.

"Amiloide polimérico soluble" se refiere a monómeros de péptidos amiloide agregados múltiples o de péptidos de tipo amiloide o de péptidos amiloide modificados o truncados o de otros derivados de péptidos amiloides que forman estructuras oligoméricas o poliméricas que son solubles en cuerpos de mamíferos o humanos más particularmente en el cerebro, pero particularmente a monómeros de β amiloide ($A\beta$) agregados múltiples o péptidos β amiloides modificados o truncados ($A\beta$) o de derivados del mismo, que son solubles en cuerpo de mamíferos o humanos más particularmente en el cerebro.

El término "hibridoma" está reconocido en el arte y es considerado por los expertos en el arte que se refiere a una célula producida por la fusión de una célula productora de anticuerpo y una célula inmortal, por ej., una células de mieloma múltiple. Esta célula híbrida es capaz de producir un suministro continuo de anticuerpo. Ver la definición de "anticuerpo monoclonal" anterior y los siguientes Ejemplos para una más detallada descripción del método de fusión.

El término "vehículo" como se usa en la presente memoria significa una estructura en la que el péptido antigénico o construcción supramolecular se puede incorporar o se puede asociar, de este modo se presenta o expone los péptidos antigénicos o parte del péptido al sistema inmune de un ser humano o animal. Cualquier partícula que se pueda usar en forma adecuada en terapia animal o humana tal como, por ejemplo, se puede usar una vesícula o partícula o un cuerpo particulado como un vehículo dentro del contexto de la presente invención.

El término "vehículo" además comprende los métodos de administración donde las composiciones de la construcción antigénica supramolecular que comprende el péptido antigénico se pueden transportar a sitios deseados por los mecanismos de administración. Un ejemplo de tal sistema de administración usa metales coloidales tal como oro coloidal.

Además, el término "vehículo" además comprende mecanismos de administración conocidos por los expertos en el arte que incluyen pero sin limitación, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina sérica bovina (BSA) y otros adyuvantes.

En la construcción antigénica supramolecular de acuerdo con la presente invención, el liposoma puede tener función dual o sea que se puede usar como un vehículo que comprende la construcción supramolecular, como se describió anteriormente en la presente memoria y al mismo tiempo, funcionar como un adyuvante para amentar o estimular la respuesta inmune en el animal blanco o ser humano tratado con la vacuna terapéutica de acuerdo con la invención. Se considera también que las composiciones de la construcción antigénica supramolecular de la presente invención pueden comprender también adyuvantes adicionales tal como, por ejemplo, lípido A, alumbre, fosfato de calcio, interleuquina 1, y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas, pero particularmente un lípido destoxificado A, tal como monofosforil o difosforil lípido

A, o alumbre, conservantes adicionales, diluyentes, emulsificantes, estabilizantes y otros componentes que son conocidos y se usan en vacunas en el arte previo. Además, se puede usar cualquier sistema adyuvante conocido en el arte en la composición de la presente invención. Tales adyuvantes incluyen, pero sin limitación, adyuvante de Freund Incompleto, adyuvante de Freund completo, manano acetilado unido β -(1,4) polidisperso ("Acemannan"), TITERMAX® (adyuvantes copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno de CytRx Corporation), adyuvantes de lípidos modificados de Chiron Corporation, adyuvantes derivados de saponina de Cambridge Biotech, *Bordetella pertussis* muertas, lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gram-negativas, aniones poliméricos grandes tal como dextran sulfato y geles inorgánicos tales como alumbre, hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio.

Las proteínas transportadoras que se pueden usar en las composiciones de la construcción antigénica supramolecular de la presente invención incluyen pero sin limitación la proteína de unión de maltosa "MBP"; albúmina sérica bovina "BSA"; hemocianina de lapa californiana "KLH"; ovalbúmina; flagelina; tiroglobulina; albúmina sérica de cualquier especie; gamma globulina de cualquier especie; células singeneicas; células singeneicas portadoras de antígenos Ia y polímeros de D- y/o L-aminoácidos.

Además el término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de anticuerpo, que cuando se administra a ser humano o animal, estimula una respuesta inmune que es suficiente para producir un efecto terapéutico en dicho ser humano o animal. La cantidad efectiva es determinada fácilmente por los expertos en el arte siguiendo procedimientos de rutina.

La "homología" entre dos secuencias redetermina por identidad de secuencia. Si dos secuencias que se comparan entre sí difieren en longitud, la identidad de secuencia con preferencia se refiere al porcentaje de los residuos de

nucleótidos de la secuencia más corta que son idénticos con los residuos de la secuencia más larga. La identidad de secuencia se puede determinar convencionalmente con el uso de programas de computación tal como programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711). El Bestfit usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489, con el fin de hallar el segmento que tiene la mayor identidad de secuencia entre dos secuencias. Cuando se usa Bestfit u otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular tiene por ejemplo 95% de identidad con una secuencia de referencia de la presente invención, los parámetros con preferencia se ajustan de modo que el porcentaje de identidad se calcula sobre la longitud completa de la secuencia de referencia y que se permitan las brechas de homología de hasta 5% del número total de nucleótidos con la secuencia de referencia. Cuando se usa Bestfit, los llamados parámetros opcionales se dejan con preferencia en los valores preestablecidos ("defecto"). Las desviaciones que aparecen en la comparación entre una secuencia dada y las secuencias anteriormente descritas de la invención se pueden originar por ejemplo por adición, supresión, sustitución, inserción o recombinación. Tal comparación de secuencia se puede realizar con preferencia también con el programa "fasta20u66" (versión 2.0u66, setiembre 1998 por William R. Pearson y la University of Virginia; ver también W.R. Pearson (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98, ejemplos anexos y <http://workbench.sdsc.edu/>). Para este propósito se pueden usar los ajustes parámetros en "defecto".

El término "hibridizar" se usa para referirse a condiciones de hibridación atómicas convencionales, con preferencia a condiciones de hibridación en las que se usa: SSPE 5x, SDS 1%, solución de Denhardt 1x se usada como solución y/o la

temperaturas de hibridación están entre 35°C y 70°C, con preferencia 65°C. Después de la hibridación, el lavado con preferencia se realiza primero con SSC 2x, SDS 1% y posteriormente con SSC 0,2x a temperaturas entre 35°C y 70°C, con preferencia a 65°C (con respecto a la definición de SSPE, SSC y solución de Denhardt ver Sambrook et al. loc. cit.). Las condiciones de hibridación rigurosas como por ejemplo describió en Sambrook et al, supra, son particularmente preferidas. .). Las condiciones de hibridación rigurosas particularmente preferidas están presentes por ejemplo si la hibridación y lavado se producen a 65°C como se indicó anteriormente). Las condiciones de hibridación no rigurosas, por ejemplo con hibridación y lavado realizado a 45°C son menos preferidas y 35°C aun menos.

La presente invenciones se puede entender más fácilmente con referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones específicas, incluidas en la presente memoria. Si bien la presente invención se ha descrito con referencia a detalles específicos de ciertas realizaciones de las misma no se pretende que tales detalles sean considerados como limitaciones al alcance de la invención.

La presente invención proporciona anticuerpos y partes funcionales de los mismos que son anticuerpos sensibles desde el punto de vista de la conformación. Estos anticuerpos reconocen epitopes específicos en una amplia variedad de antígenos proteínicos amiloideos. Los anticuerpos son útiles para la intervención diagnóstica y terapéutica en enfermedades y los trastornos causados por o asociados con la proteína amiloide o de tipo amiloide que incluye amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con proteína amiloide o de tipo amiloide tal como la proteína A β involucrada en la enfermedad de Alzheimer.

Los anticuerpos se administran a individuos para inmunizarlos en forma pasiva contra una variedad de enfermedades o trastornos, que diluyen pero sin

limitación enfermedades asociadas con la proteína amiloide tal como la enfermedad de Alzheimer.

Los anticuerpos proporcionados en la presente memoria son anticuerpos monoclonales o policlonales que tienen especificidad de unión para los péptidos antigénicos representativos de diversas enfermedades asociadas con la proteína amiloide tales como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se prepara por la inmunización de un animal, tal como un ratón, rata, conejo u otra especie animal que puede producir anticuerpos nativos o humanos, con una composición de una construcción antigénica supramolecular.

Las construcciones antigénicas supramoleculares como se describen en la presente memoria generalmente comprenden péptidos modificados para aumentar el efecto antigénico donde tales péptidos remodifican por medio de la pegilación (usando polietilenglicol o polietilenglicol modificado), o modificado por otros métodos tal como por ácido palmítico, poliaminoácidos (por ej. poli-glicina, poli-histidina), polisacáridos (por ej., ácido poligalacturónico, ácido poliláctico, poliglicólico, quitina, quitosano), polímeros sintéticos (poliamidas, poliuretanos, poliésteres) o co-polímeros (por ej., poli(ácido metacrílico) y N-(2-hidroxil)propil metacrilamida) y similares.

La modificación por ácido palmítico (palmitoilación), mientras que proporciona un anclaje para el péptido en la bicapa del liposoma, debido a la longitud reducida relativa del residuo de ácido graso $C_{16:0}$ conduce al péptido que prácticamente se extiende en la superficie de liposoma. Por consiguiente, las células que procesan el antígeno deberán tomar el liposoma entero con el péptido, en el cual la mayoría de los casos, produce una respuesta inmune más lenta en términos relativos.

En una realización de la invención, se usa un péptido amiloide 1-15 modificado en la preparación de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención. El péptido amiloide 1-15 modificado se puede sintetizar siguiendo el método informado en Nicolău et. al. 2002. El método informado en Nicolău et al implica modificar al péptido antigénico por un trasplante en la resina de un residuo lipofílico o hidrofóbico, a los residuos de aminoácidos terminales de un péptido preformado que origina un producto de pureza considerablemente alta. En particular, un aminoácido protegido, particularmente un aminoácido Fmoc-protégido, se une a una resina mediante reacciones químicas de acoplamiento conocidas. El grupo protector se elimina y se acopla un segundo residuo de aminoácido protegido. La síntesis de péptidos automatizada estándar que usa reacciones químicas de protección conocidas y, particularmente reacciones químicas de Fmoc/tBu, y luego se usan grupos protectores de cadena lateral estándar para sintetizar el péptido antigénico A β ₁₋₁₅ por acoplamiento de los aminoácidos 1 a 15 de la proteína amiloide A β ₁₋₄₂ para producir el fragmento del péptido con una secuencia dada en la SEC ID NO: 1. En un paso final se acoplan dos aminoácidos protegidos adicionales al fragmento del péptido en crecimiento. Los grupos Mtt luego se pueden escindir selectivamente y acoplar al ácido palmítico. Después del lavado de la resina, se elimina el grupo protector y se retira la resina simultáneamente seguido por las desprotecciones de la cadena lateral mediante metodología estándar. El producto final luego se puede obtener con alta pureza y se confirma su identidad por métodos conocidos en el arte tal como, por ejemplo, espectrometría de masa por electroaspersión.

El residuo lipofílico o hidrofóbico de acuerdo con la presente invención puede ser un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido donde el esqueleto carbonado de los ácidos grasos tiene por lo menos 10 átomos de carbono.

Particularmente, el residuo lipofílico o hidrofóbico es un ácido graso con un carbonado de por lo menos aproximadamente 14 átomos de carbono y hasta aproximadamente 24 átomos de carbono, con cada número individual de átomos de carbono que se incluye en este rango también como parte de la presente invención. Más particularmente, el residuo lipofílico o hidrofóbico tiene esqueleto carbonado de por lo menos 14 átomos de carbono. Los ejemplos de residuos hidrofóbicos incluyen pero sin limitación ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico y colesterol o DSPE. En una realización específica de la presente invención el residuo lipofílico o hidrofóbico es ácido palmítico.

Para mejorar la respuesta inmune, otro anclaje/espaciador se puede aplicar adecuadamente para reconstituir el péptido en el liposoma, por ej., polietilenglicol (PEG).

El PEG está unido en forma covalente al residuo de aminoácido unido a ambos extremos del péptido, en particular los residuos de aminoácidos Glu, Cys o Lys o cualquier otro residuo de aminoácido que se puede usar adecuadamente para unir PEG en forma covalente al péptido. En el otro extremo de la cadena se puede unir en forma covalente un residuo hidrofóbico para actuar como elemento de anclaje en la bicapa del liposoma tal como, por ejemplo, foafatidiletanolamina (PEA). De este modo, el liposoma todavía funciona como adyuvante y el péptido está suficientemente alejado de la bicapa que se puede procesar solo y de este modo aumenta su inmunogenicidad en comparación con el antígeno palmitoilado.

En ciertas realizaciones, las construcciones antigénicas supramoleculares usadas dentro del alcance de la presente invención comprenden una secuencia del péptido, unida en forma covalente a la lisina pegilada- en uno de cada extremo. La longitud de la cadena de PEG (polietilenglicol) puede variar de $n = 8$ a

$n = 150.000$ o más, particularmente de $n = 10$ a $n = 80.000$, más particularmente de $n = 20$ a $n = 10.000$. En una realización específica de la invención la longitud de la cadena de PEG es no más de $n = 45$, particularmente entre $n = 5$ y $n = 40$, más particularmente entre $n = 10$ y $n = 30$, y aún más particularmente $n = 10$.

Las construcciones antigénicas supramoleculares de la presente memoria se pueden sintetizar mediante la síntesis automatizada de péptidos y las reacciones químicas de protección conocidas, particularmente reacciones químicas Fmoc/tBu y grupos protectores de cadena lateral estándares. Típicamente, la pegilación de los péptidos produce mezclas de regioisómeros.

Para lograr una unión específica de sitio de un conjugado PEG-lípido a ambos C- y N- terminal de A β se puede usar péptidos parcialmente protegidos. Para estas secuencias de péptidos que contienen residuos de Lys o His internos se agrega Lys(ivDde) protegido en forma ortogonal a cada término. Una Gly adicional se puede agregar al extremo C-terminal para facilitar la síntesis. El grupo protector se elimina y se N-acetila mediante anhídrido acético seguido por la escisión selectiva de los grupos ivDde.

Una resina, particularmente una resina 2-clorotritilo, es la más favorecida, la cual es sensible al ácido y de este modo permite el aislamiento de los péptidos protegidos.

En una realización específica de la invención, la reacción de acoplamiento se realiza en fase de solución. La ruptura selectiva de la resina en condiciones moderadas luego libera los péptidos internamente protegidos.

Los acoplamientos en fase de solución se realizaron con éxito con los péptidos derivados de una secuencia de la proteína β -amiloidetal como, por ejemplo, una A β_{1-16} (SEC ID NO: 2) a una molécula de PEG modificada por un ácido graso – fosfatidilcolina tal como, por ejemplo, DSPE. La separación de los productos mono- y di-acoplados antes de las desprotecciones de la cadena

lateral se pueden lograr por medio de una cromatografía de Intercambio catiónico. Las desprotecciones posteriores de la cadena lateral del péptido conducen al aislamiento de los conjugados deseados con una pureza aceptable. La purificación se puede lograr por métodos bien conocidos en el arte tales como, por ejemplo, HPLC. etc.

Este método para la síntesis de los antígenos β -amiloides lípido-PEG N- y C-terminales que usan péptidos protegidos es aplicable a una amplia variedad de secuencias de péptidos.

Los antígenos liposomales de acuerdo con la invención luego se pueden preparar como se describe en Nicolau et al., 2002. El péptido antigénico $A\beta$ amiloide modificado, particularmente el péptido antigénico $A\beta_{1-15}$, $-A\beta_{1-16}$, $A\beta_{1-16}(\Delta 14)$, $A\beta_{22-35}$ y $A\beta_{29-40}$ palmitoilado y modificado con PEG se puede reconstituir en una construcción que consiste en liposomas, particularmente liposomas hechos de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC), dimiristoil fosfatidil etanolamina (DMPEA), dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPG) y colesterol, opcionalmente que contiene monofosforil lípido A.

En una realización específica de la invención los liposomas con lípido A se usan como adyuvantes para preparar la vacuna anti-amiloide. Se mezclan dimiristoil fosfatidil-colina, -glicerol y colesterol, particularmente en una relación de concentración molar de 0.9:1.0:0.7. Un inumodulador potente tal como, por ejemplo, monofosforil lípido A luego se agrega en una concentración adecuada, particularmente en una concentración entre 30 y 50 mg por mmol, más particularmente 40 mg por mmol de fosfolípidos. El péptido antigénico $A\beta$ modificado luego se agrega en una relación molar de péptido a fosfolípidos entre 1:30 y 1:200, particularmente en una relación molar entre 1:50 y 1:120, más particularmente de 1:100. Los solventes se eliminan, por ejemplo mediante la

evaporación y la película hidratada resultante con solución de buffer estéril tal como, por ejemplo PBS.

Los liposomas también se pueden preparar por la técnica de inyección de flujo cruzado como se describe, por ejemplo, en Wagner et al (2002) *Journal of Liposome Research* Vol 12(3), pp 259 – 270. Durante la inyección de soluciones de lípidos en un sistema de buffer acuoso, los lípidos tienden a formar “precipitados”, seguidos por disposición propia en vesículas. El tamaño de la vesícula obtenida depende de factores tales como concentración de lípidos, velocidad de agitación, velocidad de inyección y la elección de los lípidos. El sistema de preparación puede consistir en un módulo de inyección de flujo cruzado, recipientes para la fase polar (por ej., una solución buffer de PBS), un recipiente de solución de etanol/lípido y un dispositivo de presión, pero particularmente un dispositivo de presión de nitrógeno. Si bien la solución acuosa o polar se bombea a través del módulo de inyección de flujo cruzado, la solución de etanol/lípido se inyecta en la fase polar con aplicación de presiones variadas.

El liposoma aún funciona como adyuvante y el péptido que está suficientemente alejado de la bicapa se puede procesar solo y de este modo aumenta la inmunogenicidad en comparación con el antígeno palmitoilado.

El extremo libre de PEG está unido en forma covalente a una molécula de fosfatidil-etanolamina (donde el ácido puede ser: mirístico, palmítico, esteárico, oleico etc. o una combinación de los mismos) para funcionar como elemento de anclaje. Esta estructura supramolecular se puede anclar por la reconstitución de los liposomas que consisten en fosfolípidos y colesterol (fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, colesterol en relaciones molares variadas. Se pueden usar otros fosfolípidos. El lípido A se usa en una concentración de aproximadamente 40 μ g/pmol de fosfolípidos.

En ciertas realizaciones, las construcciones antigénicas supramoleculares pegiladas o palmitoilada comprenden un péptido que tiene la secuencia de aminoácido del β -amiloide. Los péptidos también pueden comprender o corresponder al péptido beta amiloide completo y los fragmentos activos del mismo. Adicionalmente, los péptidos útiles para la presente invención además comprenden $A\beta_{1-16}$ (SEC ID NO: 2); $A\beta_{1-16}(\Delta 14)$ (SEC ID NO: 3); $A\beta_{1-15}$ (SEC ID NO: 1); y fragmentos activos del mismo.

Para estimular y preparar anticuerpos y para determinar la inmunogenicidad de la construcción antigénica $A\beta$ modificada, se selecciona un animal del grupo que consiste en ratones, ratas, conejos, cerdos, pájaros, etc, pero particularmente ratones, especialmente los ratones C57BL/6 se inmunizan con el péptido antigénico. La inmunogenicidad de la construcción antigénica se determina por la prueba de muestras Sero en intervalos de tiempo adecuados después de la inmunización mediante un inmunoensayo tal como, por ejemplo, un ensayo ELISA.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden preparar mediante técnicas de clonación clásica y fusión celular bien conocidas en el arte. El inmunógeno (antígeno) de interés, típicamente se administra (por ej., inyección intraperitoneal) a ratón de tipo salvaje o endogámico (por ej., ratones BALB/c o especialmente C57BL/6), ratas, conejos u otras especies de animales o ratones transgénicos que pueden producir anticuerpos nativos o humanos. El inmunógeno se puede administrar solo o mezclado con adyuvante, o expresado a partir de un vector (vector del replicón VEE, vaccinia), o como ADN o como proteína de fusión para inducir una respuesta inmune. Las proteínas de fusión comprenden el péptido contra el cual se desea una respuesta inmune acoplado a proteínas transportadoras, tal como, por ejemplo, beta.-galactosidasa, glutathion S-transferasa, hemocianina de lapa californiana (KLH), y albúmina sérica bovina.

En estos casos, los péptidos actúan como haptenos con las proteínas transportadoras. Después de que el animal se reforzó, por ejemplo, dos o más veces, se recogen las células del bazo de los animales inmunizados e híbridomas generados por la fusión de las células del bazo sensibilizado con una línea de células de mieloma, tal como células de mieloma SP2/O murinas (ATCC, Manassas, VA) que usan los procesos bien conocidos de Kohler y Milstein (Nature 256: 495-497 (1975)) y Harlow y Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988)).

