



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUI
PATENTE DE INV

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-090192-A-00000-0000

Fecha: 2013-11-22 14:29:22

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASOR

Eve: 378.FASENACIONALI

Folios: 13

21. EXPEDIENTE No. 10-090.192A

54. TÍTULO "TRATAMIENTO Y PROFILAXIS DE AMILOIDOSIS"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12P 21/08

71. SOLICITANTE ELAN PHARMACEUTICALS, INC. y UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH FOUNDATION

DOMICILIO ESTADO DE CALIFORNIA y ESTADO DE TENNESSEE, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

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

22. BOGOTÁ, D.C. 17 ABR 2013

PETITORIO



FORMULARIO UNICO DE P ENTRADA EN F

SOLICIT

①

☒ Patente de Invención

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-090192-80000-0000

Fecha: 2010-07-23 16:50:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 388

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-090192-A-00000-0000

Fecha: 2013-11-22 14:29:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 13

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: ELAN PHARMACEUTICALS,
INC. (Folio 419)

Dirección: 800 Gateway Boulevard, South
San Francisco, CA 94080, Estados
Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: San Francisco,
Estado de California, Estados Unidos de
América.

Lugar de Constitución:

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@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: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: SCHENK, Dale, B.; SEUBERT, Peter, A.; WALL, Jonathan y
SALDANHA, Jose

Dirección: 1542 Altos Drive, Burlingame, CA 94010; 801 Castro Street, San
Francisco, CA 94114; 1216 Harrington Drive, Knoxville, TN 37922 y 21
Fillebrook Avenue, Enfield, Middlesex EN1-3BD.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América y Reino Unido.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/ US2008/088493

Fecha: 29-12-08

Publicación Internacional No. WO 2009/086539 A4

Fecha: 09-07-09

⑥

Título (54)

"TRATAMIENTO Y PROFILAXIS DE AMILOIDOSIS"

⑦

Clasificación Internacional (51) C12P 21/08

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

28-12-07

10-09-08

(31) Número de Solicitud

61/007,544

61/095,932

⑨

Cómprobante de Pago No. 10-48,204

Fecha: 15-06-2010

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

- ☐ **Conversión** ☐ **División** ☐ **Fusión**
- ☐ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Registro de Diseño Industrial
☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☐

ELAN PHARMACEUTICALS, INC. y UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH FOUNDATION

Nombre o denominación / Nombre o razón social

ALICIA LLOREDA RICAURTE

Nombre del representante legal

Tipo de empresa

☐ Micro

☐ Pequeña

☐ Mediana

☐ Otra

39.690.713 de Usaquén

Documento de identificación:

☐ C.C.

☐ C.E.

☐ NIT

☐ Otro

Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
San Francisco, Estado de California, Estados Unidos de América y Knoxville, Estado de Tennessee, Estados Unidos de América	800 Gateway Boulevard, South San Francisco, CA 94080, Estados Unidos de América y 600 Henley Street, Suite 211 Knoxville, Tennessee 37996, Estados Unidos de América	South San Francisco y Knoxville
Dirección electrónica notificacionespatentes@lloredacamacho.com	No. Fax 6069701	Número telefónico 3264270

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

3. Datos del apoderado:

ALICIA LLOREDA RICAURTE

Apellidos y Nombre

39.690.713 de Usaquén

documento de identificación

53.215

Tarjeta profesional

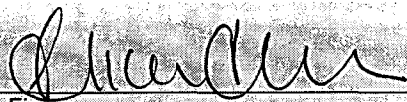
Dirección y domicilio		Ciudad
Calle 72 No 5-83 piso 5to		Bogotá
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
notificacionespatentes@lloredacamacho.com	6069701	3264270

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

4. Datos del trámite		
CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____	Expediente <u>10-090.192</u> De: <u>10-090.192</u> A: <u>10-090.192A</u>	Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____

5. Comprobante de Pago No <u>13-0032366</u>	Fecha <u>Abril 8, 2013</u>
---	----------------------------

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

7. Firma	
ALICIA LLORED A RICAURTE	
Nombre y apellidos	Firma
39.690.713 de Usaquén	53.215
C.C	Tarjeta Profesional

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0032366

Bogotá D.C., Abril 08 de 2013 - 13:13:12

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.

NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	534292721	08/04/2013	13.100.000.00

*** Conceptos Pagados ***

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

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

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-090192-00007-0000

Fecha: 2013-04-17 16:45:13 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 59

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-090192-A-00000-0000

Fecha: 2013-11-22 14:29:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 13

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

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

Abril 8 de 2013 - 13:13:22

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS		
Dependencia: <i>2020</i>	Fecha: <u>13</u> / <u>11</u> / <u>29</u> AAAA MM DD	Recorrido: <i>3</i>	
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicator:			Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	10-90192 A	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

<i>Ítem</i>	<i>Unidad de Conservación</i>
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
<i>Ítem</i>	<i>Soporte Documental</i>
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:

El CO Anexo contiene un total de 6 Archivos.

- 5 en formato pdf, las cuales fueron procesadas.
- 1 en formato Bloc de nota el cual por no cumplir con lo estipulado en la circular única no fue procesado.

Folio 4 CD.

grisdde.

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.
ABOGADOS

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-090192- -00008-0000

Fecha: 2013-05-31 16:12:59 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 608 MODIFICASOLICIT Folios: 9

Re: PI.-ELAN PHARMACEUTICALS, INC Y UNIVERSITY OF TENNESSEE
RESEARCH FOUNDATION.-Solicitud de Patente de Invención en Fase
Nacional PCT para "TRATAMIENTO Y PROFILAXIS DE AMILOIDOSIS".-
Clase C12P 21/08.-Expediente número 10-090.192A.-

1. Me refiero a mi memorial de 17 de Abril de 2013.
2. Debidamente autorizado por mi representado, me permito manifestar a ese Despacho que es deseo del solicitante presentar, en forma voluntaria, un nuevo capítulo reivindicatorio que reemplaza al originalmente presentado para la solicitud, el cual ahora consta de **19** reivindicaciones, y en el que se han realizado las siguientes modificaciones.

En la siguiente tabla explicativa ese Despacho podrá encontrar el sustento adecuado dentro de la solicitud originalmente presentada, para cada una de las reivindicaciones que conforman el nuevo capítulo reivindicatorio ahora presentado:

Nueva Reivindicación No.	Sustento
1 a 3	En las páginas 20 a 22, en el párrafo 2 de la página 28, en el párrafo 1 de la página 46, en el párrafo 2 de la página 49 y el primer párrafo de la página 50, en el párrafo 3 de la página 53, en el párrafo 1 de la página 100 y en el párrafo 1 de la página 130 de la descripción originalmente presentada.
4 y 5	En la página 8, las páginas 66 y 67, y en el párrafo 2 de la página 168 de la descripción originalmente presentada.
6 y 7	En el párrafo 2 de la página 22, en el párrafo 1 de la página 46, en el párrafo 3 de la página 53, en la página 59, en el párrafo 2 y 3 de la página 61, desde el párrafo 2 de la página 129 hasta el párrafo 1 de la página 130, en la página 163, en el párrafo 2 de la página 165, en el párrafo 2 de la página 166 y en la página 168 de la descripción originalmente presentada.

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

8 a 10	En el último párrafo de la página 6, en el párrafo 2 de la página 30, en el párrafo 2 de la página 53, en la página 61, en el párrafo 3 de la página 65, en el párrafo 3 de la página 122, en el párrafo 2 de la página 129, y en el párrafo 1 de la página 130, de la descripción, originalmente presentada.
11	En el párrafo 2 de la página 49, en los párrafos 2 y 3 de la página 61 de la descripción originalmente presentada.
12	En el párrafo 2 de la página 3, en el párrafo 2 de la página 49, y en los párrafos 2 y 3 de la página 61 de la descripción originalmente presentada.
13 a 19	En la reivindicación 82 a 88 originalmente presentadas.

En relación con este nuevo capítulo reivindicatorio, atentamente me permito manifestar a ese Despacho que el mismo **no amplía** de manera alguna el alcance de la presente invención, tal como fue originalmente presentada, toda vez que este solamente se presenta con el fin de definir en forma más clara y concisa el objeto de la presente invención. Adicionalmente, dicho nuevo capítulo reivindicatorio se encuentra perfectamente sustentado en los capítulos descriptivo y reivindicatorio actualmente presentados para la solicitud, tal como se expuso anteriormente.

3. Por otra parte atentamente me permito allegar los recibos de pago de la tasa establecida para las reivindicaciones adicionales de la solicitud arriba mencionada.

Me permito aclarar que dicho pago corresponde a las reivindicaciones **11 a 19** del nuevo capítulo reivindicatorio, el cual deberá ser estudiado junto con la presente solicitud.

4. Anexo me permito presentar:

- (a) Formulario único de modificaciones y correcciones;
- (b) Recibo número 13-0051018, expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago de las modificaciones mencionadas;
- (c) Recibo número 13-0037655 y 13-0037613, expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago de la tasa que causan las reivindicaciones adicionales; y
- (d) Copia de las páginas **195 a 197** que corresponden al nuevo capítulo reivindicatorio que consta de **19** reivindicaciones.

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

5. Ruego a usted tomar atenta nota de lo anterior y proceder de conformidad.

Señor Superintendente,



ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. 53.215

**DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
MODIFICACIONES Y/O CORRECCIONES**

1. Identificación del Trámite

- ☐ Error material ☒ **Modificación a una Solicitud en trámite**
- ☒ Patente de Invención
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad
- ☐ Registro de Diseño Industrial
- ☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del Solicitante:

Persona Natural ☐

Persona Jurídica ☒

**ELAN PHARMACEUTICALS, INC Y UNIVERSITY OF TENNESSEE
RESEARCH FOUNDATION.**

Nombre o Denominación / Nombre o Razón Social Completa

ALICIA LLOREDA RICAURTE

Nombre Representante Legal

Tipo de Empresa

Micro ☐

Pequeña ☐

Mediana ☐

Otra ☒

Documento de Identificación

☒ C.C.

☐ C.E.

☐ NIT

☐ Otro Número

39.690.713

Nacionalidad / País de Constitución	Dirección y Domicilio del Titular	Ciudad
Estado de California y Estado de Tennessee, Estados Unidos de América	800 Gateway Boulevard, South San Francisco, CA 94080, y 600 Henley Street, Suite 211 Knoxville, Tennessee 37996, Estados Unidos de América.	South San Francisco y Knoxville.
Dirección Electrónica		Fax
notificacionespatentes@lloredacamacho.com		6069701
		Número Telefónico
		3264270

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

3. Datos del Apoderado:

LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apellidos y Nombre

C.C. 39.690.713
Documento de Identificación

53.215
Tarjeta Profesional

Dirección y Domicilio		Ciudad
Calle 72 No. 5-83 Piso 5°		Bogotá D.C.
Dirección Electrónica	No. Fax	Número Telefónico
notificacionespatentes@lloredacamacho.com	6069701	3264270

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase

Indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

4. Datos del Trámite

Corrección:

Expediente No. 10-090.192A

Aparece _____

Debe ser _____

Modificación:

☒ Modificación al Capítulo Reivindicatorio.

☐ Modificación al Capítulo Descriptivo.

☐ Modificación al Resumen.

☐ Modificación a los Dibujos.

☐ Modificación al Título.

5. Anexos

☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación.

☐ Poder, si fuere el caso.

☒ Documento que contiene las modificaciones o correcciones.

☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.

6. Firma

Nombre y apellidos

ALICIA LLOREDA RICAURTE

Representante
Apoderado

Firma

C.C. 39.690.713

Tarjeta Profesional 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0051018

Bogotá D.C., Mayo 27 de 2013 - 16:38:19

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.

NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	534292776	27/05/2013	6.295.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICACIONES SOLICITUD MODIFICACIONES CAMBIO SOLICITANTE POR CESION	125.000.00	125.000.00
				\$125.000.00

SON: **CIENTO VEINTICINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-090192-00000-0000

Fecha: 2013-05-31 16:12:59 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 608 MODIFICASOLICIT Folios: 9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-090192-A-00000-0000

Fecha: 2013-11-22 14:29:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 13

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

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

Mayo 27 de 2013 - 16:38:22

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0037655

Bogotá D.C., Abril 23 de 2013 - 08:20:33

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.

NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	534292732	22/04/2013	19.279.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
8	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	240.000.00
				\$240.000.00

SON: **DOSCIENTOS CUARENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-090192-00008-0000

Fecha: 2013-05-31 16:12:59 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 608 MODIFICASOLICIT Folios: 9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-090192-A-00000-0000

Fecha: 2013-11-22 14:29:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 13

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

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

Abril 23 de 2013 - 08:34:54

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0037613

Bogotá D.C., Abril 23 de 2013 - 08:20:33

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.

NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	534292732	22/04/2013	19.279.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	30.000.00
			\$30.000.00

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

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-090192-00008-0000

Fecha: 2013-05-31 16:12:59 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 608 MODIFICASOLICIT Folios: 9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-090192-A-00000-0000

Fecha: 2013-11-22 14:29:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 13

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

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

Abril 23 de 2013 - 08:20:42

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado humanizado o quimérico, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo expuesto en una proteína de inmunoglobulina de cadena ligera agregada, en donde la proteína de inmunoglobulina de cadena ligera comprende la secuencia X_1EDX_2 , en donde X_1 es F, Y, S, A, T o P, y X_2 es N, D, F, I, V, A o E.
2. El anticuerpo aislado humanizado o quimérico, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, en donde la secuencia X_1EDX_2 se selecciona del grupo que consiste de FEDD, SEDE, AEDE, TEDE o PEDE.
3. El anticuerpo aislado humanizado o quimérico, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, en donde la secuencia X_1EDX_2 se selecciona del grupo que consiste de PEDI, PEDF, AEDV, SEDF o SEDA.
4. Un anticuerpo aislado humanizado o quimérico, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que compete para unión a una proteína A amiloide AL humana con el anticuerpo 2A4 producido por el Número de Acceso ATCC PTA-9662.
5. El anticuerpo aislado humanizado o quimérico, o fragmento de unión a antígeno de mismo, de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo aislado humanizado o quimérico, o fragmento de unión a antígeno de mismo, tiene una afinidad de menos de 1×10^{-7} M para la proteína A amiloide AL humana.
6. Un anticuerpo aislado humanizado o quimérico, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo críptico expuesto en una forma agregada de proteína de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende Glu y Asp en las posiciones que corresponden a las posiciones 81 y 82, respectivamente, de la SEQ ID NO: 86.
7. El anticuerpo aislado humanizado o quimérico, o fragmento de unión a antígeno de mismo, de la reivindicación 6, en donde el epítipo comprende amino ácidos no contiguos.

8. Un anticuerpo aislado humanizado o quimérico, o fragmento de unión a antígeno de mismo, que se une específicamente a un epítipo expuesto en una proteína AA formada por el clivado proteolítico de la proteína SAA.
9. El anticuerpo aislado humanizado o quimérico, o fragmento de unión a antígeno de mismo, de la reivindicación 8, en donde la proteína AA comprende las secuencias AEDS.
10. El anticuerpo aislado humanizado o quimérico, o fragmento de unión a antígeno de mismo, de la reivindicación 8, en donde el anticuerpo aislado humanizado o quimérico, o fragmento de unión a antígeno de mismo, no se une específicamente a un péptido que abarca un sitio de clivado de la proteína SAA.
11. Un anticuerpo neoepítipo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a proteína de inmunoglobulina de cadena ligera fibrilar, en donde el neoepítipo comprende Glu y Asp en las posiciones que corresponden a las posiciones 81 y 82, respectivamente, de la SEQ ID NO: 86.
12. Un anticuerpo neoepítipo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a fibrilos de proteína del tipo cadena amiloide ligera, en donde el neoepítipo comprende Glu y Asp en las posiciones que corresponden a las posiciones 81 y 82, respectivamente, de la SEQ ID NO: 86.
13. Un método para detectar un depósito amiloide en un sujeto que comprende administrar al sujeto el anticuerpo aislado humanizado o quimérico, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que está unido a un marcador detectable, y detectar el marcador detectable.
14. El método de la reivindicación 13, en donde el sujeto es un humano.
15. El método de la reivindicación 13, en donde la amiloidosis es amiloidosis AA, amiloidosis AL, enfermedad de Alzheimer, Deterioro Cognitivo Leve, polineuropatía amiloide, fiebre Mediterránea, síndrome de Muckle-Wells, amiloidosis sistémica reactiva asociada con enfermedades inflamatorias sistémicas, mieloma o amiloidosis asociada con macroglobulinemia, amiloidosis asociada con discrasia de inmunocito, gamopatía monoclonal, discrasia oculta o amiloidosis nodular local asociada con enfermedades inflamatorias crónicas.

16. El método de la reivindicación 13, en donde el marcador detectable es un radiomarcador.
17. El método de la reivindicación 16, en donde el radiomarcador es ^{125}I .
18. El método de la reivindicación 13, en donde la detección se realiza mediante representación gráfica SPECT/CT.
19. El método de la reivindicación 13, en donde la detección se realiza mediante espectroscopía de RMN.

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) No.° de solicitud: 10-090.192A		(51) Int Cl: C12P 21/08	
(22) Fecha de solicitud: 23-07-2010		(71)Solicitante(s) ELAN PHARMACEUTICALS, INC. y UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH FOUNDATION.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 61/007,544 61/095,932	(32) Fecha 28-12-07 10-09-08	(33) País US US
		(72) Inventor(es) SCHENK, Dale, B.; SEUBERT, Peter, A.; WALL, Jonathan y SALDANHA, Jose	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 28-07-2010		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 09/07/09	
Fecha de presentación de la solicitud: 29/12/08		N° publicación: WO 2009/086539 A4	
No. de solicitud PCT/US2008/088493			
(54) Titulo: “TRATAMIENTO Y PROFILAXIS DE AMILOIDOSIS”			

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1:

Un anticuerpo aislado humano, humanizado o quimérico, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítopo entre los residuos 70-76 de péptido A amiloide humano.

(21) N° de solicitud: 10-090.192A

(22) Fecha de solicitud: 23-07-2010

(51) Clasificación Internacional : C12P 21/08

(71) Solicitante(s) **ELAN PHARMACEUTICALS, INC. y UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH FOUNDATION**

(72) Inventor(es) SCHENK, Dale, B.; SEUBERT, Peter, A.; WALL, Jonathan y SALDANHA, Jose.

(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE

(30) Prioridad

(31) **No. Prioridad**

(32) **Fecha**

(33) **País**

61/007,544

28-12-07

US

61/095,932

10-09-08

US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 28-07-2010

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: **09-07-09**

Fecha de presentación de la solicitud: **29-12-08**

N° publicación: **WO 2009/086539 A4**

No. de solicitud **PCT/US2008/088493**

(54) Título: **"TRATAMIENTO Y PROFILAXIS DE AMILOIDOSIS"**

(21) N° de solicitud: 10-090.192A		(22) Fecha de solicitud: 23-07-2010		FIGURA CARACTERISTICA 6 x 6 cm
(51) Clasificación Internacional : C12P 21/08				
(71) Solicitante(s) ELAN PHARMACEUTICALS, INC. y UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH FOUNDATION.				
(72) Inventor(es) SCHENK, Dale, B.; SEUBERT, Peter, A.; WALL, Jonathan y SALDANHA, Jose.				
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE				
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 61/007,544 61/095,932	(32) Fecha 28-12-07 10-09-08	(33) País US US	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 28-07-2010		(87) Publicación internacional:		
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT Fecha de presentación de la solicitud: 29-12-08 No. De solicitud PCT/US2008/088493		Fecha: 09-07-09 No. Publicación : WO 2009/086539 A4		
(54) Título: "TRATAMIENTO Y PROFILAXIS DE AMILOIDOSIS"				
(57) Resumen: Reivindicación número 1: Un anticuerpo aislado humano, humanizado o quimérico, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo entre los residuos 70-76 de péptido A amiloide humano.				

TRATAMIENTO Y PROFILAXIS DE AMILOIDOSIS

RESUMEN, OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

Métodos útiles para efectuar profilaxis o tratamiento de amiloidosis, incluyendo Amiloidosis AA y amiloidosis AL mediante la administración de péptidos que comprenden neoepítomos, tales como fragmentos AA de una región C terminal de AA, y anticuerpos específicos para neoepítomos de proteínas amiloides agregadas, por ejemplo, anticuerpos específicos para la región C-terminal de fibrilos AA. Anticuerpos para la inhibición de formación y/o aumento de depuración de depósitos amiloides en un paciente, efectuando así profilaxis o tratamiento de la enfermedad amiloide.

TRATAMIENTO Y PROFILAXIS DE AMILOIDOSIS

REFERENCIAS CRUZADAS CON SOLICITUDES RELACIONADAS

Se reivindica prioridad a la Solicitud Provisional U.S. No. 61/095,932, presentada el 10 de Septiembre de 2008, y a la Solicitud Provisional U.S. No. 61/007,544, presentada el 28 de Diciembre de 2007, cada una de las cuales está incorporada aquí mediante referencia en su totalidad.

CAMPO TÉCNICO

La invención reside en los campos técnicos de inmunología y medicina.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La amiloidosis es un término general que describe un número de enfermedades caracterizadas por la existencia de formas patológicas de proteínas amiloides, que usualmente involucran la deposición extracelular de fibrilos de proteína, los cuales forman numerosos "depósitos amiloides" o "placas amiloides", que pueden ocurrir en sitios locales o sistemáticamente. Estos depósitos o placas están compuestos principalmente de una proteína o péptido soluble que se encuentra naturalmente, ensamblados en depósitos insolubles extensos de 10-100 μm de diámetro en una variedad de sitios de tejido. Los depósitos están compuestos de agregados generalmente laterales de fibrilos de aproximadamente 10-15 nm de diámetro. Los fibrilos amiloides producen una birrefringencia verde manzana característica en luz polarizada, cuando son teñidos con colorante Rojo Congo. Generalmente, la composición fibrilar de estos depósitos es una característica de identificación para las diferentes formas de enfermedad amiloide.

Los péptidos o proteínas que forman los depósitos de placa son usualmente producidos de una proteína precursora mayor. Más específicamente, la patogénesis de los agregados amiloides, tales como depósitos fibrilos, generalmente involucra el clivado proteolítico de una proteína precursora "anormal" en fragmentos que se agregan en láminas plegadas β antiparalelas. La composición fibrilar de estos depósitos es una característica de identificación para las diferentes formas de enfermedad amiloide. Por ejemplo, los depósitos intracerebrales y cerebrovasculares compuestos principalmente de fibrilos de péptido amiloide beta (β -AP) son característicos de la enfermedad de Alzheimer (tanto la forma familiar como la esporádica), el péptido de proteína amiloide del islote (IAPP; amilina) es característico de los fibrilos en depósitos amiloides de célula de islote pancreático asociados con la diabetes tipo II, y la β 2-microglobulina es un componente importante de los depósitos amiloides que se forman como una consecuencia del tratamiento de hemodiálisis a largo plazo. Más recientemente, las enfermedades asociadas con el prion, tal como enfermedad de Creutzfeld-Jacob, también han sido reconocidas como enfermedades amiloides.

En general, las amiloidosis primarias de la enfermedad están caracterizadas por la presencia de fibrilos de proteína "del tipo cadena ligera de amiloide" (tipo AL), llamados así por la homología de la región N-terminal de los fibrilos AL con el fragmento variable de cadena ligera de inmunoglobulina (kapa o lambda).

Las diferentes formas de la enfermedad se han dividido en clases, la mayoría con base en si la amiloidosis está asociada con una enfermedad sistemática subyacente. Así, ciertos trastornos son considerados como amyloidosis primarias, en las cuales no hay evidencia de enfermedad preexistente o coexistente. En la amiloidosis secundaria o reactiva (tipo AA

caracterizada por la presencia de deposición de fibrilos de proteína A amiloide (AA), hay un estado de enfermedad inflamatoria o crónica subyacente o asociada.

Las amiloidosis heredofamiliares pueden tener depósitos neuropáticos, renales o cardiovasculares asociados del tipo transtiretina ATTR. Otras amiloidosis heredofamiliares incluyen otros síndromes y pueden tener diferentes componentes amiloides (p.e., fiebre Mediterranea familiar que está caracterizada por fibrilos AA). Otras formas de amiloidosis incluyen formas locales, caracterizadas por depósitos del tipo tumor, focales que se encuentran en órganos aislados. Otras amiloidosis están asociadas con envejecimiento, y están comúnmente caracterizadas por formación de placa en el corazón o cerebro. También son comunes los depósitos amiloides asociados con hemodiálisis a largo plazo. Estas y otras formas de enfermedad amiloide se resumen en la Tabla 1 (Tan, S. Y. y Pepys, Histopathology 25:403-414, 1994; Harrison's Handbook of Internal Medicine, 13th Ed., Isselbacher, K.J., et al, eds, McGraw-Hill, San Francisco, 1995) y se describen en las Patentes U.S. Nos. 6,875,434, 6,890,535, 6,913,745, 6,923,964, y 6,936,246, que están incorporadas mediante referencia en la presente en su totalidad.

TABLA 1			
Clasificación de Enfermedades Amiloides			
Proteína/ péptido amiloide	Precursor de proteína	Variantes de proteína	Clínica
AA	Proteína A amiloide en suero (ApoSSA)		Amiloidosis reactiva (secundaria): Fiebre Mediterránea familiar Neuropatía amiloide familiar con urticaria y sordera (síndrome de Muckle-Wells)
AA	Proteína A amiloide en suero (ApoSSA)		Amiloidosis sistémica reactiva asociada con enfermedades inflamatorias sistémicas
AL	Cadenas ligeras de	Ak, A, (p.e.,	Amiloidosis idiopática (primaria):

	inmunoglobulina monoclonales (kapa, lambda)	AkIII)	asociada con mieloma o macroglobulinemia; amiloidosis sistémica asociada con discrasia del inmunocito; gammapatía monoclonal; discrasia oculta; amiloidosis nodular local asociada con enfermedades inflamatorias crónicas
AH	IgG (1(γ1))	Aγ1	Amiloidosis de cadena pesada asociada con varias discrasias del inmunocito
ATTR	Transtiretina (TTR)	Al menos 30 mutaciones puntuales conocidas	Polineuropatía de amiloide familiar (p.e., Met 30, Portugués)
ATTR	Transtiretina (TTR)	p.e., Met 111	Cardiomiopatía amiloide familiar (Danesa)
ATTR	Transtiretina (TTR)	TTR tipo salvaje o I1e 122	Amiloidosis senil sistémica
AapoA1	AapoA1	Arg 26	Polineuropatía amiloide familiar
Age1	Gelsolin	Asn 187	Amiloidosis Familiar (Finlandesa)
Acys	Cistatin C	Gln 68	Hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (Islandesa)
Aβ	Precursor de proteína b Amiloide (p.e., b-APP ₆₉₅)	Varias: Gln 618,	Enfermedad de Alzheimer Síndrome de Down Amiloidosis hemorrágica cerebral hereditaria (Dutch) Angiopatía amiloide cerebral esporádica Miositis por cuerpo de inclusión
AB ₂ M	Microglobulina beta ₂		Asociada con hemodiálisis crónica
Acal	(Pro)calcitonina	(Pro)calcitonina	Carcinoma de tiroides medular
AANF Aβ SVEP ^a AB ₂ M	Factor natriurético atrial Proteína precursora β-amiloide - Microglobulina beta ₂		Amiloidosis Senil Focal: Amiloide atrial aislado Cerebro Vesículas seminales Próstata
	Keratina		Amiloide cutáneo primario localizado (macular, popular)

PrP	Proteína precursora del prion (forma celular 33-35 kDa)	Proteína scrapie de 27-30 kDa	Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob esporádica Kuru (encefalopatías espongiforme transmisible, enfermedades del prión)
AIAPP	Polipéptido amiloide del islote (IAPP)		Islotes de Langerhans Diabetes tipo II Insulinoma
Hormonas de péptido, fragmentos	p.e., precalcitonina		Amiloidosis exocrina, asociada con APUDomas

^a proteína exocrina de vesícula seminal

Usualmente, los fibrilos que forman la masa de un depósito amiloide se derivan de una o más proteínas o péptidos precursores primarios, y están usualmente asociados con glicosaminoglicanos sulfados. Adicionalmente, los depósitos amiloides pueden incluir proteínas y péptidos menores de varios tipos, junto con otros componentes, tales como proteoglicanos, gangliosidas y otros azúcares, descritos en más detalle en las secciones siguientes.