En una realización específica de la invención la construcción antigénica de acuerdo con la invención, particularmente una composición de vacuna que comprende dicha construcción antigénica en una forma aceptable para uso farmacéutico, se administra en dosis repetidas, en particular en 1 a 15 dosis, más particularmente en 2 a 10 dosis, aún más particularmente en 3 a 7 dosis pero especialmente en 4 a 6 dosis, en intervalos de tiempo entre 1 y 10 semanas, particularmente en intervalos de tiempo entre 1 y 6 semanas, más particularmente en intervalos de tiempo entre 1 y 4 semanas y aún más particularmente en intervalos de tiempo entre 2 y 3 semanas. La respuesta inmune se controla por la toma de muestras. Sera en un tiempo adecuado después de del refuerzo, particularmente 3 a 10 días después del refuerzo, más particularmente 4 a 8 días después del refuerzo y más particularmente 5 a 6 días después del refuerzo y se determina la inmunogenicidad de la construcción antigénica mediante metodología conocida, particularmente uno de los inmunoensayos comúnmente usados tal como, por ejemplo, un ensayo ELISA.

La inmunización con la construcción antigénica de acuerdo con la invención, pero particularmente con una composición de vacuna que comprende dicha construcción antigénica de acuerdo con la invención en una forma aceptable para uso farmacéutico conduce a una respuesta inmune significativa

en el animal tratado. Los animales, pero especialmente los ratones con títulos terapéuticos se seleccionan para la fusión de las células productoras de anticuerpos, particularmente linfocitos B con un crecimiento continuo o línea celular inmortal, tal como una línea celular de mieloma. Las células se inducen a fusionar por la adición de polietilenglicol. Los títulos terapéuticos son los que brindan un resultado positivo en un ensayo ELISA en una dilución entre 1:4000 y 1:6000, particularmente entre 1:4500 y 1:5500, más particularmente de 1:5000.

Las células híbridas resultantes luego se clonan en forma convencional, por ej., usando una dilución limitante, y los clones resultantes, que producen los anticuerpos monoclonales deseados se cultivan.

Los hibridomas así obtenidos se seleccionan en forma química por la incubación de las células en un medio de selección que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT).

Los hibridomas se seleccionaron posteriormente por la capacidad de producir anticuerpos monoclonales contra las enfermedades o trastornos asociados con amiloide específicas. Los hibridomas que producen anticuerpos de interés se clonan, expanden y conservan congelados para la producción futura. El hibridoma preferido produce un anticuerpo monoclonal que tiene un isotipo IgG, con más preferencia el isotipo IgG2.

El anticuerpo policlonal se prepara para inmunizar a los animales, tal como ratones o conejos, o cualquier otro animal con composiciones de la construcción antigénica supramolecular de la presente invención descrita anteriormente. Posteriormente se recoge suero de sangre de los animales y los anticuerpos e l suero se selecciona de acuerdo con su reactividad cruzada contra el antígeno amiloide.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se pueden preparar en una formulación aceptable para uso fisiológico y pueden comprender un vehículo,

diluyente y/o excipiente aceptables para uso farmacéutico empleando técnicas conocidas. Por ejemplo, el anticuerpo de acuerdo con la invención y como se describió antes en la presente memoria, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, en particular, el anticuerpo monoclonal que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo se combina con un vehículo, diluyente y/o excipiente aceptables para uso farmacéutico para formar una composición terapéutica. Los vehículos, diluyentes y/o excipientes para usos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en el arte e incluyen, por ejemplo, soluciones salinas de buffer de fosfato, agua, emulsiones tal como emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc.

La formulación de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se puede obtener mediante la metodología estándar conocida por los expertos en el arte.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar al sujeto en forma de un sólido, líquido o aerosol en una dosis efectiva para uso farmacéutico adecuada. Los ejemplos de composiciones sólidas incluyen píldoras, cremas, y unidades de dosis implantables. Las píldoras se pueden administrar en forma oral. Las cremas terapéuticas se pueden administrar en forma tópica. Las unidades de dosis implantables se pueden administrar en forma local, por ejemplo, en un sitio del tumor, o se pueden implantar para la liberación sistemática de la composición terapéutica, por ejemplo, en forma subcutánea. Los ejemplos de composiciones líquidas incluyen formulaciones adaptadas para la inyección intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraarterial y las formulaciones para administración tópica e intraocular. Los ejemplos de formulaciones en aerosol incluyen formulaciones inhalatorias para la administración en los pulmones.

Las composiciones se pueden administrar por vías estándares de administración. En general, la composición se puede administrar por vías tópica, oral, rectal, nasal, interdérmica, intraperitoneal, o parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular). Además, la composición se puede incorporar en matrices de liberación sostenida tal como polímeros biodegradables, los polímeros se implantan en la vecindad de donde se desea la administración, por ejemplo, en el sitio del tumor. El método incluye la administración de una dosis única, administración de dosis repetidas en intervalos de tiempo predeterminados, y la administración sostenida para un período de tiempo determinado.

Una matriz de liberación sostenida, como se usa en la presente memoria es una matriz realizada de materiales, usualmente polímeros que son degradables por hidrólisis enzimática o ácido/base o por disolución. Una vez insertada en el cuerpo, la matriz actúa sobre las enzimas y líquidos corporales. La matriz de liberación sostenida se elige en forma deseable por materiales biocompatibles tal como liposomas, poliláctidos (ácido poliláctico), poliglicólido (polímero de ácido glicólico), poliláctico co-glicólido (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), polianhidridos, poli(orto)ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, condroitin sulfato, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, ácidos poliamino, aminoácidos tales como fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, polivinil propileno, polivinilpirrolidona y silicona. Una matriz biodegradable preferida es una matriz de uno de cualquier poliláctido, poliglicólido o poliláctico co-glicólido (co-polímero de ácido láctico y ácido glicólico).

Es bien sabido por los expertos en el arte pertinente que la dosis de la composición dependerá de diversos factores tal como, por ejemplo, la afección tratada, la composición particular usada y otros factores clínicos tal como peso

tamaño, sexo y condiciones de salud general del paciente, área de superficie corporal, el compuesto o composición particular administrado, otros fármacos administrado en forma concurrente y la vía de administración.

La composición se puede administrar en combinación con otras composiciones que comprende una sustancia o compuesto biológicamente activo, particularmente por lo menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos contra el estrés oxidativo, compuestos anti-apoptóticos, quelantes de metales, inhibidores de la reparación de ADN tal como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propansulfónico (3APS), 1,3-propandisulfonato (1,3PDS), activadores de secretasa, β - y γ -inhibidores de secretasa, proteínas tau, neurotransmisores, agentes anti-lámina β , moléculas antiinflamatorias o "antipsicóticos atípicos" tal como, por ejemplo clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol o olanzapina o inhibidores de colinesterasa (ChEI) tal como tacrina, rivastigmina, donepezil, y/o galantamina y otros fármacos y suplementos nutritivos, tal como, por ejemplo, vitamina B12, cisteína, un precursor de acetilcolina, lecitina, colina, Ginkgo biloba, acetil-L-carnitina, idebenona, propentofilina o un derivado de xantina, junto con un anticuerpo de acuerdo con la presente invención y opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o un excipiente aceptable para uso farmacéutico y procedimientos del tratamiento de las enfermedades.

La materia proteinácea activa para uso farmacéutico puede estar presente en cantidades 1 ng y 10 mg por dosis. Generalmente, el régimen de administración deberá ser del rango entre 0,1 μ g y 10 mg del anticuerpo de acuerdo con la invención, particularmente del rango 1,0 μ g a 1,0 mg, y más particularmente en un rango entre 1,0 μ g y 100 μ g, con todos los números individuales incluidos en estos rangos son parte de la invención. Si la administración se produce mediante la infusión continua en una dosis más

adecuada puede estar en el rango entre 0,01 μ g y 10 mg unidades por kilogramo de peso corporal por hora con todos los números individuales incluidos en estos rangos también son parte de la invención.

La administración generalmente será por vía parenteral, por ej., intravenosa. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones acuosa o no acuosas no estériles, suspensiones y emulsiones. Los solventes no acuosos incluyen sin limitación a propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tal como oleato de etilo. Los solventes acuosos se pueden elegir del grupo que consiste en agua, soluciones alcohol/acuosa, emulsiones o suspensiones que incluyen medio salino y bufferizado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, solución de Ringer lactado o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen repositorios de líquido y nutrientes, repositorios de electrolitos (tal como los basados en dextrosa de Ringer) y otros. Los conservantes también pueden estar presentes tal como, por ejemplo, antimicrobianos, anti-oxidantes, agentes quelantes, gases inertes, etc.

La composición farmacéutica puede comprender también vehículos proteináceos tal como, por ejemplo, albúmina sérica o inmunoglobulina particularmente de origen humano. Otros agentes biológicamente activos pueden estar presentes en la composición farmacéutica de la invención que dependen de uso a que está destinada.

En una realización adicional la presente invención proporciona métodos y kits para la detección y diagnóstico de enfermedades o afecciones asociadas con amiloide para diagnosticar una predisposición a una enfermedad o afección asociada con amiloide o para controlar la enfermedad residual mínima de un paciente o para predecir la respuesta de un paciente a un tratamiento con un anticuerpo o una composición de vacuna de acuerdo con la invención y como se

describió anteriormente en la presente memoria. Estos métodos incluyen métodos inmunológicos conocidos comúnmente usados para la detección o cuantificación de sustancias en muestras biológicas o en una condición *in situ*.

El diagnóstico de una enfermedades o afecciones asociadas con amiloide o de una predisposición a una enfermedad o afección asociada con amiloide de un paciente se puede lograr por la detección de la unión inmuno-específica de un anticuerpo monoclonal o de un fragmento activo del mismo con un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ*, que incluye poner en contacto la muestra o parte corporal específica o área corporal sospechada de contener el antígeno amiloide con un anticuerpo que se une a un epítipo de la proteína amiloide, lo cual permite al anticuerpo unirse al antígeno amiloide para formar un complejo inmunológico, detectar la formación del complejo inmunológico y correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia del antígeno amiloide en la muestra o parte corporal específica o área corporal, que opcionalmente compara la cantidad de dicho complejo inmunológico a un valor control normal, donde un aumento de la proporción de dicho agregado en comparación con un valor normal que dicho paciente padece o está en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección asociada con amiloide.

Controlar la enfermedad residual mínima de un paciente después del tratamiento con un anticuerpo o una composición de vacuna de acuerdo con la invención se puede lograr por la detección de la unión inmuno-específica de un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo del mismo de un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ*, que incluye poner en contacto la muestra o parte corporal específica o área corporal sospechada de contener el antígeno amiloide con un anticuerpo que se une a un epítipo de la proteína amiloide, lo cual permite al anticuerpo unirse al antígeno amiloide para formar un complejo inmunológico, detectar la formación del complejo inmunológico y

correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia del antígeno amiloide en la muestra o parte corporal específica o área corporal, opcionalmente comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico a un valor control normal, donde un aumento de la proporción de dicho agregado en comparación con un valor normal indica que dicho paciente aún puede sufrir una enfermedad residual mínima.

La predicción de la respuesta de un paciente a un tratamiento con una composición de vacuna de acuerdo con la invención se puede obtener por la detección de la unión inmuno-específica de un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo del mismo de un epítopo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ*, que incluye poner en contacto la muestra o parte corporal específica o área corporal sospechada de contener el antígeno amiloide con un anticuerpo que se une a un epítopo de la proteína amiloide, lo cual permite al anticuerpo unirse al antígeno amiloide para formar un complejo inmunológico, detectar la formación del complejo inmunológico y correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia del antígeno amiloide en la muestra o parte corporal específica o área corporal, opcionalmente comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico antes y después del comienzo del tratamiento, donde una disminución de la proporción de dicho agregado indica que dicho paciente tienen un alto potencial para responder al tratamiento.

Las muestras biológicas que se pueden usar para el diagnóstico de una enfermedad o afección asociada con amiloide, para diagnosticar una predisposición a una enfermedad o afección asociada con amiloide o para controlar la enfermedad residual mínima de un paciente o para predecir la respuesta de un paciente a un tratamiento con un anticuerpo o una composición de vacuna de acuerdo con la invención y como se describió anteriormente en la

presente memoria son, por ejemplo, fluidos tal como suero, plasma, saliva, secreciones gástricas, mucus, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático y similares o tejido o muestras de células obtenidas de un organismo tal como tejido neural, cerebral, cardíaco o vascular. Para determinar la presencia o ausencia del antígeno amiloide en una muestra se puede usar cualquier inmunoensayo conocido por los expertos en el arte. (Ver Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988 555-612) tal como, por ejemplo, ensayos que utilizan métodos de detección indirecta que emplean reactivos secundarios para la detección, ELISA y ensayos de inmunoprecipitación y aglutinación. Una descripción detallada de estos ensayos se brinda, por ejemplo, en WO96/13590 en Maertens y Stuyver, Zrein et al. (1998) y WO96/29605.

Para el diagnóstico *in situ*, el anticuerpo o cualquier parte activa y funcional del mismo se puede administrar al organismo para su diagnóstico por métodos conocidos en el arte, tal como, por ejemplo, inyección intravenosa, intranasal, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial de modo que se pueda producir una unión específica entre el anticuerpo de acuerdo con la invención con una región epitópica de la región amiloide. El complejo anticuerpo/antígeno se puede detectar mediante una marca unida al anticuerpo o fragmento funcional del mismo.

Los inmunoensayos usados en aplicaciones diagnósticas o en aplicaciones para diagnosticar una predisposición a una enfermedad o afección asociada con amiloide o para controlar la enfermedad residual mínima de un paciente o para predecir respuesta de un paciente al tratamiento con un anticuerpo o una composición de vacuna de acuerdo con la invención y como se describió anteriormente en la presente memoria típicamente dependen de antígenos marcados, anticuerpos o reactivos secundarios para detección. Estas proteínas o reactivos se pueden marcar con compuestos generalmente conocidos por los

expertos en el arte que incluyen enzimas, radioisótopos y sustancias fluorescentes, luminescente y cromogénicas que incluyen partículas coloreadas, tal como oro coloidal y microesferas de látex. De estos, se puede usar el marcado radiactivo en casi todos los tipos de ensayos y con las mayores variaciones. Las marcas conjugadas con la enzima son particularmente útiles cuando se puede evitar la radiactividad o cuando se necesitan resultados rápidos. Los fluorocromos si bien requieren equipamiento costoso para uso, proporcionan un método de detección muy sensible. Los anticuerpos útiles en estos ensayos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales de afinidad purificados

Alternativamente, el anticuerpo se puede marcar en forma indirecta por medio de la reacción con sustancias marcadas que tienen una afinidad por la inmunoglobulina, tal como la proteína A o G o segundos anticuerpos. El anticuerpo se puede conjugar con una segunda sustancia y detectar con una tercera sustancia marcada que tiene afinidad por la segunda sustancia conjugada al anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar con biotina y el conjugado anticuerpo-biotina detectado mediante avidina o estreptavidina. De modo similar, el anticuerpo se puede conjugar a un hapteno y el conjugado anticuerpo-hapteno se detecta mediante un anticuerpo anti-hapteno marcado.

Los expertos en el arte sabrán que estas y otras marcas adecuadas se pueden emplear de acuerdo con la presente invención. La unión de estas marcas a los anticuerpos o fragmentos del mismo se pueden lograr empleando técnicas estándares comúnmente usadas por los expertos en el arte. Las técnicas típicas están descritas por Kennedy, J. H., et al., 1976 (Clin. Chim. Acta 70:1-31), y Schurs, A. H. W. M., et al. 1977 (Clin. Chim Acta 81:1-40). Las técnicas de acoplamiento en esta última son el método de glutaraldehído, el método de

peróxido el método de dimaleimida y otros que están incorporados como referencia en la presente memoria.

Los inmunoensayos actuales utilizan un método de doble anticuerpo para detectar la presencia de un analito, donde el anticuerpo se marca en forma indirecta por reactividad con un segundo anticuerpo que ha sido marcado con una marca detectable. El segundo anticuerpo es con preferencia uno que se une a los anticuerpos del animal del cual se deriva el anticuerpo monoclonal. En otras palabras, si el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo de ratón, luego el segundo anticuerpo marcado es un anticuerpo anti-ratón. Para el anticuerpo monoclonal que se usa en el ensayo que se describe a continuación, esta marca es con preferencia una microesfera recubierta con anticuerpo, particularmente una microesfera magnética. Para el anticuerpo policlonal que se emplea en el inmunoensayo descrito en la presente memoria, la marca es con preferencia una molécula detectable tal como una sustancia radioactiva, fluorescente o electroquimioluminiscente.

Un sistema de doble anticuerpo alternativo, con frecuencia mencionado como sistemas de formato rápido ya que se adaptan a determinaciones rápidas de la presencia de un analito, también se puede emplear dentro del alcance de la invención. El sistema requiere alta afinidad entre el anticuerpo y el analito. De acuerdo con una realización de la presente invención, se determina la presencia del antígeno amiloide mediante un par de anticuerpos, cada uno específico para el antígeno amiloide. Uno de dichos pares de anticuerpos se menciona en la presente memoria como un "anticuerpo detector" y el otro de dicho par de anticuerpos se menciona en la presente memoria como un "anticuerpo de captura". El anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede usar tanto como anticuerpo de captura como anticuerpo detector. El anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede usar también como anticuerpo de captura y

anticuerpo detector, juntos en un ensayo único. Una realización de la presente invención de este modo usa el método sándwich del doble anticuerpo para detectar antígeno amiloide en una muestra de un fluido biológico. En este método, el analito (antígeno amiloide) se coloca a modo de sándwich entre el anticuerpo detector y el anticuerpo de captura, el anticuerpo de captura se inmoviliza en forma irreversible en un soporte sólido. El anticuerpo detector deberá contener una marca detectable, con el fin de identificar la presencia del sándwich anticuerpo-analito y de este modo la presencia del analito.

Los ejemplos de sustancias en fase sólida incluyen pero sin limitación placas de microtitulación, tubos de ensayo de poliestireno, microesferas magnéticas, plásticas o de vidrio y extendidos que son bien conocidos en el campo de radioinmunoensayo e inmunoensayo de enzima. Los métodos para acoplar anticuerpos en fases sólidas también son bien conocidos por los expertos en el arte. Más recientemente, se ha empleado varios materiales porosos tal como nylon, nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio y otros polímeros porosos como soportes sólidos.

La presente invención también se refiere un kit diagnóstico para detectar antígeno amiloide en una muestra biológica que comprende una composición como se definió anteriormente. Además, la presente invención se refiere a este último kit diagnóstico el que, además de una composición como se definió anteriormente, también comprende un reactivo de detección como se definió anteriormente. El término "kit diagnóstico" se refiere en general a cualquiera de los kit diagnósticos conocidos en el arte. Más específicamente, el último término se refiere a un kit diagnóstico como se describe en Zrein et al. (1998).

Es otro objeto de la presente invención proporcionar nuevas pruebas inmunológicas y ensayos para detección y diagnóstico enfermedades y afecciones asociadas con amiloide que comprenden anticuerpos de acuerdo con

la presente invención. Para las pruebas inmunológicas, los anticuerpos se unen en forma directa o indirecta a una molécula indicadora adecuada, por ej , una enzima o radionucleído. El kit de ensayo incluye un recipiente que contiene uno o más anticuerpos de acuerdo con la presente invención e instrucciones para uso de los anticuerpos con el propósito de unirse al antígeno amiloide para formar una complejo inmunológico y detectar la formación del complejo inmunológico de modo que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia del antígeno amiloide.

EJEMPLOS

Antígenos usados para originar anticuerpos monoclonales de ratón

mAb de ratón	Antígeno/Secuencia	Ligador	Anclaje	Adjuvante
mACI-01-Ab7	Aβ ₁₋₁₆	PEG	DSPE	Lípido A
mACI-02-Ab6	Aβ ₁₋₁₆ (Δ14)	PEG	DSPE	Lípido A
mACI-11-Ab9	Aβ ₂₂₋₃₅	PEG	DSPE	Lípido A
mACI-12-Ab11	Aβ ₂₉₋₄₀	PEG	DSPE	Lípido A
mACI-24-Ab4	Aβ ₁₋₁₅	-	Palm	Lípido A

Tabla 1. Anticuerpo y construcciones antigénicas usadas para originar dichos anticuerpos

EJEMPLO 1: Métodos para preparar construcciones antigénicas supramoleculares Aβ₁₋₁₅ palmitoiladas

Síntesis del antígeno péptido tetra(palmitoil-lisina)-Aβ1-15

El péptido amiloide 1-15 palmitoilado se sintetizó siguiendo un método previamente informado mejorado (Nicolau et. al. 2002). Este nuevo método incluye el injerto sobre la resina de ácido palmítico a los residuo de Lys terminales del péptido pre-formado más que la síntesis en fase sólida escalonada que incorpora el aminoácido modificado 9-fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc)-Lys(Pal)-OH. Este nuevo método mejora la eficacia del acoplamiento y brinda un producto de

pureza considerablemente mayor. De este modo, el aminoácido protegido en forma ortogonal Fmoc-Lys(Mtt)-OH se unió a una resina Wang mediante la reacción de acoplamiento con [hexafluorofosfato de 2-(1 H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio] (HBTU). El grupo Fmoc se retiró mediante piperidina DMF y se acopló un segundo residuo de Fmoc-Lys(Mtt)-OH. La síntesis automatizada estándar del péptido que emplea reacciones químicas de Fmoc/tBu grupos protectores de la cadena lateral estándares luego se usaron para acoplar los próximos 15 aminoácidos para producir una secuencia del péptido como la dada en SEC ID NOs: 1. Finalmente los dos últimos aminoácidos acoplados fueron Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Los grupos Mtt luego se escindirán selectivamente mediante ácido trifluoroacético 1% (TFA) en diclorometano para liberar un fragmento del péptido y luego acoplarse a ácido palmítico mediante HBTU. Después del lavado de resina, el grupo Fmoc se eliminó con piperidina 20% en dimetilformamida (DMF) y finalmente la escisión de resina simultánea y las desprotecciones de la cadena lateral se realizaron mediante TFA en condiciones estándares. El triturado en éter dietílico frío dio el producto como un sólido blanco. La espectrometría de masa por electroaspersión confirmó la identidad de producto (m/z esperado: 1097.9 ($[M]3+$); experimental 1096.8 ($[M-3H]3+$), sin otros péptidos tri-, di- o mono-palmitoilados detectados

EJEMPLO 2: Métodos para preparar construcciones antigénicas supramoleculares

Síntesis del antígeno péptido β -amiloide pegilado

Para aumentar la respuesta inmune, se ha aplicado otro anclaje/espaciador para reconstituir el péptido en el liposoma, por ej polietilenglicol (PEG). El PEG se unió en forma covalente al residuo de lisina unido a ambos extremos del péptido. En el otro extremo de la cadena (PEGn=70) el fosfatidiletanolamina (PEA) se unió en forma covalente para actuar como elemento de anclaje de la bicapa del

liposoma. De este modo, el liposoma actúa aun como un adyuvante y el péptido que está suficientemente alejado de la bicapa se puede procesar solo y de este modo aumenta la inmunogenicidad en comparación con el antígeno palmitoilado.

Las construcciones supramoleculares descritas en la presente memoria se sintetizan únicamente mediante protecciones estándares de la cadena lateral de aminoácidos Fmoc/tBu. Típicamente la pegilación de los péptidos produce mezclas de regioisómeros. En la presente memoria se demuestra que un método es conveniente para la unión específica de sitio de un conjugado PEG-Lípido en ambos extremos C- y N- de A β mediante péptidos parcialmente protegidos.

Para las secuencias de péptidos que contienen residuos internos de Lys o His (1-16, 1-16 Δ 14, 22-35), se agregó Lys(ivDde) protegido en forma ortogonal a cada extremo. Se agregó Gly adicional al C-terminal para facilitar la síntesis. El grupo Fmoc se retiró con piperidina 20 % en DMF y se N-acetiló mediante anhídrido acético. La ruptura selectiva de los grupos ivDde se obtuvo con hidrato de hidracina 3 % en DMF durante una hora. La resina 2-clorotritilo es más favorable que la más ampliamente usada resina Wang ya que la primera demostró ser mucho más resistente a la hidracinólisis. Además, la resina 2-clorotritilo es extremadamente sensible y de este modo, a diferencia de la resina Wang, permite el aislamiento de los péptidos protegidos. En realidad, fue necesario realizar la reacción de acoplamiento en la fase de solución como acoplamiento del péptido unido a resina al reactivo pre-activado de lípido pegilado DSPE-PEG-SPA no originó ningún producto de acoplamiento. De este modo la ruptura selectiva de la resina en condiciones moderadas (ácido acético/trifluoroetanol/diclorometano, 1:1:8, 1h, ta) produjo los péptidos protegidos internamente.

Los acoplamientos en fase de solución se lograron con éxito con los péptidos derivados de la secuencia A β ₁₋₁₆ (SEC ID NO: 2) a DSPE-PEG-SPA en

DMSO y exceso de base. Las reacciones luego se inactivaron por la adición de exceso de etanolamina durante 2 h y la solución se liofilizó.

Para la secuencia 29-40, no se requiere una estrategia de protección especial.

La purificación por HPLC (semi-preparativa columna C_4 fase reversa) produjo entre 50-70% pureza de los conjugados lípido-PEG N- y C- terminal cuyas identidades se confirmaron por MAALDI (ionización por desorción por láser asistida con matriz). Cada secuencia mostró una considerable variación en la facilidad de la reacción de acoplamiento y las condiciones se ajustaron en consecuencia (temperatura, número de equivalentes molares de DSPE-PEG-SPA, tiempo). Para la separación de exceso de DSPE-PEG-SPA se aplica la purificación por HPLC del producto deseado. La separación de los productos mono- y di-acoplados antes de las desprotecciones de la cadena lateral se pueden lograr por cromatografía de intercambio catiónico. Las desprotecciones posteriores de la cadena lateral del péptido y la separación del exceso de DSPE-PEG-SPA inactivado condujeron al aislamiento de los conjugados deseados con una pureza aceptable.

Este método para la síntesis de antígenos β -amiloides de lípido-PEG N- y C-terminal mediante péptidos protegidos es aplicable a una amplia variedad de secuencias peptídicas.

EJEMPLO 3: Anticuerpos estimulados por las construcciones antigénicas supramoleculares

Fabricación de mAb originados contra la construcción antigénica supramolecular $A\beta_{1-15}$ palmitoilada:

El antígeno palmitoilado (ACI-24, $A\beta_{1-15}$) se usó para la inmunización de ratones C57BL/6 en intervalos de 2 semanas. Se inmunizaron 10-12 animales con cada antígeno (volumen de inyección: 200 μ l que contienen 8 nmoles del péptido).

La última inyección se realizó 4 días antes del sacrificio de los animales. Después de 5 refuerzos, se seleccionaron ratones con títulos terapéuticos (cuando una dilución 1:5.000 de los sueros fueron positivos en el ELISA) para una fusión. Se recogieron las células del bazo de los animales inmunizados y los hibridomas generados por células del bazo sensibilizadas por fusión con una línea celular de mieloma. La fusión de los linfocitos B de los ratones de los bazos se realizó con células de la línea celular de mieloma SP2-0. (ATCC, Manassas, VA) empleando los bien conocidos procesos de Kohler y Milstein (Nature 256: 495-497 (1975)) y Harlow y Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988)).

Las células se inducen a fusionarse por la adición de polietilenglicol. Las células híbridas resultantes luego se cultivan durante 10 ± 14 días en forma convencional para permitir el crecimiento clónico. La selección clónica inicial se realizó mediante una dilución llmite. Los clones del hibridoma que producen IgG se seleccionaron y ensayaron para determinar su unión específica al péptido A β ₁₋₄₂ por ELISA y los clones resultantes, que producen los anticuerpos monoclonales deseados se cultivan.

Los hibridomas así obtenidos se seleccionan en forma química por la incubación de las células en un medio de selección que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT).

Los hibridomas se seleccionaron posteriormente por la capacidad de producir anticuerpos monoclonales contra las enfermedades o trastornos asociados con amiloide específicas. Una vez que se identificó el clon madre, se subclonó cuatro veces para garantizar la monoclonalidad y permitir al híbrido estabilizarse.

Los hibridomas que producen anticuerpos de interés se clonan, expanden y conservan congelados para la producción futura

El anticuerpo se isotipificó con un kit de isotipificación monoclonal de ratón disponible en el comercio y el clon estable se adaptó al medio libre de suero y se colocó en un biorreactor para la producción de anticuerpos.

El hibridoma preferido produce un anticuerpo monoclonal que tiene un isotipo IgG, con más preferencia el isotipo IgG1.

Fabricación de mAbs originados contra construcciones antigénicas supramoleculares PEG- $A\beta_{1-16}$, $A\beta_{4-11}$, $A\beta_{22-35}$ y $A\beta_{29-40}$ pegiladas :

Se prepararon antígenos liposomales como se describen en (Nicolau et al., 2002, PNAS, 99, 2332-37). Las secuencias de PEG- $A\beta_{1-16}$, $A\beta_{4-11}$, $A\beta_{22-35}$ y $A\beta_{29-40}$ (Figure 1) se reconstituyeron en una construcción que comprende liposomas hechos de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC), dimiristoil fosfatidiletanolamina (DMPEA), dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPG) y colesterol (relaciones molares 0.9: 0.1: 0.1: 0.7) que contienen monofosforil lípido A (fosfolípidos 40mg/mM). Estos antígenos y $A\beta_{1-16}$ pegilados se usaron para la inmunización de ratones C57BL/6 en intervalos de 2 semanas. Se inmunizaron 10-12 con cada antígeno. Después de 3 a 6se seleccionaron ratones con títulos terapéuticos (cuando una dilución 1:5.000 de los sueros fueron positivos en el ELISA) para una fusión. Se recogieron las células del bazo de los animales inmunizados y los hibridomas generados por células del bazo sensibilizadas por fusión con una línea celular de mieloma. La fusión de los linfocitos B de los ratones de los bazos se realizó con células de la línea celular de mieloma SP2-0. (ATCC, Manassas, VA) empleando los bien conocidos procesos de Kohler y Milstein (Nature 256: 495-497 (1975)) y Harlow y Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988)).

Las células se inducen a fusionarse por la adición de polietilenglicol. Las células híbridas resultantes luego se clonan en forma convencional , por ej.,

mediante una dilución límite. Los clones del hibridoma que producen IgG se seleccionaron y ensayaron para determinar su unión específica al péptido A β ₁₋₄₂ por ELISA y los clones resultantes, que producen los anticuerpos monoclonales deseados se cultivan.

Los hibridomas así obtenidos se seleccionan en forma química por la incubación de las células en un medio de selección que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT).

Los hibridomas se seleccionaron posteriormente por la capacidad de producir anticuerpos monoclonales contra las enfermedades o trastornos asociados con amiloide específicas. Los hibridomas que producen anticuerpos de interés se clonan, expanden y conservan congelados para la producción futura. El hibridoma preferido produce un anticuerpo monoclonal que tiene un isotipo IgG, con más preferencia el isotipo IgG1.

EJEMPLO 4: Determinación de especificidad para el anticuerpo mACI-24-Ab4

Para analizar la especificidad del anticuerpo mACI-24-Ab4, se transfirieron concentraciones diferentes de fibrillas de amiloide preformadas 1-42, 1-40 y 1-38 en una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham Biosciences). Después del bloqueo con 10% de leche en polvo y Tween 20 0,7 % , las membranas se incubaron con el anticuerpo principal a 20 μ g/ml durante 2h a TA. Después del lavado, las membranas se incubaron con anticuerpo de IgG anti-ratón de oveja conjugada con peroxidasa de rábano picante (Amersham Biosciences) durante 1 h a TA, se lavó e incubó con solución quimioluminiscente seguida por la exposición de la membrana a la película de rayos X.

Para medir la unión del mAb mACI-24-Ab4 a las fibras β amiloide 1-42, A β 1-42, 1-40 y fibras de 1-38 se pre-formaron durante siete días a 37°C y se transfirieron en la membrana. Se usaron 20 μ g/ml de anticuerpo para medir la

capacidad de unión y se detectó el anticuerpo unido por con anticuerpo de IgG anti-ratón de oveja conjugada con peroxidasa de rábano picante durante 20 minutos de exposición.

Como se puede demostrar por análisis de transferencia de punto, el anticuerpo mACI-24-Ab4 se une a fibras diferentes de A β preformadas con sensibilidad diferente. El anticuerpo exhibe mayor sensibilidad de unión a las fibras de A β ₁₋₄₂ que A β ₁₋₄₀ o A β ₁₋₃₈. Es capaz de detectar por lo menos 0,001 μ g de fibras de A β ₁₋₄₂ mientras que el límite de detección del anticuerpo para las fibras de A β ₁₋₄₀ es por lo menos 0,1 μ g y para las fibras de A β ₁₋₃₈ 1 μ g, lo que significa que la sensibilidad es 100 veces a 1000 veces menor para estos tipos de fibras amiloides. Los datos demuestran que el anticuerpo ACI-24-Ab4 es por lo menos 100 veces más sensible que la forma amiloidea (1-42), la cual se sabe que es insoluble por cambio de la conformación secundaria y es la mayor parte de las placas amiloides en los cerebros de los pacientes de AD.

Ejemplo 5: Unión del anticuerpo monoclonal mACI-01-Ab7 C2 del of AC Immune a especies amiloideas en transferencia Western y transferencia de punto

Para determinar si la unión del anticuerpo de ratón mACI-01-Ab7 C2 es dependiente de la conformación nativa de A, se realizó una comparación de la unión al amiloide lineal por transferencia Western o amiloide nativo por transferencia de punto (Figuras 2a y 2b)

Se generaron monómeros de amiloide por disolución del péptido A β ₁₋₄₂ en HFIP y el solvente evaporado en argón. La película del péptido seco se conservó a -80°C hasta el uso. Para la preparación de los monómeros, la película del péptido se resuspendió en DMSO a una concentración de 2,75 μ g/ μ l y se diluyó en PBS a 1 μ g/ μ l. Para la preparación de oligómeros, la película del péptido seco se resuspendió en DMSO a 5mM, se sonicó y se agregó PBS para alcanzar 400 μ M

de amiloide seguido por la adición de SDS a una concentración final de 0,2%. Después de 6 horas de incubación a 37 °C, el amiloide se diluyó en agua a una concentración final de 100µM y se incubó otras 18h a 37°C. Los oligómeros amiloides se precipitaron con metanol 33% frío en hielo, solución de ácido acético 4% durante 1h a 4°C, se centrifugó a 16200g durante 10 minutos y el sedimento se resuspendió en Na₂H₂PO₄ 5mM, NaCl 35mM pH 7,4 a una concentración final de 1µg/µl. Para la preparación de fibras, se diluyó la película del péptido en buffer Tris-HCl 50mM para obtener una concentración de 1mg/ml de amiloide e incubó a 37°C durante 5 días. Los tubos se centrifugaron a 10000g durante 5 minutos y el sedimento se resuspendió en buffer de carbonato 0,1M pH 9,6 para alcanzar 1µg/µl.

Se diluyeron 1 o 5 µg de monómeros, oligómeros o fibras en PBS y en buffer de carga y se aplicaron a un SDS-PAGE 12% y el gel se transfirió a las membranas de nitrocelulosa. Alternativamente, se diluyeron 3 o 1µg o 100 y 10ng de especies amiloideas en PBS y se sembraron directamente en la membrana de nitrocelulosa y las membranas se secaron a TA durante 1 hora. Después del bloqueo durante 30 minutos con solución de caseína (Vector), las membranas se incubaron durante 30 minutos con los anticuerpos mACI-01-Ab7 C2 o 6E10 (Chemicon) diluidos a 1µg/ml en solución de caseína. Después de 3 lavados en solución de caseína, las membranas se incubaron a TA durante 30 minutos con IgG anti-ratón de cabra marcado con HRP (Dako Cytomation) diluida en solución de caseína, se lavaron 3 veces y se desarrollo con sustrato DAB (Dako Cytomation).

El anticuerpo monoclonal de ratón mACI-01-Ab7 C2 se unió específicamente a monómeros, oligómeros y fibras en un ensayo de transferencia de punto tal como lo hizo el anticuerpo de control positivo 6E10. En contraste, el anticuerpo mACI-01-Ab7C2 no detectó especies amiloides lineales por

transferencia Western en contraste con el anticuerpo 6E10 que reconoce con claridad todos los péptidos lineales. Este resultado demuestra que la unión del mACI-01-Ab7 C2 al amiloide es dependiente de la conformación nativa del amiloide.

EJEMPLO 6: Interacciones de ACI-01Ab7 C2 –A β ₁₋₄₂

Las interacciones entre el anticuerpo líder mACI-01-Ab7 C2 (mC2) con el péptido amiloide A β ₁₋₄₂ se estudiaron mediante la resonancia del plasmón superficial. Se determinó la unión del anticuerpo de ratón mACI-01-Ab7 C2 r a cada uno de los monómeros o fibras de A β ₁₋₄₂.

Todos los experimentos de SPR se realizaron en un Biacore X instrument (Biacore AB). Los reactivos para la inmovilización (EDC, NHS y etanolamina), los chips de los sensores CM5 y SA además de l buffer de corrida y de muestra HBS-EP se compraron en Biacore AB. Se usó acetato de sodio (10 mM, pH 5.0) como buffer de acoplamiento para aumentar el rendimiento del acoplamiento. Las fibrillas A β ₁₋₄₂ (Bachem) se prepararon por la adición de buffer de PBS a A β ₁₋₄₂ hasta una concertación final de 3 mg/ml y se dejan los viales a 37 °C durante 7 días. Las fibrillas de A β ₁₋₄₂ se acoplaron a un chip del sensor CM5 que contiene una matriz de carboximetil dextrano unido a superficie. El A β ₁₋₄₂ monomérico biotinilado (Bachem) se acopló a un chip Sensor SA que consiste en una matriz de carboximetil dextrano con estreptavidina unida en forma covalente. Típicamente se ensayaron cuatro o cinco concentraciones de mAb por diluciones seriadas empleando el buffer de corrida. Las inyecciones se realizaron a partir de la concentración más baja y se pasaron ambos fc 1 y 2 con un caudal de flujo de 30 μ l/min durante 3 min. La célula de flujo 2 no se derivatizó y se sustrajeron las respuestas del fc 1 para corregir el ruido del instrumento y los cambios de masa refractarios. Después de que la inyección finalizó, se lavaron las superficies inmediatamente con buffer de corrida durante 5 minutos. Para eliminar el

anticuerpo unido restante de las fibrillas de Aβ₁₋₄₂, la regeneración de superficie se realizó por inyección por pulsos de NaOH 10 mM . El análisis de la cinética se realizó mediante algoritmos para integración numérica y análisis global mediante BIAevaluation 3.0. Las curvas obtenidas para las inyecciones del analito a concentraciones diferentes se superpusieron y se ajustaron las líneas basales a cero. Para el ajuste de la curva, todos los datos se ajustaron simultáneamente a un complejo homogéneo 1:1.

La unión del anticuerpo de ratón mACI-01-Ab7 C2 al amiloide se determinó que era relativamente potente. Como se demostró en la Tabla 2, el anticuerpo de ratón mACI-01-Ab7 C2 se unió específicamente a las fibras de Aβ₁₋₄₂ inmovilizadas con una constante de asociación promedio (ka) de 3,8 x 10⁻⁴ M/s, una constante de disociación (kd) de 1,1 x 10⁻³ s⁻¹ y en consecuencia con la KD promedio resultante de 3,5 x 10⁻⁸ M. La asociación de los mACI-01-Ab7 C2 a los monómeros de Aβ fue similar o ligeramente más rápida con una ka promedio de 1,6 x 10⁻⁴ M/s pero la disociación fue más rápida que dio una KD de 2,5 x 10⁻⁷ M.

	Monómeros			Fibras		
	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD (M)	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD (M)
mACI-01-Ab7 C2 exp. 1	1,8E+04	2,7E-03	1,5E-07	2,4E+04	9,9E-04	4,1E-08
mACI-01-Ab7 C2 exp. 2	1,5E+04	5,3E-03	3,5E-07	5,60E+04	9,66E-04	1,73E-08
mACI-01-Ab7 C2 exp. 3						4,58E-08
promedio mACI-01-Ab7 C2	1,6E+04	4,0E-03	2,5E-07	3,8E+04	1,1E-03	3,5E-08
	±0,21	1,84	1,41	1,66	0,3	1,53

EJEMPLO 7: Unión del anticuerpo mACI-01-Ab7 C2 monoclonal a las fibras amiloideas

Para analizar el sitio de unión molecular del anticuerpo en las fibras preformadas se realizó microscopía electrónica de transmisión con contraste negativo (TEM) (Figuras 3a y 3b).

El anticuerpo, mACI-01-Ab7 C2, se acopló con oro coloidal de 8 nm de acuerdo con ^{4,5}. Para la co-incubación de las fibras amiloides 1-42 ($A\beta_{1-42}$) 6,65 μ M se incubaron durante 24h a TA con el anticuerpo marcado con oro con una relación molar de 1:100. Posteriormente se incubaron 5 μ l de muestra en una grilla de Cu descargada del brillo fresca (200 mesh) cubierta con una película parlodio/C durante 45 segundos, se lavaron 3 veces con agua y 1 vez con acetato de uranilo 2% fresco diluido y filtrado. Las muestras se tiñeron en acetato de uranilo 2% durante 15-20 segundos. El exceso de tñido en las grillas se absorbió y por consiguiente se secó al aire. Se prepararon tres grillas de cada muestra. As grillas se analizaron en microscopía electrónica de transmisión Hitachi 7000.