Los fibrilos AA están compuestos de fragmentos de péptido que varían en tamaño, pero son generalmente de aproximadamente 8000 daltons (péptido o proteína AA) formados por clivado proteolítico de proteína A amiloide en suero (SAA), una apolipoproteína circulante que está presente en partículas HDL y que es sintetizada en hepatocitos en respuesta a citoquinas tales como interleucina (IL)-1 e IL-6, así como el factor α de necrosis de tumor. Ver Husby, G. et al. *Amyloid* 1, 119-137 (1994). La clivado proteolítico produce la deposición patológica de un N-terminal de ~76 residuos dos tercios de la proteína SAA. En humanos, la concentración en plasma de SAA es normalmente de ~0.1 mg/ml pero puede aumentar más de 1,000 veces en respuesta a un estímulo inflamatorio. Como parte de este proceso, la molécula de SAA se somete a proteólisis y el producto del clivado N-terminal es depositado sistémicamente como fibrilos de AA en órganos vitales, incluyendo

el hígado, bazo, riñones, y glándulas adrenales. La deposición también es común en el corazón y el tracto gastrointestinal.

Generalmente, la amiloidosis AA es una manifestación de enfermedades que provocan una respuesta de fase aguda sostenida. Tales enfermedades incluyen trastornos inflamatorios crónicos, infecciones microbianas locales o sistémicas, y neoplasmas malignos. Las enfermedades amiloide AA incluyen, pero no se limitan a enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondilitis anquilosante, soriasis, artropatía soriática, síndrome de Reiter, Enfermedad de Still del adulto, síndrome de Behcet, y enfermedad de Crohn. Los depósitos de AA también se producen como resultado de infecciones microbianas crónicas, tales como lepra, tuberculosis, bronquiectasis, úlceras por decúbito, pielonefritis crónica, osteomielitis, y enfermedad de Whipple. Ciertos neoplasmas malignos también pueden producir depósitos amiloides de fibrilos AA. Estos incluyen condiciones tales como linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas del intestino, pulmón y tracto urogenital, carcinoma de célula basal, y leucemia de célula vellosa. La enfermedad amiloide AA también puede resultar de enfermedades inflamatorias heredadas tales como Fiebre Mediterránea Familiar. Adicionalmente, la enfermedad amiloide AA puede resultar de trastornos linfoproliferativos tales como enfermedad de Castleman. La amiloidosis AA es insidiosa y progresiva. Los síntomas se presentan usualmente en etapas tardías de la enfermedad. Frecuentemente, el paciente no es diagnosticado hasta que ha ocurrido un daño significativo en órgano. Los fibrilos AA se depositan en órganos vitales que conducen a la disfunción del órgano y posteriormente la muerte. La tasa de supervivencia de cinco años es del 45-50%. La supervivencia media después del diagnóstico es de 4-8 años. La enfermedad Renal en etapa final es la causa de muerte en el 40-60% de los casos. Ver Gillmore J.D. et al, *Lancet* 358:24-9 (2001).

Actualmente, no existen tratamientos aprobados específicos dirigidos al amiloide para ninguna de las enfermedades amiloides, incluyendo Amiloidosis AA. Ver Gillmore J.D. et al., *Lancet* 358:24-9 (2001). Cuando hay un estado de enfermedad subyacente o asociado, la terapia se dirige a disminuir la producción de proteína amiloidogénica tratando la enfermedad subyacente. Por ejemplo, la estrategia de tratamiento actual para la Amiloidosis AA es dirigirse a la inflamación subyacente, reducir los niveles de ApoSSA por debajo de 10mg/l. Las terapias empleadas actualmente incluyen quimioterapia (clorambucil y MTX), inmunosupresores (azatioprina), fármacos antiinflamatorios (colchicina) e inhibidores de TNF. La invención, por ende, cumple con una necesidad de hace mucho tiempo de regímenes terapéuticos para prevenir o mejorar los efectos de la Amiloidosis AA.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención provee un anticuerpo aislado humano, humanizado o quimérico, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo entre los residuos 70-76 del péptido A amiloide humano, por ejemplo, un epítipo entre los residuos 70-76 de la SEQ ID NO: 2 o un epítipo que comprende los residuos establecidos como SEQ ID NOs: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, u 11. Los anticuerpos o fragmentos de unión a anticuerpo de la invención incluyen aquellos que compiten para la unión al péptido A amiloide humano con anticuerpo 2A4 producido mediante Número de Acceso ATCC _____ o con el anticuerpo 7D8 producido mediante Número de Acceso ATCC _____. Los anticuerpos adicionales de la invención compiten para unión al péptido A amiloide humano con un anticuerpo que tiene una región variable de cadena ligera indicada como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 152 o los residuos 20-131 de 153 y una región variable de cadena pesada indicada como los residuos 20-138 de la SEQ ID NO: 154.

Los anticuerpos revelados incluyen versiones humanizadas y quiméricas del anticuerpo 2A4 producidas por el Número de Acceso ATCC _____ o una versión humanizada o quimérica del anticuerpo 7D8 producida por el Número de Acceso ATCC _____.

Por ejemplo, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno representativos comprenden una región variable de cadena ligera que comprende una o más regiones de complementariedad de una región variable de cadena ligera de 2A4 indicada como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 152 o una o más regiones de complementariedad de una región variable de cadena ligera de 7D8 indicada como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 153. Como otro ejemplo, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno representativos comprenden una región variable de cadena ligera que comprende dos regiones de complementariedad de una región variable de cadena ligera de 2A4 indicada como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 152 o dos regiones de complementariedad de una región variable de cadena ligera de 7D8 indicada como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 153. Anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno representativos adicionales comprenden una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones de complementariedad de una región variable de cadena ligera de 2A4 indicada como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 152 o tres regiones de complementariedad de una región variable de cadena ligera de 7D8 indicada como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 153. Las versiones humanizadas representativas de un anticuerpo 2A4 o 7D8 comprenden al menos un residuo de marco de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste de L87 y L90 (convención de numeración Kabat), que está ocupado por Y y F, respectivamente, y en donde el resto de la región variable de cadena ligera está ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana. Anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno representativos comprenden al menos un residuo de marco

de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste de +7, +14, +15, +17, +18, +50, +75, +88, + 92, y +109 (numeración lineal), que está ocupada por T, S, L, D, Q, K, Y, L, F, y L, respectivamente, y en donde el resto de la región variable de cadena ligera está ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana. Por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno representativos comprenden al menos un residuo de marco de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste de +75 y +92 (numeración lineal), que está ocupado por Y y F, respectivamente, y en donde el resto de la región variable de cadena ligera está ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora. En otros anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno representativos de la invención, la región variable de cadena ligera comprende un residuo de marco en +105 (numeración lineal) ocupado por Q.

Por ejemplo, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la invención incluyen aquellos que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende un residuo de marco en +7 (numeración lineal) ocupado por T, en donde el resto de la región variable de cadena ligera está ocupada por un residuo correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno una región variable de cadena ligera que comprende un residuo de marco en +14 (numeración lineal) ocupada por S, en donde el resto de la región variable de cadena ligera es ocupada por un residuo correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno una región variable de cadena ligera que comprende un residuo de marco en +15 (numeración lineal) ocupada por L, en donde el resto de la región variable de cadena ligera es ocupada por un residuo correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a

antígeno una región variable de cadena ligera que comprende un residuo de marco en +17 (numeración lineal) ocupado por D, en donde el resto de la región variable de cadena ligera es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno una región variable de cadena ligera que comprende un residuo de marco en +18 (numeración lineal) ocupado por Q, en donde el resto de la región variable de cadena ligera es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno una región variable de cadena ligera que comprende un residuo de marco en +50 (numeración lineal) ocupado por K, en donde el resto de la región variable de cadena ligera es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno una región variable de cadena ligera que comprende un residuo de marco en +75 (numeración lineal) ocupado por Y, en donde el resto de la región variable de cadena ligera es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno una región variable de cadena ligera que comprende un residuo de marco en +88 (numeración lineal) ocupado por L, en donde el resto de la región variable de cadena ligera es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno una región variable de cadena ligera que comprende un residuo de marco en +92 (numeración lineal) ocupado por F, en donde el resto de la región variable de cadena ligera es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno una región variable de cadena ligera que comprende un residuo de marco en +109 (numeración lineal) ocupado por L, en donde el resto de la región variable de cadena ligera es ocupado por un residuo correspondiente en

una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana; y anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno una región variable de cadena ligera que comprende un residuo de marco en +105 (numeración lineal) ocupado por Q, en donde el resto de la región variable de cadena ligera es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana.

Las regiones variables de cadena de inmunoglobulina aceptora humana usadas en la invención incluyen la región variable de cadena ligera del subgrupo 2 kappa humano (convención Kabat), por ejemplo, región variable de cadena ligera del subgrupo 2 humano de una línea germinal humana VKIIA 19/A3, tal como la región variable de cadena ligera Vk humana que comprende una secuencia indicada como SEQ ID NO: 166 o 167. En aspectos particulares de la invención, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno comprenden una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 152, residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 153, o indicados como SEQ ID NO: 155, 156, 157, 158, 159, 160, 174, 175, o 176.

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno representativos de la invención incluyen también aquellos que comprenden una region variable de cadena pesada que comprende una o más regiones de complementariedad de una región variable de cadena pesada de 2A4 indicada como los 20-138 de la SEQ ID NO: 154, por ejemplo, una región variable de cadena pesada que comprende dos regiones de complementariedad de una región variable de cadena pesada de 2A4 indicada como los residuos 20-138 de la SEQ ID NO: 154, o una región variable de cadena pesada que comprende las regiones de complementariedad de una región variable de cadena pesada de 2A4 indicada como los residuos 20-138 de la SEQ ID NO: 154. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno, 2A4 y 7D8 humanizados representativos comprenden al

menos un residuo de marco de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste de H37, H49, H70, y H93 (convención de numeración Kabat), que está ocupado por I, A, F, o V, respectivamente, y en donde el resto de la región variable de cadena pesada es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana. Anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno humanizados representativos comprenden al menos un residuo de marco de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste de +10, +15, +19, +37, +49, +73, +78, +79, +80, +87, +95, +99, +119 (numeración lineal), que es ocupado por R, K, K, I, A, F, Q, S, M, N, M, V, o A, respectivamente, y en donde el resto de la región variable de cadena pesada es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana. Por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno humanizados representativos comprenden al menos un residuo de marco de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste de +37, +49, +73, y +99 (numeración lineal), que es ocupado por I, A, F, o V, respectivamente, y en donde el resto de la región variable de cadena pesada es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana.

Por ejemplo, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la invención incluyen aquellos que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende un residuo de marco en +10 (numeración lineal) ocupado por R, en donde el resto de la región variable de cadena pesada es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno una región variable de cadena pesada que comprende un residuo de marco en +15 (numeración lineal) ocupado por K, en donde el resto de la región variable de cadena pesada es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno una región

variable de cadena pesada que comprende un residuo de marco en +19 (numeración lineal) ocupado por K, en donde el resto de la región variable de cadena pesada es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno una región variable de cadena pesada que comprende un residuo de marco en +37 (numeración lineal) ocupado por I, en donde el resto de la región variable de cadena pesada es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno una región variable de cadena pesada que comprende un residuo de marco en +49 (numeración lineal) ocupado por A, en donde el resto de la región variable de cadena pesada es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno una región variable de cadena pesada que comprende un residuo de marco en +73 (numeración lineal) ocupado por F, en donde el resto de la región variable de cadena pesada es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno una región variable de cadena pesada que comprende un residuo de marco en +78 (numeración lineal) ocupado por Q, en donde el resto de la región variable de cadena pesada es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno una región variable de cadena pesada que comprende un residuo de marco en +79 (numeración lineal) ocupado por S, en donde el resto de la región variable de cadena pesada es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos and fragmentos de unión a antígeno una región variable de cadena pesada que comprende un residuo de marco en +80 (numeración lineal) ocupado por M, en donde el resto de la región variable de cadena

pesada es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno una región variable de cadena pesada que comprende un residuo de marco en +87 (numeración lineal) ocupado por N, en donde el resto de la región variable de cadena pesada es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno una región variable de cadena pesada que comprende un residuo de marco en +95 (numeración lineal) ocupado por M, en donde el resto de la región variable de cadena pesada es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno una región variable de cadena pesada que comprende un residuo de marco en +99 (numeración lineal) ocupado por V, en donde el resto de la región variable de cadena pesada es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana; y anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno una región variable de cadena pesada que comprende un residuo de marco en +109 (numeración lineal) ocupado por A, en donde el resto de la región variable de cadena pesada es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana.

Las regiones variables de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana incluyen una región variable de cadena pesada del subgrupo 3 gama humana (convención Kabat), por ejemplo, región variable de cadena pesada del subgrupo 3 gama humana que comprende una secuencia indicada como SEQ ID NO: 165, tal como una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como los residuos 20-138 de la SEQ ID NO: 154 o indicada como la SEQ ID NO: 161, 162, o 163.

Anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno representativos adicionales comprenden una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de una región variable de cadena ligera de 2A4 indicada como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 152 o tres regiones de complementariedad de una región variable de cadena ligera de 7D8 indicada como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 153, y una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones de complementariedad de una 2A4 región variable de cadena pesada indicada como los residuos 20-138 de la SEQ ID NO: 154. Por ejemplo, tales anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno incluyen aquellos que tienen una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad indicadas como las SEQ ID NOs: 168, 169, y 170, y una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones de complementariedad indicadas como las SEQ ID NOs: 171, 172, y 173. Como otro ejemplo, tales anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno incluyen aquellos que tienen una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad indicadas como las SEQ ID NOs: 177, 169, y 170, y una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones de complementariedad indicadas como SEQ ID NOs: 171, 172, y 173. Como otro ejemplo, tales anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno incluyen aquellos que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 152 o como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 153, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como los residuos 20-138 de la SEQ ID NO: 154. Como otro ejemplo, tales anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno incluyen aquellos que tienen una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 155, 156, 157, 158, 159, 160, 174, 175, o 176, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como SEQ ID NO: 161, 162, o 163.

En aspectos particulares de la invención, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 155, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como SEQ ID NO: 161; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como SEQ ID NO: 155, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como SEQ ID NO: 162; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como SEQ ID NO: 155, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como SEQ ID NO: 163; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 156, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 161; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como SEQ ID NO: 156, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 162; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como SEQ ID NO: 156, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 163; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 157, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 161; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 157, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 162; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 157, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino

ácido indicada como la SEQ ID NO: 163; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 158, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 161; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 158, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 162; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 158, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 163; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 159, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 161; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 159, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 162; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 159, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 163; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 160, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 161; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 160, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 162; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 160, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 163; SEQ ID NO: 174, y una región variable de cadena pesada que comprende

una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 161; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 174, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 162; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 174, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 163; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 175, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 161; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 175, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 162; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 175, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 163; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 176, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 161; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 176, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 162; o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 176, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 163.

También se proveen ácidos nucleicos aislados que codifican un anticuerpo humano, humanizado, o quimérico, o fragmento de unión a antígeno

del mismo, que se une específicamente a un epítipo entre los residuos 70-76 de péptido A amiloide humano, incluyendo todos estos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno aquí descritos y como se indican en las reivindicaciones. Se proveen además células que expresan tales ácidos nucleicos.

En otros aspectos, la presente invención provee un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo que comprende X_1EDX_2 en una proteína amiloide agregada, en donde X_1 y X_2 son cualquier amino ácido. Tales anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno incluyen anticuerpos humanos, humanizados, o quiméricos, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, por ejemplo, aquellos que se unen específicamente a un epítipo entre los residuos 70-76 de péptido A amiloide humano.

Anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno representativos adicionales incluyen aquellos en donde X_1 es H, T, F, S, P, A, L, C, Q, R, E, K, D, G, V, Y, I, o W, y en donde X_2 es T, S, E, R, I, V, F, D, A, G, M, L, N, P, C, K, Y, or Q; or X_1 es H, T, F, S, P, o A, y en donde X_2 es T, S, E, R, I, V, F, D, o A; o X_1 es H, T, F, o A; o X_2 es T, S, E, D, o A; o X_1 es H, T, F, o A y X_2 es T, S, E, D, o A; o X_1 es H, T, o A y X_2 es T, S, E, o A; o X_1 es H o A y X_2 es T, S, o A; o X_1 es H y X_2 es T o A; o X_1 es A y X_2 es S, T, E o V; o X_1 es A y X_2 es S, T o E; o X_1 es T y X_2 es E; o X_1 es F y X_2 es D; o X_1 es S y X_2 es E, F o A; o X_1 es P y X_2 es E, I o F. Por ejemplo, tales anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno se unen a un epítipo que consiste de una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo de GHEDT (SEQ ID NO: 3), HEDT (SEQ ID NO: 12), AEDS (SEQ ID NO: 13), AEDT (SEQ ID NO: 14), HEDA (SEQ ID NO: 15), TEDE (SEQ ID NO: 16), FEDD (SEQ ID NO: 17), SEDE (SEQ ID NO: 18), AEDE (SEQ ID NO: 19), PEDE (SEQ ID NO: 20), PEDI (SEQ ID NO: 21), PEDF (SEQ ID NO: 22), AEDV (SEQ ID NO: 23), SEDF (SEQ ID NO: 24), y

SEDA (SEQ ID NO: 25); o un epítipo que consiste de una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de GHEDT (SEQ ID NO: 3), HEDT (SEQ ID NO: 12), AEDS (SEQ ID NO: 13), AEDT (SEQ ID NO: 14), HEDA (SEQ ID NO: 15), TEDE (SEQ ID NO: 16), FEDD (SEQ ID NO: 17), SEDE (SEQ ID NO: 18), AEDE (SEQ ID NO: 19), PEDE (SEQ ID NO: 20), PEDI (SEQ ID NO: 21), PEDF (SEQ ID NO: 22), SEDF (SEQ ID NO: 24), y SEDA (SEQ ID NO: 25); o un epítipo que consiste de una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de GHEDT (SEQ ID NO: 3), HEDT (SEQ ID NO: 12), AEDS (SEQ ID NO: 13), AEDT (SEQ ID NO: 14), HEDA (SEQ ID NO: 15), and TEDE (SEQ ID NO: 16). Los epítopos revelados se pueden encontrar en una proteína amiloide agregada, por ejemplo, un epítipo que comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de GHGAEDS (SEQ ID NO: 4), GHDAEDS (SEQ ID NO: 5), GDHAEDS (SEQ ID NO: 7), STVIEDS (SEQ ID NO: 8), y GRGHEDT (SEQ ID NO: 9); o un epítipo que comprende una secuencia de amino ácido GHGAEDS (SEQ ID NO: 4); o un epítipo que comprende los amino ácidos HEDT (SEQ ID NO: 12); o un epítipo que comprende los amino ácidos HEDA (SEQ ID NO: 15); o un epítipo que comprende los amino ácidos AEDS (SEQ ID NO: 13) o un epítipo que comprende los amino ácidos AEDT (SEQ ID NO: 14); o un epítipo que comprende los amino ácidos TEDE (SEQ ID NO: 16); o un epítipo que comprende la secuencia de amino ácido AEDV (SEQ ID NO: 23); o un epítipo que comprende la secuencia de amino ácido SEDF (SEQ ID NO: 24) o PEDF (SEQ ID NO: 22); o un epítipo que comprende una secuencia de amino seleccionada del grupo que consiste de PEDS (SEQ ID NO: 26), PEDL (SEQ ID NO: 27), TEDV (SEQ ID NO: 28), AEDE (SEQ ID NO: 19), SEDI (SEQ ID NO: 29) y TEDT (SEQ ID NO: 30); o un epítipo que comprende una secuencia amino seleccionada del grupo que consiste de LEDG (SEQ ID NO: 31), AEDM (SEQ ID NO: 32), HEDS (SEQ ID NO: 33), CEDD (SEQ ID NO: 34), QEDS (SEQ ID NO: 35), REDS (SEQ ID NO: 36), TEDG (SEQ ID NO: 16), QEDR (SEQ ID NO: 38), TEDL (SEQ ID NO: 39), PEDN (SEQ ID NO: 40), EEDP

(SEQ ID NO: 41), LEDL (SEQ ID NO: 42), KEDA (SEQ ID NO: 43), SEDC (SEQ ID NO: 44), EEDD (SEQ ID NO: 45), SEDK (SEQ ID NO: 46), DEDD (SEQ ID NO: 47), DEDG (SEQ ID NO: 13), LEDE (SEQ ID NO: 49), GEDA (SEQ ID NO: 13), VEDF (SEQ ID NO: 51), YEDE (SEQ ID NO: 52), IEDL (SEQ ID NO: 53), WEDY (SEQ ID NO: 54), DEDW (SEQ ID NO: 55), SEDL (SEQ ID NO: 56), YEDQ (SEQ ID NO: 57), LEDW (SEQ ID NO: 58), YEDR (SEQ ID NO: 59) y PEDK (SEQ ID NO: 60).

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno aquí descritos incluyen aquellos que se unen a la proteína amiloide en forma monomérica con una afinidad de menos de aproximadamente 10^7 M^{-1} . Proteínas amiloide representativas incluyen proteína A amiloide en suero (SAA), proteína de cadena ligera de inmunoglobulina (tal como $\text{V}\lambda 6 \text{ Wi}1$ y $\text{V}\kappa$), polipéptido precursor de amiloide de islote humano (IAPP), péptido beta amiloide, transtiretina (TTR), y ApoA1.

También se proveen ácidos nucleicos aislados que codifican un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se unen específicamente a un epítipo que comprende X_1EDX_2 en una proteína amiloide agregada, en donde X_1 y X_2 son cualquier amino ácido, incluyendo todos los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno aquí descritos anteriormente y como se indican en las reivindicaciones. Se proveen además células que expresan tales ácidos nucleicos.

La presente invención provee adicionalmente métodos para tratar terapéuticamente o profilácticamente un sujeto que tiene amiloidosis AA usando un anticuerpo humano, humanizado, o quimérico, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo entre los residuos 70-76 de péptido A amiloide humano, por ejemplo, un epítipo entre los residuos 70- 76 de la SEQ ID NO: 2. Los sujetos que se pueden beneficiar

con los métodos terapéuticos revelados incluyen sujetos que sufren de una enfermedad amiloide seleccionada del grupo que consiste de artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondilitis anquilosante, soriasis, artropatía soriática, síndrome de Reiter, Enfermedad de Still del Adulto, síndrome de Behcet, enfermedad de Crohn, lepra, tuberculosis, bronquiéctasis, úlceras por decúbito, pielonefritis crónica, osteomielitis, enfermedad de Whipple, linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas de intestino, pulmón y tracto urogenital, carcinoma de célula basal, leucemia de célula vellosa, Fiebre Mediterránea Familiar, y Enfermedad de Castleman. Los sujetos que se pueden beneficiar de los métodos profilácticos revelados incluyen sujetos susceptibles o en riesgo de desarrollar cualquiera de los trastornos anteriores.

También se proveen métodos para tratar terapéuticamente o profilácticamente un sujeto que tiene amiloidosis asociada con una proteína amiloide agregada, que comprende la secuencia de amino ácido ED usando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a un epítipo que comprende X_1EDX_2 en una proteína amiloide agregada, en donde X_1 y X_2 son cualquier amino ácido. Los sujetos que se pueden beneficiar con los métodos terapéuticos revelados para tratar la amiloidosis asociada con una proteína amiloide agregada incluyen aquellos sujetos que sufren de amiloidosis AA, amiloidosis AL, enfermedad de Alzheimer, Deterioro cognitivo leve, polineuropatía amiloide, fiebre Mediterránea, síndrome de Muckle-Wells, amiloidosis sistémica reactiva asociada con enfermedades inflamatorias sistémicas, amiloidosis asociada con mieloma o macroglobulinemia, amiloidosis asociada con discrasia del inmunocito, gammapatía monoclonal, discrasia oculta, y amiloidosis nodular local asociada con enfermedades inflamatorias crónicas. Los sujetos que se pueden beneficiar de los métodos profilácticos revelados incluyen aquellos sujetos susceptibles o en riesgo de desarrollar cualquiera de los trastornos anteriores. En un aspecto de la invención, la proteína amiloide comprende la secuencia AEDV (SEQ ID NO: 23), y la

enfermedad amiloidogénica tratada terapéuticamente o profilácticamente, usando los métodos revelados es amiloidosis AA, amiloidosis AL, polineuropatía amiloide, fiebre Mediterránea, síndrome de Muckle-Wells, amiloidosis sistémica reactiva asociada con enfermedades inflamatorias sistémicas, amiloidosis asociada con mieloma o macroglobulinemia, amiloidosis asociada con discrasia del inmunocito, gammapatía monoclonal, discrasia oculta, y amiloidosis modilar local asociada con enfermedades inflamatorias crónicas.

Los métodos terapéuticos y profilácticos revelados son útiles para el tratamiento de sujetos humanos. Los índices representativos de tratamiento terapéutico eficaz incluyen ralentización de la progresión de la amiloidosis, inhibición de la deposición de agregados de fibrilo amiloide, y/o depuración de los agregados de fibrilo amiloide. Los índices representativos de tratamiento profiláctico eficaz incluyen retraso de la aparición de la amiloidosis y/o reducción de un riesgo de amiloidosis.

Aún adicionalmente se proveen métodos para detectar un depósito amiloide asociado con amiloidosis AA en un sujeto anticuerpo humano, humanizado, o quimérico, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo entre los 70-76 del péptido A amiloide humano, cuyo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno está unido a un marcador detectable, y luego detectar el marcador detectable en el sujeto. Métodos adicionales comprenden detectar una proteína amoliode agregada que comprende la secuencia de amino ácido ED usando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a un epítipo que comprende X_1EDX_2 en una proteína amiloide agregada, en donde X_1 y X_2 son cualquier amino ácido. Los métodos de detección anteriores se pueden usar, por ejemplo, para monitorear la aparición o progresión de la enfermedad, o terapia en cualquiera de las enfermedades y trastornos anotados

anteriormente. En cuanto a los métodos de tratamiento aquí revelados, tal monitoreo se puede realizar en sujetos humanos así como no humanos. Marcadores detectables útiles incluyen radiomarcadores, tales como ^{125}I . Para realizar tales métodos de detección, el paso de detectar el marcador detectable se puede llevar a cabo mediante técnicas no invasivas, tales como representación gráfica SPECT/CT y espectroscopía de RMN.

Se proveen aún además métodos de inmunoterapia activa de un sujeto que tiene amiloidosis AA, usando un agente que induce una respuesta inmune a los residuos 70-76 del péptido A amiloide efectivo para inducir una respuesta inmune que comprende anticuerpos contra los residuos 70-76 de un péptido A amiloide. Agentes representativos para inducir la respuesta inmune incluyen los residuos 70-76 de péptido A amiloide o un subfragmento de al menos 3 residuos contiguos del mismo, que tienen menos de 20 amino ácidos contiguos de un péptido AA. Estos métodos son útiles terapéuticamente y/o profilácticamente para el tratamiento de los sujetos aquí descritos anteriormente con respecto a la inmunoterapia pasiva, p.e., administrando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a los residuos 70-76 del péptido AA amiloide. Los índices de eficacia terapéutica y profiláctica también son como se anotaron anteriormente con respecto a la inmunoterapia pasiva.

Lo anterior resume aspectos particulares de la invención, y los aspectos adicionales de la invención se describen aquí.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Alineación de secuencia de SAA1 humana, SAA2 humana, SAA3 humana y SAA4 humana.

- Figura 2: Alineación de secuencia de SAA1 humana y AA1 humana.
- Figura 3: Alineación de secuencia de SAA2 humana y AA2 humana.
- Figura 4: Alineación de secuencia de SAA3 humana y AA3 humana.
- Figura 5: Alineación de secuencia de SAA4 y AA4 humana.
- Figura 6: Alineación de secuencia de AA1 humana, AA2 humana, AA3 humana y AA4 humana.
- Figura 7: Alineación de secuencia de al menos siete residuos de AA1 humana, AA2 humana, AA3 humana y AA4 humana.
- Figura 8: Alineación de secuencia de SAA1 de ratón, SAA2 de ratón, SAA3 de ratón y SAA4 de ratón.
- Figura 9: Alineación de secuencia de SAA1 de ratón y AA1 de ratón.
- Figura 10: Alineación de secuencia SAA2 de ratón y AA2 de ratón.
- Figura 11: Alineación de secuencia SAA3 de ratón y AA3 de ratón.
- Figura 12: Alineación de secuencia de SAA4 de ratón y AA4 de ratón.
- Figura 13: Alineación de secuencia AA1 de ratón, AA2 de ratón, AA3 de ratón, AA4 de ratón.
- Figura 14: Alineación de secuencia de los últimos siete residuos de AA1 de ratón, AA2 de ratón, AA3 de ratón, AA4 de ratón.
- Figura 15: Alineación de secuencia de SAA1 humana y SAA1 de ratón.
- Figura 16: Alineación de secuencia de AA1 humana y AA1 de ratón.
- Figura 17: Alineación de secuencia de SAA1 humana y fragmento de SAA1 de ratón.
- Figura 18: Alineación de secuencia de SAA1 alfa humana, SAA1 beta humana, y SAA1 gamma humana.
- Figura 19: Alineación de secuencia de SAA2 alfa humana y SAA2 beta humana.
- Figura 20: Comparación de secuencia de proteínas SAA. La región de péptido usada para generar 2A4, 8G9 y 7D8 se muestra en líneas punteadas. La inserción de amino ácido 8 entre las posiciones 67 y 68 en la secuencia

Shar Pei se indica mediante el subrayado y la flecha. Alineación realizada con CLUSTAL W.

Figura 21: Secuencias de línea germinal de cadenas ligeras de V_{κ} .

Figura 22: Secuencias de línea germinal de cadenas pesadas de V_{λ} .

Figura 23: Secuencia de amino ácido de $V_{\lambda 6}$ Wil.

Figura 24: Cristal de rayos X de $V_{\lambda 6}$ Wil que muestra la posición de Glu50-Asp51.

Figura 25: Cristal de rayos X de $V_{\lambda 6}$ Wil que muestra la posición de Glu81-Asp82

Figura 26: Cinética de unión de mAbs Elan a fibrilos $V_{\lambda 6}$ Wil sintéticos. Mediciones BIAcore de la interacción de los mAbs 2A4, 7D8 y 8G9 a 6.6 nM con fibrilos $V_{\lambda 6}$ Wil inmovilizados. La KD calculada para cada interacción fue ~ 1 nM.

Figura 27: Cinética de la unión dependiente de concentración del mAb 7D8 a fibrilos $V_{\lambda 6}$ Wil sintéticos. La interacción de anticuerpo a una concentración de 6.6 - 33.3 nM con fibrilos $V_{\lambda 6}$ Wil inmovilizados se midió mediante BIAcore.

Figura 28: Cinética de unión del mAb 7D8 a fibrilos $V_{\lambda 6}$ Wil sintéticos en la presencia de los péptidos p39 y p41. La interacción del mAb 7D8 a 6.6 nM con fibrilos $V_{\lambda 6}$ Will inmovilizados se midió mediante BIAcore en la presencia de los péptidos p39 y p41 a 1 o 20 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 29: Reactividad de anticuerpos monoclonales con depósitos amiloides de tejido AL λ .

Figura 30: Biodistribución de mAb 7D8 ^{125}I -marcado en ratones que portan un amiloidoma AL λ humano.

Figura 31: Interacción de anti-AA de sobrenadantes de cultivo con fibrilos AA derivados de murino. Resultados de sobrenadantes de cultivo de mAb que se une a AEF AA murino. Los paneles superiores e inferiores son datos de una recolección de fluido de primer y segundo cultivo, respectivamente.

Figura 32: Análisis SDS-PAGE de mAbs 2A4, 8G9 y 7D8 purificados de proteína A.

Figura 33: Unión de mAbs purificados a péptido inmunizante (p#39) y de control (p#41).

Figura 34: Unión a extracto amiloide AA murino (AEF).

Figura 35: Unión de mAbs purificados a extracto amiloide AA renal humano.

Figuras 36A-36E: Secuencias de regiones variables de cadena pesada y ligera de 2A4, 7D8, y 8G9 murinos (Figura 36A); secuencias de regiones variables de cadena ligera de 2A4/8G9 y 7D8 humanizado (Figuras 36B-36C); secuencias de regiones variables de cadena ligera humanas usadas como marcos aceptores (Figura 36D); secuencias de regiones variables de cadena pesada de 2A4/7D8/8G9 humanizados y región variable de cadena pesada humana usada como marco aceptor (Figura 36E). Subrayadas, CDRs; subrayado doble, secuencias líder; minúscula, retro mutaciones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención provee un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo que incluye X_1EDX_2 en una proteína amiloide agregada, en donde X_1 y X_2 son cualquier amino ácido. Anticuerpos representativos de la invención también incluyen anticuerpos o fragmentos de los mismos que (a) compiten por unión a un epítipo que incluye X_1EDX_2 con un anticuerpo 2A4, 7D8, o 8G9; (b) se unen al mismo epítipo que incluye X_1EDX_2 como un anticuerpo 2A4, 7D8, o 8G9; (c) incluyen un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo 2A4, 7D8, o 8G9; o (d) incluyen las seis regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de un anticuerpo 2A4, 7D8, o 8G9.

La invención también provee una región variable de anticuerpo aislado que incluye (a) una región variable de cadena ligera de un anticuerpo derivado del anticuerpo 2A4, 7D8, o 8G9; o (b) una región variable de cadena pesada de un anticuerpo derivado de un anticuerpo 2A4, 7D8, o 8G9.

La invención también provee un ácido nucleico aislado que codifica una región variable de cadena ligera o región variable de cadena pesada de anticuerpo, incluyendo (a) una secuencia de nucleótido que codifica una región variable de cadena ligera o cadena pesada de un anticuerpo 7D8, 2A4, o 8G9; (b) una secuencia de nucleótido que es idéntica a la secuencia de nucleótido de un anticuerpo 7D8, un 2A4, o un 8G9 que codifica una región variable de cadena ligera o cadena pesada; (c) una secuencia de nucleótido que es sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleótido de (a) o (b); o (d) un ácido nucleico que hibridiza específicamente a un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido que es el complemento de una secuencia de nucleótido de (a) o (b) bajo condiciones de hibridación severas.

También se proveen las células que expresan los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la presente invención. La invención provee además células que expresan los ácidos nucleicos de la invención.

La invención también incluye métodos de tratamiento de enfermedades amiloides y métodos de profilaxis de enfermedades amiloides usando los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la invención. Actualmente, no hay tratamientos dirigidos a amiloide aprobados específicos para ninguna de las enfermedades amiloides, incluyendo Amiloidosis AA y amiloidosis AL. Ver Gillmore J.D. et al., *Lancet* 358:24-9 (2001). Cuando hay un estado de enfermedad subyacente o asociado, la terapia se dirige a disminuir la producción de proteína amiloidogénica mediante el tratamiento de la enfermedad subyacente. Por ejemplo, la estrategia de tratamiento actual para la Amiloidosis AA es dirigirse a la inflamación subyacente, reducir los niveles de ApoSSA por debajo de 10 mg/l. Las terapias usadas actualmente incluyen quimioterapia (clorambucil y MTX), inmunosupresores (azatioprina), fármacos anti-inflamatorios (colicina) e inhibidores de TNF. La invención provee

composiciones farmacéuticas y métodos para el tratamiento de enfermedades amiloides, incluyendo amiloidosis, tales como, por ejemplo, amiloidosis AA y AL amiloidosis AL. De acuerdo con un aspecto, la invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden, como un ingrediente activo, un agente que es efectivo para inducir una respuesta inmune en un paciente contra un componente amiloide. El agente puede ser un péptido que comprende un fragmento que consiste de la secuencia de amino ácido X_1EDX_2 derivada de una proteína amiloide. El agente puede ser un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo que comprende X_1EDX_2 . En otras realizaciones, el agente puede ser un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo. Tales composiciones incluirán también generalmente excipientes y, en realizaciones preferidas, pueden incluir adyuvantes. En realizaciones adicionales preferidas, los adyuvantes incluyen, por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, MPL™, QS-21 (STIMULON™) o adyuvante de Freund incompleto. De acuerdo con una realización relacionada, tales composiciones farmacéuticas puede incluir una pluralidad de agentes efectivos para inducir una respuesta inmune contra más de un componente amiloide en el paciente.

En una realización relacionada, el agente es efectivo para producir una respuesta inmune dirigida contra una proteína amiloide agregada, tal como un componente amiloide de péptido o proteína de fibrilo. Preferiblemente, tal péptido o proteína de fibrilo se deriva de una proteína precursora de fibrilo conocida por estar asociada con ciertas formas de enfermedades amiloides, como se describe aquí. Tales proteínas precursoras incluyen, pero no se limitan a, Proteína A Amiloide en Suero (ApoSSA), cadena ligera de inmunoglobulina, cadena pesada de inmunoglobulina, ApoA1, transtiretina, lisozima, cadena α de fibrógeno, gelsolina, cistatina C, precursor de proteína β amiloide (β -APP), microglobulina Beta₂, proteína precursora del prión (PrP), factor natriurético atrial, queratina, polipéptido amiloide del islote, una hormona de péptido, y sinucleína. Tales precursores también incluyen proteínas

mutantes, fragmentos de proteína y péptidos proteolíticos de tales precursores. En una realización preferida, el agente es efectivo para inducir una respuesta inmune dirigida contra un neoepítipo formado por una proteína o péptido de fibrilo, con respecto a una proteína precursora de fibrilo. Esto es, como se describe en más detalle en la presente, muchos péptidos o proteínas formadoras de fibrilo son fragmentos de tales proteínas precursoras, tales como los listados anteriormente. Cuando se forman tales fragmentos, tal como mediante clivado proteolítico, se pueden revelar epítopos que no están presentes en el precursor y, por lo tanto, no están inmunológicamente disponibles para el sistema inmune cuando el fragmento es una parte de la proteína precursora. Los agentes dirigidos a tales epítopos pueden ser agentes terapéuticos preferidos porque pueden ser menos probables de inducir una respuesta autoinmune en el paciente. Preferiblemente, tales agentes producen preferencialmente una respuesta inmune dirigida contra una forma patológica de la proteína amiloide, por ejemplo, una proteína amiloide agregada, con relación a formas no patológicas de la proteína amiloide.

De acuerdo con una realización relacionada, las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agentes dirigidos a agregados amiloides, tales como los seleccionados del grupo que incluye, pero no se limita a los siguientes péptidos o proteínas agregadas (p.e., fibrilos): AA, AL, ATTR, AApoA1, Alys, Agel, Acys, A β , AB₂M, AScr, Acal, AIAPP y fragmento NAC de sinucleína. Los nombres completos y composiciones de estos péptidos se describen aquí. Tales péptidos se pueden hacer de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica aquí descritos.

Los métodos comprenden administrar al paciente una dosis efectiva de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo que comprende X₁EDX₂ en una proteína amiloide, en donde X₁ es H, T, F, S, P, A o cualquier otro residuo de amino ácido que precede inmediatamente ED en tal proteína

amiloide; y en donde X_2 es T, S, E, R, I, V, F, A o cualquier otro residuo de amino ácido inmediatamente después de ED en tal proteína amiloide. En algunos métodos, el paciente sufre de una amiloidosis asociada con una proteína amiloide agregada que comprende la secuencia de amino ácido ED. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo que consiste de tal X_1EDX_2 . En algunos anticuerpos, X_1 es H, T, F, S, P, o A, y X_2 es T, S, E, D, R, I, V, F o A. En algunos de estos anticuerpos, cuando X_1 es H, X_2 es T o A; cuando X_1 es A, X_2 es S, T, E o V; cuando X_1 es T, X_2 es E; cuando X_1 es F, X_2 es D; cuando X_1 es S, X_2 es E, F o A; y cuando X_1 es P, X_2 es E, I o F. En algunos anticuerpos, X_1 es H, T, F, S, P, o A y X_2 es T, S, E, D, R, I, V, F o A, con la condición que si X_1 es A, X_2 no es V. En algunos anticuerpos, cuando X_1 es A, X_2 es S, T o E.

Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo que comprende la secuencia de amino ácido GHEDT, (SEQ ID NO: 3), HEDT, (SEQ ID NO: 12), AEDS, (SEQ ID NO 13), AEDT (SEQ ID NO: 14), HEDA (SEQ ID NO: 15), TEDE, (SEQ ID NO: 16), FEDD, (SEQ ID NO: 17), SEDE, (SEQ ID NO: 18), AEDE, (SEQ ID NO: 19), PEDE, (SEQ ID NO: 20), PEDI, (SEQ ID NO: 21), PEDF, (SEQ ID NO: 22), AEDV, (SEQ ID NO: 23), SEDF (SEQ ID NO: 24), o SEDA, (SEQ ID NO: 25).

Algunos anticuerpos se unen específicamente a un péptido que comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de GHEDT, (SEQ ID NO: 3), HEDT, (SEQ ID NO: 12), AEDS, (SEQ ID NO: 13), AEDT, (SEQ ID NO: 14), HEDA, (SEQ ID NO: 15), TEDE, (SEQ ID NO: 16), FEDD, (SEQ ID NO: 17), SEDE, (SEQ ID NO: 18), AEDE, (SEQ ID NO: 19), PEDE, (SEQ ID NO: 20), PEDI, (SEQ ID NO: 21), PEDF, (SEQ ID NO: 22), SEDF, (SEQ ID NO: 24), y SEDA, (SEQ ID NO: 25). Algunos anticuerpos se unen específicamente a un péptido que comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de GHEDT, (SEQ ID NO: 3, HEDT,

(SEQ ID NO: 12), AEDS, (SEQ ID NO: 13), AEDT, (SEQ ID NO: 14), HEDA, (SEQ ID NO: 15), y TEDE, (SEQ ID NO: 16).

Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo entre los residuos 70 a 76 de AA. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo entre los residuos 71 a 75 de AA. Algunos anticuerpos son elevados a un péptido que comprende GHEDT, (SEQ ID NO: 3).

Algunos anticuerpos se unen específicamente a un péptido que comprende la secuencia de amino ácido PEDS, (SEQ ID NO: 26), PEDL, (SEQ ID NO: 27), TEDV, (SEQ ID NO: 28), AEDE, (SEQ ID NO: 19), SEDI, (SEQ ID NO: 29), y TEDT, (SEQ ID NO: 30). Algunos anticuerpos se unen específicamente a un péptido que comprende la secuencia de amino ácido LEDG, (SEQ ID NO: 31), AEDM, (SEQ ID NO: 32), HEDS, (SEQ ID NO: 33), CEDD, (SEQ ID NO: 34), QEDS, (SEQ ID NO: 35), REDS, (SEQ ID NO: 36), TEDG, (SEQ ID NO: 37), QEDR, (SEQ ID NO: 38), TEDL, (SEQ ID NO: 39), PEDN, (SEQ ID NO: 40), EEDP, (SEQ ID NO: 41), LEDL, (SEQ ID NO: 42), KEDA, (SEQ ID NO: 43), SEDC, (SEQ ID NO: 44), EEDD, (SEQ ID NO: 45), SEDK, (SEQ ID NO: 46), DEDD, (SEQ ID NO: 47), DEDG, (SEQ ID NO: 48), LEDE, (SEQ ID NO: 49), GEDA, (SEQ ID NO: 50), VEDF, (SEQ ID NO: 51), YEDE, (SEQ ID NO: 52), IEDL, (SEQ ID NO: 53), WEDY, (SEQ ID NO: 54), DEDW, (SEQ ID NO: 55), SEDL, (SEQ ID NO: 56), YEDQ, (SEQ ID NO: 57), LEDW, (SEQ ID NO: 58), YEDR, (SEQ ID NO: 59), y PEDK, (SEQ ID NO: 60).

Algunos anticuerpos se unen específicamente a un péptido que comprende la secuencia de amino ácido AEDV, (SEQ ID NO: 23). Algunos anticuerpos se unen específicamente a un péptido que comprende la secuencia de amino ácido SEDF, (SEQ ID NO: 24) o PEDF, (SEQ ID NO: 22). Algunos anticuerpos se unen específicamente a un péptido que comprende la secuencia de amino ácido AEDS, (SEQ ID NO: 13). Algunos anticuerpos se unen

específicamente a un péptido que comprende la secuencia de amino ácido PEDI (SEQ ID NO: 21), AEDV, (SEQ ID NO 23), SEDF, (SEQ ID NO: 24), SEDA, (SEQ ID NO: 25), SEDE, (SEQ ID NO: 18), AEDE, (SEQ ID NO: 19), y PEDE, (SEQ ID NO: 20). Algunos anticuerpos se unen a un péptido que comprende la secuencia de amino ácido TEDE, (SEQ ID NO: 16).

Algunos anticuerpos se unen específicamente a un péptido que comprende la secuencia de amino ácido AEDV, (SEQ ID NO: 23). Algunos anticuerpos se unen específicamente a un péptido que comprende la secuencia de amino ácido SEDF, (SEQ ID NO: 24) o PEDF, (SEQ ID NO: 22). Algunos anticuerpos se unen específicamente a un péptido que comprende la secuencia de amino ácido AEDS, (SEQ ID NO: 13). Algunos anticuerpos se unen específicamente a un péptido que comprende la secuencia de amino ácido PEDI (SEQ ID NO: 21), AEDV, (SEQ ID NO 23), SEDF, (SEQ ID NO: 24), SEDA, (SEQ ID NO: 25), SEDE, (SEQ ID NO: 18), AEDE, (SEQ ID NO: 19), y PEDE, (SEQ ID NO: 20). Algunos anticuerpos se unen a un péptido que comprende la secuencia de amino ácido TEDE, (SEQ ID NO: 16).

Cualquiera de los anticuerpos descrito anteriormente puede ser administrado en los métodos antes descritos para tratar o efectuar profilaxis de una enfermedad caracterizada por la deposición de una proteína amiloide tal como, por ejemplo, una proteína amiloide que compende la secuencia de amino ácido ED. En algunos métodos, si la proteína amiloide comprende la secuencia de amino ácido AEDV, (SEQ ID NO: 23), entonces el anticuerpo no se administrar para tratar o efectuar profilaxis de la enfermedad de Alzheimer o Deterioro Cognitivo Leve. La proteína amiloide puede ser cualquiera de proteína A amiloide en suero, proteína de cadena ligera de inmunoglobulina, tal como, por ejemplo, V λ 6 Wil o V κ , polipéptido precursor de amiloide de islote humano (IAPP), péptido beta amiloide, transtiretina (TTR) o ApoA1.

Opcionalmente, el paciente es humano. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente a un péptido cuyos residuos consisten de la SEQ ID NOS. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, u 11. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo entre los residuos 70-76 de (SEQ ID NO: 2). Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo humano, anticuerpo humanizado o anticuerpo quimérico. Opcionalmente, el anticuerpo humano es de isotipo IgG1, IgG4, IgG2 o IgG3 humano. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es de isotipo IgG1, IgG4, IgG2 o IgG3 humano. Opcionalmente, el anticuerpo quimérico es de isotipo IgG1, IgG4, IgG2 o IgG3 humano. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo de ratón. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En algunos métodos de tratamiento, el anticuerpo comprende dos copias del mismo par de cadenas ligera y pesada. En otros métodos, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer par de cadena ligera y pesada que se une específicamente al epítipo de A β y un segundo par de cadena ligera y pesada que se une específicamente a un receptor Fc sobre células microgliales. En otros métodos, una cadena del anticuerpo está fusionada a un polipéptido heterólogo.

Algunos métodos de tratamiento, la dosis de anticuerpo es de al menos 1 mg/kg de peso corporal del paciente. En otros métodos, la dosis de anticuerpo es al menos 10 mg/kg de peso corporal del paciente. En algunos métodos de tratamiento, el anticuerpo es administrado con un portador como una composición farmacéutica. En otros métodos, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano a AA preparado de células B de un humano inmunizado con un péptido AA. Opcionalmente, el humano inmunizado con el péptido AA es el paciente. En algunos métodos, el anticuerpo es administrado intraperitonealmente, oralmente, intranasalmente, subcutáneamente, intramuscularmente, tópicamente o intravenosamente.

En algunos métodos de tratamiento, el anticuerpo es administrado mediante la administración de un polinucleótido que codifica al menos una cadena de anticuerpo al paciente, y el polinucleótido es expresado para producir la cadena de anticuerpo en el paciente. Opcionalmente, el polinucleótido codifica cadenas pesada y ligera del anticuerpo y el polinucleótido es expresado para producir las cadenas pesada y ligera en el paciente.

Algunos de los métodos de tratamiento anteriores comprenden además administrar una dosis efectiva de al menos un anticuerpo diferente que se une a un epítipo diferente de AA. Algunos de los métodos de tratamiento anteriores comprenden además monitorear el nivel en sangre de anticuerpo administrado al paciente. En otros métodos, el anticuerpo es administrado en dosis múltiples en un período de al menos seis meses. En otros métodos, el anticuerpo es administrado como una composición de liberación sostenida.

La invención provee además métodos para efectuar profilaxis de amiloidosis AA en un paciente susceptible a la amiloidosis AA. Los métodos comprenden administrar al paciente una dosis efectiva de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo entre los 70 a 76 de AA. Opcionalmente, el paciente es humano. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente a un péptido cuyos residuos consisten de las SEQ ID NOS. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, u 11. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo entre los residuos 70-76 de (SEQ ID NO: 2). En algunos métodos, el paciente sufre de una enfermedad amiloide subyacente seleccionada del grupo que consiste de artritis reumatoide, artritis juvenil crónica, espondilitis anquilosante, soriasis, artropatía soriática, síndrome de Reiter, Enfermedad de Still del Adulto, síndrome de Behcet, enfermedad de Crohn, lepra, tuberculosis, bronquiectasis, úlceras por decúbito, pielonefritis crónica, osteomielitis, enfermedad de

Whipple, linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas de intestino, pulmón y tracto urogenital, carcinoma de célula basal, leucemia de célula vellosa, Fiebre Mediterránea Familiar, y Enfermedad de Castleman.

La invención provee adicionalmente un anticuerpo humano, humanizado o quimérico que se une específicamente a un epítipo entre los 70 a 76 de AA. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado se une específicamente a un epítipo entre los residuos 70 a 76 de AA. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo 7D8 de versión humanizada (Número de Acceso ATCC _____). Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo 7D29 de versión humanizada. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo 7D19 de versión humanizada. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo 7D47 de versión humanizada. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo 7D39 de versión humanizada. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo 7D66 de versión humanizada. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo 8G9 de versión humanizada. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo 8G3 de versión humanizada. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo 8G4 de versión humanizada. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo 8G51 de versión humanizada. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo 8G22 de versión humanizada. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo 8G30 de versión humanizada. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo 8G46 de versión humanizada. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo 2A4 de versión humanizada (Número de Acceso ATCC _____). Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo 2A20 de versión humanizada. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo 2A44 de versión humanizada. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo 2A77 de versión humanizada. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo 2A13 de versión humanizada.

Opcionalmente, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo 2A14 de versión humanizada.

La invención provee además composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas comprenden un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo entre los residuos 70 a 76 de AA, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Algunas composiciones farmacéuticas comprenden un anticuerpo humano, humanizado, o quimérico que se une específicamente a un epítipo entre los 70 a 76 de AA, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otras composiciones farmacéuticas comprenden un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo entre los 70 a 76 de AA y un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde el isotipo del anticuerpo es IgG1 humano, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas composiciones farmacéuticas el isotipo del anticuerpo es IgG2, IgG3, o IgG4 humano. En algunas composiciones farmacéuticas el anticuerpo es humano. En algunas composiciones farmacéuticas el anticuerpo es humanizado. En algunas composiciones farmacéuticas el anticuerpo es quimérico. En algunas composiciones farmacéuticas el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En algunas composiciones farmacéuticas el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas composiciones farmacéuticas el anticuerpo comprende dos copias del mismo par de cadenas ligera y pesada. En algunas composiciones farmacéuticas el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende un par de cadena ligera y pesada que se une específicamente al epítipo de AA y un segundo par de cadena ligera y pesada que se une específicamente a un receptor Fc sobre células microgliales. En algunas composiciones farmacéuticas una cadena del anticuerpo está fusionada a un polipéptido heterólogo. En algunas composiciones farmacéuticas el vehículo es un diluyente fisiológicamente aceptable para administración parenteral. Algunas composiciones farmacéuticas están adaptadas para ser administradas intraperitonealmente, oralmente, intranasalmente, subcutáneamente,

intramuscularmente, tópicamente o intravenosamente. Algunas composiciones farmacéuticas están adaptadas para ser administradas en dosis múltiples en un período de al menos seis meses. Algunas composiciones farmacéuticas están adaptadas para ser administradas como una composición de liberación sostenida. Algunas composiciones farmacéuticas comprenden además al menos un anticuerpo diferente que se une a un epítipo diferente de AA.