El anticuerpo monoclonal, mACI-01-Ab7 C2, se une directamente a las fibras $A\beta_{1-42}$. De modo interesante, el anticuerpo exhibe una unión no simétrica al eje de las fibras únicas pero se une en particular y no a todas las áreas de las ramas laterales de la red de fibras. Parece ser que el anticuerpo se dirige a regiones específicas de las ramas laterales. La explicación potencial es una estructura secundaria específica que produce solo en sus ramas laterales específicas. Esta hipótesis está avalada por los datos de RMN que demuestran que el anticuerpo indujo la transición de conformación y en consecuencia es probable que su unión es dependiente de una conformación de la fibra amiloide que comprende una estructura de lámina β .

EJEMPLO 8: Fraccionamiento de la ultracentrifugación por gradiente de densidad

Las propiedades de los anticuerpos monoclonales de inhibir la polimerización de fibras $A\beta_{1-42}$ y la desagregación de las fibras de $A\beta_{1-42}$ se

estudieron por ultracentrifugación por gradiente de densidad (Rzepecki et al., 2004) que se basa en el principio de distribuir entre fibras de péptidos resultantes de tamaño diferente tamaño después de la incubación con y sin anticuerpos seguidos por el análisis de sedimentación SDS-PAGE en un gradiente preformado (OptiPrep™). El análisis simultáneo de poblaciones de las fibras preformadas de A β , desagregación e inhibición de las propiedades de agregación de los anticuerpos co-incubados, y la unión de los anticuerpos a las fibras son ventajas obvias de estos métodos.

Los anticuerpos monoclonal originados contra A β_{1-16} (mACI-01-Ab7 C2), A $\beta_{1-16(\Delta 14)}$ (mACI-02-Ab6), A β_{1-15} (mACI-24-Ab4), A β_{22-35} (mACI-11-Ab9), y A β_{29-40} (mACI-12-Ab11) se analizaron en ensayos de desagregación mientras que la inhibición de las propiedades de agregación se estudiaron solo para el anticuerpo monoclonal mACI-02-Ab6, mACI-24-Ab4, y mACI-01-Ab7 C2.

Para la inhibición de la agregación de A β_{1-42} , los monómeros de A β_{1-42} se incubaron con los mAb con dos relaciones molares diferentes (relación molar del monómero A β_{1-42} treinta - o cuarenta veces mayor que mAb) con la concentración final de A β de 50 μ M. Después de la 24 horas de incubación a 37°C, las muestras se recubrieron sobre un gradiente discontinuo de Optiprep™ y los tubo se centrifugaron a 259.000 g durante 3 horas a 4°C. Se recogieron 15 fracciones (cada una 140 μ l), la fracción 1 fue la fracción menos densa del extremo superior del gradiente y la fracción 15 es la fracción más densa del extremo inferior del gradiente. También se tomó el sedimento. Las fracciones recogidas se analizaron por SDS-PAGE con tinción de plata. La concentración de A β_{1-42} para los ensayos de inhibición fue cinco veces menor que para los ensayos de desagregación que disminuyen la cinética de la agregación de amiloide y asegura la medición dentro de la fase lineal.

Para la desagregación de fibrillas preformadas de $A\beta_{1-42}$ por co-incubación con los mAb (a dos relaciones molares diferentes 1:30 y 1:100, mAb + Monómero $A\beta_{1-42}$ con la concentración final de $A\beta$ de 246 μ M), las muestras se incubaron durante 24 horas a 37°C. Después de 24 horas las muestras se fraccionaron por ultracentrifugación y se separaron por SDS-PAGE como se describió anteriormente (Rzepecki et al., 2004).

Ensayo de inhibición de agregación de $A\beta_{1-42}$

Se pudo demostrar que sin la adición del mAb, el péptido $A\beta$ se agregó después de 24 horas del tiempo de incubación y la mayoría de la proteína se halló en las fracciones 13-15, lo cual demuestra la polimerización completa de los monómeros del péptido $A\beta$. La inhibición significativa y exitosa de la agregación deberá originar fibras mas pequeñas o proteína β amiloide ($A\beta$) polimérica soluble, la cual se debe hallar en las fracciones con menor densidad (10-13). En forma exacta este cambio de bandas se pudo demostrar en el ensayo de agregación que contiene mACI-01-Ab7 C2 que mostró una distribución del péptido $A\beta$ sobre las fracciones 11, 12 y 13.

Esto se confirmó en un 2^{do} experimento donde mACI-01-Ab7 C2 originó otra vez un cambio de bandas para la mayoría (banda mas intensa) de 14 a 13 y una solubilización significativa de las bandas que corren de la fracción 14 al sedimento. Esto significa que mACI-01-Ab7 C2 exhibe una capacidad importante para inhibir la polimerización de los monómeros del péptido $A\beta$ en fibras y revelaron una unión específica a las fibras $A\beta$ (en la fracción 13)

Se realizaron observaciones similares cuando se usan los anticuerpos mACI-24-Ab4 y mACI-02-Ab6. Sin la adición del mAb, el péptido $A\beta$ se agregó después de 24 horas del tiempo de incubación y la mayoría de la proteína se halló en las fracciones 13 al sedimento (sedimento, muy poco en 12), lo cual demuestra la polimerización completa de los monómeros del péptido $A\beta$. La inhibición

significativa y exitosa de la agregación deberá originar fibras mas pequeñas o proteína β amiloide ($A\beta$) polimérica soluble, la cual se debe hallar en las fracciones con menor densidad. En el ensayo de inhibición de agregación, el mACI-24-Ab4 causó un cambio de las bandas para la mayoría (banda mas intensa) de 13 a 11 y 12 y una solubilización significativa de las bandas que corren de la fracción 13 al sedimento mientras que mACI-02-Ab6 causó un cambio de las bandas de 13 a 10 pero adicionalmente una inhibición completa de las fibras más largas (fraccionadas en 13 al sedimento). Estos datos indican que tanto mACI-24-Ab4 como mACI-02-Ab6 exhiben una capacidad importante para inhibir la polimerización de los monómeros del péptido $A\beta$ en fibras y revelaron una unión específica a las fibras $A\beta$ (en las fracciones 11 y 12).

En contraste, el ensayo de agregación que contiene mACI-11-Ab9, en una relación molar de 1:30, mostró agregados más grandes dispersos entre las fracciones 12-15 y el sedimento. En presencia de mACI-12-Ab11, en una relación molar 1:30, los agregados se hallaron en las fracciones 11-15 y el sedimento, pero con la señal más intensa en las fracciones 11 y 12. esto significa que los mACI-01-Ab7 C2 y mACI-24-Ab4 exhiben una capacidad importante para inhibir la polimerización de los monómeros del péptido $A\beta$ en fibras. El mACI-12-Ab11 tiene propiedades de inhibición significativamente menores que mACI-01-Ab7 C2, para obtener esta actividad inhibitoria débil se requiere una relación molar tres veces superior. Se puede observar una inhibición aún menor cuando se compara a mACI-11-Ab9 que no pudo inhibir la agregación de fibras del péptido $A\beta$. Todos los mAb revelaron una unión específica a las fibras de $A\beta$ (para mACI-01-Ab7 C2 en la fracción 11 + 12; para mACI-11-Ab9 en la fracción 12 y débil en 13; para mACI-12-Ab11 en la fracción 11 y 12).

En todos los ensayos de inhibición, el péptido se detectó en las fracciones del extremo inferior. El mAb no unido (37 kDa, 95 kDa y mayor de 120 kDa)

aparecieron en la parte media superior del gradiente (fracciones 3-9 y 4-8, respectivamente).

Ensayo de desagregación de fibras $A\beta_{1-42}$

Debido a la polimerización incompleta de fibras la distribución de las fibrillas de $A\beta_{1-42}$ solas de muestra un rango más amplio de fracciones (11-15). En consecuencia la demostración de las propiedades de desagregación exitosa y significativa de los anticuerpos cuando se co-incuba con las fibras pre-formadas es más difícil que en el análisis de la agregación. Sólo un cambio de la mayoría de las fibras hacia las fracciones de menor densidad pero aun dentro del rango de la fracción amiloidea sola indicaría la actividad de desagregación; para el amiloide solo la banda principal es la fracción 12. La adición de mACI-01-Ab7 C2 en una relación molar 1:100 no mostró cambios de fibras amilideas hacia las fracciones de menor densidad (aun entre fracciones 11-15), pero con un cambio de la señal más intensa en el rango de la fracción de 12 a 11, cuando se compara con el amiloide solo. A pesar de las circunstancias no óptimas de la formación de fibra incompleta, el mACI-01-Ab7 C2 indica actividades de desagregación bajas pero detectables.

En contraste, la co-incubación de las fibrillas preformadas $A\beta_{1-42}$ con mACI-02-Ab6 no demostraron cambios de las bandas en la fracción de menor densidad cuando se incuba con la misma relación molar de amiloide:anticuerpo como mACI-01-Ab7 C2. Solo cuando se usó una relación molar tres veces superior de 1:30 las fibras amiloides cambiaron de las fracciones 12-15 (amiloide solo sin co-incubación del anticuerpo) a las de 11-15. En consecuencia pareció que mACI-01-Ab7 C2 tiene propiedades de degradación ligeramente superiores que mACI-02-Ab6.

La detección de bandas que corresponden a mAb a la mitad inferior de la fracción del gradiente demuestra la unión de mACI-02-Ab6 y mACI-01-Ab7 C2 a las fibrillas de A β ₁₋₄₂ (fracción 11 a 15 para ambos mAb).

La propiedad de desagregación del mACI-01-Ab7 C2 se puede confirmar en un experimento adicional, donde la polimerización de fibras completas se pudo de mostrar por la distribución de las fibrillas de A β ₁₋₄₂ en ausencia de un anticuerpo en las fracciones 13 a P (sedimento). Aquí los cambios de las fibras hacia las fracciones de menor densidad indican la actividad de desagregación del anticuerpo, cuando se co-incuba a las fibras pre-formadas. La adición de mACI-01-Ab7 C2 con una relación molar 1:100 mostró un cambio de la mayoría de las fibras amiloideas de 13 a 12 y adicionalmente un cambio de la banda con la menor densidad de 13 hacia 11. En consecuencia el mACI-01-Ab7 C2 también indica una fuerte actividad de desagregación.

La detección de bandas que corresponden a mAb en la mitad inferior de las fracciones del gradiente de muestra la unión de mACI-01-Ab7 C2 a las fibrillas A β ₁₋₄₂ (fracción 11 a P) mientras que las bandas correspondientes a mAb en las fracciones 4a 7 indican anticuerpo no unido.

Para sintetizar estos resultados, se pudo demostrar con éxito que el anticuerpo monoclonal mACI-01-Ab7 C2 que se dirige al péptido amiloide A β se une a las fibras pre-formadas y es capaz de inhibir *in vitro* la agregación de los péptidos monoméricos de A β a las fibras y se desagregan las fibras pre-formadas.

Se realizaron observaciones similares cuando se usa el mACI-24-Ab4. En modo similar al ensayo de agregación, se pudo demostrar la polimerización e fibras completa por la distribución de las fibrillas de A β ₁₋₄₂ solas en las fracciones 12 a P (sedimento). Aquí los cambios de las fibras hacia las fracciones de menor densidad indican la actividad de desagregación del anticuerpo, cuando se co-incuba a las fibras pre-formadas. La adición de mACI-24-Ab4 con una relación

molar 1:100 mostró un cambio de la mayoría de las fibra amiloideas de 12 a 11. En consecuencia el mACI-24-Ab4 indica también indica una fuerte actividad de desagregación.

EJEMPLO 9: Ensayo fluorescente para medir la inhibición de la agregación del filamento de $A\beta_{1-42}$ y la desagregación de los filamentos preformados de $A\beta_{1-42}$ por co-incubación con mAb

Ensayo fluorescente BIS-ANS

Para evaluar las propiedades de inhibición del mAb, se usó el ensayo fluorescente BIS-ANS (LeVine, 2002) que detecta específicamente la población del monómero o no fibrillas de los filamentos $A\beta_{1-42}$. Antes de la medición de fluorescencia, los monómeros de $A\beta_{1-42}$ se pre-incubaron con cualquier buffer, actuaron como control, o mAb (relación molar 1:100, mAb vs. péptido $A\beta_{1-42}$) durante 14 horas a 37°C. Las unidades de fluorescencia relativa se registraron en forma automática y los resultados se expresaron como en el porcentaje del control

El mACI-02-Ab6 mostró una habilidad de inhibición leve cuando se compara con el control ($125,8 \pm 28,5\%$ vs $100 \pm 29,5\%$). El mACI-01-Ab7 C2 pareció tener actividad débil ($108,0 \pm 30,0\%$) y ninguna mejora en comparación con el control se pudo observar con los mAb mACI-11-Ab9 y mACI-12-Ab11 ($93,5 \pm 21,9\%$ y $73,2 \pm 47,7\%$). Este resultado confirma los datos ultracentrifugación en el cual el mACI-01-Ab7 C2 exhibe una capacidad de inhibición mayor que mACI-11-Ab9 y mACI-12-Ab11.

EJEMPLO 10: Ensayo fluorescente de tioflavina T (Th-T)

Para medir tanto las propiedades de inhibición de la agregación además de la desagregación del mAb, se usó el ensayo fluorescente de tioflavina T (Th-T) que se une específicamente a las moléculas de las fibrillas de $A\beta_{1-42}$ y

posteriormente la intensidad de emisión fluorescente se correlaciona con la cantidad de filamentos de $A\beta_{1-42}$ presentes en solución.

Antes de la medición de fluorescencia, los monómeros de $A\beta_{1-42}$ se pre-incubaron con cualquier buffer, actuaron como control, o mAb (relación molar 1:100, mAb vs. péptido $A\beta_{1-42}$) durante 48 horas a 37°C. Las unidades de fluorescencia relativa se registraron en forma automática y los resultados se expresaron como porcentaje respecto del control.

El mACI-01-Ab7 C2 mostró una habilidad de inhibición significativa cuando se compara con el control ($11,03 \pm 20,7\%$ vs $100 \pm 40,5\%$). Estos resultados confirman los datos de ultracentrifugación, en el cual ACI-01-Ab7 C2 exhibe la capacidad de inhibición.

Para medir las propiedades de desagregación del mAb, se usó el ensayo fluorescente de tioflavina T (Th-T) que se une específicamente a las moléculas de las fibrillas de $A\beta_{1-42}$ y posteriormente la intensidad de emisión fluorescente se correlaciona con la cantidad de filamentos de $A\beta_{1-42}$ presentes en solución. Antes de la medición, las fibras de $A\beta$ se preformaron durante 7 días (a 37°C en PBS, pH 7,1) y luego posteriormente se co-incubaron con mAb o buffer (control negativo), durante 24 horas a 37°C en una relación molar de 1 : 100 (mAb vs. $A\beta_{1-42}$). Las unidades de fluorescencia relativa se registraron en forma automática por un lector de placa de microtitulación de ELISA y los resultados se expresaron como cambios en el porcentaje del control.

De acuerdo con los datos de ultracentrifugación de mACI-01-Ab7 C2, también mostraron en el ensayo de desagregación de Th-T en dos experimentos independientes las mejores propiedades con $35 \pm 11\%$ y $64,57 \pm 13,58\%$ (vs $100,0 \pm 15,37\%$), respectivamente, poder de desagregación sobre el control.

El mACI-24-Ab4 también mostró propiedades de desagregación significativas ($62,99 \pm 10,34\%$ vs $100,0 \pm 10,03\%$; $p < 0,0001$) en el ensayo Th-T.

El mACI-11-Ab9 fue algo menos activo con $28 \pm 14\%$, mientras que ACI-02-Ab6 y ACI-12-Ab11 no exhiben propiedades de desagregación significativas ($17 \pm 12\%$ y $13 \pm 11\%$ respectivamente).

Cuando se resumen los ensayos de ultracentrifugación y fluorescente los mACI-01-Ab7 C2, mACI-01-Ab6 y mACI-24-Ab4 mostraron capacidades de bifuncionalidad para inhibir la agregación de fibras y acortar los filamentos $A\beta_{1-42}$ en experimentos de centrifugación que se podrían confirmar por un ensayo fluorescente. Adicionalmente, el experimento de centrifugación demostró unión específica del mAb a las fibras amiloideas.

El mACI-11-Ab9 mostró una habilidad de inhibición significativa menor en la ultracentrifugación, cuando se compara con mACI-01-Ab7 C2 aun si estuviera tres veces más concentrado, lo cual se pudo confirmar por un ensayo BIS-ANS. Para el análisis de desagregación el mACI-01-Ab7 C2 demostró en el análisis por centrifugación y el ensayo de ThT propiedades para acortar los filamentos preformados de $A\beta_{1-42}$. El mACI-02-Ab6, tres veces más concentrado en el experimento de centrifugación, también fue positivo en ambos ensayos pero mucho más intenso en el experimento de centrifugación.

A partir de los resultados anteriores es evidente que mACI-01-Ab7 C2 y mACI-02-Ab6 son los únicos anticuerpos que muestran actividad en términos de bi-funcionalidad para interactuar con los filamentos $A\beta_{1-42}$, inhibición de agregación y desagregación de las fibras preformadas.

EJEMPLO 11: RMN y caracterización de fluorescencia de la interacción del anticuerpo monoclonal mACI-01-Ab7 C2 con el péptido β -amiloide 1-42 marcado con ^{13}C

Para evaluar el mecanismo potencial por el cual el mAb solubiliza las fibras pre-formadas o inhibe la formación de fibras, se realizó un experimento de comparación entre el ensayo fluorescente Th-T y RMN en estado sólido de U- ^{13}C

Tyr10 y péptido β -amiloide 1-42 marcado con ^{13}C en Val12 (Figura 4). En consecuencia el propósito de esta investigación fue seguir la transición de la lámina β por espectroscopía RMN en estado sólido en el péptido β amiloide y en presencia del anticuerpo monoclonal y compara directamente este con la capacidad de desagregación mediada por un ensayo fluorescente Th-T.

La espectroscopía RMN en estado sólido no solo detecta una transición de la estructura secundaria pero también permite localizar los dominios del péptido $\text{A}\beta_{1-42}$ que domina la transición estructural. El RMN en estado sólido ha demostrado su aplicabilidad en el problema a medida que ha contribuido a la determinación de la estructura de las fibras $\text{A}\beta_{1-42}$ (Petkova et al., 2004, Petkova et al., 2002). En particular la correlación del cambio químico $^{13}\text{C}_\alpha$ y $^{13}\text{C}_\beta$ con la estructura secundaria (Cornilescu et al., 1999, Luca et al., 2001, Iwadate et al., 1999) es una herramienta valiosa para examinar cambios de la estructura secundaria de un péptido.

La síntesis del péptido marcado que incluye una valina pre-marcada ^{13}C en la posición 12 (^{12}Val) y una tirosina pre-marcada con ^{13}C en la posición 10 (^{10}Tyr) se realizó por un protocolo de síntesis Fmoc. Se confirmaron la identidad y pureza del péptido por espectroscopía de masas MALDI. El péptido β amiloide (1-42) marcado se usó para generar fibras por la incubación de la solución del péptido en el buffer de PBS durante 1 semana a 37°C . El problema mayor, la mal solubilidad de péptido β -amiloide en el buffer de PBS, se pudo resolver de la siguiente manera: El valor del pH del buffer PBS aumentó temporariamente en cantidades diminutas de amoniaco para disolver el péptido β -amiloide. El valor original del pH del buffer PBS se obtuvo otra vez por incubación de la muestra en presencia de un baño mayor de PBS que usa el carácter volátil del amoníaco.

Para medir el efecto de los anticuerpos que rompen la lámina β , una solución de fibras se incubó con el anticuerpo durante 24 horas a 37°C para

ambos ensayos de RMN y Th-T. Para la comparación en tiempo real se usó una alícuota de la misma solución para el ensayo fluorescente Th-T y la solución restante se liofilizó para las mediciones de RMN.

Después de analizar primero las capacidades de desagregación del mACI-01-Ab7 C2 por la co-incubación con fibras preformados β -amiloides marcadas con ^{13}C mediante el ensayo fluorescente Th-T, se pudo demostrar que el mAb desagregó las fibras en 38%. Luego se realizó el espectro RMN.