La invención provee métodos de tratamiento de amiloidosis AA en un paciente. Los métodos comprenden administrar un agente que induce una respuesta inmune a AA70-76 en un régimen efectivo para inducir una respuesta inmune que comprende anticuerpos contra AA70-76 en un régimen efectivo para inducir una respuesta inmune que comprende anticuerpos contra AA70-76. En algunos métodos el paciente es humano. Opcionalmente, la agente comprende AA70-76 o un subfragmento de al menos 3 residuos contiguos del mismo, y tiene menos de 20 aminoácidos contiguos de un péptido AA. Opcionalmente, el agente es un péptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, y subfragmentos de al menos 3 residuos contiguos del mismo, y tiene menos de 20 amino ácidos de un péptido AA. Opcionalmente, el agente está unido en sus terminales N y C a los primero y segundo polipéptidos heterólogos. Opcionalmente, el agente está unido en su terminal N a un polipéptido heterólogo, y en su terminal C a al menos una copia adicional del segmento N-terminal. En algunos métodos el polipéptido heterólogo induce una respuesta de célula T contra el polipéptido heterólogo y por consiguiente, una respuesta de célula B contra AA. En algunos métodos el polipéptido comprende además al menos una copia adicional de AA. Opcionalmente, el polipéptido comprende desde el terminal N al terminal C, AA, una pluralidad de copias adicionales de AA, y el segmento de amino ácido heterólogo.

En algunos métodos de tratamiento, el polipéptido es administrado con un adyuvante que mejora una respuesta inmune al segmento N-terminal. Opcionalmente, el adyuvante y el polipéptido son administrados juntos como una composición. Opcionalmente, el adyuvante es administrado antes del polipéptido. Opcionalmente, el adyuvante es administrado después del polipéptido. En algunos métodos el adyuvante es alum. En algunos métodos el adyuvante es MPL. En algunos métodos el adyuvante es QS-21. En algunos métodos el adyuvante es adyuvante de Freund incompleto. En algunos métodos la respuesta inmune comprende células T que se unen al péptido AA como un componente de un complejo MHC I o MHC II.

La invención provee métodos para efectuar profilaxis de amiloidosis AA en un paciente. Los métodos comprenden administrar un agente que induce una respuesta inmune a AA70-76 en un régimen efectivo para inducir una respuesta inmune que comprende anticuerpos contra AA70-76 en un régimen efectivo para inducir una respuesta inmune que comprende anticuerpos contra AA70-76. En algunos métodos el paciente es humano. En algunos métodos el paciente es asintomático. En algunos métodos el paciente sufre de una enfermedad amiloide subyacente seleccionada del grupo que consiste de artritis reumatoide, artritis juvenil crónica, espondilitis anquilosante, soriasis, artropatía soriática, síndrome de Reiter, Enfermedad de Still del Adulto, síndrome de Behcet, enfermedad de Crohn, lepra, tuberculosis, bronquiectasis, úlceras por decúbito, pielonefritis crónica, osteomielitis, enfermedad de Whipple, linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas de intestino, pulmón y tracto urogenital, carcinoma de célula basal, leucemia de célula vellosa, Fiebre Mediterránea Familiar, y Enfermedad de Castleman.

En algunos métodos para efectuar profilaxis, el agente comprende AA70-76 o un subfragmento de al menos 3 residuos contiguos del mismo y tiene menos de 20 amino ácidos contiguos de un péptido AA. Opcionalmente,

el agente es un péptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOS 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, y subfragmentos de al menos 3 residuos contiguos de la misma y tiene menos de 20 amino ácidos de un péptido AA. Opcionalmente, el agente está unido en sus terminales N y C a los primer y segundo polipéptidos heterólogos. Opcionalmente, el agente está unido en su terminal N a un polipéptido heterólogo, y en su terminal C a al menos una copia adicional del segmento N-terminal. En algunos métodos el polipéptido heterólogo induce una respuesta de célula T contra el polipéptido heterólogo, y por consiguiente una respuesta de célula B contra AA. En algunos métodos, el polipéptido comprende además al menos una copia adicional de AA. Opcionalmente, el polipéptido comprende del terminal N al terminal C, AA, una pluralidad de copias adicionales de AA, y el segmento de amino ácido heterólogo.

La invención provee además composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas comprenden un fragmento AA que consiste de los residuos que empiezan en el residuo 70 de AA y un residuo que termina en el residuo 76 de AA. Opcionalmente, el fragmento AA está unido en su C terminal a un polipéptido heterólogo. Opcionalmente, el fragmento AA está unido en su terminal N a un polipéptido heterólogo. Opcionalmente, el fragmento AA está unido en sus terminales N y C a los primero y segundo polipéptidos heterólogos. Opcionalmente, el fragmento AA está unido en su terminal N a un polipéptido heterólogo, y en su terminal C a al menos una copia adicional del segmento N-terminal. Opcionalmente, el polipéptido comprende además al menos una copia adicional del segmento N-terminal. Opcionalmente, el polipéptido comprende desde el terminal N al terminal C, AA, una pluralidad de copias adicionales del segmento N-terminal, y el segmento de amino ácido heterólogo. En algunas composiciones farmacéuticas el polipéptido heterólogo induce una respuesta de célula T contra el polipéptido

heterólogo, y por ende, una respuesta de célula B contra el segmento N-terminal.

Algunas composiciones farmacéuticas comprenden además un adyuvante que mejora una respuesta inmune a AA. Opcionalmente, el adyuvante es alum. Opcionalmente, el adyuvante es MPL. Opcionalmente, el adyuvante es QS-21. Opcionalmente, el adyuvante es adyuvante de Freund incompleto. Opcionalmente, el adyuvante comprende además GM-CSF. Opcionalmente, el adyuvante es M-CSF. Opcionalmente, la composición comprende más de 10 microgramos del polipéptido.

La invención provee métodos de tratamiento de amiloidosis AA en un paciente. Los métodos comprenden administrar un agente efectivo para inducir una respuesta inmune contra un componente péptido de un depósito amiloide en el paciente y un agente diferente que trata una enfermedad subyacente, y por ende, trata la amiloidosis AA en el paciente. En algunos métodos la enfermedad subyacente es seleccionada del grupo que consiste de artritis reumatoide, artritis juvenil crónica, espondilitis anquilosante, soriasis, artropatía soriática, síndrome de Reiter, Enfermedad de Still del Adulto, síndrome de Behcet, enfermedad de Crohn, lepra, tuberculosis, bronquiéctasis, úlceras por decúbito, pielonefritis crónica, osteomielitis, enfermedad de Whipple, linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas de intestino, pulmón y tracto urogenital, carcinoma de célula basal, leucemia de célula vellosa, Fiebre Mediterránea Familiar, y enfermedad de Castleman.

La invención provee métodos de efectuar profilaxos de amiloidosis AA en un paciente. Los métodos comprenden administrar un agente efectivo para inducir una respuesta inmune contra un componente péptido de un depósito amiloide en el paciente, y un agente diferente que trata una enfermedad subyacente, y por consiguiente trata amiloidosis AA en el paciente. En algunos

métodos la enfermedad subyacente es seleccionada del grupo que consiste de artritis reumatoide, artritis juvenil crónica, espondilitis anquilosante, soriasis, artropatía soriática, síndrome de Reiter, Enfermedad de Still del Adulto, síndrome de Behcet, enfermedad de Crohn, lepra, tuberculosis, bronquiectasis, úlceras por decúbito, pielonefritis crónica, osteomielitis, enfermedad de Whipple, linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas del intestino, pulmón y tracto urogenital, carcinoma de célula basal, leucemia de célula vellosa, Fiebre Mediterránea Familiar, y enfermedad de Castleman.

La invención provee métodos de selección para actividad de un anticuerpo en el tratamiento de un paciente que tiene amiloidosis AA. Los métodos comprenden contactar el anticuerpo con péptido AA y determinar si el anticuerpo se une específicamente a AA, la unión específica provee una indicación que el anticuerpo tiene actividad en el tratamiento de amiloidosis AA.

La invención provee métodos de selección de un anticuerpo para actividad de depuración de una entidad biológica físicamente asociada con un antígeno. Los métodos comprenden combinar la entidad biológica asociada con el antígeno, el anticuerpo y las células fagocíticas que portan receptores Fc en un medio; y monitorear la cantidad de la entidad biológica asociada con el antígeno que queda en el medio, una reducción de la cantidad de entidad biológica asociada con antígeno indica que el anticuerpo tiene actividad de depuración contra el antígeno. En algunos métodos el paso de monitoreo vigila la cantidad del antígeno que permanece en el medio. En algunos métodos, la combinación comprende adicionar la entidad asociada con el antígeno al medio, y contactar el medio con las células fagocíticas que portan receptores Fc. En algunos métodos la entidad biológica asociada con antígeno se proporciona como una muestra de tejido. In some métodos el antígeno es la entidad biológica. En algunos métodos la muestra de tejido comprende un depósito amiloide. Opcionalmente, la muestra de tejido es del paciente o un

mamífero que tiene patología de Amiloidosis AA. En algunos métodos, el antígeno es AA. En algunos métodos, las células fagocíticas son células microgliales. En algunos métodos, la muestra de tejido es seleccionada del grupo que consiste de una muestra de tejido canceroso, una muestra de tejido infectado viralmente, una muestra de tejido que comprende células inflamatorias, un crecimiento celular anormal no maligno, y una muestra de tejido que comprende una matriz extracelular anormal.

La invención provee métodos para detectar un depósito amiloide en un paciente. Los métodos comprenden administrar al paciente un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo entre los amino ácidos 70-76 de AA y detectar la presencia del anticuerpo en el paciente. Opcionalmente, el anticuerpo es marcado. Opcionalmente, el anticuerpo es marcado con un marcador paramagnético. Opcionalmente, el anticuerpo marcado es detectado mediante resonancia magnética nuclear. Opcionalmente, el anticuerpo marcado es detectado con representación gráfica SPECT/CT. En algunos métodos, el anticuerpo carece de capacidad para inducir una respuesta de depuración en la unión a un depósito amiloide en el paciente.

La invención kits de diagnóstico. Los kits comprenden un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo entre los residuos 70-76 de AA. Algunos kits comprenden además etiquetas que describen el uso del anticuerpo para diagnóstico in vivo o monitoreo de una enfermedad asociada con depósitos amiloides de AA en un paciente. En algunas realizaciones, los kits incluyen instrucciones para el uso del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, para detectar AA.

La invención provee además un método de diagnóstico de amiloidosis en un sujeto que comprende: (a) administrar al sujeto un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que está unido a un marcador

detectable, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo se une específicamente a un epítipo que comprende X_1EDX_2 en una proteína amiloide agregada, en donde X_1 y X_2 son cualquier amino ácido; y (b) detectar la presencia o ausencia del anticuerpo unido o fragmento del mismo, en donde la presencia del anticuerpo o fragmento unido indica un diagnóstico de amiloidosis AA.

En la presente se provee además un método de tratamiento o profilaxis de amiloidosis usando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo que comprende X_1EDX_2 en una proteína amiloide agregada, en donde X_1 y X_2 son cualquier amino ácido. La presente invención provee un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un epítipo que comprende X_1EDX_2 , en una proteína amiloide agregada, en donde X_1 y X_2 son cualquier amino ácido. Por ejemplo, X_1 incluye H, T, F, S, P, A, L, C, Q, R, E, K, D, G, V, Y, I o W, tal como H, T, F, S, P, o A, o tal como H, T, F, o A. X_2 incluye T, S, E, R, I, V, F, D, A, G, M, L, N, P, C, K, Y, o Q, tal como T, S, E, R, I, V, F, D, o A, o tal como T, S, E, D, o A. En otros ejemplos, X_1 es H, T, o A y X_2 es T, S, E, o A, tal como X_1 es H o A y X_2 es T, S, o A. En aún ejemplos adicionales, X_1 es H y X_2 es T o A; o X_1 es A y X_2 es S, T, E, o V, tal como X_1 es A y X_2 es S, T, o E, o X_1 es T y X_2 es E, o X_1 es F y X_2 es D, o X_1 es S y X_2 es E, F, o A; o X_1 es P y X_2 es E, I, o F.

En particular, los epítipos incluyen secuencias de amino ácido tales como las indicadas en la SEQ ID NO: 3 a la SEQ ID NO: 25, tales como las SEQ ID NOS: 3, 12, 13, 14, 15, y 16. Ejemplos adicionales incluyen las SEQ ID NOS: 4, 5, 7, 8, y 9, tal como SEQ ID NO: 4. Los anticuerpos de la invención que se unen a los epítipos, tales como a la SEQ ID NO: 3, incluyen los anticuerpos 2A4, 7D8, y 8G9.

Las proteínas amiloide agregadas a las cuales se unen los anticuerpos de la invención son proteínas no monoméricas. Tales proteínas amiloide agregadas incluyen proteína A de amiloide en suero (SAA), proteína de cadena ligera de inmunoglobulina, polipéptido de precursor amiloide de islote humano (IAPP), péptido beta amiloide, transtiretina (TTR), y ApoA1, tal como SAA.

La invención provee además anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que (a) compiten por la unión a un epítipo que incluye X_1EDX_2 con un anticuerpo 2A4, 7D8, o 8G9; (b) se unen al mismo epítipo que incluye X_1EDX_2 como un anticuerpo 2A4, 7D8, o 8G9; (c) tienen un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo 2A4, 7D8, o 8G9; o (d) incluyen las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de un anticuerpo 2A4, 7D8, o 8G9. La invención también provee versiones quiméricas o humanizadas de un anticuerpo 2A4, 7D8, o 8G9.

Anticuerpos representativos, que se unen específicamente a un epítipo que incluye X_1EDX_2 , incluyen también anticuerpos que tienen al menos uno, dos o tres de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de una cadena ligera de un anticuerpo 2A4, 7D8 o 8G9. Los anticuerpos de la invención, que se unen específicamente a un epítipo que incluye X_1EDX_2 , también incluyen anticuerpos que tienen al menos una, dos o tres de las CDR de una cadena pesada de un anticuerpo 2A4, 7D8, o 8G9.

Las CDR pueden ser identificadas de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, sistemas de numeración para identificar CDR son de uso común. La definición Kabat se basa en la variabilidad de secuencia, y la definición Chothia se basa en la ubicación de las regiones de asa estructurales. La definición de AbM es un compromiso entre los enfoques Kabat y Chothia. Las CDR de la región variable de cadena ligera están limitados por los residuos en las posiciones 24 y 34 (CDR1-L), 50 y 56 (CDR2-L), y 89 y 97 (CDR3-L) de

acuerdo con Kabat, Chothia, o el algoritmo AbM. De acuerdo con la definición Kabat, las CDR de la región variable de cadena pesada están limitadas por los residuos en las posiciones 31 y 35B (CDR1-H), 50 y 65 (CDR2-H), y 95 y 102 (CDR3-H) (numeración de acuerdo con Kabat). De acuerdo con la definición Chothia, las CDR de la región variable de cadena pesada están limitadas por los residuos en las posiciones 26 y 32 (CDR1-H), 52 y 56 (CDR2-H), y 95 y 102 (CDR3-H) (numeración de acuerdo con Chothia). De acuerdo con la definición AbM, las CDR de la región variable de cadena pesada están limitadas por los residuos en las posiciones 26 y 35B (CDR1-H), 50 y 58 (CDR2-H), y 95 y 102 (CDR3-H) (numeración de acuerdo con Kabat). Ver Martin et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9268-9272; Martin et al. (1991) *Methods Enzymol.* 203: 121-153; Pedersen et al. (1992) *Immunomethods* 1:126; y Rees et al. (1996) In Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, pp. 141-172.

Los anticuerpos de la invención incluyen además un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo que comprende X_1EDX_2 , en una proteína amiloide agregada, en donde X_1 y X_2 son cualquier amino ácido, que tiene regiones variables derivadas de regiones variables de un anticuerpo 2A4, 7D8, o 8G9. También se incluyen anticuerpos que tienen regiones variables de los anticuerpos 2A4, 7D8, o 8G9.

Los anticuerpos de la invención incluyen además anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos tetaméricos, anticuerpos tetravalentes, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos específicos de dominio, anticuerpos de dominio eliminado o proteínas de fusión.

También se proveen fragmentos de los anticuerpos de la invención. Los fragmentos de la invención pueden ser fragmentos Fab, fragmento Fab',

fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fv o fragmentos ScFv. Tales anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden estar acoplados con un agente citotóxico, un agente radioterapéutico, o un marcador detectable.

La invención provee también una región variable aislada de anticuerpo que comprende (a) una región variable de cadena ligera derivada de una región variable de cadena ligera de un anticuerpo 7D8, 2A4, o 8G9, o (b) una región variable de cadena pesada derivada de una región variable de cadena ligera de un anticuerpo 7D8, 2A4, o 8G9. También se proporcionan regiones variables aisladas que tienen una región variable de cadena ligera o cadena pesada de un anticuerpo 7D8, 2A4, o 8G9. Las regiones variables de anticuerpo aisladas son útiles en la producción de anticuerpo.

La invención también provee ácidos nucleicos aislados que codifican una región variable de cadena ligera o una región variable de cadena pesada de anticuerpo que tiene (a) una secuencia de nucleótido que codifica una región variable de cadena ligera o cadena pesada de un anticuerpo 7D8, 2A4, o 8G9; (b) una secuencia de nucleótido que es idéntica a una secuencia de nucleótido de un anticuerpo 7D8, a 2A4, o 8G9 que codifica una región variable de cadena ligera o cadena pesada; o (c) una secuencia de nucleótido que es sustancialmente idéntica, p.e., al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, o 99% a una secuencia de nucleótido de (a) o (b); o (d) un ácido nucleico que hibrida específicamente a un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido que es el complemento de una secuencia de nucleótido de (a) o (b) bajo condiciones de hibridación severas, por ejemplo, condiciones de lavado final de $0.1 \times \text{SSC}$ a 65°C .

La presente invención provee además células y líneas celulares que expresan los anticuerpos o ácidos nucleicos de la invención. Las células

hospederas representativas incluyen células mamíferas y humanas, tales como células CHO, células HEK-293, células HeLa, células CV-1, y células COS. Los métodos para generar una línea celular estable después de la transformación de un constructor heterólogo a una célula hospedera son conocidos en la técnica. Células hospederas no mamíferas representativas incluyen células de insectos (Potter et al. (1993) *Int. Rev. Immunol.* 10(2-3): 103-112). Los anticuerpos también pueden ser producidos en animales transgénicos (Houdebine (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.* 13(6):625-629) y plantas transgénicas (Schillberg et al. (2003) *Cell Mol. Life. Sci.* 60(3):433-45).

La invención también provee métodos de tratamiento o para efectuar profilaxis de amiloidosis asociada usando fragmentos inmunogénicos de una proteína amiloide que comprende X_1EDX_2 , en donde X_1 es H, T, F, S, P, A o cualquier otro residuo de amino ácido que precede inmediatamente a ED en tal proteína amiloide; y en donde X_2 es T, S, E, R, I, V, F, A o cualquier otro residuo de amino ácido inmediatamente después de ED en tal proteína amiloide. Sin desear estar ligado por una teoría particular, se cree que un epítipo que comprende X_1EDX_2 puede quedar expuesto cuando una proteína amiloide se agrega, o sufre fibrillogénesis o entra de otra forma a una estructura fibrilar, ya sea mediante clivado de una proteína precursora más grande o mediante cambio conformacional. Por ejemplo, los métodos de tratamiento o profilaxis de amiloidosis AA representativos incluyen la administración de fragmentos 70-76 AA o fragmentos inmunogénicos de los mismos. La invención también provee métodos de tratamiento o para efectuar profilaxis de amiloidosis asociada con deposición de proteína amiloide usando anticuerpos reactivos con X_1EDX_2 en una proteína amiloide agregada, en donde X_1 es H, T, F, S, P, A o cualquier otro residuo de amino ácido que precede inmediatamente ED en tal proteína amiloide agregada; y en donde X_2 es T, S, E, R, I, V, F, A o cualquier otro residuo de amino ácido inmediatamente después de ED en tal proteína amiloide agregada. Preferiblemente, tales anticuerpos son

preferencialmente reactivos con proteína amiloide agregada relativa a proteína amiloide no patológica. Por ejemplo, los métodos de tratamiento o profilaxis de amiloidosis AA asociados con fibrilos AA pueden incluir la administración de anticuerpos específicos para la región C-terminal de los fibrilos AA (~ residuos 70-76 de AA). Los anticuerpos pueden inhibir la formación de agregados AA (p.e., fibrilos) o producir su desagregación y depuración, tratando o efectuando así profilaxis de la amiloidosis AA.

I. Definiciones

El término “identidad sustancial” significa que dos secuencias de péptido, cuando se alinean de manera óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de intervalos por omisión, comparten al menos 65 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 80 o 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 95 por ciento de identidad de secuencia o más (p.e., 99 por ciento de identidad de secuencia o mayor). Preferiblemente, las posiciones de residuo, que no son idénticas difieren por sustituciones de amino ácido conservativas.

Para la comparación de secuencia, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la cual se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencia, las secuencias de prueba y referencia son entradas a una computadora, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia entonces calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de prueba con relación a la secuencia de referencia, con base en los parámetros del programa designados.

La alineación óptima de secuencias para comparación puede ser conducida, p.e., mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante búsqueda por el método de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete de Software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (*ver generalmente* Ausubel et al, *supra*). Un ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul *et al*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). El software para realizar los análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de para Información de Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Típicamente, se pueden usar los parámetros del programa por defecto para realizar la comparación de secuencia, aunque también se pueden usar parámetros especificados. Para las secuencias de amino ácido, el programa BLASTP usa como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y the la matriz de puntuación BLOSUM62 (*ver* Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10915 (1989))

Con el fin de clasificar las sustituciones de amino ácido como conservativas o no conservativas, los amino ácidos son agrupados de la siguiente forma: Grupo I (cadenas laterales hidrofóbicas): norleucina, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrofílicas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gin, his, lys, arg; Grupo V (residuos que influyen la orientación de cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservativas involucran sustituciones entre amino ácidos de la

misma clase. Las sustituciones no conservativas constituyen el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

El término "todos D" se refiere a péptidos que tienen > 75%, > 80%, > 85%, > 90%, > 95%, y 100% de amino ácidos en configuración D.

El término "agente" se usa para describir un compuesto que tiene o puede tener una actividad farmacológica. Los agentes incluyen compuestos que son fármacos conocidos, compuestos para los cuales se ha identificado actividad farmacológica pero que están siendo sometidos a evaluación terapéutica adicional, y compuestos que son miembros de colecciones y librerías que serán seleccionadas para una actividad farmacológica.

"Enfermedad amiloide" o "amiloidosis" se refiere a cualquier número de trastornos que tienen como un síntoma o como parte de su patología, la acumulación o formación de placas amiloides. Una "placa amiloide" es un depósito extracelular compuesto principalmente de fibrilos proteináceos. Generalmente, los fibrilos están compuestos de una proteína o péptido dominante; sin embargo, la placa puede incluir también componentes adicionales que son péptidos o moléculas diferentes a péptido, aquí descritas.

Una "proteína amiloide" o "péptido amiloide" es una proteína o péptido capaz de sufrir clivado, cambio conformacional, agregación o fibrilogénesis, produciendo la formación de oligómeros patológicos, fibrilos amiloides, placas amiloides y/o componentes amiloides.

Un "componente amiloide" es cualquier entidad molecular que está presente en una placa amiloide que incluye porciones antigénicas de tales moléculas. Los componentes amiloides incluyen, pero no se limitan a proteínas, péptidos, proteoglicanos, y carbohidratos.

Un "agente anti-amiloide" es un agente que es capaz de producir una respuesta inmune contra un componente de placa amiloide en un sujeto vertebrado, cuando se administra mediante técnicas de inmunización activas o pasivas.

Una "proteína AA" o "péptido AA" se refiere a la forma de la proteína A o péptido amiloide formado por clivado proteolítico de la proteína A amiloide en suero (SAA), ya sea monomérica o agregada, soluble o insoluble.

Una "proteína amiloide agregada" o "péptido amiloide agregado" o "agregado amiloide" se refiere a una forma agregada, no monomérica, patológica de una proteína amiloide o péptido amiloide. Las proteínas amiloides y péptidos amiloides agregados pueden ser solubles o insolubles. Algunas proteínas amiloide agregadas y péptidos amiloides agregados pueden formar oligómeros, fibrilos y/o placas amiloides. Ejemplos de tales proteínas amiloides y péptidos amiloides agregados, incluyendo péptidos y proteínas de fibrilo, se proveen en la presente.

Un "agregado AA" se refiere a una forma agregada de AA.

Los agentes terapéuticos de la invención son típicamente sustancialmente puros de contaminantes indeseados. Esto significa que un agente es típicamente al menos aproximadamente 50% p/p (peso/peso) puro, así como sustancialmente libre de proteínas y contaminantes que interfieren. Algunas veces, los agentes son al menos aproximadamente 80% p/p y, más preferiblemente al menos 90 o aproximadamente 95% p/p puros. Sin embargo, usando técnicas de purificación de proteína convencionales, se pueden obtener péptidos homogéneos de al menos 99% p/p. Los agentes terapéuticos de la

invención pueden prevenir, efectuar profilaxis, o tratar una enfermedad asociada con depósitos amiloides.

La unión específica entre dos entidades significa que las entidades tienen una afinidad mutua entre sí que es al menos 10, 100 o 100 veces mayor que la afinidad de cualquier entidad por un control, tal como antígeno no relacionado o anticuerpo a un antígeno diferente. A afinidad mutua de las dos entidades entre sí es usualmente, por lo menos 10^7 M^{-1} , 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , o 10^{10} M^{-1} . Se prefieren afinidades mayores de 10^8 M^{-1} .

El término "inmunoglobulina" o "anticuerpo" (usado intercambiamente en la presente) se refiere a una proteína de unión a antígeno que tiene una estructura de cadena básica de cuatro polipéptidos que consiste de dos cadenas pesadas y dos ligeras, estando dichas cadenas estabilizadas, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro entre cadena, que tienen la habilidad de unirse específicamente al antígeno. Tanto la cadena pesada como la ligera están plegados en dominios. El término "dominio" se refiere a una región globular de un polipéptido de cadena pesada o ligera que comprende asas de péptido (p.e., que comprenden 3 a 4 asas de péptido) estabilizadas, por ejemplo, mediante lámina β plegada y/o enlace de disulfuro entre cadena. Los dominios son referidos aaquí adicionalmente como "constantes" o "variables", con base en la falta relativa de variación de secuencia dentro de los dominios de varias clases en el caso de un dominio "constante", o la variación significativa entre los dominios de miembros de varias clases en el caso de un dominio "variable". Los dominios "constantes" en la cadena ligera son referidos intercambiamente como "regiones constantes de cadena ligera", "dominios constantes de cadena ligera", regiones "CL" o dominios "CL". Los dominios "constantes" en la cadena pesada son referidos intercambiamente como "regiones constantes de cadena pesada", "dominios constantes de cadena pesada", regiones "CH" o dominios "CH". Los dominios "variables" en la

cadena ligera son referidos intercambiamente como "regiones variables de cadena ligera", "dominios variables de cadena ligera", regiones "VL" o dominios "VL". Los dominios "variables" en la cadena pesada son referidos intercambiamente como "regiones constantes de cadena pesada", "dominios constantes de cadena pesada", regiones "CH" o dominios "CH".

El término "región" se refiere a una parte o porción de una cadena de anticuerpo e incluye dominios constantes o variables definidos aquí, así como partes o porciones discretas de dichos dominios. Por ejemplo, los dominios o regiones variables de cadena ligera incluyen "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR" intercaladas entre "regiones de marco" o "FRs", definidas aquí.

Las inmunoglobulinas o anticuerpos pueden existir en forma monomérica o polimérica. El término "fragmento de unión a antígeno" se refiere a un fragmento de polipéptido de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une a antígeno o compete con el binds anticuerpo intacto (p.e., con el anticuerpo intacto del cual se derivan) para unión a antígeno (p.e., unión específica). El término "conformación" se refiere a la estructura terciaria de una proteína o polipéptido (p.e., un anticuerpo, cadena de anticuerpo, dominio o región del mismo). Por ejemplo, la frase "conformación de cadena ligera (o pesada)" se refiere a la estructura terciaria de una región variable de cadena ligera (o pesada), y la frase "conformación de anticuerpo" o "conformación de fragmento de anticuerpo" se refiere a la estructura terciaria de un anticuerpo o fragmento del mismo.

"Unión específica" de un anticuerpo significa que el anticuerpo exhibe afinidad apreciable por el antígeno o epítipo preferido y, preferiblemente, no exhibe reactividad cruzada significativa. Unión "apreciable" o preferida incluye unión con una afinidad de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 M^{-1} , o 10^{10} M^{-1} . Las

afinidades mayores de 10^7 M^{-1} , preferiblemente mayores de 10^8 M^{-1} son más preferidas. Valores intermedios de aquellos indicados aquí también pretenden estar dentro del alcance de la presente invención y una finidad de unión preferida puede ser indicada como un rango de afinidades, por ejemplo, 10^6 a 10^{10} M^{-1} , preferiblemente 10^7 a 10^{10} M^{-1} , más preferiblemente 10^8 a 10^{10} M^{-1} . Un anticuerpo que "no exhibe reactividad cruzada significativa" es uno que no se unirá apreciablemente a una entidad indeseada (p.e., una entidad proteínica indeseada). Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a AA se unirá apreciablemente a AA pero no reaccionará significativamente con proteínas o péptidos diferentes a AA (p.e., proteínas o péptidos diferentes de AA incluidos en placas). Un anticuerpo específico para un epítipo preferido, por ejemplo, no reaccionará significativamente con epítipos remotos en la misma proteína o péptido. La unión específica puede ser determinada de acuerdo con cualquier medio reconocido en la técnica para determinar tal unión. Preferiblemente, la unión específica se determina de acuerdo con el análisis Scatchard y/o ensayos de unión competitivos.

Los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno son producidos mediante técnicas de ADN recombinantes, o mediante clivado enzimático o químico de inmunoglobulinas intactas. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fabc, Fv, cadenas sencillas, y anticuerpos de cadena sencilla. Fragmentos de anticuerpo adicionales y variantes de función efectora se discuten aquí en la sección titulada "Anticuerpos". Diferente a las inmunoglobulinas o anticuerpos "biespecíficos" o "bifuncionales", se entiende que una inmunoglobulina o anticuerpo tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. Un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares diferentes de cadena pesada/ligera y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser producidos mediante una variedad de métodos que incluyen fusión de hibridomas o unión

de fragmentos Fab'. Ver, *p.e.*, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

El término "inmunoglobulina humanizada" o "anticuerpo humanizado" se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo que incluye al menos una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo humanizado (*p.e.*, al menos una cadena ligera o pesada humanizada). El término "cadena de inmunoglobulina humanizada" o "cadena de anticuerpo humanizada" (*p.e.*, una "cadena ligera de inmunoglobulina humanizada" o "cadena pesada de inmunoglobulina humanizada") se refiere a una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo (*p.e.*, una cadena ligera o pesada, respectivamente) que tiene una región variable que incluye una región de marco variable sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano y regiones determinantes de complementariedad (CDRs) (*p.e.*, al menos una CDR, preferiblemente dos CDR, más preferiblemente tres CDR) sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano, y que incluye además regiones constantes (*p.e.*, al menos una región constante o porción de la misma, en el caso de una cadena ligera, y preferiblemente tres regiones constantes en el caso de una cadena pesada). El término "región variable humanizada" (*p.e.*, "región variable de cadena ligera humanizada" o "región variable de cadena pesada humanizada") se refiere a una región variable que incluye una región de marco variable sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano y regiones determinantes de complementariedad (CDR) sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano.

La frase "sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano" o "sustancialmente humano" significa que, cuando se alinean a una secuencia de amino de inmunoglobulina o anticuerpo humano para propósitos de comparación, la región comparte al menos 80-90%, preferiblemente 90-95%, más preferiblemente 95-99% de identidad (*p.e.*, identidad de secuencia local)

con el marco o secuencia de región constante humana, permitiendo, por ejemplo, sustituciones conservativas, sustituciones de secuencia de consenso, sustituciones de línea germinal, retromutaciones, y similares. La introducción de sustituciones conservativas, sustituciones de secuencia de consenso, sustituciones de línea germinal, retromutaciones, y similares, son usualmente referidas como "optimización" de un anticuerpo o cadena humanizada. La frase "sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano" o "sustancialmente no humano" significa que tiene una secuencia de inmunoglobulina o anticuerpo al menos 80-95%, preferiblemente 90-95%, más preferiblemente, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la de un organismo no humano, p.e., un mamífero no humano.

En consecuencia, todas las regiones o residuos de una inmunoglobulina o anticuerpo humanizado, o de una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las regiones o residuos correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulina humana nativa. El término "región correspondiente" o "residuo correspondiente" se refiere a una región o residuo sobre una segunda secuencia de amino ácido o nucleótido que ocupa la misma posición (p.e., equivalente) que una región o residuo de una primera secuencia de amino ácido o nucleótido, cuando la primera y segunda secuencias están alineadas óptimamente para propósitos de comparación.

Los términos "inmunoglobulina humanizada" o "anticuerpo humanizado" no pretenden abarcar inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, definidos *infra*. Aunque las inmunoglobulinas o anticuerpos humanizados son quiméricos en su construcción (p.e., comprenden regiones de más de una especie de proteína), incluyen características adicionales (p.e., regiones variables que comprenden residuos de CDR donores y residuos de región de marco

aceptores) no encontrados en inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, aquí definidos.

El término "inmunoglobulina quimérica" o anticuerpo se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo cuyas regiones variables se derivan de una primera especie y cuyas regiones constantes se derivan de una segunda especie. Las inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos pueden ser contruidos, por ejemplo mediante ingeniería genética, a partir de segmentos de gen de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies.

Un "antígeno" es una entidad (p.e., una entidad proteinácea o péptido) al cual un anticuerpo se une específicamente.

El término "epítopo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio sobre un antígeno al cual se une específicamente una inmunoglobulina o anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo). Los epítomos pueden formarse a partir de amino ácidos contiguos o amino ácidos no contiguos yuxtapuestos por doblado terciario de una proteína. Los epítomo formados de amino ácidos contiguos son típicamente retenidos a la exposición de solventes desnaturizantes, mientras que los epítomos formados por doblado terciario típicamente se pierden al tratamiento con solventes desnaturizantes. Un epítopo incluye típicamente al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 amino ácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de epítomos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear en 2 dimensiones. Ver, p.e., *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

Anticuerpos representativos de la invención incluyen un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a un epítopo que incluye

X_1EDX_2 en una proteína amiloide agregada, que se une específicamente al epítipo que incluye X_1EDX_2 que también se une mediante, p.e., un anticuerpo 2A4, 7D8, o 8G9. Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo pueden ser identificados en un inmunoensayo simple que muestra la habilidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno objetivo, p.e., un ensayo de unión competitivo. La unión competitiva se determina en un ensayo en el cual la inmunoglobulina bajo prueba inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como A β . Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (RIA), inmunoensayo de enzima directo o indirecto de fase sólida (EIA), ensayo de competición en emparejado (ver Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); EIA biotina-avidina directa en fase sólida (ver Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); ensayo marcado directo en fase sólida, ensayo directo de emparejado en fase sólida (ver Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA directa de marcador en fase sólida usando marcador de I-125 (ver Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); EIA directa de biotina-avidina de fase sólida (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546 (1990)); y RIA directo marcado. (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Típicamente, tales ensayos involucran el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que portan cualquiera de estos, una inmunoglobulina de prueba no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o células en la presencia de la inmunoglobulina de prueba. Usualmente, la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Usualmente, cuando un anticuerpo en competencia está presente en exceso, este inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70% 70-75% o más.

Un epítopo es también reconocido por células inmunológicas, por ejemplo, células B y/o células T. El reconocimiento celular de un epítopo puede ser determinado por ensayos *in vitro* que miden la proliferación dependiente de antígeno, determinada por incorporación de H-timidina, mediante secreción de citoquina, por secreción de anticuerpo, o mediante eliminación dependiente de antígeno (ensayo de linfocito T citotóxico).

El término "neoepítopo" se refiere a un sitio nuevo y/o único en un antígeno al cual las células B y/o T responden.

El término "anticuerpos de neoepítopo" se refieren a anticuerpos que reconocen específicamente una nueva secuencia de amino ácido N- o C-terminal expuesta por clivado proteolítico de una molécula, pero no se une a tal epítopo en la molécula nativa (no clivada). El término "anticuerpos de neoepítopo" pueden referirse a anticuerpos que reconocen específicamente una nueva secuencia de amino ácido N- o C-terminal expuesta por clivado proteolítico de SAA, pero no se unen a tal epítopo en la molécula de SAA nativa (no clivada). Algunos anticuerpos de neoepítopo se unen a AA ya sea soluble o insoluble y producen disociación de agregados AA, incluyendo fibrilos AA. Un "anticuerpo de neoepítopo" también puede ser un anticuerpo que reconoce específicamente un epítopo nuevo que está disponible solamente para unirse a un anticuerpo después que una proteína se somete a cambio de conformación, por ejemplo, como en el caso de la amiloidosis AL y cadena ligera, cuando solamente la cadena ligera está expresada y forma amiloide.

El término respuesta "inmunológica" o "inmune" es el desarrollo de una respuesta humoral benéfica (mediada por anticuerpo) y/o una celular (mediada por células T específicas de antígeno o sus productos de secreción) dirigida contra un péptido amiloide en un paciente recipiente. Tal respuesta puede ser una respuesta activa inducida por la administración de inmunógeno, o una

respuesta pasiva inducida por la administración de anticuerpo o células T cebadas. Una respuesta inmune celular es producida por la presentación de epítopos de polipéptido en asociación con moléculas de MHC Clase I o Clase II para activa células colaboradoras $CD4^+$ T específicas de antígeno y/o células T $CD8^+$ citotóxicas. La respuesta también puede involucrar la activación de monocitos, macrófagos, células NK, basófilos, células dendríticas, astrocitos, células microglia, eosinófilos u otros componentes de inmunidad innata. La presencia de una respuesta inmunológica mediada por célula se puede terminar mediante ensayos de proliferación (células T $CD4^+$) o ensayos CTL (linfocito T citotóxico) (ver Burke, *supra*; Tigges, *supra*). Las contribuciones relativas de respuestas humores y celulares al efecto protector o terapéutico de un inmunógeno puede distinguirse por separado aislando anticuerpos y células T de un animal singénico inmunizado y midiendo el efecto protector o terapéutico en un segundo sujeto.

Un "agente inmunogénico" o "inmunógeno" es capaz de inducir una respuesta inmunológica contra el mismo a la administración a un mamífero, opcionalmente en conjunción con un adyuvante.

El término "polinucleótido desnudo" se refiere a un polinucleótido no complejo con materiales coloidales. Los polinucleótidos desnudos son algunas veces clonados en un vector plásmido.

El término "adyuvante" se refiere a un compuesto que cuando es administrado en conjunción con un antígeno, aumenta la respuesta inmune al antígeno, pero cuando es administrado solo no genera una respuesta inmune al antígeno. Los adyuvantes pueden aumentar una respuesta inmune mediante varios mecanismos incluyendo reclutamiento de linfocito, estimulación de células B y/o T, y estimulación de macrófagos.

El término "dosis efectiva" o "dosificación efectiva" se define como una cantidad suficiente para lograr o al menos lograr parcialmente el efecto deseado. El término "dosis terapéuticamente efectiva" se define como una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que sufre de la enfermedad. Las cantidades efectivas para este uso dependerán de la severidad de la infección y el estado general del propio sistema inmune del paciente.

El término "paciente" incluyen sujetos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico.

La invención provee anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a un epítipo que incluye X_1EDX_2 en una proteína amiloide agregada, y que compiten para unión al epítipo que comprende X_1EDX_2 con p.e., un anticuerpo 2A4, 7D8, o 8G9. La competencia entre anticuerpos se determina mediante un ensayo en el cual la inmunoglobulina a prueba inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como AA. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitivos, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (RIA), inmunoensayo de enzima directo o indirecto de fase sólida (EIA), ensayo de competición en emparedado (ver Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242-253 (1983)); EIA biotina-avidina directa en fase sólida (ver Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614-3619 (1986)); ensayo marcado directo en fase sólida, ensayo directo de emparedado en fase sólida (ver Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA directa de marcador en fase sólida usando marcador de I-125 (ver Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1):7-15 (1988)); EIA directa de biotina-avidina de fase sólida (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546-552 (1990)); y RIA directo marcado. (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82 (1990)). Típicamente, tales ensayos involucran el uso de antígeno purificado unido a

una superficie sólida o células que expresan el antígeno, una inmunoglobulina de prueba no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o células en la presencia de la inmunoglobulina de prueba. Usualmente, la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Los anticuerpos identificados por el ensayo de competición (anticuerpos en competencia) incluyen anticuerpos que se unen al mismo apítopo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítopo adyacente suficientemente próximo al epítopo unido por el anticuerpo de referencia para que ocurra hidrancia estérica. Usualmente, cuando un anticuerpo en competencia está presente en exceso, este inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos 50 a 75%.

Un anticuerpo que se une específicamente a una proteína amiloide significa un anticuerpo que se une a la proteína amiloide con una afinidad de al menos 10^7 M^{-1} . Algunos anticuerpos se unen a la proteína amiloide con afinidades entre 10^8 M^{-1} y 10^{11} M^{-1} .

Un anticuerpo que se une específicamente a proteína amiloide agregada tal como AA agregada sin unirse específicamente a proteína amiloide monomérica significa un anticuerpo que se une a proteína amiloide agregada, tal como, por ejemplo fibrilos (p.e., AA en forma de láminas β plegadas tal como de un cadáver de un paciente con Amiloidosis AA o un modelo de animal transgénico) descrito anteriormente, y que tiene al menos diez veces, y usualmente al menos 100 veces menos afinidad de unión específica para formas monoméricas de la proteína amiloide. Por ejemplo, tal anticuerpo podría unirse a AA soluble con una afinidad de 10^9 M^{-1} y a placas con una afinidad de menos de 10^7 M^{-1} . La afinidad de tales anticuerpos para placas es usualmente de menos de 10^7 o 10^6 M^{-1} . Tales anticuerpos son adicionalmente o alternativamente definidos por intensidad de fluorescencia con relación a un

anticuerpo de control irrelevante (p.e., un anticuerpo o mezcla de anticuerpos policlonales a un péptido AA reversómero) cuando los anticuerpos son contactados con fibrilos y se evalúa la unión mediante marcación fluorescente. La intensidad de fluorescencia de los anticuerpos que se unen a péptido AA soluble AA sin unión a placas está dentro de un factor de cinco, algunas veces dentro de un factor de dos, y algunas veces no se puede distinguir entre el error experimental y el del anticuerpo de control.

Las composiciones o métodos "que comprenden" uno o más elementos enumerados pueden incluir otros elementos no enumerados específicamente. Por ejemplo, una composición que comprende péptido AA abarca tanto un péptido AA aislado como un péptido AA como un componente de una secuencia de polipéptido mayor.

II. Enfermedades Amiloides

1. Generalidades y Patogénesis

Las enfermedades amiloides o amiloidosis incluyen un número de estados de enfermedad que tienen una amplia variedad de síntomas externos. Estos trastornos tienen en común la presencia de depósitos extracelulares anormales de fibrilos de proteína, conocidos como "depósitos amiloides" o "placas amiloides" que son usualmente de aproximadamente 10-100 μm de diámetro y están localizados en órganos específicos o regiones de tejido. Tales placas están compuestas principalmente de una proteína o péptido soluble que se encuentra naturalmente. Estos depósitos insolubles están compuestos de agregados generalmente laterales de fibrilos que son de aproximadamente 10-15 nm de diámetro. Los fibrilos amiloides producen una birrefringencia verde manzana característica en luz polarizada, cuando son teñidos con colorante Rojo Congo. Los trastornos están clasificados con base en los componentes

más importantes de fibrilo que forman los depósitos de placa discutidos a continuación.

Los péptidos o proteínas que forman los depósitos de placa son usualmente producidos de una proteína precursora mayor. Más específicamente, la patogénesis de los depósitos de fibrilo amiloides involucra generalmente clivado proteolítico de una proteína precursora "anormal" en fragmentos. Estos fragmentos generalmente se agregan en láminas plegadas β antiparalelas; sin embargo, se ha reportado que ciertas formas no degradadas de proteína precursora se agregan y forman fibrilos en la polineuropatía amiloide familiar (fibrilos de transtiretina variantes) y amiloidosis relacionada con diálisis (fibrilos de macroglobulina β_2) (Tan, *et al*, 1994, *supra*).

2. Síndromes Clínicos

Esta sección provee descripciones de los tipos más importantes de amiloideosis, incluyendo sus composiciones de fibrilo de placa. Es un descubrimiento general de la presente invención que las enfermedades amiloides pueden ser tratadas administrando agentes que sirven para estimular una respuesta inmune contra un componente o componentes de los diferentes depósitos amiloides específicos de la enfermedad. Como se discute en más detalla en la sección C siguiente, tales componentes son preferiblemente constituyentes de los fibrilos que forman las placas. Las siguientes secciones sirven para ejemplificar las formas más importantes de amiloidosis y no pretenden limitar la invención.

a. Amiloidosis AL

La deposición de amiloide AL está generalmente asociada con casi cualquier discrasia del linaje de linfocito B, que varía desde malignancia de

células de plasma (mieloma múltiple) a gammapatía monoclonal benigna. En momentos, la presencia de depósitos amiloides puede ser un indicador primario de la discrasia subyacente.

Los fibrilos de depósitos amiloides AL están compuestos de cadenas ligeras de inmunoglobulina monoclonales o fragmentos de las mismas. Más específicamente, los fragmentos son derivados de la región N-terminal de la cadena ligera (kappa o lambda) y contienen todo o parte del dominio variable (V_L) del mismo. Los depósitos se encuentran generalmente en los tejidos mesenquimáticos, causando neuropatía periférica y autonómica, síndrome del túnel carpiano, macroglosia, cardiomiopatía restrictiva, artropatía de articulaciones grandes, discrasias inmunes, mielomas, así como discrasias ocultas. Sin embargo, se debe notar que casi cualquier tejido puede estar involucrado, particularmente órganos viscerales tales como el corazón.

b. Amiloidosis Sistémicas Hereditarias

Existen muchas formas de amiloidosis sistémicas hereditarias. Aunque son condiciones relativamente raras, la aparición de síntomas en el adulto y sus patrones hereditarios (usualmente dominante autosomal) conduce a la persistencia de tales trastornos en la población general. Generalmente, los síndromes son atribuibles a mutaciones puntuales en la proteína precursora que conduce a la producción de péptidos o proteínas amiloidogénicas variantes. La Tabla 2 resume la composición de fibrilo de las formas ejemplares de estos trastornos.

Tabla 2
Amiloidosis Hereditarias^a

Proteína/péptido de fibrilo	Variante genética	Síndrome clínico
Transtiretina y fragmentos (ATTR)	Met30, muchos otros	Polineuropatía amiloide familiar (FAP), (principalmente nervios periféricos)
Transtiretina y fragmentos (ATTR)	Thr45, Ala60, Ser84, Met111, Ile122	Participación cardíaca predominante sin neuropatía
Fragmento N-terminal de Apolipoproteína A1 (apoA1)	Arg26	Polineuropatía amiloide familiar (FAP), (principalmente nervios periféricos)
Fragmento N-terminal de Apolipoproteína A1 (apoA1)	Arg26, Arg50, Arg60, otras	Tipo Ostertag, no neuropática (principalmente participación visceral)
Lisozima (Alys)	Thr56, His67	Tipo Ostertag, no neuropática (principalmente participación visceral)
Fragmento de cadena α de fibrógeno	Leu 554, Val 526	Tipo Ostertag, no neuropática (principalmente participación visceral)
Fragmento de gelsolina (age1)	Asn187, Tyr187	Neuropatía craneal con distrofia córnea en enrejado
Fragmento C de cistatina	Glu68	Hemorragia cerebral hereditaria (angiopatía amiloide cerebral) – tipo islandesa
Proteína β -amiloide ($A\beta$) derivada de Proteína Precursora Amiloide (APP)	Gln693	Hemorragia cerebral hereditaria (angiopatía amiloide cerebral) – tipo alemana
Proteína β -amiloide ($A\beta$) derivada de Proteína Precursora Amiloide (APP)	Ile717, Phe717, Gly717	Enfermedad de Alzheimer familiar

Proteína β -amiloide ($A\beta$) derivada de Proteína Precursora Amiloide (APP)	Asn670, Leu671	Demencia Familiar – enfermedad de Alzheimer probable
Proteína del prión (PrP) derivada de la proteína precursora de PrP inserción 51-91	Leu102, Val197, Asn178, Lys200	Enfermedad de Creutzfeldt- Jakob Familiar; síndrome de Gerstman-Str Äussler-Scheinker (encefalopatías espongiformes hereditarias, enfermedades del prion)
AA derivada de proteína A amiloide en suero (ApoSSA)		Fiebre Mediterránea Familiar, participación renal principal (recesivo autosomal)
AA derivada de proteína A amiloide en suero (ApoSSA)		Síndrome de Muckle-Well, nefropatía, sordera, urticaria, dolor de miembros
Desconocida		Cardiomiopatía con parálisis auricular persistente
Desconocida		Depósitos cutáneos (bullosos, papulares, postulo dérmicos)

^a Datos derivados de Tan & Pepys, 1994, *supra*.

Los datos proporcionados en la Tabla 2 son ejemplares y no pretenden limitar el alcance de la invención. Por ejemplo, se han descrito más de 40 mutaciones puntuales separadas en el gen transtiretina, todas las cuales dan lugar a formas clínicamente similares de polineuropatía amiloide familiar.

La transtiretina (TTR) es una proteína de 14 kilodalton que también es referida algunas veces como prealbúmina. Es producida por el hígado y el plexo coroideo, y funciona en el transporte de hormonas tiroideas y vitamina A. Al menos 50 formas variantes de la proteína, cada una caracterizada por un solo cambio de amino ácido, son responsables de varias formas de polineuropatía amiloide familiar. Por ejemplo, la sustitución de prolina por

leucina en la posición 55 produce una forma particularmente progresiva de neuropatía; la sustitución de metionina por leucina en la posición 111 produjo una cardiopatía severa en pacientes daneses. Los depósitos amiloides aislados de tejido cardíaco de pacientes con amiloidosis sistémica han revelado que los depósitos están compuestos de una mezcla heterogénea de TTR y fragmentos de la misma, colectivamente referidos como ATTR, cuyas secuencias de longitud total han sido caracterizadas. Los componentes de fibrilo ATTR pueden ser extraídos de tales placas y su estructura y secuencia determinada de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica (p.e., Gustavsson, A., *et al.*, *Laboratory Invest.* 73: 703-708, 1995; Kametani, F., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125: 622-628, 1984; Pras, M., *et al.*, *PNAS* 80: 539-42, 1983).

Las personas que tienen mutaciones puntuales en la molécula de apolipoproteína AI (p.e., Gly → Arg26; Trp → Arg50; Leu → Arg60) exhiben una forma de amiloidosis ("tipo Ostertag") caracterizada por depósitos de la proteína apolipoproteína AI o fragmentos de la misma (AApo AI). Estos pacientes tienen niveles bajos de lipoproteína de alta densidad (HDL) y presentan una neuropatía periférica o falla renal.

Una mutación en la cadena alfa de la enzima lisozima (p.e., Ile → Thr56 o Asp → His57) es la base de otra forma de amiloide ehreditario no neuropático tipo Ostertag reportado en familias inglesas. Aquí, los fibrilos de la proteína de lisozima mutante (Alys) están depositados, y los pacientes exhiben generalmente función renal deteriorada. Esta proteína, a diferencia de la mayoría de las proteínas que forman fibrilo aquí descritas, está usualmente presente en forma entera (no fragmentada) (Benson, M.D., *et al.* CIBA Fdn. Symp. 199: 104-131, 1996).

El péptido β -amiloide ($A\beta$) es un péptido de 39-43 amino ácidos derivado por proteólisis de una proteína grande conocida como proteína precursora beta amiloide (β APP). Las mutaciones en la β APP producen formas familiares de la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down y/o demencia senil, caracterizadas por la deposición cerebral de placas compuestas de fibrilos $A\beta$ y otros componentes, que se describen en más detalle a continuación. Las mutaciones conocidas en APP asociadas con la enfermedad de Alzheimer se encuentran próximas a los sitios de clivado de secretasa β o γ , o entre $A\beta$. Por ejemplo, la posición 717 está próxima al sitio de clivado de secretasa γ de APP en su procesamiento a $A\beta$, y las posiciones 670/671 están próximas al sitio de clivado de secretasa β . Las mutaciones en cualquiera de estos residuos pueden producir enfermedad de Alzheimer, presumiblemente causando un aumento en la cantidad del amino ácido 42/43 del $A\beta$ generado del APP. La estructura y secuencia de péptidos $A\beta$ de varias longitudes son bien conocidas en la técnica. Tales péptidos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica (p.e., Glenner y Wong, Biochem Biophys. Res. Comm. 129: 885-890, 1984; Glenner y Wong, Biochem Biophys. Res. Comm. 122: 1131-1135, 1984). Adicionalmente, varias formas de los péptidos están disponibles comercialmente.

La sinucleína es una proteína asociada con la sinapsis que se asemeja a una alipoproteína y es abundante en el citosol neuronal y en los terminales presinápticos. Un fragmento de péptido derivado de la α -sinucleína, llamado NAC, también es un componente de placas amiloides de la enfermedad de Alzheimer. (Clayton, et al., 1998). Este componente también sirve como un objetivo para tratamientos inmunológicamente basados de la presente invención, como se detalla más adelante.

La gelsolina es una proteína de unión a calcio que se une y fragmenta los filamentos de actina. Las mutaciones en la posición 187 (p.e., Asp $\rightarrow$ Asn;

Asp → Tyr) de la proteína producen una forma de amiloidosis sistémica hereditaria, usualmente encontrada en pacientes de Finlandia, así como personas de origen Aleman o Japonés. En individuos afectados, los fibrilos formados de los fragmentos de gelsolina (Agel), consiste usualmente de los amino ácidos 173-243 (fragmento carboxiterminal de 68 kDa) y se depositan en los vasos sanguíneos y las membranas basales, produciendo distrofia córnea y neuropatía craneal que progresa a neuropatía periférica, cambios distróficos de la piel y deposición en otros órganos. (Kangas, H., *et al.* Human Mol. Genet. 5(9): 1237-1243, 1996).