Para investigar las diferencias entre PBS (control) y la incubación con mAbm, cada espectro descifra mediante PeakFit (<http://www.systat.com/products/PeakFit>). Las líneas se aparearon bien por el empleo de un procedimiento de ajuste Lorentzian/Gaussian mixto, cuyos resultados se muestran en la Figura 4. Los resultados se sintetizan en la Tabla 3 pero la diferencia más obvio es la intensidades integrales de las dos poblaciones que se necesitan para ajustar el pico doble alrededor 30-33 ppm. El pico de 33 ppm corresponde a la conformación de la lámina beta de las fibras mientras que 30 ppm es un resultado de una conformación de arrollamiento al azar. La muestra incubada en PBS mostró la mayoría de la marca en una conformación de la lámina beta (81,7%) (Fig. 2 parte superior) que se reduce cuando la muestra se incuba con mACI-01-Ab7 C2 (53,5%) (Fig. 4 parte inferior). La reducción de la población de la conformación de lámina beta con respecto a la conformación de arrollamiento al azar como lo determina por estudio de la Val 12 C β es del orden de 35% y está en consecuencia en estrecho acuerdo con esta medición usando fluorescencia.

Resonancia	PBS			mACI-01-Ab7-C2		
	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	% de Intensidad integral	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	% de Intensidad integral
lámina Val C β	32,60	479	81,7	33,09	366	53,5
Val C β -al	30,27	200	18,3	30,27	340	46,5

azar						
------	--	--	--	--	--	--

Tabla 3. Comparación de los parámetros ajustados para las dos conformaciones de Val 12 C β . Los desplazamientos químicos ajustados para las dos conformaciones son bastante similares pero las intensidades integrales son muy diferentes, lo cual refleja una reducción de la conformación de lámina beta original en aproximadamente un 35% (1-(53,5/81,7)). Esto está en estrecho acuerdo con el valor obtenido de la medición de fluorescencia.

Para resumir estos resultados se pudo demostrar con éxito que el anticuerpo monoclonal mACI-01-Ab7 C2 que se dirige a la región 1-16 N-terminal del péptido A β amiloide se une a las fibras pre-formadas y es capaz de inhibir *in vitro* la agregación de los péptidos A β monoméricos a fibras y fibras preformadas desagregadas, como lo demostró el experimento de ultracentrifugación por gradiente de densidad además del ensayo fluorescente Th-T. Además por unión de este anticuerpo a las fibras pre-formadas, se pudo inducir una transición de la mayoría de la lámina beta al ambiente de la conformación secundaria arrollada al azar de Val12. Este podría ser el potencial mecanismo por el cual las fibras se podrían solubilizar por la unión del anticuerpo monoclonal mACI-01-Ab7 C2, también porque el detallado análisis del pico de Val 12 C β revela la reducción del componente de lámina beta en un 35%, lo cual está en estrecha concordancia con los datos de fluorescencia (38%).

Ejemplo 12: Funcionalidad del mACI-01-Ab7 C2 en las fibras amiloideas

12.1 Modificación de la conformación de las fibras A β 1-42 e iniciación de la desagregación después de la unión del anticuerpo mACI-01-Ab7 C2

Con el fin de evaluar el mecanismo por el cual el anticuerpo es capaz de desagregar fibras preformadas beta-amiloides (A β ₁₋₄₂) en un ensayo de comparación punto a punto, el ensayo de Tioflavina-T (Th-T) fluorescente se

realizó midiendo la desagregación y el de Resonancia magnética nuclear RMN en estado sólido (NMR) de U-¹³C Tirosina¹⁰ y péptido Aβ¹⁻⁴² marcado en la Valina¹² analizando la conformación secundaria. El anticuerpo se solubilizó en 35,4 % de las fibras preformadas Aβ¹⁻⁴² y simultáneamente indujo un cambio en la conformación secundaria de la lámina beta a enrollada al azar. La reducción de la población de la conformación lámina beta con respecto a la enrollada al azar es del orden del 35% y en consecuencia está en estrecha concordancia con la que se mide usando el ensayo de fluorescencia Th-T. Estos datos indican que la unión del anticuerpo inicia una transición de la estructura secundaria, la cual potencialmente causa la desestabilización de la disposición intermolecular paralela de las laminas beta que afectan la ruptura de de las fibras elongadas en fragmentos más pequeños.

12.2 Afinidad de unión dependiente de la conformación del anticuerpo mACI-01-Ab7 C2

Ya que es bien conocido en la bibliografía científica que una proporción de la energía de unión del anticuerpo-antígeno se puede usar para una modificación de dependiente de energía de la conformación de un antígeno⁶, se realizó un experimento de comparación de la afinidad de unión del anticuerpo mACI-01-Ab7 C2 a la proteína Aβ¹⁻⁴² total y aun péptido más pequeño de nueve aminoácidos de largo que comprende el epítopo del anticuerpo. Para esta comparación se analizaron las afinidades del anticuerpo mACI-01-Ab7 C2 por ELISA usando péptidos biotinilados que cubren la secuencia completa de aminoácidos de los epítopos de mACI-01-Ab7 C2 (aminoácidos 13-21 de la secuencia de Aβ¹⁻⁴², producida por Mimotopes y comprada en ANAWA Trading SA) y un péptido Aβ¹⁻⁴² completo biotinilado (Bachem). El análisis se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mimotopes). El anticuerpo se une con un 38,40% de mayor afinidad al péptido que comprende su epítopo específico (aminoácidos 13-

21 de la secuencia de A β ₁₋₄₂) que a la proteína A β ₁₋₄₂ completa. En consecuencia, se sugiere que la diferencia de energía de la afinidad de unión se usó para la transición con consumo de energía de la conformación secundaria de la proteína amiloide para presentar el antígeno en una posición más aceptable para la interacción del anticuerpo. Esto puede explicar por qué la afinidad del anticuerpo es menor para la proteína nativa (la proteína amiloide completa) que para la subunidad aislada.

Ejemplo 13: Unión específica de la conformación del mACI-01-Ab7 C2 a diferentes clases de proteína amiloide

Con el fin de evaluar la especificidad del mACI-01-Ab7 C2 en diferentes estadios de la proteína amiloide polimerizada, amiloide monomérica y polimérica soluble, particularmente, proteína β amiloide (A β) y amiloide fibrillar, se realizó un ELISA recubierto con estos diferentes estadios del beta-amiloide polimérico. Los monómeros se prepararon de acuerdo con un método modificado publicado por ⁷, amiloide polimérico soluble, particularmente, amiloide β (A β) de acuerdo con ⁸, mientras que las fibras se realizaron por incubación del amiloide (Bachem, Switzerland) con una concentración final de 1 μ g/ μ l en Tris/HCl pH 7,4 a 37°C durante 5 días seguido por un paso de centrifugación (10.000 rpm durante 5 minutos). Luego los polímeros de amiloide se recubrieron en las placas de ELISA con una concentración final de 55 μ g/ml y se realizó una prueba de afinidad de unión ELISA por medio de un anticuerpo monoclonal IgG anti-ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) marcado con fosfatasa alcalina. El anticuerpo se une con mayor afinidad a la proteína β amiloide polimérica soluble (A β) (IC₅₀ = 2,53nM) que a las fibras (IC₅₀ = 5,27nM) y con la menor afinidad a los monómeros (IC₅₀ = 8,3nM). Estos datos indican que la unión del anticuerpo está influenciada además de por su epítopo por la conformación de los diferentes agregados amiloideos.

Ejemplo 14: Mapeo del epitope del anticuerpo monoclonal mACI-01-Ab7 C2

El mapeo del epitope del anticuerpo monoclonal mACI-01-Ab7 C2 se realizó por ELISA usando tres genotecas de péptidos diferentes. Una genoteca comprende un total de 33 péptidos biotinilados que cubren la secuencia de aminoácidos completa (aa) de A β 1-42 (producida por Mimotopes y comprada en ANAWA Trading SA), la segunda genoteca contiene péptidos biotinilados que usan el péptido 12 (aa12-20 de A β) proveniente de la primer genoteca de péptidos y sustituyendo cada aminoácido de la secuencia por una alanina (ver siguiente Tabla 41), y la tercer genoteca contiene los péptidos biotinilados 13, 14, o 15 (aa 13-21, 14-22 o 15-23 de A β) y sustituyendo en cada caso el último aminoácido con una alanina o una glicina para el aa 21 que ya es una alanina (ver tabla 5 siguiente). Un péptido A β 1-42 completo biotinilado se usó como control (Bachem). El mapeo del epitope se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mimotopes). Brevemente, las placas recubiertas con estreptavidina (NUNC) se bloquearon con BSA 0,1% en PBS toda la noche a 4°C. Después del lavado con PBS-0,05% Tween 20, las placas se incubaron durante 1 hora a TA con los diferentes péptidos de la genoteca, se diluyó en BSA 0,1% , azida sódica 0,1% en PBS a una concentración final de 10 μ M. Después del lavado, las placas se incubaron durante 1 hora a TA con el anticuerpo mACI-01-Ab7 C2 o un anticuerpo IgG2b de ratón isotipo control diluido a 10 μ g/ml en BSA 2%, azida sódica 0,1% en PBS. Las placas se lavaron otra vez y se incubaron con IgG de anti-ratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina durante 1h a TA. Después del lavado final, las placas se incubaron con el sustrato de fosfatasa (pNPP) y se leyeron a 405 nm con un lector de placa de ELISA.

Se demostró que el anticuerpo monoclonal mACI-01-Ab7 C2 se unió específicamente a los péptidos 12, 13, 14 y 15 de la primer genoteca de péptidos.

Estos 4 péptidos comprenden los aa 12-20 (VHHQKLVFF), 13-21 (HHQKLVFFA), 14-22 (HQKLVFFAE) y 15-23 (QKLVFFAED) de Aβ1-42 lo cual sugiere que el epitope se halla en la región de 12-23 de Aβ. Una segunda genoteca con sustituciones de alanina se uso para determinar los aa críticos para la unión al péptido 12-20 (VHHQKLVFF). La unión del anticuerpo mACI-01-Ab7 C2 se perdió completamente cuando los aa 16, 17, 19 o 20 está sustituidos por una alanina, lo que indica a estos aa son absolutamente críticos para la unión del anticuerpo a Aβ. La unión del anticuerpo mACI-01-Ab7 C2 se perdió en forma parcial cuando se sustituyeron los aa 15 y 18.

La unión también se perdió casi por completo cuando el aa 14 se sustituyó con una alanina, lo que indica que el aa 14 es también muy importante para la unión.

Finalmente, se usó una tercera genoteca para determinar si los aa 21, 22 o 23 son críticos para la unión del epitope. La unión del anticuerpo al aa 15-23 se redujo cuando el aa 23 se sustituyó con una alanina, lo cual indica que el aa 23 es también importante para la unión. La unión se perdió en forma parcial cuando el aa 21 se sustituyó con glicina y se perdió en forma leve cuando el aa 22 se sustituyó con una alanina.

Tabla 4. Resumen de péptidos usados de la segunda genoteca.

Los aa importantes para la unión están marcados en *itálica* y subrayados y los aa absolutamente críticos importantes para la unión están marcados en *itálica*, en **negrita** y subrayados

p12-20	V	H	H	Q	K	L	V	F	F
A12	A	H	H	Q	K	L	V	F	F
A13	V	A	H	Q	K	L	V	F	F
A14	V	H	A	Q	K	L	V	F	F
A15	V	H	H	A	K	L	V	F	F
A16	V	H	H	Q	A	L	V	F	F

A17	V	H	H	Q	K	A	V	F	F
A18	V	H	H	Q	K	L	A	F	F
A19	V	H	H	Q	K	L	V	A	F
A20	V	H	H	Q	K	L	V	F	A
aa no.	12	13	14	<u>15</u>	16	17	<u>18</u>	19	20

Tabla 5. Resumen de péptidos usados de la tercer genoteca .

Los aa importantes para la unión están marcados en *itálica* y subrayados y los aa absolutamente críticos importantes para la unión están marcados en *itálica*, **negrita** y subrayados

p13-21		H	H	Q	K	L	V	F	F	A		
p13-21	G21	H	H	Q	K	L	V	F	F	G		
p14-22			H	Q	K	L	V	F	F	A	E	
p14-22	A22		H	Q	K	L	V	F	F	A	A	
p15-23				Q	K	L	V	F	F	A	E	D
p15-23	A23			Q	K	L	V	F	F	A	E	A
aa no.		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23

Ejemplo 15: Influencia de la vacunación pasiva con mACI-01-Ab7 C2 en la carga amiloidea del cerebro en ratones transgénicos hAPP único

Para evaluar la capacidad *in vivo* del anticuerpo monoclonal mACI-01-Ab7 C2 para unirse y depurar el amiloide soluble fuera del cerebro, se usaron ratones hAPP únicos de 6 meses⁹, apareados en género y sexo para un estudio de inmunización pasiva con diferentes dosis. La carga de amiloide soluble se analizó en el final del estudio por la recolección del cerebro de los animales y por la realización de un ELISA específico de Aβ 1-40 y Aβ 1-42 (TGC, Germany).

8-13 animales por grupo recibieron en un intervalo de una semana dos inyecciones de 100, 300 y 1000 µg de anticuerpo monoclonal en 200µl de PBS mientras que la inyección de PBS solo sirvió como control. Un día después de la segunda inyección los animales se sacrificaron para la realizaron del análisis bioquímico de la fracción amiloidea soluble. Para cuantificar la cantidad de Aβ 1-

40 humano y A β 1-42 humano de la fracción soluble de los homogenizados cerebros y/o en líquido cefalorraquídeo (CSF), se usaron kits de ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzima (ELISA) disponibles en el comercio (h Amyloid β 40 o β 42 ELISA de alta sensibilidad, TGC, Switzerland). El ELISA se realizó de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Brevemente, se prepararon estándares (una dilución de A β 1-40 o A β 1-42 sintético) y muestras en una placa de propileno 96 pocillos sin capacidad de unir proteínas (Greiner, Germany). Las diluciones estándares con concentraciones finales de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3 y 15,6 pg/ml y las muestras se prepararon en el diluyente de muestra, provisto con el kit de ELISA, a un volumen final de 60 μ l. Ya que los niveles de amiloide aumentan con la edad del ratón y ya que la evaluación real requiere que las lecturas de las muestras estén dentro de la parte lineal de la curva del estándar, las muestras para el análisis de A β 40 se diluyeron 2:3, las muestras para el análisis de A β 42 no se diluyeron.

Las muestras, estándares y blancos (50 μ l) se agregaron a la placa de polistirolo recubierta con anti-A β (el anticuerpo de captura reconoce selectivamente el extremo C-terminal del antígeno) además de un conjugado de anticuerpo anti-A β selectivo (anticuerpo de detección biotinilado) y se incubó toda la noche a 4°C para permitir la formación del complejo anticuerpo-amiloide-anticuerpo. El día siguiente, se agregó el conjugado estreptavidina-peroxidasa, después de 30 más se agregó la mezcla de TMB/peróxido, lo cual produjo la conversión del sustrato en un producto coloreado y se midió la intensidad del color por medio de la fotometría con un lector de ELISA con un filtro de 450. La cuantificación del contenido A β de las muestras se obtuvo por comparación de la absorbancia de la curva estándar realizada con A β 1-40 o A β 1-42 sintético. Los datos se expresaron como cambios individuales del valor control medio (en porcentaje del control).

La cantidad total de A β 40 en los homogenizados de cerebro se podría reducir en forma significativa y aproximadamente en forma no significativa para A β 42 cuando los ratones hAPP solos se inmunizaron pasivamente con dos inyecciones i.p. del anticuerpo monoclonal ACI-01-Ab7 C2 en una dosis de 300 μ g (A β 40: $-27,3 \pm 13,9\%$ con $p < 0,05$; A β 42: $-8,6 \pm 22,4$ con $p = 0,56$; prueba T de Student no apareada), mientras que 100 y 1.000 μ g no tuvieron significación. La inmunización con 100 μ g condujo a un aumento de A β 40 y A β 42 de los homogenizados de cerebro (A β 40: $32,3 \pm 36,8\%$; A β 42: $38,3 \pm 51,4\%$) mientras que el tratamiento con 1.000 μ g estimuló la tendencia correcta de reducción de la carga de amiloide y podría ser potencialmente efectiva con un número aumentado de animales por grupo (A β 40: $-2,2 \pm 26,0\%$; A β 42: $-9,3 \pm 15,9\%$). Estos datos demuestran que en el protocolo de inmunización aguda un anticuerpo mACI-01-Ab7 C2 es capaz de disminuir la cantidad total de A β soluble en el cerebro de este modelo AD murino. De modo interesante, parece ser que la relación con la dosis es transitoria pero se deben realizar más estudios con grupos más grande para obtener datos significantes.

Ejemplo 16: Influencia de la administración pasiva crónica del mACI-01-Ab7 C2 en la carga de placa en ratones transgénicos hAPPxPS1 dobles

Para evaluar la capacidad *in vivo* del anticuerpo monoclonal mACI-01-Ab7 C2 para unirse y reducir las placas amiloides del cerebro, se usaron ratones transgénicos dobles hAPPxPS1¹⁰ de 3,5 meses, apareados en género y sexo para un estudio de inmunización pasiva prolongado crónico. Las placas amiloideas se analizaron en el final del estudio por la histoquímica del cerebro de los animales por unión con Tioflavina S.

15 animales transgénicos recibieron 16 inyecciones semanales de 500 μ g de anticuerpo monoclonal en PBS. 15 animales se inyectaron con PBS solo, actuando como controles. Todas las inyecciones se dieron por vía intra-peritoneal.

En el momento del sacrificio, los ratones se anestesiaron y se purgó en forma trans-cardíaca con suero fisiológico a 4°C para eliminar la sangre de los vasos cerebrales. Posteriormente, se retiró el cerebro del cráneo y se separaron el cerebro anterior y posterior con un corte en el plano corona/ frontal. El cerebro anterior se dividió finalmente en el hemisferio izquierdo y derecho por medio de un corte sagital de la línea media. Un hemisferio se fijó posteriormente toda la noche en paraformaldehído 4% para el estudio histológico. Las secciones del micrótopo Sagittal (40 μ m) se cortaron para las incubaciones flotantes libres y se conservaron a 4°C hasta la tinción en PBS con azida sódica 0,1%. Se tiñeron cinco secciones de diferentes niveles de placas densas con Tioflavina S. Las secciones de todos los animales usados se aleatorizaron para la tinción y cuantificación ciega. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio Leica DMR equipado con una cámara Sony DXC-9100P y señalaron con una computadora que emplea un programa de computación Leica Q-Win. La intensidad de luz y los ajustes del condensador del microscopio se mantuvieron constantes durante todo el proceso de adquisición de imágenes. Todas las imágenes obtenidas se sometieron a las mismas subrutinas de computador para minimizar el sesgo del investigador. El umbral de densidad del extendido se aplicó en forma uniforme a lo largo del análisis. El área del subiculum se seleccionó para la cuantificación automática de la carga amiloidea en la tinción con Tioflavina S.

La carga total de placa y el número de placas del área del subiculum se pudo reducir en forma significativa cuando los ratones hAPP/PS1 dobles se inmunizaron pasivamente durante 4 meses como se describió anteriormente. Se pudo lograr una disminución significativa de la carga de placa del 31% (mACI-01-Ab7 C2: $1,11 \pm 0,21\%$ y control: $1,61 \pm 0,35\%$; $p=0,003$, Mann-Whitney U-Test) mientras que la inmunización pasiva crónica redujo en forma significativa la cantidad de placas en 19% (mACI-01-Ab7 C2: $8,73 \pm 1,36$ y control: $10,78 \pm 1,36$;

$p=0,006$, Mann-Whitney U-Test), lo que indica que la solubilización de las placas se produjo en una medida ligeramente menor que la ruptura de placa.

Ejemplo 17: Influencia de la vacunación pasiva con mACI-01-Ab7 C2 sobre la capacidad de memoria de los ratones transgénicos hAPP simples

Para analizar la capacidad *in vivo* del anticuerpo mACI-01-Ab7 C2 para modificar o aumentar la funcionalidad cognitiva, se usaron ratones hAPP simples de 9 meses, aparados en género y edad, para un estudio de inmunización pasiva. Se midió la cognición no espacial en el fin del periodo de inmunización evaluado por el nueva técnica de reconocimiento de objetos (ORT).

12 animales por grupo recibieron dos inyecciones intraperitoneales de 400 μ g de anticuerpo monoclonal en 200 μ l de PBS mientras que la inyección de f PBS solo sirvió como control. Un día después de la segunda inyección reestudio la capacidad cognitiva con la nueva técnica de reconocimiento de objetos (ORT)^{12, 13}. Para el enrolamiento ORT, los ratones se colocaron durante 10 minutos en una pista de comportamiento y se los enfrentó con un objeto nuevo desconocido. Se registró el tiempo de exploración. Tres horas después los mismos animales se re-colocaron en la misma pista para una 2^{da} sesión pero enfrentado al objeto viejo previamente explorado, y a un objeto nuevo adicional. De nuevo, se registraron los tiempos de exploración para ambos objetos y se calcularon los índices de cognición resultante como la relación del tiempo de exploración del nuevo objeto con respecto al tiempo de exploración total y se expresaron como cambios proporcionales con el control.