Otras proteínas mutadas, tales como la cadena alfa mutante de fibrinógeno (AfibA) y la cistatina C mutante (Acys) también forman fibrilos y producen trastornos hereditarios característicos. Los fibrilos de AfibA forman depósitos característicos de un amiloide hereditario no neuropático característico con enfermedad renal; los depósitos Acys son característicos de una angiopatía amiloide cerebral hereditaria reportada en Islandia. (Isselbacher, *et al.*, Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, San Francisco, 1995; Benson, *et al.*, *supra*). En al menos algunos casos, los pacientes con angiopatía amiloide cerebral (CAA) han mostrado tener fibrilos amiloides que contienen una forma no mutante de cistatina C en conjunción con beta proteína. (Nagai, A., *et al.* Molec. Chem. Neuropathol. 33: 63-78, 1998).

Ciertas formas de enfermedad del prión son ahora consideradas heritarias, que equivalen hasta el 15% de los casos, que se pensaba previamente que eran de naturaleza principalmente infecciosa. (Baldwin, *et al.*, *in Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders*, John Wiley y Sons, New York, 1995). En tales trastornos del prión, los pacientes desarrollan placas compuestas de isoformas anormales de la proteína del prión normal (PrP^C). Una isoforma mutante predominante, PrP^{Sc}, también referida

como AScr, difiere de la proteína celular normal en su resistencia a la degradación de proteasa, insolubilidad después de la extracción de detergente, deposición en lisosomas secundarios, síntesis post-transduccional, y alto contenido de placa plegada β . Se ha establecido el enlace genético para al menos cinco mutaciones que producen enfermedad de Creutzfeldt-Jacob disease (CJD), síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), e insomnio familiar fatal (FFI). (Baldwin) Los métodos para extraer péptidos de fibrilo de los fibrilos scrapie, determinando secuencias y haciendo tales péptidos son conocidos en la técnica. (p.e., Beekes, M., *et al.* J. Gen. Virol. 76: 2567-76, 1995).

Por ejemplo, una forma de GSS ha estado ligada a una mutación PrP en el codón 102, mientras que el GSS telencefálico se segrega con una mutación en el codón 117. Las mutaciones en los codones 198 y 217 producen una forma de GSS en la cual las placas neuríticas características de la enfermedad de Alzheimer contienen PrP en lugar de péptido A β . Ciertas formas de CJD familiar han sido asociadas con mutaciones en los codones 200 y 210; las mutaciones en los codones 129 y 178 se encuentran en CJD familiar y FFI. (Baldwin, *supra*).

c. Amiloidosis Sistémica Senil

La deposición amiloide, ya sea sistémica o focal, aumenta con la edad. Por ejemplo, los fibrilos de transtiretina tipo salvaje (TTR) se encuentran comúnmente en el tejido del corazón de individuos ancianos. Estos pueden ser asintomáticos, clínicamente silenciosos, o pueden producir falla cardíaca. Los depósitos focales fibrilares asintomáticos se pueden encontrar también en el cerebro (A β), cuerpo amiláceo de la próstata (microglobulina A β_2), articulaciones y vesículas seminales.

d. Amiloidosis Cerebral

La deposición local de amiloide es común en el cerebro, particularmente en individuos ancianos. El tipo más frecuente de amiloide en el cerebro está compuesto principalmente de fibrilos de péptido A β , que producen demencia o enfermedad de Alzheimer esporádica (no hereditaria). De hecho, la incidencia de enfermedad de Alzheimer esporádica excede en gran medida las formas que muestran ser hereditarias. Los péptidos de fibrilo que forman estas placas son muy similares a los descritos anteriormente, con referencia a las formas hereditarias de enfermedad de Alzheimer (AD).

e. Amiloidosis relacionada con Diálisis

Las placas compuestas de fibrilos de microglobulina β_2 (A β_2 M) se desarrollan comúnmente en pacientes que reciben hemodiálisis a largo plazo o diálisis peritoneal. La microglobulina β_2 es un polipéptido de 11.8 kilodalton y es la cadena ligera de los antígenos MCH Clase I, que están presentes en todas las células nucleadas. Bajo circunstancias normales, es separada continuamente de membranas celulares y es normalmente filtrada por el riñón. La falla en la depuración, tal como en el caso de la función renal deteriorada, conduce a la deposición en el riñón y otros sitios (principalmente tejidos de las articulaciones ricos en colágeno). A diferencia de otras proteínas de fibrilo, las moléculas de A β_2 M están generalmente presentes en forma no fragmentada en los fibrilos. (Benson, *supra*).

f. Amiloidosis derivada de Hormona

Los órganos endocrinos pueden albergar depósitos amiloides, particularmente en individuos ancianos. Los tumores que secretan hormona también pueden contener placas de amiloide derivadas de hormona, los fibrilos

que son preparados de hormonas de polipéptido tales como calcitonina (carcinoma medular de la tiroides), polipéptido amiloide del islote (amilina; que se encuentra en la mayoría de los pacientes con diabetes Tipo II), y péptido natriurético auricular (amiloidosis auricular aislada), las secuencias y estructuras de estas proteínas son bien conocidas en la técnica.

g. Amiloidosis Misceláneas

Existe una variedad de otras formas de enfermedad amiloide que se manifiestan normalmente como depósitos localizados de amiloide. En general, estas enfermedades son probablemente el resultado de la producción localizada y/o la falta de catabolismo de los precursores de fibrilo específicos o una predisposición de un tejido particular (tal como la articulación) para la deposición de fibrilo. Ejemplos de tal deposición idiopática incluye amiloide AL modular, amiloide cutáneo, amiloide endocrino, y amiloide relacionado con tumor.

III. Enfermedades Amiloides AA

La amiloidosis AA, inicialmente llamada amiloidosis secundaria o reactiva porque se desarrolla secundaria a una enfermedad preexistente o coexistente. Tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide, artritis juvenil crónica, espondilitis anquilosante, soriasis, artropatía soriática, síndrome de Reiter, Enfermedad de Still del Adulto, síndrome de Behcet, y enfermedad de Crohn. Los depósitos AA también son producidos como resultado de infecciones microbianas crónicas, tales como lepra, tuberculosis, bronquiectasis, úlceras por decúbito, pielonefritis crónica, osteomielitis, y enfermedad de Whipple. Ciertos neoplasmas malignos también pueden producir depósitos amiloides de fibrilo AA. Estos incluyen condiciones tales como linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas del

intestino, pulmón y tracto urogenital, carcinoma de célula basal, y leucemia de célula vellosa. La enfermedad amiloide AA también puede resultar de enfermedades inflamatorias hereditarias tal como Fiebre Mediterránea Familiar. Adicionalmente, la enfermedad amiloide AA puede resultar de trastornos linfoproliferativos tales como Enfermedad de Castleman.

1. Enfermedades Inflamatorias Asociadas con Amiloidosis AA

La artritis reumatoide es una enfermedad sistémica crónica principalmente de las articulaciones. Los síntomas de la artritis reumatoide están marcados por cambios inflamatorios en las membranas sinoviales y estructuras articulares (articulaciones) y por atrofia y rarefacción (la densidad del hueso disminuye) de los huesos. En estados tardíos de artritis reumatoide, se desarrolla deformidad y anquilosis (inmovilidad de la articulación). Un modelo de artritis reumatoide puede ser inducido en ratones o ratas administrando colágeno tipo II en adyuvante de Freund completo.

La artritis juvenil crónica viene en muchas formas; siendo la más común la artritis reumatoide juvenil. Puede ocurrir en niños a cualquier edad, pero aparece primero más comúnmente entre las edades de los 2 y 6 años. Hay 3 tipos principales de artritis reumatoide juvenil, a saber, artritis pauciarticular, artritis poliarticular, y artritis sistémica (también conocida como enfermedad de Still). La artritis pauciarticular afecta típicamente 4 o menos articulaciones, usualmente las más grandes tales como las rodillas. Puede estar acompañada por rigidez, causando cojera en el niño. La artritis poliarticular está caracterizada por afectar 5 o más articulaciones, más comúnmente las articulaciones más pequeñas de las manos y los pies. Los niños con artritis poliarticular usualmente tienen una forma más severa de la enfermedad. La artritis sistémica está caracterizada por inflamación de la articulación en combinación con fiebre y un salpullido rosado. Las articulaciones pueden no

empezar a inflamarse hasta algunos meses o años después que empiezan las fiebres. También puede afectar órganos internos tales como el hígado, corazón, bazo y ganglios linfáticos, y la anemia es común. Mientras que la artritis sistémica tiene a aplacarse a decisión propia, un pequeño porcentaje de estos niños pueden tener artritis severa que continua en la adultez.

La espondilitis anquilosante es una enfermedad reumática que causa artritis de la columna y articulaciones sacroilíacas y puede causar inflamación de los ojos, pulmones y válvulas cardíacas. Varía desde episodios intermitentes de dolor de espalda que ocurren durante la vida a una enfermedad crónica severa que ataca la columna, las articulaciones periféricas y otros órganos corporales, produciendo rigidez severa de articulaciones y espalda, pérdida de movimiento y deformidad a medida que progresa la vida.

La soriasis es una dermatosis escamosa, crónica común marcada por exacerbación y remisiones y que tiene un patrón hereditario poligénico. Los síntomas de la soriasis están marcados por la presencia de parches escamosos secos redondeados de diferentes tamaños, cubiertos por escamas blancas plateadas o blancas grisáceas que tienen una predilección por superficies extensoras, uñas, cuero cabelludo, genitales y la región lumbosacra.

La artropatía soriática es un trastorno en el cual la soriasis está enlazada con el desarrollo de la artritis. El trastorno puede ser exhibido en una variedad de formas. La artritis es generalmente leve e involucra solamente unas pocas articulaciones. En unos pocos pacientes, la enfermedad es severa y usualmente afecta los dedos y la columna. Cuando se afecta la columna, los síntomas son mucho más como los de la espondilitis anquilosante.

El syndrome de Reiter es un grupo de síntomas que consisten de artritis, uretritis (inflamación del tracto urogenital), conjuntivitis (inflamación del forro del ojo), y lesiones de la piel y membranas mucosas. El syndrome de Reiter es también referido como artritis reactiva, que significa que la artritis ocurre como una "reacción" a una infección que empezó en algún lugar en el cuerpo. La *chlamydia trachomatis* es la bacteria más usualmente asociada con el síndrome de Reiter adquirida por contacto sexual. Varias bacterias diferentes están asociadas con el síndrome de Reiter adquirido a través del tracto digestivo, incluyendo *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, y *Campylobacter*.

La enfermedad de Still del Adulto, también llamada Enfermedad de Still del Adulto es una condición inflamatoria rara que ataca órganos internos, articulaciones y otras partes del cuerpo. Puede aparecer y desaparecer repentinamente. En muchos casos severos, la enfermedad de Still del Adulto se vuelve crónica y extremadamente debilitante, causando dolor terrible y rigidez. Después de muchos años, la enfermedad inutiliza órganos vitales tales como el corazón y los pulmones.

El síndrome de Behcet es un trastorno de multisistema que se presenta con ulceraciones orales y/o genitales recurrentes, uveítis crónica con recaída que puede causar ceguera y deterioros neurológicos. Se caracteriza por 4 síntomas importantes: úlceras aftosas orales, lesiones de piel, síntomas oculares, y ulceraciones genitales, y ocasionalmente por inflamación en tejidos y órganos en todo el cuerpo, incluyendo el tracto gastrointestinal, sistema nervioso central, sistema vascular, pulmones, y riñones. La artritis del síndrome de Behcet es usualmente intermitente, auto limitada, no deformante y localizada en las rodillas y tobillos.

La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria granulomatosa crónica (cierpo o crecimiento del tipo grano pequeño) que involucra cualquier

parte del tracto gastrointestinal desde la boca al ano; pero involucra comúnmente el íleo (las tres quintas partes del intestino delgado) con cicatrización y engrosamiento de la pared intestinal. Los síntomas de la enfermedad de Crohn incluyen la presencia de diarrea crónica, sonidos intestinales aumentados, calambres, posiblemente evidenciados por pérdida de peso y aversión a la comida.

2. Enfermedades de Infección Microbiana Crónica Asociadas con Amiloidosis AA

La lepra es una enfermedad infecciosa caracterizada por úlceras de piel desfigurantes, daño de nervio periférico, y debilitamiento progresivo. La lepra es causada por el organismo *Mycobacterium leprae*, que no es muy contagioso y tiene un largo período de incubación. La lepra tiene dos formas comunes, tuberculoide y lepromatosa. Ambas formas producen úlceras en la piel, pero la forma lepromatosa es la más severa, produciendo grandes nodos desfigurantes (bultos y ronchas). La lepra eventualmente causa daño neurológico periférico. Los pacientes con lepra de largoplazo pueden perder el uso de sus manos o pies debido al daño repetido resultante de la falta de sensación.

La tuberculosis es una infección bacteriana contagiosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*. La enfermedad está caracterizada por el desarrollo de granulomas (tumores granulares) en los tejidos infectados. Los pulmones están principalmente involucrados, pero la infección puede diseminarse a otros órganos.

La bronquiectasis es una destrucción anormal y dilatación de las vías aéreas importantes. La bronquiectasis es usualmente causada por inflamación o infección recurrente de las vías aéreas. Una bacteria clásica que se ve en pacientes con bronquiectasis es *Pseudomonas aeruginosa*, que es

notoriamente difícil de erradicar. Las infecciones repetidas de las vías aéreas por esta bacteria pueden conducir a la colonización de los bronquios por este organismo, lo que predispone a tales personas a neumonías *Pseudomonal pneumonias*, lo que requiere de antibióticos especiales para tratamiento.

La úlcera por decúbito también conocida como úlcera por presión o llagas, es una ulceración de la piel y tejidos subyacentes causada por presión prolongada sobre el área afectada. Empiezan como piel enrojecida, pero empeoran progresivamente, formando una ampolla, luego una llaga abierta y finalmente un cráter. Estas ulceraciones ocurren usualmente sobre prominencias huesudas tales como como talones, área del coxis de las nalgas y parte posterior de la cabeza.

La pielonefritis crónica es una infección del riñón y los uréteres (ductos que llevan la orina desde el riñón). La pielonefritis ocurre más usualmente como resultado de una infección del tracto urinario, particularmente en la presencia de retroflujo de orina ocasional o persistente desde la vejiga en los uréteres o pelvis renal.

La osteomielitis es una infección ósea aguda o crónica causada usualmente por bacterias. Usualmente la infección inicia en otra parte del cuerpo y se disemina al hueso mediante la sangre. Cuando el hueso está infectado, se produce pus dentro del hueso, lo que puede producir un absceso. El absceso priva entonces al hueso de su suministro de sangre. La osteomielitis crónica resulta cuando el tejido óseo muere como resultado de la pérdida del suministro de sangre. La infección crónica puede persistir intermitentemente por años.

La enfermedad de Whipple es una condición rara que causa la absorción inadecuada de nutrientes desde el tracto intestinal debido a la infección del

intestino. Es causada por la bacteria *Tropheryma whippelii*. Los síntomas incluyen diarrea, sangrado intestinal, dolor abdominal, pérdida del apetito, pérdida de peso, fatiga, y debilidad. La artritis y la fiebre usualmente ocurren varios años antes de que se desarrollen los síntomas intestinales. Los pacientes pueden experimentar síntomas neurológicos también. El diagnóstico se basa en los síntomas y los resultados de una biopsia de un tejido del intestino Delgado u otros órganos que están afectados. Cuando se reconoce y se trata, la enfermedad de Whipple puede ser usualmente curada. Sin tratamiento, la condición es usualmente fatal.

3. Neoplasmas Malignos Asociados con Amiloidosis AA

El linfoma de Hodgkin es un cáncer del tejido linfático encontrado en los ganglios linfáticos, bazo, hígado, y médula espinal. El primer signo de este cancer es a menudo un glanglio linfático agrandado. La enfermedad se puede diseminar a glándulas linfáticas cercanas y luego se puede diseminar a los pulmones, hígado o médula espinal.

Un carcinoma renal es un cáncer de riñón. Las células cancerosas se encuentran en el recubrimiento de túbulos en el riñón. El primer síntoma es a menudo sangre en la orina. Algunas veces ambos riñones están involucrados. El cáncer se disemina fácilmente, más a menudo a los pulmones y otros órganos. El carcinoma de célula renal es el tipo más común de cáncer de riñón seguido por carcinoma de célula renal papilar, carcinoma de célula renal cromófoba y carcinoma renal de ducto de recolección. Aproximadamente el 5% del carcinoma renal no está clasificado debido a que su apariencia no encaja en ninguna de las otras categorías.

Los carcinomas del intestino incluyen cánceres gastrointestinales tales como colorrectal, pancreático, de estómago y esofágico. El cancer colorrectal

es cáncer que inicia en el intestino grueso al recto. Casi todos los cánceres colorrectales empiezan como pólipos benignos que, durante un período de muchos años, se desarrollan en cánceres. La mayoría de los casos de cáncer colorrectal no tienen síntomas. El cáncer pancreático es una malignancia del páncreas. Los síntomas incluyen dolor abdominal, pérdida de apetito, pérdida de peso significativa e ictericia indolora. El cáncer de estómago, también llamado cáncer gástrico, se puede desarrollar en cualquier parte del estómago y puede diseminarse en el estómago y a otros órganos; particularmente el esófago y el intestino delgado. También se puede diseminar, a través de la pared estomacal, a glándulas linfáticas cercanas y órganos tales como el hígado, páncreas, y los pulmones, o a órganos distantes tales como glándulas linfáticas por encima de la clavícula, el colon y los ovarios. El cáncer de estómago es a menudo asintomático. El cáncer esofágico es malignancia del esófago. Los síntomas incluyen disfagia (dificultad para tragar), dolor y pérdida de peso sustancial.

Los carcinomas del pulmón son un cáncer de los pulmones caracterizado por la presencia de tumores malignos. Hay dos tipos principales de cáncer pulmón: cáncer de pulmón de célula no pequeña y cáncer de pulmón de célula pequeña. Los síntomas dependen del tipo de cáncer específico, pero muchos pueden incluir tos crónica, expectorar con sangre, falta de aliento, silbidos, dolor de pecho, pérdida del apetito, pérdida de peso y fatiga.

Los carcinomas del tracto urogenital incluyen pero no se limitan a cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer endometrial, cáncer cervical y cáncer de ovario. El cáncer de próstata involucra un crecimiento de tumor maligno dentro de la glándula prostática. Los síntomas pueden incluir micción frecuente, dificultad para iniciar y mantener una corriente de orina estable, sangre en la orina, micción dolorosa, dificultad para lograr la eyeculación o eyeculación dolorosa. El cáncer de vejiga se refiere a cualquiera de varios tipos de

crecimientos malignos de la vejiga urinaria. Los síntomas incluyen sangre en la orina, micción frecuente, micción dolorosa, y urgencia urinaria. El cáncer endometrial involucra crecimiento canceroso del endometrio (recubrimiento del útero). Ocurre principalmente después de la menopausia, y se presenta con sangrado vaginal. El cáncer cervical es una malignancia de la cervix. Las etapas iniciales del cáncer cervical pueden ser completamente asintomáticas. El sangrado vaginal puede indicar la presencia de malignancia. En etapas avanzadas, la metástasis puede estar presente en el abdomen, pulmones o en alguna otra parte. El cáncer de ovario es un neoplasma maligno de los ovarios. Los síntomas del cáncer de ovario son a menudo vagos y no específicos, que incluyen incomodidad abdominal inferior vaga, sentido de pesadez pélvica, ciclo menstrual anormal, sangrado vaginal, ganancia o pérdida de peso, síntomas gastrointestinales no específicos. Cánceres de ovario, células de cáncer separadas que usualmente se implantan en el útero, vejiga, intestino y recubrimiento de la pared intestinal. Estas células de cáncer pueden empezar a formar nuevos crecimientos de tumor antes que el cáncer sea incluso sospechado.

El carcinoma de célula basal es un tumor de piel de crecimiento lento que involucra cambios cancerosos en las células de piel basales. Los síntomas incluyen lesiones de piel localizadas en la cara, oreja, cuello, pecho, espalda o cuero cabelludo; vasos sanguíneos visibles en la lesión o piel adyacente; y llagas persistentes que no sanan. Este cáncer usualmente permanece local y casi nunca se disemina a partes distantes del cuerpo, pero puede continuar creciendo e invadir tejidos y estructuras cercanas, incluyendo nervios, huesos y cerebro. La leucemia de célula vellosa es un cáncer de linfocitos (células B) que conduce a bajos conteos sanguíneos. La enfermedad es causada por células B de forma anormal con proyecciones similares a cabello. Los síntomas son usualmente vagos. Los bajos conteos sanguíneos causados por la

leucemia de célula vellosa pueden conducir a infecciones, fatiga, y sangrado excesivo.

4. Enfermedad Inflamatoria Heredada Asociada con AA

La Fiebre Mediterránea Familiar es un trastorno heredado causado por fiebre e inflamación recurrente, que a menudo involucra el abdomen o el pulmón. Los síntomas incluyen inflamación en el recubrimiento de la cavidad abdominal, cavidad torácica, piel, o articulaciones, junto con altas fiebres que tienen pico usualmente en 12 a 24 horas. Los ataques pueden variar en severidad de los síntomas, y las personas usualmente no tienen síntomas entre los ataques. Esta enfermedad es muy rara. Los factores de riesgo incluyen una historia familiar de Fiebre Mediterránea Familiar o que tienen ancestros Mediterráneos.

5. Trastornos linfoproliferativos Asociados con Amiloidosis AA

La enfermedad de Castleman es una forma de trastorno linfoproliferativo caracterizado por la presencia de hiperplasia de glándula linfática gigante con infiltración de célula en plasma. Los pacientes con enfermedad de Castleman comúnmente tienen fiebre, anemia, hipergammaglobulinemia, y un aumento de las concentraciones en suero de proteínas reactivas en fase aguda, todas las cuales están adscritas a la gran cantidad de IL-6 producida en los ganglios linfáticos.

IV. Amiloide A en suero

1. Amiloide A en Suero Humano

El Amiloide A en suero (SAA) es el precursor circulante de proteína A amiloide, el componente fibrilar de los depósitos amiloides. Los estudios estructurales mostraron que la SAA humana es heterogénea y representa una familia de genes SAA polimórficos y productos de proteína. La superfamilia del gen SAA comprende un grupo de genes íntimamente ligados localizados a 11p15.1. Ver Sellar, GC et al. *Genomics* 19: 221-227 (1994). Se han descrito los cuatro genes SAA en humanos. Las secuencias de amino ácido de proteínas representativas codificadas por los cuatro genes SAA se ilustran en la Figura 1. Dos genes (*SAA1* y *SAA2*) condifican la amiloide A en suero en fase aguda (A-SAA) y son inducidas de manera coordinada en respuesta a la inflamación. Los *SAA1* y *SAA2* comparten 95% de identidad de secuencia en regiones codificantes y no codificantes. Hay isoformas alfa, beta y gamma de *SAA1* e isoformas alfa y beta de *SAA2* humana ilustradas por las Figuras 18 y 19. El *SAA3* es un pseudogen. *SAA4* codifica SAA constitutiva y es mínimamente inducible. Ver Cunnane G. *Bailliere 's Clin. Rheumatol.* 13(4): 615-628. Todas las moléculas SAA/AA humanas contienen una secuencia de tetrapéptido de unión a calcio teórica, Gly-Pro-Gly-Gly, de posible importancia para la auto agregación y con mitades extrafibrilares de amiloide en la fibrillogénesis. Ver Fykse, E.M. et al. *Biochem. J.* 256:973-980 (1988) y Turnell et al. *Mol. Biol. Med.* 3:387-407 (1986). La porción N terminal de SAA/AA es fuertemente hidrofóbica, probablemente de importancia para la auto agregación y otros componentes de los depósitos amiloides. Ver Husby et al. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 70(1):2-9 (1994). La secuencia de cada isoforma de AA y su relación con sus isoformas SAA correspondientes se ilustra en las Figuras 2-5. Por ejemplo, la isoforma alfa de *SAA1* humana tiene la secuencia:

H₂N-Met-Lys-Leu-Leu-Thr-Gly-Leu-Val-Phe-Cys-Ser-Leu-Val-Leu-Gly-Val-Ser-Ser-Arg-Ser-Phe-Phe-Ser-Phe-Leu-Gly-Glu-Ala-Phe-Asp-Gly-Ala-Arg-Asp-Met-Try-Arg-Ala-Tyr-Ser-Asp-Met-Arg-Glu-Ala-Asn-Tyr-Ile-Gly-Ser-Asp-Lys-Tyr-Phe-His-Ala-Arg-Gly-Asn-Tyr-Asp-Ala-Ala-Lys-Arg-Gly-Pro-Gly-Gly-Ala-Try-Ala-

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

AA, que es el fragmento proteolítico de SAA, es también heterogéneo. El peptide AA humano predominante consiste de 76 amino ácidos. Un ejemplo de AA tiene la secuencia:

H₂N-Arg-Ser-Phe-Phe-Ser-Phe-Leu-Gly-Glu-Ala-Phe-Asp-Gly-Ala-Arg-Asp-Met-Try-Arg-Ala-Tyr-Ser-Asp-Met-Arg-Glu-Ala-Asn-Tyr-Ile-Gly-Ser-Asp-Lys-Tyr-Phe-His-Ala-Arg-Gly-Asn-Tyr-Asp-Ala-Ala-Lys-Arg-Gly-Pro-Gly-Gly-Ala-Try-Ala-Ala-Glu-Val-Ile-Ser-Asp-Ala-Arg-Glu-Asn-Ile-Gln-Arg-Phe-Phe-Gly-His-Gly-Ala-Glu-Asp-Ser-OH (SEQ ID NO:2).

AA70-76 se refiere a un fragmento AA que empieza en el residuo 70 y termina en el residuo 76 de la (SEQ ID NO:2) que consiste de la secuencia GHGAEDS, (SEQ ID NO: 4), o segmento correspondiente de otra proteína AA que se encuentra naturalmente de un humano u otra especie, cuando la secuencia de esa proteína está máximamente alineada con la SEQ ID NO:2.

2. Amiloide A en Suero Murino

En el ratón se han descrito cuatro genes SAA. Las secuencias de amino ácido representativas de las proteínas codificadas por los cuatro genes SAA murinos se ilustran en la Figura 8. La familia de gen SAA de ratón comprende cuatro miembros que están íntimamente relacionados en el cromosoma 7. Dos de estos genes que codifican los isotipos de SAA de ratón más importantes (SAA1 y SAA2) comparten alta identidad de secuencia no solamente en exones sino también en intrones y regiones de flaqueo y están inducidos en cantidades aproximadamente iguales en respuesta a los modelos de inducción

amiloide. Estos dos isotipos difieren en solamente 9 de 103 residuos de amino ácido; sin embargo, solamente SAA2 se deposita selectivamente en fibrilos amiloides. Ver de Beer M.C. *Biochem J.* 1991 280(Pt 1): 45-49 (1991); Hoffman J.S. et al. *J Exp Med.* 159:641-646 (1984); Shiroo M et al. *Scand J. Immunol.* 26:709-716 (1987). SAA3 es una apolipoproteína HDL menor y producida periféricamente en fase aguda. SAA4 es una subfamilia constitutiva que es una apolipoproteína HDL menor normal que comprende más de 90% de la SAA durante la homeóstasis. Ver Stearman R.S. et al. *Nucleic Acids Research*, 14(2)797-809 (1986) y de Beer M.C. *Genomics*, 34(1): 139-42 (1996).

La AA murina, que es un fragmento proteolítico de SAA también es heterogénea. La secuencia de cada isoforma murina de AA y su relación con su forma SAA correspondiente se ilustra en las Figuras 9-12. Una alineación de secuencia de AA1, AA2, AA3 y AA4 murina se ilustra en la Figura 13.

La AA1 es la murina equivalente a la AA1 humana. Ver Figura 16. En particular, los residuos 69-75 de AA1 murina (GRGHEDT, SEQ ID NO: 9) están máximamente alineados con los residuos 70-76 de AA1 humana (GHGAEDS, SEQ ID NO: 4). Ver también Figura 17.

3. Amiloide A en Suero de Shar Pei

La secuencia de Shar Pei está indicada en la Figura 20. De manera interesante, la region hom+ologa en la proteína SAA humana -AEDS, (SEQ ID NO: 13) contiene una sustitución Thr a Ser conservada en la posición 76, así como cadena lateral significativamente diferente del residuo en la posición 73 (His a Ala; Fig. 1). La secuencia AEDS, (SEQ ID NO: 13), también se observa en las especies de perro Shar Pei, una raza que es particularmente susceptible a amiloidosis AA y podría proveer un modelo que se encuentra naturalmente de

AA sistémica en el cual evaluar aplicaciones diagnósticas y terapéuticas novedosas de anticuerpos específicos de amiloide AA y otros compuestos.

4. El segmento N-Terminal de la Proteína AA determina su Propiedad Fibrillogénica

La proteína AA de fibrilo amiloide consiste de una parte N-terminal de longitud variable de la proteína AA precursora en suero. La evidencia muestra que la parte amiloidogénica de la molécula es el segmento N-terminal de 10-15 amino ácidos de longitud. Las sustituciones de amino ácido en esta parte de la molécula pueden explicar porqué solo una de las dos isoformas de SAA de ratón es amiloidogénica. Ver Westermarck G.T. *Biochem Biophys Res Commun.* 182(1):27-33 (1992).

V. Otras Proteínas Amiloidogénicas Humanas

Los números de Acceso al GenBank y las secuencias X₁EDX₂ se proporcionan en la Tabla 3 para varias proteínas amiloidogénicas humanas, incluyendo algunas de las listadas anteriormente en la Tabla 2.

Tabla 3
Proteínas Amiloidogénicas Humanas

Proteína Amiloidogénica Humana	Secuencia de Concenso	Número de Acceso al GenBank
SAA1	AEDS, (SEQ ID NO: 13)	
SAA2	AEDS, (SEQ ID NO: 13)	
SAA3	AEDS, (SEQ ID NO: 13)	
SAA4	AEDS, (SEQ ID NO: 13)	
Región V de cadena ligera kappa de inmunoglobulina anti-Sm	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAB26897

región variable de inmunoglobulina usada por la cadena ligera kappa de ITC52 (subgrupo V kappa III	PEDS, (SEQ ID NO: 26)	AAC61608
región variable de inmunoglobulina usada por la cadena ligera kappa de ITC48 (subgrupo V kappa IV	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAC61606
precursor de cadena ligera kappa T125 monoclonal anti-RhD	SEDF, (SEQ ID NO: 24)	AAW82027
precursor de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	CAA45496
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAT44350
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAT44349
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAT44348
cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	CAA09185
cadena ligera kappa de inmunoglobulina	SEDF, (SEQ ID NO: 24)	CAA09181
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	SEDF, (SEQ ID NO: 24)	AAU14891
cadena ligera kappa de inmunoglobulina anti-rabia SOJA	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAO17825
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina anti-estreptocócica/anti-miosina	SEDF, (SEQ ID NO: 24)	AAB68786
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina anti-estreptocócica/anti-miosina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAB68785
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina anti-HLA-A2/anti-HLA-A28	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAC99644
región V de cadena ligera kappa de inmunoglobulina; anticuerpo 18/2 anti-ADN	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAB62946
cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAF75949
cadena ligera kappa 48d de inmunoglobulina gp120 anti-HIV-1	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAR88370

cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDL, (SEQ ID NO: 27)	BAA97671
cadena ligera kappa de inmunoglobulina histolítica anti-Entamoeba	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAA82105
cadena ligera kappa de inmunoglobulina histolítica anti-Entamoeba	TEDV, (SEQ ID NO: 28)	BAA82102
cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAC41705
región variable de cadena ligera kappa monoclonal de IgM gangliósido anti-GM2	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAC26480
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina anti-SARS-CoV	PEDV, (SEQ ID NO: 151)	AAT51719
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina anti-SARS-CoV	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	ATT51718
región VLJ de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAD27502
región VLJ de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	SEDF, (SEQ ID NO: 24)	BAD27497
cadena ligera kappa 47e de inmunoglobulina gp120 anti-VIH-1	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAR88378
cadena ligera kappa 16c de inmunoglobulina gp120 anti-VIH-1	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAR88374
cadena ligera kappa 411g de inmunoglobulina gp120 anti-VIH-1	SEDF, (SEQ ID NO: 24)	AAR88372
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAF14212
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAF14211
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAF14210
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAF14209
cadena ligera kappa de región V de inmunoglobulina	PEDI, (SEQ ID NO: 21)	AAR02415
cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAM46647
cadena ligera kappa de inmunoglobulina	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAM46643
cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAA82103

histolítica anti-Entamoeba		
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAL65723
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65718
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	SEDF, (SEQ ID NO: 24)	AAL65717
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	SEDF, (SEQ ID NO: 24)	AAL65716
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65714
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65713
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65712
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65711
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65710
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	LEDG, (SEQ ID NO: 31) PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65709
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	LEDG, (SEQ ID NO: 31) PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65708
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65707
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65706
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65705
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65704
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65703
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	SEDF, (SEQ ID NO: 24)	AAC64146

región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	SEDF, (SEQ ID NO: 24)	AAC64144
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	ABI64139
Cadena ligera kappa de inmunoglobulina de polisacárido capsular anti-neumocócico	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAL04535
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAL65722
región variable kappa de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAL65720
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAA19563
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	BAA19562
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	BAA19561
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAA19560
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAA19559
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	BAA19558
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDI, (SEQ ID NO: 21)	BAA19556
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAA71907
región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAA71905
región variable de cadena ligera Fab G1 de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAF48998
región variable de cadena ligera Fab G1 de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAF48996
región V de cadena ligera kappa	AEDM, (SEQ ID NO: 32)	CAA37675
región variable de cadena ligera Fab G1 de inmunoglobulina	SEDF, (SEQ ID NO: 24)	BAF48994

región variable de cadena ligera Fab G1 de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAF48992
región V-J-C precursora de cadena kappa de Ig	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	A53261
región V precursora de cadena kappa de Ig	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	A49137
región V-I precursora de cadena kappa de Ig	SEDI, (SEQ ID NO: 29)	PN0445
región V-III precursora de cadena kappa de Ig (EVI-15)	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	A32274
región V-IV (Dep) de cadena kappa de Ig	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	A34153
región V-IV (Fue) de cadena kappa de Ig	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	B34153
región V-II (Pec) de cadena kappa de Ig	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	C34153
Cadena L, Fragmento Fab de Igg (unión a Cd-25)	AEDA, (SEQ ID NO: 62)	1MIM_L
Cadena H, Fragmento Fab de Igg (unión a Cd-25)	HEDS, (SEQ ID NO: 33)	1 MIM_H
región C de cadena mu de Ig, forma empalmada secretada	CEDD, (SEQ ID NO: 34)	MHHU
región VJ de cadena kappa de inmunoglobulina	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAA58923
región variable de cadena ligera kappa de IgM 12 de anticuerpo monoclonal recombinante	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	ABA41551
cadena ligera de inmunoglobulina	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	CAA65054
región variable lambda de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	AAL65769
región variable lambda de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	AAL65767
región variable lambda de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	AAL65765
región variable lambda de cadena ligera de inmunoglobulina	TEDE, (SEQ ID NO: 16)	AAL65764
región variable lambda de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	AAL65763
región variable lambda de cadena ligera de inmunoglobulina	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	AAL65762

región variable lambda de cadena ligera de inmunoglobulina	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	AAL65761
región variable lambda de cadena ligera de inmunoglobulina	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	AAL65760
región variable lambda de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	AAL65759
región variable lambda de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	AAL65758
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAA19563
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	BAA19562
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	BAA19561
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAA19560
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAA19559
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	BAA19558
región V-J de cadena ligera de inmunoglobulina	PEDI, (SEQ ID NO: 21)	BAA19556
región variable de cadena ligera de inmunoglobulina 30 lambda	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	AAK95335
PREDICHO: similar al precursor del receptor II-a de región gamma Fc de inmunoglobulina de baja afinidad (Fc-RII-a gamma) (FcRII-a) (receptor II-a de Fc IgG) (Fc-gamma-RIIa) (antígeno CD32) (CDw32)	QEDS, (SEQ ID NO: 35)	XP_001129584
Fragmento Fc de IgG, Ia de alta afinidad, receptor (CD64)	REDS, (SEQ ID NO: 36) TEDG, (SEQ ID NO: 37) QEDR, (SEQ ID NO: 38)	NP_000557
Fragmento Fc de IgG, IIb de baja afinidad, receptor para la isoforma 2 (CD32)	QEDS, (SEQ ID NO: 35)	NP_001002273 XP_9493944
Fragmento Fc de IgG, IIb de baja afinidad,	QEDS, (SEQ ID NO: 35)	NP_003992

receptor para la isoforma 1 (CD32)		
Fragmento Fc de IgG, IIb de baja afinidad, receptor para la isoforma 4 (CD32)	QEDS, (SEQ ID NO: 35)	NP_001002275
Fragmento Fc de IgG, IIb de baja afinidad, receptor para la isoforma 3 (CD32)	QEDS, (SEQ ID NO: 35)	NP_001002274 XP_001129592
Fragmento Fc de IgG, Ib de alta afinidad, receptor isoforma a (CD64)	QEDR, (SEQ ID NO: 38)	NP_001017986
Fragmento Fc de IgG, Ib de alta afinidad, receptor isoforma b (CD64)	QEDR, (SEQ ID NO: 38)	NP_0010004340 XP_496386
Fragmento Fc de IgG, IIa de baja afinidad, receptor (CD32)	QEDS, (SEQ ID NO: 35)	NP_067674 XP_943942
Precursor del receptor III-B de la región gamma Fc de inmunoglobulina de baja afinidad	TEDL, (SEQ ID NO: 39) PEDN, (SEQ ID NO: 40) EEDP, (SEQ ID NO: 41)	NP_000561
Fragmento Fc de IgG, IIIa de baja afinidad, receptor para (CD16)	TEDL, (SEQ ID NO: 39) PEDN, (SEQ ID NO: 40) EEDP, (SEQ ID NO: 41)	NP_000560 XP_001133750
precursor del receptor II-a de región gamma Fc de inmunoglobulina de baja afinidad (Fc-RII-a gamma) (FcRII-a) (receptor II-a de Fc IgG) (Fc-gamma-RIIa) (antígeno CD32) (CDw32)	QEDS, (SEQ ID NO: 35)	P12318
precursor del receptor III-B de región gamma Fc de inmunoglobulina de baja afinidad (receptor III-1 de Fc de IgG) (Fc-gamma-RIII-beta) (Fc-gamma RIIIb) (FcRIIIb) (RIII Fc-gamma) (FcRIII) (FcR-10) (antígeno CD16b)	TEDL, (SEQ ID NO: 39) PEDN, (SEQ ID NO: 40) EEDP, (SEQ ID NO: 41)	O75015
precursor del receptor III-A de región gamma Fc de inmunoglobulina de baja afinidad (receptor III-2 de Fc de IgG) (Fc-gamma-RIII-alfa) (Fc-gamma RIIIa) (FcRIIIa) (RIIIa Fc-gamma) (FcRIII) (FcR-10) (antígeno CD16a)	TEDL, (SEQ ID NO: 39) PEDN, (SEQ ID NO: 40) EEDP, (SEQ ID NO: 41)	P08637
precursor del receptor I de gamma Fc de inmunoglobulina de alta afinidad (Fc-gamma RI) (Fc-RI) (FcRI) (Receptor I de Fc IgG)	REDS, (SEQ ID NO: 36) TEDG, (SEQ ID NO: 37) QEDR, (SEQ ID NO: 38)	P12314

(antígeno CD64)		
gamma 1 constante pesada de inmunoglobulina IGHG1 (marcador G1m)	AEDT, (SEQ ID NO: 14)	Q6PJA4
ApoA1 [Homo sapiens]	LEDL, (SEQ ID NO: 42)	CAA01253
precursor de apolipoproteína C-III [Homo sapiens]	AEDA, (SEQ ID NO: 62)	NP_000031
precursor de apolipoproteína A-IV [Homo sapiens]	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	NP_000473
gelsolina (amiloidosis, tipo Finlandés) [Homo sapiens]	TEDT, (SEQ ID NO: 30) KEDA, (SEQ ID NO: 43) SEDC, (SEQ ID NO: 44) QELD, (SEQ ID NO: 63)	CAM20459
gelsolina (amiloidosis, tipo Finlandés) [Homo sapiens]	TEDT, (SEQ ID NO: 30) KEDA, (SEQ ID NO: 43) SEDC, (SEQ ID NO: 44) QELD, (SEQ ID NO: 63)	CAII4413
gelsolina (amiloidosis, tipo Finlandés) isoforma CRA_c [Homo sapiens]	TEDT, (SEQ ID NO: 30) KEDA, (SEQ ID NO: 43) SEDC, (SEQ ID NO: 44) QELD, (SEQ ID NO: 63)	EAW87491
gelsolina (amiloidosis, tipo Finlandés) isoforma CRA_b [Homo sapiens]	TEDT, (SEQ ID NO: 30) KEDA, (SEQ ID NO: 43) SEDC, (SEQ ID NO: 44) QELD, (SEQ ID NO: 63)	EAW87490
gelsolina (amiloidosis, tipo Finlandés) isoforma CRA_a [Homo sapiens]	TEDT, (SEQ ID NO: 30) KEDA, (SEQ ID NO: 43) SEDC, (SEQ ID NO: 44) QELD, (SEQ ID NO: 63)	EAW87489
Proteína precursora amiloide; APP [Homo sapiens]	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAB23646
Proteína precursora amiloide; APP [Homo sapiens]	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAB19991
Péptido amiloide	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAA51768
Precursor de proteína A4 amiloide beta (APP)	EEDD, (SEQ ID NO: 45) SEDK, (SEQ ID NO: 46)	P05067

(ABPP) (proteína amiloide de enfermedad de Alzheimer) (péptido amiloide cerebral vascular) (CVAP) (proteasa nexina-II) (PN-II) (APPI) (PreA4) [Contiene: APP-alfa soluble (S-APP-alfa); APP-beta soluble (S-APP-beta); C99; proteína 42 beta-amiloide (Beta-APP42); proteína 40 beta-amiloide (Beta-APP40); C83; P3(42); P3(40); Gamma-CTF(59) (fragmento 59 C-terminal gamma-secretasa) (dominio 59 intracelular amiloide) (AICD-59); Gamma-CTF(57) (fragmento 57 C-terminal gamma-secretasa) (dominio 57 intracelular amiloide) (AID(57)) (AICD-57); Gamma-CTF(50) (fragmento 50 C-terminal gamma-secretasa) (dominio 50 intracelular amiloide) (AID(50)) (AICD-50); C31]	DEDD, (SEQ ID NO: 47) DEDG, (SEQ ID NO: 48) AEDV, (SEQ ID NO: 23)	
proteína APP [Homo sapiens]	EEDD, (SEQ ID NO: 45) SEDK, (SEQ ID NO: 46) DEDD, (SEQ ID NO: 47) DEDG, (SEQ ID NO: 48)	AAH65523
proteína APP [Homo sapiens]	EEDD, (SEQ ID NO: 45) SEDK, (SEQ ID NO: 46) DEDD, (SEQ ID NO: 47) DEDG, (SEQ ID NO: 48)	AAH04369
proteína precursora (A4) amiloide beta (proteasa nexina-II, enfermedad de Alzheimer) [Homo sapiens]	EEDD, (SEQ ID NO: 45) SEDK, (SEQ ID NO: 46) DEDD, (SEQ ID NO: 47) DEDG, (SEQ ID NO: 48) AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAW82435
calcitonina	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	AAA58403
precursor de calcitonina	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	AAA35501
preprocalcitonina [Homo sapiens]	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	CAA25103
preprocalcitonina	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	AAA51913
precursor de calcitonina [contiene:	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	P01258

calcitonina; katacalcina (péptido carboxil-terminal de calcitonina)		
preproteína isoforma CALCA de calcitonina [homo sapiens]	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	NP_001029124
preproteína isoforma CALCA de calcitonina [homo sapiens]	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	NP_001732
preproteína isoforma CGRP de calcitonina [homo sapiens]	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	NP_001029125
precursor de péptido 1 relacionado con el gen de calcitonina (péptido 1 relacionado con gen de calcitonina) (CGRP-1) (CGRP- tipo alfa)	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	P06881
factor natriurético auricular	LEDE, (SEQ ID NO: 49)	AAA35528
propéptido del factor natriurético auricular [Homo sapiens]	LEDE, (SEQ ID NO: 49)	CAA25700
factor natriurético auricular	LEDE, (SEQ ID NO: 49)	1101403A
precursor del factor natriurético auricular (ANF) (péptido natriurético auricular) (ANP) (Prepronatriodilatina) (CCD-ANF) [contiene: péptido relacionado con cardiodilatina (CDP)]	LEDE, (SEQ ID NO: 49)	P01160
Péptido natriurético auricular	LEDE, (SEQ ID NO: 49)	AAA35529
Queratina [Homo sapiens]	GEDA, (SEQ ID NO: 50)	AAB30058
Queratina [Homo sapiens]	VEDF, (SEQ ID NO: 51) YEDE, (SEQ ID NO: 52)	CAA31695
Queratina	IEDL, (SEQ ID NO: 53) GEDA, (SEQ ID NO: 50)	ABB59562
Queratina, tipo II citoesquelética (Citoqueratina-C6) (CK 6C) (K6c queratina) (Citoqueratina-6E) (CK 6E) (Queratina k6h)	VEDL, (SEQ ID NO: 64) YEDE, (SEQ ID NO: 52) LEDA, (SEQ ID NO: 65)	P48668
Fibrinógeno [homo sapiens]	WEDY, (SEQ ID NO: 54)	CAA50740
precursor de subunidad alfa de fibrinógeno [Homo sapiens]	DEDW, (SEQ ID NO: 55) SEDL, (SEQ ID NO: 56) YEDQ, (SEQ ID NO: 57) SEDG, (SEQ ID NO: 66) LEDW, (SEQ ID NO: 58)	AAC97142

cadena alfa de fibrinógeno [Homo sapiens]	DEDW, (SEQ ID NO: 55) SEDL, (SEQ ID NO: 56) YEDQ, (SEQ ID NO: 57) SEDG, (SEQ ID NO: 66)	AAI01936
cadena alfa de fibrinógeno [Homo sapiens]	DEDW, (SEQ ID NO: 55) SEDL, (SEQ ID NO: 56) YEDQ, (SEQ ID NO: 57) SEDG, (SEQ ID NO: 66)	AAH98280
cadena alfa de fibrinógeno, isoforma CRA_b [Homo sapiens]	DEDW, (SEQ ID NO: 55) SEDL, (SEQ ID NO: 56) YEQD, (SEQ ID NO: 57) SEDG, (SEQ ID NO: 66) LEDW, (SEQ ID NO: 58)	EAX04926
cadena alfa de fibrinógeno, isoforma CRA_c [Homo sapiens]	DEDW, (SEQ ID NO: 55) SEDL, (SEQ ID NO: 56) YEDQ, (SEQ ID NO: 57) SEDG, (SEQ ID NO: 66)	EAX04928
cadena alfa de fibrinógeno, isoforma CRA_a [Homo sapiens]	DEDW, (SEQ ID NO: 55) SEDL, (SEQ ID NO: 56)	EAX04924
precursor de proteína del prión, PRNP [Homo sapiens]	YERD, (SEQ ID NO: 59)	AAC62750
precursor de proteína del prión importante (PrP) (PrP27-30) (PrP33-35C) (antígeno CD320)	YERD, (SEQ ID NO: 59)	P04156
preproteína de proteína del prión [Homo sapiens]	YERD, (SEQ ID NO: 59)	NP_000302
Prolactina [Homo sapiens]	PEDK, (SEQ ID NO: 60)	CAA38264
Prolactina [Homo sapiens]	PEDK, (SEQ ID NO: 60)	AAH88370

VI. Péptidos Amiloides para Inmunización Activa

Los agentes terapéuticos para uso en los métodos de la invención son péptidos inmunogénicos, tales como péptidos AA y péptidos AL, que a la administración a un paciente generan anticuerpos que se unen

específicamente a uno o más epítomos que comprenden X_1EDX_2 , tales como, por ejemplo, epítomos entre los residuos 70-76 de AA ("agentes AA"). Ejemplos adicionales de agentes incluyen péptidos inmunogénicos que comprenden un fragmento que consiste de X_1EDX_2 derivado de otras proteínas amiloides ("fragmentos de X_1EDX_2 "), tales como fragmentos VK de AL que consisten de la secuencia de amino ácido PEDI, (SEQ ID NO: 21), PEDF, (SEQ ID NO: 22), AEDV, (SEQ ID NO: 23), SEDF, (SEQ ID NO: 24), o SEDA, (SEQ ID NO: 25), y fragmentos V λ de AL que consisten de la secuencia de amino amino ácido SEDE, (SEQ ID NO: 18), AEDE, (SEQ ID NO: 19), TEDE, (SEQ ID NO: 16) o PEDE, (SEQ ID NO: 20). También se puede usar un fragmento V λ de AL que consiste de la secuencia de amino ácido FEDD, (SEQ ID NO: 17). Algunas proteínas amiloides adecuadas incluyen proteína A amiloide en suero, proteína de cadena ligera de inmunoglobulina, polipéptido precursor de amiloide de islote humano (IAPP), péptido beta amiloide, transtiretina (TTR), ApoA1 y otras proteínas amiloides listadas en la Tabla 1 y que comprenden la secuencia X_1EDX_2 . En algunos agentes X_1 es H, T, F, S, P, A o cualquier otro residuo de amino ácido que precede inmediatamente ED en una proteína amiloide; y X_2 es T, S, E, R, I, V, F, D, A o cualquier otro residuo de amino ácido inmediatamente después de ED en tal proteína amiloide. En algunos agentes, X_1 es H, T, F, S, P, o A y X_2 es T, S, E, D, R, I, V, F o A. En algunos de tales agentes, cuando X_1 es H, X_2 es T o A; cuando X_1 es A, X_2 es S, T, E o V; cuando X_1 es T, X_2 es E; cuando X_1 es F, X_2 es D; cuando X_1 es S, X_2 es E, F o A; y cuando X_1 es P, X_2 es E, I o F. En algunos agentes, X_1 es H, T, F, S, P, o A y X_2 es T, S, E, D, R, I, V, F o A, con la condición que si X_1 es A, X_2 no es V. En algunos agentes, cuando X_1 es A, X_2 es S, T o E.

Algunos agentes comprenden la secuencia de amino ácido GHEDT, (SEQ ID NO: 3), HEDT, (SEQ ID NO: 12), AEDS, (SEQ ID NO: 13), AEDT, (SEQ ID NO: 14), HEDA, (SEQ ID NO: 15), TEDE, (SEQ ID NO: 16), FEDD, (SEQ ID NO: 17), SEDE, (SEQ ID NO: 18), AEDE, (SEQ ID NO: 19), PEDE,

(SEQ ID NO: 20), PEDI, (SEQ ID NO: 21), PEDF, (SEQ ID NO: 22), AEDV, (SEQ ID NO: 23), SEDF, (SEQ ID NO: 24) o SEDA, (SEQ ID NO: 25). Algunos agentes consisten de una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de GHEDT, (SEQ ID NO: 3, HEDT, (SEQ ID NO: 12), AEDS, (SEQ ID NO: 13), AEDT, (SEQ ID NO: 14), HEDA, (SEQ ID NO: 15), TEDE, (SEQ ID NO: 16), FEDD, (SEQ ID NO: 17), SEDE, (SEQ ID NO: 18), AEDE, (SEQ ID NO: 19), PEDE, (SEQ ID NO: 20), PEDI, (SEQ ID NO: 21), PEDF, (SEQ ID NO: 22), AEDV, (SEQ ID NO: 23), SEDF, (SEQ ID NO: 24), o SEDA, (SEQ ID NO: 25), unisa a un vehículo para formar un conjugado. Algunos agentes comprenden la secuencia de amino ácido GHEDT, (SEQ ID NO: 3, HEDT, (SEQ ID NO: 12), AEDS, (SEQ ID NO: 13), AEDT, (SEQ ID NO: 14), HEDA, (SEQ ID NO: 15), TEDE, (SEQ ID NO: 16), FEDD, (SEQ ID NO: 17), SEDE, (SEQ ID NO: 18), AEDE, (SEQ ID NO: 19), PEDE, (SEQ ID NO: 20), PEDI, (SEQ ID NO: 21), PEDF, (SEQ ID NO: 22), AEDV, (SEQ ID NO: 23), SEDF, (SEQ ID NO: 24), o SEDA, (SEQ ID NO: 25). Algunos agentes consisten de una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de GHEDT, (SEQ ID NO: 3, HEDT, (SEQ ID NO: 12), AEDS, (SEQ ID NO: 13), AEDT, (SEQ ID NO: 14), HEDA, (SEQ ID NO: 15), TEDE, (SEQ ID NO: 16), FEDD, (SEQ ID NO: 17), SEDE, (SEQ ID NO: 18), AEDE, (SEQ ID NO: 19), PEDE, (SEQ ID NO: 20), PEDI, (SEQ ID NO: 21), PEDF, (SEQ ID NO: 22), AEDV, (SEQ ID NO: 23), SEDF, (SEQ ID NO: 24) y SEDA, (SEQ ID NO: 25), unida a un vehículo para formar un conjugado. Algunos agentes comprenden una secuencia de amino ácido sequence seleccionada del grupo que consiste de GHEDT, (SEQ ID NO: 3, HEDT, (SEQ ID NO: 12), AEDS, (SEQ ID NO: 13), AEDT, (SEQ ID NO: 14), HEDA, (SEQ ID NO: 15) y TEDE, (SEQ ID NO: 16).