La vacunación pasiva con mACI-01-Ab7 C2 v condujo a un aumento significativo de las capacidades de memoria cognitiva en ratones transgénicos simples AD (mACI-01-Ab7 C2: $131,6 \pm 9,1\%$ y control: $100,0 \pm 9,2\%$ con $p<0,05$; prueba T de Student no apareada y $n=12$ por cada grupo).

Depósitos:

Las siguientes líneas celulares de hibridoma redepusitaron con el "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, bajo las disposiciones del Tratado de Budapest:

Designación de la línea del hibridoma	Designación del anticuerpo	Fecha de depósito	No de acceso
FP 12H3	mACI-01-Ab7	01 de diciembre de 2005;	DSM ACC2752
FP 12H3-C2	mACI-01-Ab7C2	01 de diciembre de 2005	DSM ACC2750
FP 12H3-G2	mACI-01-Ab7G2	01 de diciembre de 2005	DSM ACC2751
ET 7E3	mACI-02-Ab6	8 de diciembre de 2005	DSM ACC2755
EJ 7H3	mACI-24-Ab4	8 de diciembre de 2005	DSM ACC2756

and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. *J Neuroinflammation* 2:22.

Hodgson et al., *Bio/Technology*, 9:421 (1991)

Iwadata M, Asakura T, Williamson MP. (1999) *J.Biomol.NMR*; 13: 199-211.

Kirschner,D.A., Abraham,C., & Selkoe,D.J. X-ray diffraction from intraneuronal paired helical filaments and extraneuronal amyloid fibers in Alzheimer disease indicates cross-beta conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 503-507 (1986).

Khaw, B. A. et al. *J. Nucl. Med.* 23:1011-1019 (1982)

Kennedy, J. H., et al., 1976 (*Clin. Chim. Acta* 70:1-31)

Klein WL (2002) Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41(5):345-352.

Kohler y Milstein (*Nature* 256: 495-497 (1975))

LeVine, H. III, (2002). *Arch Biochem Biophys* 404, 106-115.

Luca et al., 2001

McGeer et al., 1994

Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, Van LF (1999) Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem* 274:6483-6492.

Nelson,R. & Eisenberg,D. Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.*(2006).

Nicolau, C., Greferath, R., Balaban, T. S., Lazarte, J. E., y Hopkins, R. J. (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2332-2337.

Queen et al., *Proc. Natl Acad Sci USA*, 86:10029-10032 (1989)

Pearson W.R. (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98

Petkova AT, Buntkowsky G, Dyda F, Leapman RD, Yau WM, Tycko R. *J.Mol.Biol.* 2004; 335: 247-260.

Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, Antzutkin ON, Leapman RD, Delaglio F, Tycko R. (2002) *Proc.Nat..Acad.Sci.U.S.A*; 99: 16742-16747.

Rousseaux et al. *Methods Enzymology*, 121:663-69, Academic Press, 1986

Rzepecki, P., Nagel-Steger, L., Feuerstein, S., Linne, U., Molt, O., Zadnart, R., Aschermann, K., Wehner, M., Schrader, T. y Riesner, D. (2004). J Biol Chem 279, 47497-47505.

Sambrook et al. loc. cit.

Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Smith, S. O., y Bormann, B. J. (1995). Proc Natl Acad Sci U S A 92, 488-491.

Schenk et al., 1999

Schurs, A. H. W. M., et al. 1977 (Clin. Chim Acta 81:1-40

Slot JW, Geuze HJ (1985) A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. Eur J Cell Biol 38:87-93.

Smith y Waterman, Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489

Van dA, I, Wera S, Van LF, Henderson ST (2005) A ketogenic diet reduces amyloid beta 40 and 42 in a mouse model of Alzheimer's disease. Nutr Metab (Lond) 2:28.

Wagner et al (2002) Journal of Liposome Research Vol 12(3), pp 259 – 270

Ye, J., Dave, U. P., Grishin, N. V., Goldstein, J. L., y Brown, M. S. (2000). Proc Natl Acad Sci U S A 97, 5123-5128.

Zrein et al. (1998), Cinical y Diagnostic Laboratory Immunology, 5(1): 45-49.

Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256

WO 2004/058258

WO96/1359

WO96/29605

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AC Immune S.A.

<120> Anticuerpo monoclonal

<130> L3017

<150> EP 05027092.5

<151> 2005-12-12

<150> EP 06014729.5

<151> 2006-07-14

<150> EP 06020766.9

<151> 2006-10-02

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Péptido antigénico Aß 1-15

<400> 1

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

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Péptido antigénico Aß 1-16

<400> 2

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

<210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Péptido antigénico A β 1-16 (A14)

<400> 3
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His Gln Lys
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Péptido antigénico A β 22-35

<400> 4
 Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met
 1 5 10

<210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Péptido antigénico A β ₂₉₋₄₀

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

<210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Péptido antigénico A β ₁₋₁₇

<400> 6
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
 1 5 10 15

<210> 7
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 9
gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta ttacattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcttgatct acaaagtttc caaccgattt 180
tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttctt 300
tggacgttcg gtggaggcac caagctagaa atcaaa 336

<210> 10
<211> 417
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 10
atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttcttgcttc cagcagtgat 60
gttgatgaga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
tcttgcagat ctagtcagag ccttgatat agtaatggag acacctattt acattggtac 180
ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa cggattttct 240
ggggtcccag acagggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc 300
agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccttgg 360
acgttcggtg gaggcaccaa gctagaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgta 417

<210> 11
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 11
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120
ccagacaaga ggctggaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180
ccagacagtg tgaagggcgc attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaatga gcagctctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagtgggtgac 300
tactggggcc aaggctccac tctcacagtc tcctca 336

<210> 12
<211> 408
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 12
atgrasttsg ggytcagintt grttttcctt gcccttattt taaaagggtgt ccaatgtgag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtcctt gaaactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tatggcatgt ctggggttcg ccagactcca 180
gacaagaggc tgggaattggc cgcaagcatc aatagtaatg gtggtagcac ctattatcca 240
gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag tgggtgactac 360
tggggccaag gctccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacaccc 408

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> homo sapiens

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

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

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe o Ile

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe o Ile

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, Ser o Ile

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa puede ser Glu o Asp

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Xaa puede ser Glu o Asp

<400> 13

His	Xaa	Lys	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5					10

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa puede ser His, Asn, Gln, Lys o Arg

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser Asn o Gln

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser His, Asn, Gln, Lys o Arg

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, Ser o Ile

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, Ser o Ile

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, Ser o Ile

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

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa puede ser Glu o Asp

<400> 14

Xaa	His	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Phe	Phe	Xaa	Xaa	Xaa
1				5					10	

<210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

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

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

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

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

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

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

<400> 15

Xaa	Xaa	Lys	Leu	Xaa	Phe	Phe	Xaa	Xaa	Xaa
1				5				10	

<210> 16

<211> 10
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

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

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

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

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

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

<400> 16

His Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

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

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

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

<220>

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

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

<400> 17

Xaa	Xaa	Lys	Leu	Xaa	Phe	Phe	Xaa	Xaa	Asp
1				5					10

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

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

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

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

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

<400> 18

His	Xaa	Lys	Leu	Xaa	Phe	Phe	Xaa	Xaa	Asp
1				5					10

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

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

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

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser Lys, His, Asn, Gln o Arg

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

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

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser Glu o sp

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

<400> 19

Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Phe	Phe	Xaa	Xaa	Xaa
1				5					10

<210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 20

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

<210> 21
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

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

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215

<210> 22
<211> 448
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 22

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

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

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

35	40	45
Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys		
	85	90 95
Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser		
	100	105 110
Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly		
	115	120 125
Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr		
	130	135 140
Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser		
145	150	155 160
Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met		
	165	170 175
Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val		
	180	185 190

Thr	Cys	Ser	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Thr	Val	Asp	Lys	Lys	195	200	205	
Leu	Glu	Pro	Ser	Gly	Pro	Ile	Ser	Thr	Ile	Asn	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	210	215	220	
Lys	Glu	Cys	His	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	225	230	235	240
Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Asn	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	245	250	255	
Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	260	265	270	
Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	275	280	285	
Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Ile	Arg	Val	Val	290	295	300	
Ser	Thr	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	305	310	315	320
Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	325	330	335	
Ile	Ser	Lys	Ile	Lys	Gly	Leu	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Ile	Leu	340	345	350	
Pro	Pro	Pro	Ala	Glu	Gln	Leu	Ser	Arg	Lys	Asp	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	355	360	365	
Leu	Val	Val	Gly	Phe	Asn	Pro	Gly	Asp	Ile	Ser	Val	Glu	Trp	Thr	Ser	370	375	380	
Asn	Gly	His	Thr	Glu	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asp	Thr	Ala	Pro	Val	Leu	Asp	385	390	395	400

REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descrito y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo

1. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que después de la co-incubación con péptidos monoméricos amiloides, en particular péptidos β -amiloides tales como, por ejemplo, los péptidos monoméricos $A\beta$ 1-39, 1-40, 1-41, 1-42 o 1-43, pero especialmente los péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$, inhibe la agregación de los monómeros $A\beta$ a fibrillas poliméricas de alto peso molecular.

2. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, anticuerpo que inhibe la agregación de los monómeros $A\beta$ a fibrillas poliméricas de alto peso molecular por lo menos un 50%, particularmente por lo menos un 60%, particularmente por lo menos un 65%, más particularmente por lo menos un 75%, aun más particularmente por lo menos un 80%, pero especialmente por lo menos un 85%-90% o más en comparación con los respectivos monómeros de péptidos amiloides incubados en buffer (control).

3. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, anticuerpo que se co-incuba con péptidos amiloides monoméricos a una relación de concentraciones molares de hasta 1:100

4. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con la reivindicación 3, anticuerpo que exhibe su propiedad de inhibición de la

agregación después de la co-incubación con péptidos amiloides monoméricos a una relación de concentraciones molares de entre 1:30 y 1:100.

5. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, anticuerpo que exhibe su propiedad de inhibición de la agregación después de la co-incubación con péptidos amiloides monoméricos durante 48 horas a una temperatura de 37°C.

6. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con la reivindicación 5, anticuerpo que después de la co-incubación a una relación de concentraciones molares de entre 1:30 y 1:100, en particular en una relación de 1:100 con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptidos amiloides monoméricos, particularmente péptidos β -amiloides monoméricos tales como, por ejemplo, los péptidos A β monoméricos 1-39, 1-40, 1-41, 1-42 o 1-43, pero especialmente los péptidos A β ₁₋₄₂ monoméricos, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en por lo menos 35%, particularmente en por lo menos 40%, más particularmente en por lo menos 50%, aún más particularmente en por lo menos 60%, pero especialmente en por lo menos 70% o más.

7. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la inhibición de la agregación y el potencial de desagregación del anticuerpo, respectivamente, se determina por ultracentrifugación en gradiente de densidad seguida de análisis de sedimentación por SDS-PAGE en un gradiente preformado.

8. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con

cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la inhibición de la agregación y el potencial de desagregación del anticuerpo, respectivamente, se determina por el ensayo de tioflavina T (Th-T) fluorescente.

9. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que, después de la co-incubación con fibrillas o filamentos preformados amiloides poliméricos de alto peso molecular formados por la agregación de péptidos amiloides monoméricos, particularmente péptidos β amiloides monoméricos tales como, por ejemplo, los péptidos A β monoméricos 1-39, 1-40, 1-41, 1-42 o 1-43, pero especialmente péptidos A β_{1-42} monoméricos, es capaz de inducir una transición de la conformación de lámina β a una conformación de arrollamiento al azar en una localización dada de la molécula, que produce un aumento de la conformación enrollada al azar a expensas de la conformación de lámina β y una solubilización mejorada de las fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados.

10. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con la reivindicación 9, anticuerpo que es capaz de inducir un aumento de la conformación enrollada al azar a expensas de la conformación de lámina β con reducción de esta última en por lo menos 30%, particularmente en por lo menos 35%, y más particularmente en por lo menos 40% y más, en comparación con las fibrillas o filamentos amiloides poliméricos preformados respectivos incubados en buffer (control).

11. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10, donde la transición de la conformación secundaria tiene lugar en el ambiente de la Val12 de la proteína A β .

12. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-11, donde la co-incubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados se realizó durante 24 horas a una temperatura de 37°C.

13. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con la reivindicación 9-12, donde el potencial del anticuerpo para inducir una transición en la estructura secundaria se determina por espectroscopía RMN en estado sólido.

14. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que después de la co-incubación con péptidos amiloides monoméricos, particularmente péptidos β -amiloides monoméricos tales como, por ejemplo, los péptidos A β monoméricos 1-39, 1-40, 1-41, 1-42 o 1-43, pero especialmente los péptidos A β_{1-42} monoméricos, inhibe la agregación de los monómeros A β a fibrillas o filamentos poliméricos de alto peso molecular y además, después de la co-incubación con fibrillas o filamentos preformados amiloides poliméricos de alto peso molecular formados por la agregación de péptidos amiloides monoméricos, particularmente péptidos β -amiloides monoméricos tales como, por ejemplo, los péptidos A β monoméricos 1-39, 1-40, 1-41, 1-42 o 1-43, pero especialmente los péptidos A β_{1-42} monoméricos, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados.

15. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con la reivindicación 14, donde la co-incubación con péptidos amiloides monoméricos y fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados,

respectivamente, tiene lugar a una relación de concentraciones molares de hasta 1:100.

16. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con la reivindicación 15, donde la co-incubación con péptidos amiloides monoméricos y fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados, respectivamente, tiene lugar a una relación de concentraciones molares entre 1:30 y 1:100, particularmente a una relación de concentraciones molares de 1:100.

17. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-16, donde la co-incubación con péptidos amiloides monoméricos y fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados se realiza durante 48 horas y 24 horas, respectivamente, a una temperatura de 37°C.

18. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-17, anticuerpo que es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en por lo menos 10%, particularmente en por lo menos 25%, más particularmente en por lo menos 35%, aún más particularmente en por lo menos 50%, pero especialmente en por lo menos 60-70% o más.

19. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-17, anticuerpo que inhibe la agregación de péptidos amiloides monoméricos, particularmente péptidos β -amiloides monoméricos tales como, por ejemplo, los péptidos A β monoméricos 1-39, 1-40,

1-41, 1-42 o 1-43, pero especialmente los péptidos $A\beta_{1-42}$ monoméricos en por lo menos 50%, particularmente en por lo menos 65%, más particularmente en por lo menos 75%, aún más particularmente en por lo menos 80%, pero especialmente en por lo menos 85-90% o más, en comparación con los monómeros del péptido amiloide respectivo incubados en buffer (control).

20. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que incorpora la propiedad de inhibición de agregación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y 14-19 y la propiedad de desagregación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-8, 12 y 14-19 además de la propiedad de ruptura de la lámina β de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-13.

21. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que se une en forma directa y específica a las fibras $A\beta$ por localización de una región epitópica del polipéptido de $A\beta$ limitado por los residuos de aminoácidos aa_n - aa_m , siendo n un número entero entre 13 y 15, pero especialmente 14 y m un número entero entre 22 y 24, pero especialmente 23, donde n y m no pueden ser números idénticos y n siempre debe ser un número más pequeño que m , con la diferencia entre n y $m \geq 2$.

22. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que reconoció la conformación nativa del amiloide ya que se une específicamente a los oligómeros y fibras de amiloide pero no a las especies amiloides no linealizadas.

23. Un anticuerpo monoclonal, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, anticuerpo o fragmento que se

une a un monómero A β con una afinidad de unión de por lo menos aproximadamente 1×10^{-6} a por lo menos aproximadamente 1×10^{-8} , particularmente de por lo menos aproximadamente 1×10^{-6} a por lo menos aproximadamente 1×10^{-7} , más particularmente de por lo menos aproximadamente 1×10^{-7} a por lo menos aproximadamente 1×10^{-8} , aún más particularmente de por lo menos aproximadamente 1×10^{-7} a por lo menos aproximadamente 4×10^{-7} pero, con preferencia, no muestra ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora amiloide (APP).

24. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, anticuerpo o fragmento que se une a una fibra, fibrilla o filamento de A β con una afinidad de unión de por lo menos aproximadamente 1×10^{-7} a por lo menos aproximadamente 1×10^{-9} , particularmente de por lo menos aproximadamente 1×10^{-7} a por lo menos aproximadamente 1×10^{-8} , más particularmente de por lo menos aproximadamente 1×10^{-8} a por lo menos aproximadamente 1×10^{-9} , aún más particularmente de por lo menos aproximadamente 1×10^{-8} a por lo menos aproximadamente 5×10^{-8} , pero, con preferencia, no muestra ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora amiloide (APP).

25. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, anticuerpo o fragmento que presenta una afinidad de unión con una fibra, fibrilla o filamento de A β que es por lo menos 5 veces, particularmente por lo menos 10 veces, más particularmente por lo menos 15 veces, superior a la afinidad de unión de un monómero de A β .

26. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que

Incorpora por lo menos una de las propiedades de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, o sea inhibición de la agregación, inducción de desagregación, inducción de la transición conformacional, reconocimiento y unión directa a una región epitópica del polipéptido A β , pero especialmente una combinación de dos o más de dichas propiedades.

27. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que exhibe alta especificidad con los péptidos monoméricos A β ₁₋₄₂ pero esencialmente no muestra reactividad cruzada con los péptidos monoméricos A β ₁₋₃₈, A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₄₀ y/o A β ₁₋₄₁.

28. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 27 que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo es hasta 100 veces, particularmente 50 a 100 veces, más particularmente 80 a 100 veces, pero especialmente 100 veces más sensible al péptido amiloide A β ₁₋₄₂ en comparación con A β ₁₋₃₈, A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₁ y es capaz de inhibir, *in vitro* e *in vivo*, la agregación de péptidos monoméricos amiloidogénicos.

29. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con las reivindicaciones 27 o 28 que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que tiene una alta sensibilidad de unión al péptido amiloide A β ₁₋₄₂ y es capaz de detectar las fibras A β ₁₋₄₂ en una concentración de hasta 0,01 μ g, pero particularmente en un rango de concentraciones entre 0,5 μ g y 0,01 μ g, más particularmente entre 0,1 μ g y 0,01 μ g, pero especialmente en una concentración de 0,01 μ g.

30. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente

equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que es capaz de disminuir la cantidad total de A β soluble en el cerebro de un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que sufre una enfermedad o afección que conduce a concentraciones aumentadas de A β soluble en el cerebro.

31. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que es capaz de alterar las placas, disminuyendo de este modo la carga de placas en el cerebro de un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que sufre una enfermedad o afección que conduce a una carga de placas aumentada en el cerebro.

32. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 31 que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo disminuye la carga de placas en el cerebro en por lo menos 20%, particularmente en por lo menos 25%, más particularmente en por lo menos 30%, aún más particularmente en más de 30%.

33. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 31 que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que es capaz de solubilizar las placas, lo cual conduce a la reducción de la cantidad de placas en el cerebro de un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que sufre una enfermedad o afección que conduce a una carga de placas aumentada en el cerebro.

34. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 31 que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que reduce la cantidad de placas en el cerebro en por lo menos 10%, particularmente en por lo menos 15%, más particularmente en por lo menos 20%.

35. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que incorpora por lo menos una de las propiedades seleccionadas del grupo que consiste en inhibición de la agregación, desagregación, inducción de la transición conformacional, reconocimiento y unión directa a un epítopo, particularmente un epítopo discontinuo de la conformación en la región 14-23, particularmente en la 14-20, lo que reduce o disminuye la velocidad de formación de placas amiloides, disminuyendo la cantidad total de A β soluble del cerebro, disminuyendo la carga de placas en el cerebro, reduciendo la proporción de placas del cerebro, reteniendo o aumentando la capacidad de memoria cognitiva, pero especialmente una combinación de dos o más de dichas propiedades.

36. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 35 que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que incorpora por lo menos 2, particularmente por lo menos 3, más particularmente por lo menos 4, aún más particularmente por lo menos 5, 6, 7 u 8, pero especialmente todas las propiedades mencionadas anteriormente.

37. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que reconoce y se une a por lo menos un sitio de unión distinto, particularmente a por lo menos dos sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide donde el dicho por lo menos uno o dichos por lo menos dos sitios de unión distintos comprenden por lo menos un residuo de aminoácido y por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, respectivamente, involucrados en forma predominante en la unión del anticuerpo, donde, en una realización específica de la invención, el por lo menos un residuo que constituye el primer sitio de unión distinto es Leu y los por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, que constituyen el

segundo sitio de unión distinto, son -Phe-Phe- incluidos en la siguiente secuencia nuclear:

- Xaa₁ - Xaa₂ - Xaa₃ - Leu -Xaa₄ - Phe - Phe - Xaa₅ - Xaa₆ - Xaa₇ -,

donde

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

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

Xaa₃ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Lys, His, Asn, Gln y Arg;

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

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

Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp,

Xaa₇ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp.

38. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que reconoce y se une a por lo menos un sitio de unión distinto, particularmente a por lo menos dos sitios de unión distintos, más particularmente a por lo menos tres sitios de unión distintos de la proteína β -amiloide, donde dichos sitios de unión distintos comprenden por lo menos uno y por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, respectivamente, involucrados en forma predominante en la unión del anticuerpo, donde el por lo menos uno y los por lo menos dos aminoácidos consecutivos, que están separados por lo menos por un residuo de

aminoácido no involucrado en la unión al anticuerpo o en una medida significativamente menor en comparación con los residuos de aminoácidos involucrados en forma predominante en la unión del anticuerpo, son -His- y -Lys-Leu-, respectivamente, incluidos en la siguiente secuencia nuclear:

- His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃- Xaa₄- Xaa₅-Xaa₆- - Xaa₇ - Xaa₈ -,

donde

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

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

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

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

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

Xaa₇ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp;

Xaa₈ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp

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

39. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que reconoce y se une a por lo menos un sitio de unión distinto, particularmente a por lo menos dos sitios de unión distintos, más particularmente a por lo menos tres

sitios de unión distintos de la proteína β -amiloide, donde dichos sitios de unión distintos comprenden por lo menos uno y por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, respectivamente, involucrados en forma predominante en la unión del anticuerpo, donde los por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos que representan un primer sitio de unión son –Phe-Phe- y el por lo menos un residuo de aminoácido es –His-, incluidos en la siguiente secuencia nuclear:

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

donde

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

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

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

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

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

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

Xaa₈ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp,

Xaa₉ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp, y donde dichos residuos de aminoácidos Xaa₁, Xaa₃, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈

y Xaa₉ no están involucrados en la unión al anticuerpo o en una medida significativamente menor en comparación con el sitio de unión His y -Phe-Phe-.

40. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que reconoce y se une a por lo menos un sitio de unión distinto, particularmente a por lo menos dos sitios de unión distintos, más particularmente a por lo menos tres sitios de unión distintos de la proteína β -amiloide, donde dichos sitios de unión distintos comprenden por lo menos uno y por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, respectivamente, involucrados en forma predominante en la unión del anticuerpo, donde el primero de los por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos predominantemente involucrados en la unión del anticuerpo son -Lys- y -Leu-, y el segundo de los por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos son -Phe-Phe- incluidos en la siguiente secuencia nuclear:

- Xaa₁ - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₄ - Phe - Phe - Xaa₅ - Xaa₆ - Xaa₇ -,

donde

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

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

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

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

Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp;

Xaa₇ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp, y donde dichos residuos de aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇ no están involucrados en la unión del anticuerpo o en una medida significativamente menor en comparación con el sitio de unión -Lys-Leu y -Phe-Phe-.

41. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que reconoce y se une a por lo menos un sitio de unión distinto, particularmente a por lo menos dos sitios de unión distintos, más particularmente a por lo menos tres sitios de unión distintos de la proteína β -amiloide, donde dichos sitios de unión distintos comprenden por lo menos uno y por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, respectivamente, involucrados en forma predominante en la unión del anticuerpo, donde el primero de los por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos predominantemente involucrados en la unión del anticuerpo son -Lys-Leu-, y el segundo de los por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos son -Phe-Phe-, y el tercer por lo menos un residuo de aminoácido es -His- incluido en la secuencia nuclear:

-His - Xaa₂ - Lys - Leu -Xaa₄ - Phe - Phe - Xaa₅ - Xaa₆ - Xaa₇ -,

donde

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

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

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

Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp;

Xaa₇ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp, y donde los residuos de aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇ no están involucrados en la unión del anticuerpo o en una medida significativamente menor en comparación con el sitio de unión -His-, -Lys-Leu y -Phe-Phe-.

42. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que reconoce y se une a por lo menos un sitio de unión distinto, particularmente a por lo menos dos sitios de unión distintos, más particularmente a por lo menos tres sitios de unión distintos de la proteína β -amiloidé, donde dichos sitios de unión distintos comprenden por lo menos uno y por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, respectivamente, involucrados en forma predominante en la unión del anticuerpo, donde el primero de los por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos predominantemente involucrados en la unión del anticuerpo son -Lys-Leu-, y el segundo de los por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos son -Phe-Phe-, y el tercer por lo menos un residuo de aminoácido es -Asp- incluido en la secuencia nuclear siguiente:

- Xaa₁ - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₄ - Phe - Phe - Xaa₅ - Xaa₆ - Asp -,

donde

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

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

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

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

Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp, y donde dichos residuos de aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇ no están involucrados en la unión al anticuerpo o en una medida significativamente menor en comparación con el sitio de unión de -Asp-, -Lys-Leu y -Phe-Phe-.

43. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que se une a 4 sitios de unión distintos de la proteína β -amiloide donde dichos 4 sitios de unión distintos comprenden un residuo de aminoácido y dos residuos de aminoácidos consecutivos, respectivamente, residuos que están involucrados en forma predominante en la unión del anticuerpo, donde dichos 4 sitios de unión distintos se ubican en estrecha proximidad entre sí en el antígeno, separados por lo menos por un residuo de aminoácido no involucrado en la unión al anticuerpo o en una medida significativamente menor en comparación con dicho residuo de aminoácido y dichos dos residuos de aminoácidos consecutivos de los 4 sitios de unión distintos, formando de este modo un epítopo discontinuo conformacional.

44. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 43, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, donde el primero de los dos residuos de aminoácidos consecutivos involucrados en forma predominante en la unión del anticuerpo son -Lys-Leu-, y el segundo de por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos es -Phe-Phe-, el primero de los residuos de aminoácidos únicos es -His- y el segundo de los residuos de aminoácidos únicos es -Asp- incluido en la siguiente secuencia nuclear:

- His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₄ - Phe - Phe - Xaa₅ - Xaa₆ - Asp -

donde

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

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

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

Xaa₆ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que comprende Glu y Asp, y donde dichos residuos de aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇ no están involucrados en la unión al anticuerpo o en una medida significativamente menor en comparación con el sitio de unión de -His-, -Asp-, -Lys-Leu y -Phe-Phe-.

45. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 37-44, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, donde dichos residuos de aminoácidos consecutivos, particularmente -Lys-Leu- en posición 16 y 17 y -Phe-Phe- en posición 19 y 20, que están predominantemente involucrados en la unión de la proteína β -amiloide, están incluídos en la siguiente región nuclear del péptido β amiloide:

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

46. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-36, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que reconoce y se une a un epítope discontinuo conformacional como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 37 a 45.

47. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que comprende la región variable de la cadena liviana (LCVR) de la SEC ID NO: 7.

48. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que comprende la región variable de la cadena pesada (HCVR) de la SEC ID NO: 8.

49. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que comprende tanto la región variable de la cadena pesada (HCVR) de la SEC ID NO: 8 como la región variable de la cadena liviana (LCVR) de la SEC ID NO: 7.

50. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo que comprende una región variable de la cadena liviana (LCVR) o una región variable de la cadena pesada (HCVR) o ambas, una región variable de la cadena liviana (LCVR) y una región variable de la cadena pesada (HCVR) que es homóloga a cualquiera de los péptidos proporcionados en las SEC ID NO: 7 y 8, respectivamente.

51. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 50 que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo donde la región variable de cadena liviana (LCVR) presenta una secuencia de aminoácidos que es 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia dada SEC ID NO: 7.

52. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 50 que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo donde la región variable de cadena pesada (HCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia dada en la SEC ID NO: 8.

53. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 50 que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo donde la región variable de cadena liviana (LCVR) y la región variable de cadena pesada (HCVR) juntas tienen una secuencia de aminoácidos que es 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia dada en las SEC ID NOs: 7 y 8.

54. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 47-53 que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que reconoce y se une a un epítopo discontinuo conformacional como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 37 a 45 y exhibe las propiedades específicas de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-36.

55. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma FP 12H3, depositados el 01 de diciembre de 2005 y 9 de diciembre de 2005, respectivamente, como DSM ACC2752.

56. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma FP 12H3-C2, depositados el 01 de diciembre de 2005 y 9 de diciembre de 2005, respectivamente, como DSM ACC2750.

57. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma FP 12H3-G2, depositados el 01 de diciembre de 2005 y 9 de diciembre de 2005, respectivamente, como DSM ACC2751.

58. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma ET 7E3, depositado el 08 de diciembre de 2005 como DSM ACC2755.

59. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma EJ 7H3, depositado el 08 de diciembre de 2005 como DSM ACC2756.

60. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo producido por la línea celular de hibridoma FP 12H3, depositados el 01 de diciembre de 2005 y 09 de diciembre de 2005, respectivamente, como DSM ACC2752, incluyendo los equivalentes funcionales del mismo.

61. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo producido por la línea celular de hibridoma FP 12H3-C2, depositados el 01 de diciembre de 2005 y 09 de diciembre de 2005, respectivamente, como DSM ACC2750, incluyendo los equivalentes funcionales del mismo.

62. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo producido por la línea celular de hibridoma FP 12H3-G2, depositados el 01 de diciembre de 2005 y 09 de diciembre de 2005, respectivamente como DSM ACC2751, incluyendo los equivalentes funcionales del mismo.

63. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo producido por la línea celular de hibridoma ET 7E3, depositado el 08 de diciembre de 2005 como DSM ACC2755, incluyendo los equivalentes funcionales del mismo.

64. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo producido por la línea celular de hibridoma EJ 7H3, depositado el 08 de diciembre de 2005 como DSM ACC2756, incluyendo los equivalentes funcionales del mismo.

65. Un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que se ha preparado contra una construcción antigénica supramolecular que comprende un péptido antigénico correspondiente a la secuencia de aminoácidos del péptido β -amiloide, particularmente del péptido β -amiloide $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-16}$ y $A\beta_{1-16}(\Delta 14)$, modificado con residuos hidrofóbicos tales como, por ejemplo, ácido palmítico o un residuo hidrofílico tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o una combinación de ambos, donde dicho residuo hidrofóbico y residuo hidrofílico, respectivamente, está unido en forma covalente a cada extremo a través de un aminoácido tal como, por ejemplo, lisina o cualquier aminoácido o análogo del aminoácido adecuado capaz de servir como molécula conectora.

66. Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que comprende

a) por lo menos la secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena liviana de la SEC ID NO: 9;

b) una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos de (a) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético;

c) una secuencia de nucleótidos con la secuencia complementaria a (a) y (b) o

d) un fragmento de una secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c) que comprende una extensión contigua de nucleótidos seleccionada del grupo que

consiste en por lo menos 20 nucleótidos contiguos, por lo menos 25 nucleótidos contiguos, por lo menos 30 nucleótidos contiguos, por lo menos 35 nucleótidos contiguos, por lo menos 40 nucleótidos contiguos, por lo menos 45 nucleótidos contiguos y por lo menos 50 nucleótidos contiguos.

67. Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que comprende

a) por lo menos la secuencia de nucleótidos de la cadena liviana de la SEC ID NO:10;

b) una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos de (a) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético;

c) una secuencia de nucleótidos con la secuencia complementaria a (a) y (b) o

d) un fragmento de una secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c) que comprende una extensión contigua de nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en por lo menos 20 nucleótidos contiguos, por lo menos 25 nucleótidos contiguos, por lo menos 30 nucleótidos contiguos, por lo menos 35 nucleótidos contiguos, por lo menos 40 nucleótidos contiguos, por lo menos 45 nucleótidos contiguos y por lo menos 50 nucleótidos contiguos.

68. Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que comprende

a) por lo menos la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada SEC ID NO: 11;

b) una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos de (a) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético;

c) una secuencia de nucleótidos con la secuencia complementaria a (a) y (b) o

d) un fragmento de una secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c) que comprende una extensión contigua de nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos de por lo menos 20 nucleótidos contiguos, por lo menos 25 nucleótidos contiguos, por lo menos 30 nucleótidos contiguos, por lo menos 35 nucleótidos contiguos, por lo menos 40 nucleótidos contiguos, por lo menos 45 nucleótidos contiguos y por lo menos 50 nucleótidos contiguos.

69. Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, que comprende

a) por lo menos la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de la SEC ID NO: 12;

b) una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos de (a) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético;

c) una secuencia de nucleótidos con la secuencia complementaria a (a) y (b) o

d) un fragmento de una secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c) que comprende una extensión contigua de nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en por lo menos 20 nucleótidos contiguos, por lo menos 25 nucleótidos contiguos, por lo menos 30 nucleótidos contiguos, por lo menos 35 nucleótidos contiguos, por lo menos 40 nucleótidos contiguos, por lo menos 45 nucleótidos contiguos y por lo menos 50 nucleótidos contiguos.

70. Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que hibridiza con una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 66-69.

71. Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 70, donde dicha secuencia de nucleótidos que hibridiza en condiciones de hibridación convencionales, en particular en condiciones de hibridación rigurosas, con una secuencia de nucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 66-69.

72. La región variable de cadena liviana (LCVR) de la SEC ID NO: 7.

73. La región variable de cadena pesada (HCVR) de la SEC ID NO: 8.

74. Un polinucleótido que codifica la región variable de cadena liviana (LCVR) de la SEC ID NO: 7.

75. Un polinucleótido que codifica la región variable de cadena pesada (HCVR) de la SEC ID NO: 8.

76. Una composición que comprende el anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65 en una cantidad terapéuticamente efectiva.

77. Una composición de acuerdo con la reivindicación 76, que es una composición farmacéutica que opcionalmente comprende también un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

78. Una composición de acuerdo con la reivindicaciones 77, que comprende el anticuerpo monoclonal en una cantidad terapéuticamente efectiva.

79. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 76 a 78 para su uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide, que incluyen la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide tales como la proteína A β involucrada en la enfermedad de Alzheimer.

80. Una mezcla que comprende un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65 en una cantidad terapéuticamente efectiva y, opcionalmente, otra sustancia biológicamente activa y/o un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente aceptables para uso farmacéutico.

81. Una mezcla de acuerdo con la reivindicación 79, donde la otra sustancia biológicamente activa es un compuesto usado en la medicación de enfermedades y trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide que incluyen la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide tales como la proteína A β involucrada en la enfermedad de Alzheimer.

82. Una mezcla de acuerdo con las reivindicaciones 80 o 81 que comprende además del anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65, por lo menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos contra el estrés oxidativo, compuestos anti-apoptóticos, quelantes de metales, inhibidores de la reparación de ADN tales como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propansulfónico (3APS), 1,3-propandisulfonato (1,3PDS), activadores de secretasas, inhibidores de β - y γ -secretasas, proteínas tau, neurotransmisores, agentes anti-lámina β , moléculas antiinflamatorias o inhibidores de colinesterasa (ChEI) tales como tacrina, rivastigmina, donepezil y/o galantamina y otros fármacos y suplementos nutritivos, junto con un anticuerpo de acuerdo con la presente invención y, opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o un excipiente aceptable para uso farmacéutico.

83. Una mezcla de acuerdo con la reivindicación 82, donde el compuesto es un inhibidor de la colinesterasa (ChEIs).

84. Una mezcla de acuerdo con la reivindicación 82, donde el compuesto es uno seleccionado del grupo que consiste en tacrina, rivastigmina, donepezil, galantamina, niacina y memantina.

85. Una mezcla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 80 a 84 que comprende el anticuerpo monoclonal y/o la sustancia biológicamente activa en una cantidad terapéuticamente efectiva.

86. Un método para producir un anticuerpo que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65, método que comprende preparar en un organismo hospedante adecuado anticuerpos pero particularmente anticuerpos monoclonales contra una construcción antigénica supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del péptido β -amiloide, particularmente del péptido β -amiloide $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-16}$ y $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$, modificado con residuos hidrofóbicos tales como, por ejemplo, ácido palmítico o un residuo hidrofílico tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o una combinación de ambos, donde dicho residuo hidrofóbico e hidrofílico, respectivamente, está unido en forma covalente a cada extremo a través de un aminoácido tal como, por ejemplo, lisina o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado capaz de servir como molécula conectora, y aislar el anticuerpo.

87. Uso de un anticuerpo monoclonal y/o una parte funcional del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65 y/o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 76 a 79, o una mezcla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 80 a 85 para la preparación de un medicamento para tratar o aliviar los efectos de enfermedades

y trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide que incluyen la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas amiloides que incluye la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tales como enfermedades que incluyen, pero sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (AD) y enfermedades o afecciones caracterizadas por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam; además de otras enfermedades que se basan o asocian con proteínas de tipo amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionado con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), miositis con cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de comienzo adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos y otras, que incluyen degeneración macular.

88. Un método de preparación de una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 76 a 79, o una mezcla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 80 a 85 que emplea un anticuerpo monoclonal y/o una parte funcional del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65 para su uso en el tratamiento o alivio de los efectos de las enfermedades o trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide que incluyen la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas amiloides que incluyen la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tales como enfermedades que incluyen, pero sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (AD) y enfermedades o afecciones caracterizadas por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como,

por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam; además de otras enfermedades que se basan o asocian con proteínas de tipo amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionado con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de comienzo adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos y otras, que incluyen degeneración macular.

89. Un método de preparación de un medicamento empleando un anticuerpo monoclonal y/o una parte funcional del mismo o un anticuerpo funcionalmente equivalente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65, una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 76 a 79 o una mezcla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 80 a 85 para prevenir, tratar o aliviar los efectos de enfermedades o trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide que incluyen la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas amiloides que incluyen la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tales como enfermedades que incluyen, pero sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (AD) y enfermedades o afecciones caracterizadas por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam; además de otras enfermedades que se basan o asocian con proteínas de tipo amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis

lateral amiotrófica), miositis con cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de comienzo adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos y otras, que incluyen degeneración macular.

90. Un método para la preparación de una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 76 a 79 empleando un anticuerpo monoclonal y/o un parte funcional del mismo o un anticuerpo funcionalmente equivalente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65, que comprende la formulación de dicho anticuerpo en una forma aceptable para uso farmacéutico.

91. Un método de acuerdo con la reivindicación 90, donde el anticuerpo está comprendido en la composición en una cantidad terapéuticamente efectiva.

92. Un método para reducir la carga de placas en el cerebro de un animal, particularmente un mamífero pero especialmente un ser humano que sufre de una enfermedad o afección que conduce a una carga de placas aumentada en el cerebro, que comprende administrar a un animal, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que requiere de tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65, o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 76 a 79, o una mezcla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 80 a 85.

93. Un método de acuerdo con la reivindicación 92, donde la carga de placas en el cerebro se reduce en por lo menos 20%, particularmente en por lo menos 25%, más particularmente en por lo menos 30%, aún más particularmente en más del 30%.

94. Un método para reducir la cantidad de placas en el cerebro de un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que sufre de una enfermedad o afección que conduce a una carga de placas

aumentada en el cerebro, que comprende administrar a un animal, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano necesitado de tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65, o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 76 a 79, o una mezcla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 80 a 85.

95. Un método de acuerdo con la reivindicación 94, donde la cantidad de placas en el cerebro se reduce en por lo menos 10%, particularmente en por lo menos 15%, más particularmente en por lo menos 20%.

96. Un método para disminuir la cantidad total de A β soluble en el cerebro de un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que sufre de una enfermedad o afección que conduce a concentraciones aumentadas de A β soluble en el cerebro, que comprende administrar a un animal, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que necesita tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65, o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 76 a 79, o una mezcla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 80 a 85.

97. Un método de prevenir, tratar o aliviar los efectos de enfermedades y trastornos causados por o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide que incluyen la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas amiloides que incluyen la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tales como enfermedades que incluyen, pero sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (AD) y enfermedades o afecciones caracterizadas por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral

hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam; además de otras enfermedades que se basan o asocian con proteínas de tipo amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), miositis con cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de comienzo adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos y otras, que incluyen degeneración macular, por administración de un anticuerpo, pero particularmente un anticuerpo monoclonal o una composición o mezcla que comprende tal anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39 a un animal o un ser humano afectado por tal trastorno, que comprende administrar a un animal, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que necesita tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65, o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 76 a 79, o una mezcla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 80 a 85.

98. Un método para retener o aumentar la capacidad de memoria cognitiva en un mamífero que exhibe una enfermedad o afección asociada con amiloide que comprende administrar a un animal, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que necesita tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65, o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 76 a 79, o una mezcla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 80 a 85.

99. Un método de acuerdo con la reivindicación 98, donde el anticuerpo monoclonal o la composición que comprende el anticuerpo monoclonal se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva.

100. Una línea celular de hibridoma caracterizada porque produce un anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65.

101. Una línea celular de hibridoma caracterizada porque produce un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma FP 12H3, depositado el 01 de diciembre de 2005 como DSM ACC2752.

102. Una línea celular de hibridoma caracterizada porque produce un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma FP 12H3-C2, depositado el 01 de diciembre de 2005 como DSM ACC2750.

103. Una línea celular de hibridoma caracterizada porque produce un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma FP 12H3-G2, depositado el 01 de diciembre de 2005 como DSM ACC2751.

104. Una línea celular de hibridoma caracterizada porque produce un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma ET 7E3, depositado el 01 de diciembre de 2005 como DSM ACC2755.

105. Una línea celular de hibridoma caracterizada porque produce un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma EJ 7H3, depositado el 08 de diciembre de 2005 como DSM ACC2756.

106. Línea celular de hibridoma FP 12H3, depositada el 01 de diciembre de 2005 como DSM ACC2752.

107. Línea celular de hibridoma FP 12H3-C2, depositada el 01 de diciembre de 2005 as DSM ACC2750.

108. Línea celular de hibridoma FP 12H3-G2, depositada el 01 de diciembre de 2005 como DSM ACC2751.

109. Línea celular de hibridoma ET 7E3, depositada el 08 de diciembre de 2005 como DSM ACC2755.

110. Línea celular de hibridoma EJ 7H3, depositada el 08 de diciembre de 2005 como DSM ACC2756.

111. Método de diagnóstico de una enfermedad o afección asociada con amiloide en un paciente, que comprende detectar la unión inmuno-específica de un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo del mismo a un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ*, que incluye los pasos de

(a) poner la muestra o parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha contiene el antígeno amiloide en contacto con un anticuerpo de acuerdo con la invención y como se describió anteriormente en la presente memoria, anticuerpo que se une a un epítipo de la proteína amiloide;

(b) permitir que el anticuerpo se una al antígeno amiloide para formar un complejo inmunológico;

(c) detectar la formación del complejo inmunológico y

(d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia del antígeno amiloide en la muestra o parte o área específica del cuerpo.

112. Método para determinar el grado de carga de placas amiloidogénicas de un tejido que comprende

(a) obtener una muestra representativa del tejido bajo investigación;

(b) examinar dicha muestra para determinar la presencia del antígeno amiloide con un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65;

(c) determinar la cantidad de anticuerpo unido al antígeno; y

(d) calcular la carga total de placas del tejido.

113. Un método de acuerdo con la reivindicación 112, donde la formación del complejo inmunológico en el paso c) se determina de modo tal que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlaciona con la presencia o ausencia del antígeno amiloide.

114. Un método para diagnosticar una predisposición a una enfermedad o afección asociada a amiloide en un paciente, que comprende detectar la unión inmunoespecífica de un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo del mismo a un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ*, que incluye los pasos de

(a) poner la muestra o parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha contiene el antígeno amiloide en contacto con un anticuerpo de acuerdo con la invención y como se describió anteriormente en la presente memoria, anticuerpo que se une a un epítipo de la proteína amiloide;

(b) permitir que el anticuerpo se una al antígeno amiloide para formar un complejo inmunológico;

(c) detectar la formación del complejo inmunológico y

(d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia del antígeno amiloide en la muestra o parte o área específica del cuerpo.

(e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor normal de control,

donde un aumento de la cantidad de dicho agregado en comparación con un valor normal de control indica que dicho paciente padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o afección asociada con amiloide.

115. Un método para controlar la enfermedad residual mínima es un paciente después del tratamiento con un anticuerpo o una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho método comprende:

(a) poner la muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha contiene el antígeno amiloide en contacto con un anticuerpo de acuerdo con la invención y como se describió anteriormente en la presente memoria, anticuerpo que se une a un epítipo de la proteína amiloide;

(b) permitir que el anticuerpo se una al antígeno amiloide para formar un complejo inmunológico;

(c) detectar la formación del complejo inmunológico y

(d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia del antígeno amiloide en la muestra o parte o área del cuerpo específica;

(e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor normal de control,

donde un aumento de la cantidad de dicho agregado en comparación con un valor de control normal indica que dicho paciente todavía padece una enfermedad residual mínima.

116. Un método para predecir la respuesta de un paciente tratado con un anticuerpo o una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende:

(a) poner la muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha contiene el antígeno amiloide en contacto con un

anticuerpo de acuerdo con la invención y como se describió anteriormente en la presente memoria, anticuerpo que se une a un epítoto de la proteína amiloide;

(b) permitir que el anticuerpo se una al antígeno amiloide para formar un complejo inmunológico;

(c) detectar la formación del complejo inmunológico y

(d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia del antígeno amiloide en la muestra o parte del cuerpo o área específica.

(e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico antes y después del comienzo del tratamiento,

donde una disminución de la cantidad de dicho agregado indica que dicho paciente tiene un alto potencial para responder al tratamiento.

117. Kits de ensayo para la detección y diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas con amiloide que comprenden los anticuerpos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-65.

118. Kit de ensayo de acuerdo con la reivindicación 117 que comprende un recipiente que contiene uno o más anticuerpos de acuerdo con la presente invención e instrucciones para utilizar los anticuerpos con el propósito de unirse al antígeno amiloide para formar un complejo inmunológico y detectar la formación del complejo inmunológico de modo que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia del antígeno amiloide.

p.p de: AC IMMUNE S.A.

A β 1-15 (ACI-24)

H₂N-Lys-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-
Ser(tBu)-Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys-Lys-OH

A β 1-16 (ACI-01)

Ac-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-
Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Lys-Gly-OH

A β 1-16(Δ 14) (ACI-02)

Ac-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-
Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Lys-Gly-OH

A β 22-35 (ACI-11)

Ac-Lys-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Val-Gly-Ser(tBu)-Asn(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Ala-
Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Lys-Gly-OH

A β 29-40 (ACI-12)

Ac-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Lys-Gly-OH

FIG 1

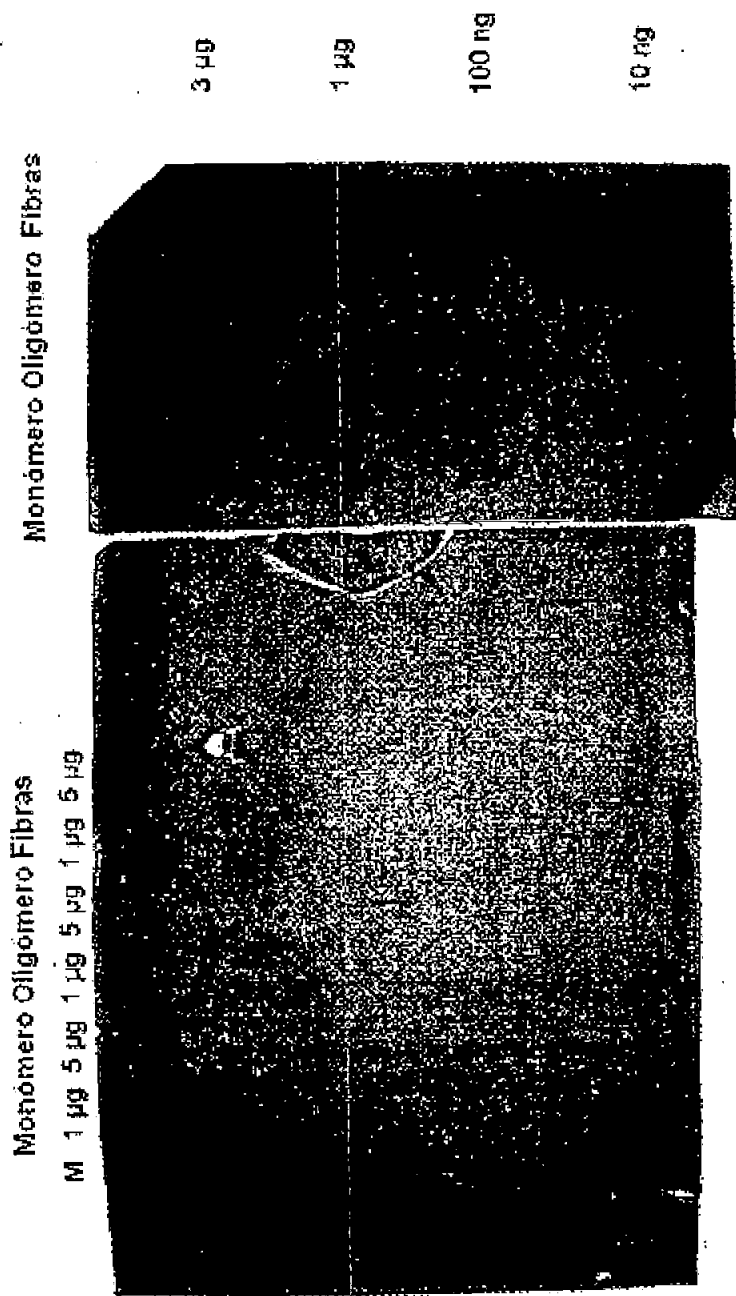


FIG. 2a

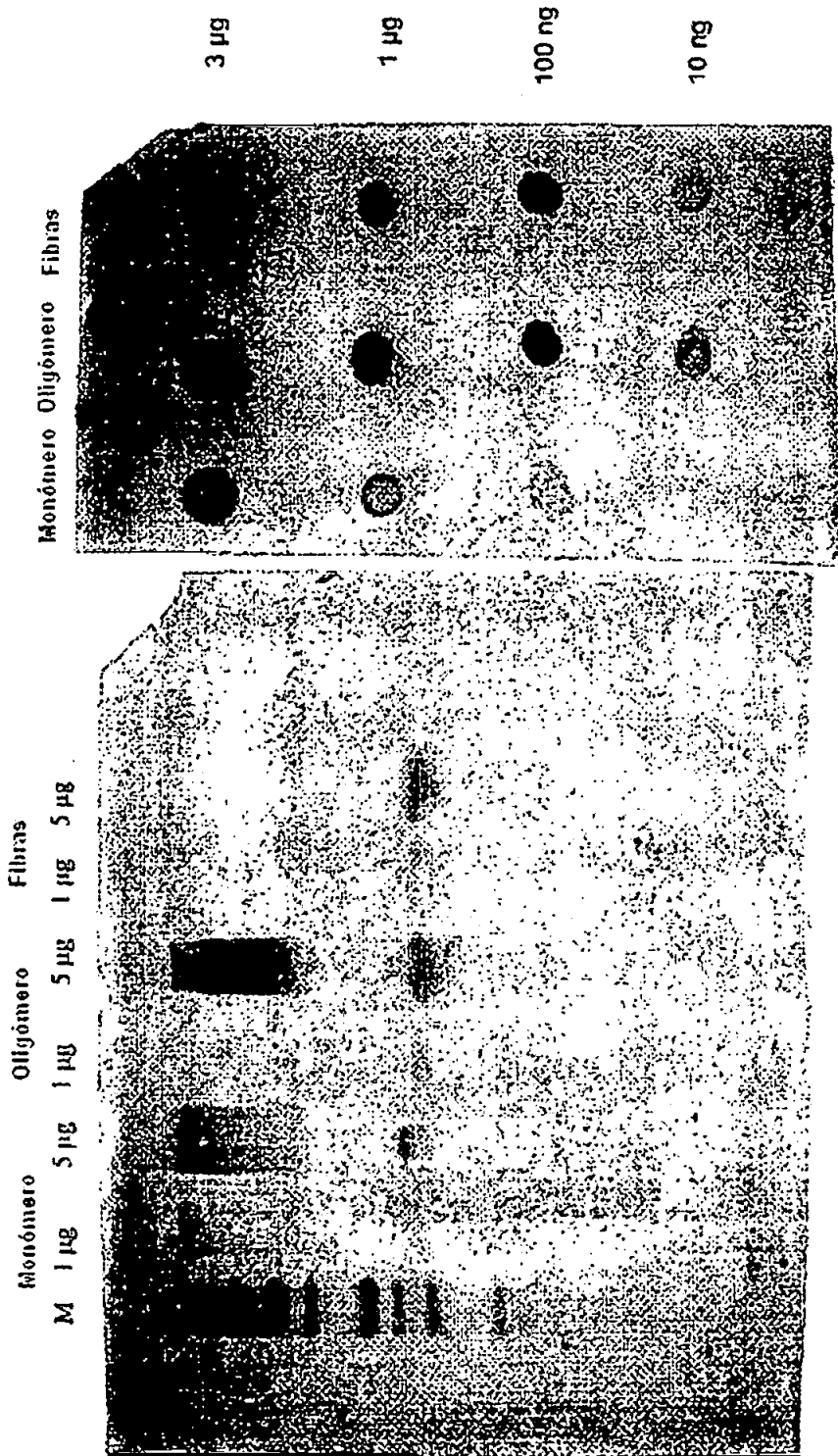


FIG. 2b

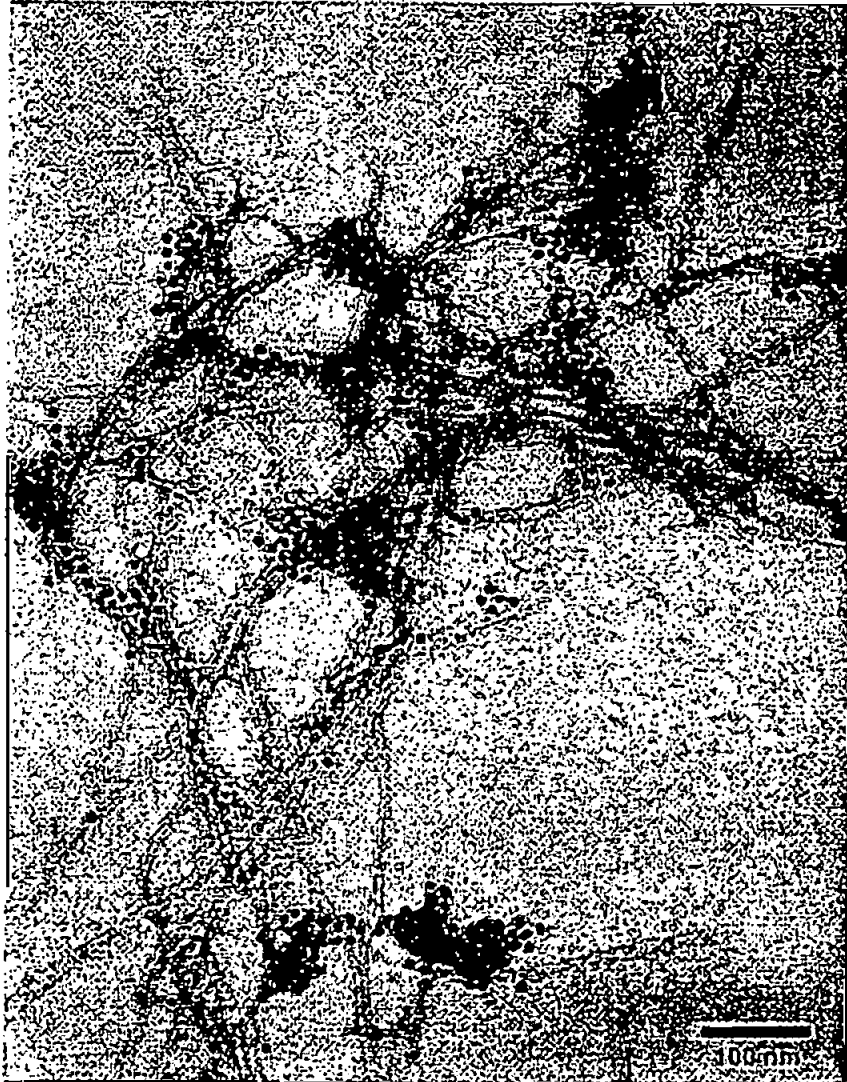
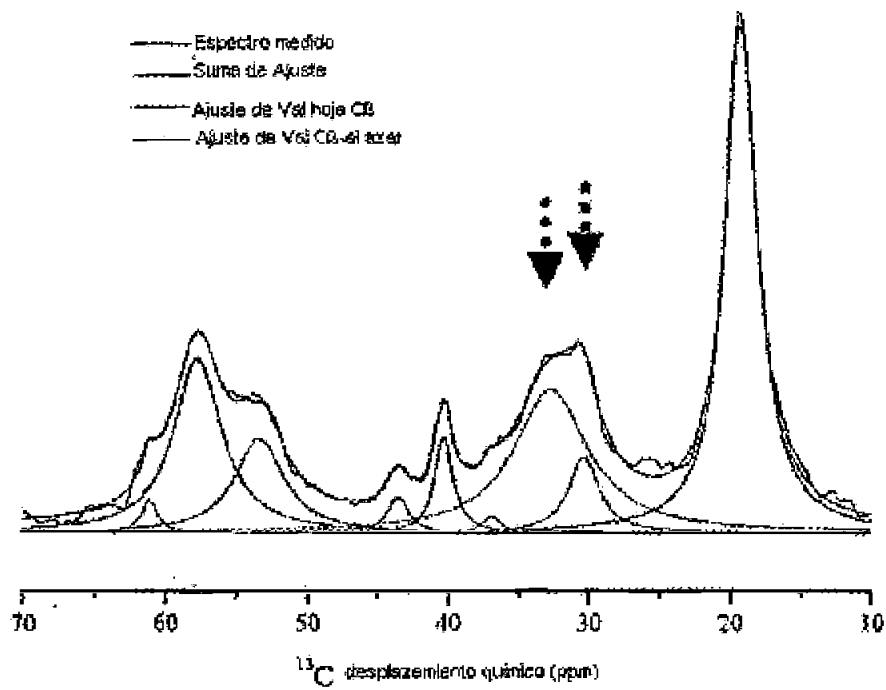
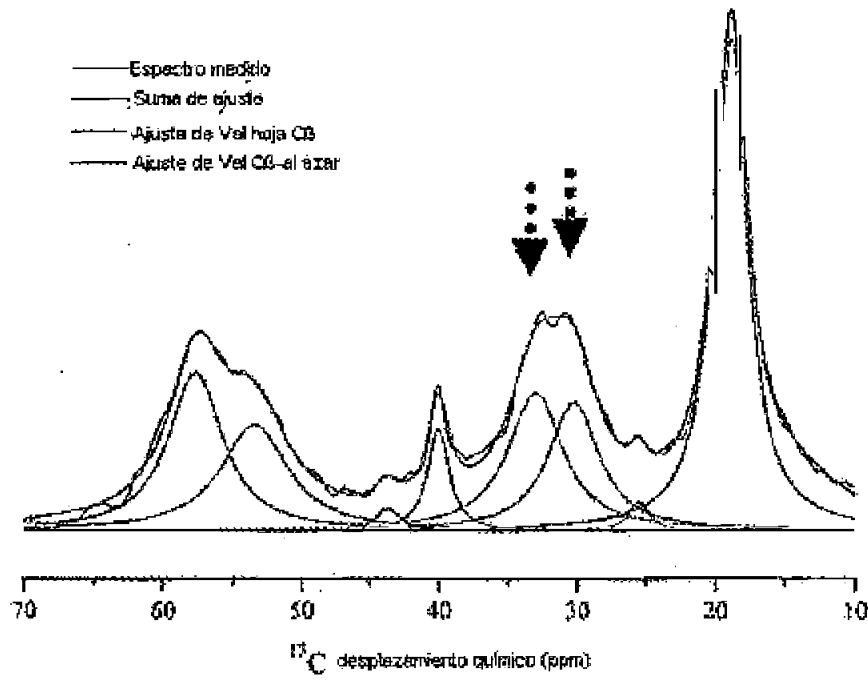


FIG. 3a



FIG 3b

6/6



- ➤ Ajuste para lámina de ^{13}C -marcado Val12
- ➤ Ajuste para espiral aleatorio de ^{13}C -marcado Val12

FIG. 4

288

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-054164- -00000-0000

Fecha: 2008-05-28 15:53:08 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTE IYI Evg. 378 FASE NACIONAL I
Act. 411 PRESENTACION Folios: 236

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION [x]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x] 1
- ◆ Descripción de la invención [x] 37
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [X] 231
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x] 2

COMPLETA [x]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de 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 []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Edgar Navea
Firma Responsable

Fecha 28-05-08

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

288

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA

REFERENCIA	Radicación No.	8 54164
	Solicitud internacional	PCT/EP2006/011862
	Fecha inicio fase nacional	12/07/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	9659

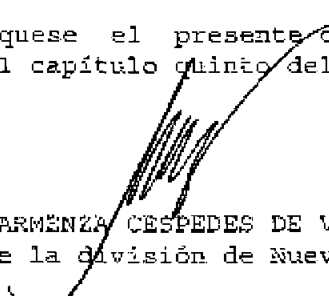
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, deben legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 15 JUL. 2008
jfernand