Los fragmentos AA preferidos son los residuos 70-76 isoforma alfa AA1 humana (HAA1) (GHGAEDS, SEQ ID NO:4), residuos 70-76 (GHDAEDS, SEQ ID NO:5) isoforma beta HAA1, residuos 70-76 (GHDAEDS, SEQ ID NO: 5) de la isoforma gamma HAA1, residuos 70-76 (GHGAEDS, SEQ ID NO: 4) de las

isoformas alfa y beta de HAA2, residuos 70-76 (GDHAEDS, SEQ ID NO:7) de HAA3, residuos 78-84 (STVIEDS, SEQ ID NO:8) de HAA4, residuos 69-75 (GRGHEDT, SEQ ID NO:9) de AA1 de ratón (MAA1), residuos 69-75 (GRGHEDT, SEQ ID NO: 9) de MAA2, residuos 62-68 (GHGAEDS, SEQ ID NO: 10) de MAA3, y residuos 76-82 (NHGLETL, SEQ ID NO: 11) de MAA4 o subfragmentos de al menos tres amino ácidos contiguos de estos. Algunos fragmentos AA no contienen residuos de un péptido de amiloidosis AA diferente del segmento designado anteriormente. Otros fragmentos AA contienen residuos flanqueantes adicionales de un péptido de amiloidosis AA pero no contienen más de 20 o preferiblemente, no más de 10 residuos contiguos en total de un péptido de amiloidosis AA. Fragmentos de X_1EDX_2 y AL preferidos adicionales incluyen GHEDT, (SEQ ID NO: 3), HEDT, (SEQ ID NO: 12), AEDS, (SEQ ID NO: 13), AEDT, (SEQ ID NO: 14), HEDA, (SEQ ID NO: 15), y TEDE, (SEQ ID NO: 16).

Los agentes terapéuticos para uso en los métodos de la invención también incluyen péptidos AA inmunogénicos que a la administración a un paciente generan anticuerpos que se unen específicamente a epítomos N-terminales de AA. Los agentes preferidos inducen una respuesta inmunogénica dirigida a un epítomo entre los residuos 1-15 de AA humana.

Preferiblemente, el fragmento de AA o AL u otros agentes, tales como fragmentos X_1EDX_2 , administrados carecen de un epítomo que generaría una respuesta de célula T al fragmento. Generalmente, los epítomos de célula T son mayores a 10 amino ácidos contiguos. Por lo tanto, los fragmentos preferidos de proteínas amiloides, tales como fragmentos de AA o X_1EDX_2 son de tamaño de 4-10 o preferiblemente 7-10 amino ácidos contiguos; p.e., suficiente longitud para generar una respuesta de anticuerpo sin generar una respuesta de célula T. La ausencia de epítomos de célula T es preferida porque estos epítomos no son necesarios para actividad inmunogénica de los fragmentos, y pueden

causar una respuesta inflamatoria indeseada en un subconjunto de pacientes (Anderson et al, (2002) *J. Immunol.* 168, 3697-3701; Senior (2002) *Lancet Neurol.* 1, 3).

Los fragmentos AA preferidos son los los residuos 70-76 (GHGAEDS, SEQ ID NO:4) de la isoforma alfa AA1 humana (HAA1), residuos 70-76 (GHDAEDS, SEQ ID NO:5) isoforma beta HAA1, residuos 70-76 (GHDAEDS, SEQ ID NO: 5) de la isoforma gamma HAA1, residuos 70-76 (GHGAEDS, SEQ ID NO: 4) de las isoformas alfa y beta de HAA2, residuos 70-76 (GDHAEDS, SEQ ID NO:7) de HAA3, residuos 78-84 (STVIEDS, SEQ ID NO:8) de HAA4, residuos 69-75 (GRGHEDT, SEQ ID NO:9) de AA1 de ratón (MAA1), residuos 69-75 (GRGHEDT, SEQ ID NO: 9) de MAA2, residuos 62-68 (GHGAEDS, SEQ ID NO: 10) de MAA3, y residuos 76-82 (NHGLETL, SEQ ID NO: 11) de MAA4 o subfragmentos de al menos tres amino ácidos contiguos de estos. Algunos fragmentos AA no contienen residuos de un péptido de amiloidosis AA diferente del segmento designado anteriormente. Otros fragmentos AA contienen residuos flanqueantes adicionales de un péptido de amiloidosis AA pero no contienen más de 20 o preferiblemente, no más de 10 residuos contiguos en total de un péptido de amiloidosis AA. Fragmentos de X₁EDX₂ y AL preferidos adicionales incluyen GHEDT, (SEQ ID NO: 3), HEDT, (SEQ ID NO: 12), AEDS, (SEQ ID NO: 13), AEDT, (SEQ ID NO: 14), HEDA, (SEQ ID NO: 15), y TEDE, (SEQ ID NO: 16).

También se pueden usar análogos de la amiloidosis AA natural, amiloidosis AL, y otros péptidos de amiloidosis para inducir una respuesta inmune en los métodos y composiciones de la invención. Los análogos incluyen variantes alélicas, de especie e inducidas. Los análogos de AA inducen anticuerpos que se unen específicamente a un péptido 70-76 AA natural. Algunos de tales análogos fallan en inducir anticuerpos que se unen específicamente a epítomos fuera de AA70-76. Los análogos de AA difieren

típicamente de los péptidos que se encuentran naturalmente en hasta 30% de las posiciones de amino ácido por hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 cambios de posición. Cada delección o sustitución de un residuo de amino ácido natural se considera un cambio de posición como es la inserción de un residuo sin sustitución. Las sustituciones de amino ácidos son a menudo sustituciones conservativas.

Algunos análogos de AA o fragmentos de AA o AL o fragmentos de AL u otros fragmentos de proteína amiloide tales como fragmentos X_1EDX_2 incluyen también amino ácidos no naturales o modificaciones de amino ácidos N o C terminales en una, dos, cinco, diez o incluso todas las posiciones. Por ejemplo, El residuo de ácido residuo aspártico natural puede ser reemplazado con ácido iso-aspártico. Ejemplos de amino ácidos no naturales son amino ácidos D, alfa, alfa-disustituidos, N-alquil amino ácidos, ácido láctico, 4-hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato, epsilon-N,N,N-trimetilisina, epsilon-N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxi lisina, omega-N-metilarginina, β -alanina, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxprolina, tiroxina, ácido gamma-amino butírico, homoserina, citrulina, y ácido isoaspértico. Algunos agentes terapéuticos de la invención son todos péptidos D, p.e., AA todos D o fragmentos de AA todos D, y análogos de péptido todos D. Algunos agentes terapéuticos de la invención son 90% todos péptidos D, p.e., 90% de AA todos D o 90% de fragmentos de AA todos D, y 90% de análogos de péptido todos D. Algunos agentes terapéuticos de la invención son 80% péptidos todos D, p.e., 80% AA todos D o 80% fragmentos AA todos D, y 80% análogos de péptido todos D. Los fragmentos y análogos pueden ser seleccionados para eficacia profiláctica o terapéutica en modelos de animales transgénicos en comparación con controles no tratados o placebo descritos más adelante.

AA, AL, sus fragmentos y análogos y fragmentos X_1EDX_2 y sus análogos pueden ser sinterizados mediante síntesis de péptido en fase sólida o expresión recombinante, o pueden ser obtenidos de fuentes naturales. Los sintetizadores de péptido automáticos están disponibles comercialmente de numerosos proveedores, tal como Applied Biosystems, Foster City, California. La expresión recombinante puede ser en bacterias, tales como *E. coli*, levadura, células de insecto o células mamíferas. Los procedimientos para expresión recombinante se describen en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (C.S.H.P. Press, NY 2d ed., 1989.)

Los agentes terapéuticos también incluyen polipéptidos más largos que incluyen, por ejemplo, un fragmento inmunogénico del péptido AA, péptido AL o un fragmento X_1EDX_2 , junto con uno o más amino ácidos diferentes que flanquean el péptido AA, péptido AL o fragmento X_1EDX_2 sobre uno o ambos sitios. Por ejemplo, los agentes preferidos incluyen proteínas de fusión que comprenden un segmento de fragmento AA, AL o X_1EDX_2 fusionado a una secuencia de amino ácido heteróloga que induce una respuesta de célula T colaboradora contra la secuencia de amino ácido heteróloga y por consiguiente, una respuesta de célula B contra el segmento AA, segmento AL o fragmento X_1EDX_2 . También se pueden usar uno o más amino ácidos heterólogos de flanco para tapar un péptido AA o AL o fragmento X_1EDX_2 para protegerlo de degradación durante la fabricación, almacenamiento o uso. Tales polipéptidos pueden ser seleccionados para eficacia profiláctica o terapéutica en modelos de animal en comparación con controles no tratados o placebo descritos más adelante. Los agentes terapéuticos de la invención incluyen un fragmento inmunogénico de AA o AL o fragmento X_1EDX_2 flanqueado por secuencias de polilisina. Las secuencias de polilisina pueden estar fusionadas al terminal N, el terminal C, o el terminal N y C de AA o AL o un fragmento inmunogénico de AA o AL o fragmento X_1EDX_2 . El peptide AA o AL, fragmento X_1EDX_2 , análogo, fragmento activo de AA u otro polipéptido

puede ser administrado en forma asociada o multimérica o en forma disociada. Los agentes terapéuticos también incluyen multímeros de agentes inmunogénicos monoméricos.

En una variación adicional, un fragmento inmunogénico de AA o AL o fragmento X_1EDX_2 puede estar representado por un virus o una bacteria como parte de una composición inmunogénica. Un ácido nucleico que codifica el péptido inmunogénico es incorporado en un genoma o episoma del virus o bacteria. Opcionalmente, el ácido nucleico es incorporado de tal manera que el péptido inmunogénico es expresado como una proteína secretada o como una proteína de fusión con una proteína de superficie exterior de un virus o una proteína de transmembrana de una bacteria de forma que se despliega el péptido. Los virus o bacterias usados en tales métodos deben ser no patogénicos o atenuados. Virus adecuados incluyen adenovirus, VSH, virus de la encefalitis equina venelozana y otros alfa virus, virus de estomatitis vesicular, y otros rabdo virus, vaccinia y viruela de aves de corral. Bacterias adecuadas incluyen *Salmonella* y *Shigella*. La fusión de un péptido inmunogénico a HBsAg de HBV es particularmente adecuada.

Los agentes terapéuticos también incluyen péptidos y otros compuestos que no necesariamente tienen una similitud de secuencia de amino ácido significativa con AA o AL o fragmento X_1EDX_2 , pero sin embargo, sirven como imitadores de AA o AL o fragmento X_1EDX_2 e inducen una respuesta inmune similar. Por ejemplo, cualquiera de los péptidos y proteínas que forman placas plegadas β pueden ser seleccionados para conveniencia. También se pueden usar anticuerpos anti-idiotípicos contra anticuerpos monoclonal a AA o AL u otros péptidos amiloidogénicos tales como o fragmentos X_1EDX_2 . Tales anticuerpos anti-Id imitan el antígeno y generan una respuesta inmune a este (ver Essential Immunology (Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, 6th ed.), p. 181). Los agentes diferentes a péptidos AA deben inducir una

respuesta inmunogénica contra uno o más de los segmentos preferidos de AA listados anteriormente (p.e., AA70-76 o GHEDT, (SEQ ID NO: 3) o un AL o fragmento X_1EDX_2 listado anteriormente, tal como, por ejemplo, HEDT, (SEQ ID NO: 12), AEDS, (SEQ ID NO: 13), AEDT, (SEQ ID NO: 14), HEDA, (SEQ ID NO: 15) y TEDE, (SEQ ID NO: 16).

Preferiblemente, tales agentes inducen una respuesta inmunogénica que está dirigida específicamente a uno de estos segmentos sin estar dirigido a otros segmentos de AA o AL o proteína amiloide de la cual se deriva el fragmento X_1EDX_2 .

Las librerías aleatorias de péptidos u otros compuestos también pueden ser seleccionadas para conveniencia. Se pueden producir librerías combinatorias para muchos tipos de compuestos que pueden ser sintetizados de una forma paso-a-paso. Tales compuestos incluyen polipéptidos, miméticos de giro beta, polisacáridos, fosfolípidos, hormonas, prostaglandinas, esteroides, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, benzodiazepinas, glicinas N-sustituidas oligoméricas y oligocarbamatos. Se pueden construir grandes librerías de los compuestos mediante el método de librerías sintéticas codificadas (ESL) descrito en Affymax, WO 95/12608, Affymax, WO 93/06121, Columbia University, WO 94/08051, Pharmacoepia, WO 95/35503 y Scripps, WO 95/30642 (cada una de las cuales está incorporada mediante referencia para todos los propósitos). Las librerías de péptido también pueden ser generadas mediante métodos de despliegue del fago. Ver, p.e., Devlin, WO 91/18980.

Las librerías combinatorias y otros compuestos son inicialmente seleccionados para conveniencia determinando su capacidad a unirse específicamente a anticuerpos o linfocitos (B o T) conocidos por ser específicos para AA u otros péptidos amiloidogénicos. Por ejemplo, las selecciones

iniciales se pueden realizar con cualquier suero gpoliclonal o anticuerpo monoclonal a AA o AL o un fragmento de los mismos, o a un fragmento X_1EDX_2 . Los compuestos pueden ser seleccionados para unirse específicamente a un epítipo específico entre AA (p.e., AA70-76 o GHEDT, (SEQ ID NO: 3) o AL o a un fragmento X_1EDX_2 listado anteriormente, tal como, por ejemplo, HEDT, (SEQ ID NO: 12), AEDS, (SEQ ID NO: 13), AEDT, (SEQ ID NO: 14), HEDA, (SEQ ID NO: 15) y TEDE, (SEQ ID NO: 16).

Los compuestos pueden ser evaluados mediante los mismos procedimientos descritos para el mapeo de especificidades de epítipo de anticuerpo. Los compuestos identificados mediante tales selecciones son entonces analizados adicionalmente para su capacidad de inducir anticuerpos o linfocitos reactivos a AA o AL o fragmentos de los mismos o a un fragmento X_1EDX_2 . Por ejemplo, diluciones múltiples de sueros pueden ser evaluadas en placas microtituladoras que han sido recubiertas previamente con AA o AL o un fragmento de los mismos, o un fragmento X_1EDX_2 y se puede llevar a cabo una ELISA estándar para evaluar para anticuerpos reactivos a AA o AL o el fragmento o al fragmento X_1EDX_2 . Los compuestos pueden ser entonces evaluados para eficacia profiláctica y terapéutica en animales transgénicos predispuestos a amiloidosis, tal como, por ejemplo, Amiloidosis AA o amiloidosis AL. El mismo criterio de selección se puede usar en otros agentes potenciales, análogos de AA, análogos de AL y péptidos más largos, incluyendo fragmentos de AA, AL y fragmentos X_1EDX_2 , descritos anteriormente.

VII. Conjugados

Algunos agentes para inducir una respuesta inmune contienen el epítipo apropiado para inducir una respuesta inmune contra AA pero son demasiado pequeños para ser inmunogénicos. En esta situación, un inmunógeno péptido

puede estar enlazado a una molécula vehículo adecuada para formar un conjugado que ayuda a producir una respuesta inmune. Un solo agente puede estar enlazado a un solo vehículo, múltiples copias de un agente pueden estar enlazadas a múltiples copias de un vehículo, que están a su vez enlazadas entre sí, múltiples copias de un agente pueden estar enlazadas a una sola copia de un vehículo, o una sola copia de un agente puede estar enlazada a múltiples copias de un vehículo, o diferentes vehículos. Vehículos adecuados incluyen albúminas de suero, hemocianina extraída del molusco, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbúmina, toroide del tétano, o un toxoide de otras bacterias patogénicas, tales como difteria, *E. coli*, cólera, o *H. pylori*, o un derivado de toxina atenuado. Los epítopos de célula T también son moléculas vehículo adecuadas. Algunos conjugados se pueden formar mediante agentes enlazantes de la invención a una molécula polímera inmunoestimuladora {p.e., tripalmitoil-S-glicerina cisteína (Pam₃Cys), manano (un polímero de manosa), o glucano (un polímero beta 1 → 2)), citoquinas {p.e., IL-1, péptidos IL-1 alfa y beta, IL-2, gamma-INF, IL-10, GM-CSF), y quimioquinas {p.e., MIP1 alfa y beta, y RANTES). Los agentes inmunogénicos también pueden estar enlazados a péptidos que mejoran el transporte a través de los tejidos, como se describe en O'Mahony, WO 97/17613 y WO 97/17614. los inmunógenos pueden estar enlazados a los vehículos con o sin amino ácidos espaciadores (p.e., gly-gly).

Algunos conjugados se pueden formar enlazando agentes de la invención a al menos un epítipo de célula T. Algunos epítopos de célula T son promiscuos mientras que otros epítopos de célula T son universales. Los epítopos de célula T promiscuos son capaces de mejorar la inducción de inmunidad de célula T en una amplia variedad de sujetos que muestran varios tipos de HLA. En contraste con los epítopos de célula T promiscuos, los epítopos de célula T universales son capaces de mejorar la inducción de inmunidad de célula T en un gran porcentaje, p.e., al menos 75%, de sujetos

que muestran varias moléculas de HLA codificadas por diferentes alelos de HLA-DR.

Existe un gran número de epítomos de célula T que se encuentran naturalmente, tales como, toxoide de tétano (p.e., los epítomos P2 y P30), antígeno desuperficie de Hepatitis B, pertusis, toxoide, proteína F del virus de sarampión, proteína de membrana exterior mayor de *Chlamydia trachomatis*, toroide de difteria (p.e., CRM 197), circumsporozoito T de *Plasmodium falciparum*, antígeno CS de *Plasmodium falciparum*, triosa fosfato isomerasa de *Schistosoma mansoni*, TraT de *Escherichia coli*, y hemaglutinina del virus de la Influenza (HA). Los péptidos inmunogénicos de la invención también pueden estar conjugados a los epítomos de célula T descritos en Sinigaglia F. et al, *Nature*, 336:778-780 (1988); Chicz R.M. et al, *J. Exp. Med.*, 178:27-47 (1993); Hammer J. et al., *Cell* 74:197-203 (1993); Falk K. et al., *Immunogenetics*, 39:230-242 (1994); WO 98/23635; Southwood S. et al. *J. Immunology*; 160:3363-3373 (1998); and, Giannini, G. et al. *Nucleic Acids Res.* 12: 4063-4069 (1984), (each of which is incorporated herein by reference for all purposes). Ejemplos adicionales incluyen:

Hemaglutinina de Influenza: HA₃₀₇₋₃₁₉

Malaria CS: epítomo T3 EKIAKMEKASSVFNV, (SEQ ID NO: 67).

Antígeno de superficie de Hepatitis B: HBsAg₁₉₋₂₈ FFLTRILTI, (SEQ ID NO: 68).

Proteína 65 de choque al calor: hsp65₁₅₃₋₁₇₁ DQSIGDLIAEAMDKVGNEG, (SEQ ID NO: 69).

Bacilo de Calmette-Guerin QVHFQPLPPAVVKL, (SEQ ID NO: 70).

Toxoide tetánico: TT₈₃₀₋₈₄₄ QYIKANSKFIGITEL, (SEQ ID NO: 71).

Toxoide tetánico: TT₉₄₇₋₉₆₇ FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE, (SEQ ID NO: 72).

T1 gp120 de VIH: KQIINMWQEVGKAMYA, (SEQ ID NO: 73).

Toxoide tetánico: TT₉₄₇₋₉₆₇ FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE
 T1 gp120 de VIH: KQIINMWQEVGKAMYA.

Alternativamente, los conjugados pueden formarse mediante agentes enlazantes de la invención a al menos un epítipo de célula T artificial capaz de unirse a una gran proporción de moléculas de MHC Clase II, tales como el epítipo pan-DR ("PADRE"). PADRE se describe en US 5,736,141, WO 95/07707, y Alexander J et al., *Immunity*, 1:751-761 (1994) (cada una de las cuales está incorporada aquí mediante referencia para todos los propósitos). Un péptido PADRE preferido es AKXVAAWTLKAAA, (SEQ ID NO: 74), (residuos comunes en negrita) en donde X es preferiblemente ciclohexilalanina, tirosina o fenilalanina, siendo la más preferida con ciclohexilalanina.

Los agentes inmunogénicos pueden estar enlazados a vehículos por entrecruzamiento químico. Las técnicas para enlazar un inmunógeno a un vehículo incluyen la formación de enlaces de disulfuro usando N-succinimidil-3-(2-piridil-tio)propionato (SPDP) y succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato (SMCC) (si el péptido carece de un grupo sulfhidrilo, esto se puede proveer mediante la adición de un residuo de cisteína). Estos reactivos crean un enlace de disulfuro entre ellos mismos y la cisteína de péptido reside en una proteína y un enlace de amida a través del epsilon-amino en una lisina, u otro grupo amino libre en otros amino ácidos. Una variedad de tales agentes formadores de disulfuro/amida se describen en *Immun. Rev.* 62, 185 (1982). Otros agentes de acoplamiento bifuncionales forman un tioéter en lugar de un enlace de disulfuro. Muchos de estos agentes formadores de tio-éter están disponibles comercialmente e incluyen ésteres reactivos de ácido 6-maleimidocapróico, ácido 2-bromoacético, y ácido 2-yodoacético, ácido 4-(N-maleimido-metil)ciclohexan-1-carboxílico. Los grupos carboxílicos pueden ser activados combinándolos con succinimida o ácido 1-hidroxil-2-nitro-4-sulfónico, sal sódica.

La inmunogenicidad puede ser mejorada a través de la adición de residuos espaciadores (p.e., Gly- Gly) entre el epítipo T_h y el inmunógeno péptido de la invención. Además de separar físicamente el epítipo T_h del epítipo de célula B (p.e., el inmunógeno péptido), los residuos de glicina pueden perturbar cualquier estructura secundaria artificial creada por la unión del epítipo T_h con el inmunógeno péptido, y por consiguiente, eliminan la interferencia entre las respuestas de célula T y/o B. La separación conformacional entre el epítipo colaborador y el dominio que produce anticuerpo permite así interacciones más eficientes entre el inmunógeno presentado y las células T_h y B apropiadas.

Para mejorar la inducción de inmunidad de célula T en un gran porcentaje de sujetos que muestran varios tipos de HLA a un agente de la presente invención, se puede preparar una mezcla de conjugados con diferentes epítipos de célula T_h . La mezcla puede contener una mezcla de al menos dos conjugados con diferentes epítipos de célula T_h , una mezcla de al menos tres conjugados con diferentes epítipos de célula T_h , o una mezcla de al menos cuatro conjugados con diferentes epítipos de célula T_h . La mezcla puede ser administrada con un adyuvante.

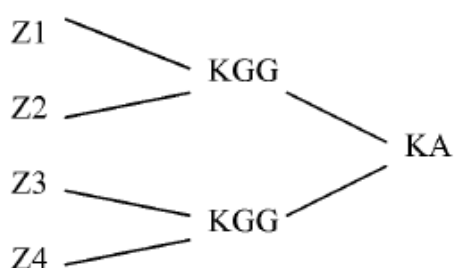
Los péptidos inmunogénicos también pueden ser expresados como proteínas de fusión con vehículos (p.e., péptidos heterólogos). El péptido inmunogénico puede estar enlazado en su terminal amino, su terminal carboxilo, o ambos a un vehículo. Opcionalmente, múltiples repeticiones del péptido inmunogénico pueden estar presentes en la proteína de fusión. Opcionalmente, un péptido inmunogénico puede estar enlazado a múltiples copias de un péptido heterólogo, por ejemplo, en ambos terminales N y C del péptido. Opcionalmente, múltiples copias de un péptido inmunogénico pueden estar enlazadas a múltiples copias de un péptido heterólogo, que están

enlazadas entre sí. Algunos péptidos vehículo sirven para inducir una respuesta de célula T colaboradora contra el péptido vehículo. Las células T colaboradoras inducidas a su vez inducen una respuesta de célula B contra el péptido inmunogénico enlazado al vehículo.

Algunos ejemplos de proteínas de fusión adecuadas para uso en la invención se muestran a continuación. Algunas de estas proteínas de fusión comprenden segmentos de AA enlazados a epítomos de toroide tétanos descritos en US 5,196,512, EP 378,881 y EP 427,347. Algunas proteínas de fusión comprenden segmentos de AA enlazado a al menos un péptido PADRE descrito en US 5,736,142. Algunos péptidos heterólogos son epítomos de célula T promiscuos, mientras que otros péptidos heterólogos son epítomos de célula T universales. En algunos métodos, el agente para administración es simplemente una sola proteína de fusión con un segmento AA enlazado a un segmento heterólogo en configuración lineal. Los agentes terapéuticos de la invención pueden ser representados usando una formula. Por ejemplo, en algunos métodos, el agente es multímero de proteínas de fusión representadas por la formula 2^x , en la cual x es un entero de 1-5. Preferiblemente x es 1, 2 o 3, siendo más preferido 2. Cuando x es dos, tal multímero tiene cuatro proteínas de fusión enlazadas en una configuración preferida referida como MAP4 (ver US 5,229,490).

La configuración MAP4 se muestra a continuación, donde las estructuras ramificadas son producidas iniciando la síntesis del péptido tanto en el terminal N como en las aminas de cadenas laterales de lisina. Dependiendo del número de veces que se incorpora la lisina en la secuencia, y se deja ramificar, la estructura resultante presentará múltiples terminales N. En este ejemplo, se han producido cuatro terminales N idénticos en el núcleo que contiene lisina ramificada. Tal multiplicidad mejora en gran medida la respuesta de las células B cognado. En los siguientes ejemplos, Z se refiere a un fragmento

inmunogénico de AA, AL o un fragmento X_1EDX_2 , y Z1-4 se refiere a fragmento(s) inmunogénico(s) de AA, AL o un fragmento de X_1EDX_2 . Los fragmentos pueden ser iguales entre sí o diferentes.



Otros ejemplos de proteínas de fusión incluyen:

Z-Toxoide tetánico 830-844 en una configuración MAP4:

Z-QYIKANSKFIGITEL, (SEQ ID NO: 71)

Z-Toxoide tetánico 947-967 en una configuración MAP4:

Z-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE, (SEQ ID NO: 72)

Z-Toxoide tetánico 830-844 en una configuración MAP4:

Z-QYIKANSKFIGITEL, (SEQ ID NO: 71)

Z-Toxoide tetánico 830-844 + 947-967 en una configuración lineal:

Z-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE, (SEQ ID NO: 75).

Péptido PADRE (todos en configuración lineal), en donde X es preferiblemente ciclohexilalanina, tirosina o fenilalanina, siendo la ciclohexilalanina la más preferida-**Z**:

AKXVAAWTLKAAA-Z, (SEQ ID NO: 74).

Z x 3-péptido PADRE:

Z-Z-Z-AKXVAAWTLKAAA, (SEQ ID NO: 74).

Z-ovalbúmina 323-339 en una configuración lineal:

Z-ISQAVHAAHAEINEAGR, (SEQ ID NO: 76).

Ejemplos adicionales de proteínas de fusión incluyen:

AKXVAAWTLKAAA-Z-Z-Z-Z, (SEQ ID NO: 74).

Z-AKXVAAWTLKAAA, (**Z**-(SEQ ID NO: 74).

PKYVKQNTLKLAT-Z-Z-Z, (SEQ ID NO: 77).

Z-PKYVKQNTLKLAT-Z, (SEQ ID NO: 77).

Z-Z-Z-PKYVKQNTLKLAT, (SEQ ID NO: 77).

Z-Z-PKYVKQNTLKLAT, (**Z-Z**-(SEQ ID NO: 77)

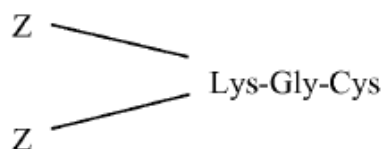
Z-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-(SEQ ID NO: 78)

Z-Z-Z-QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE, (SEQ ID NO: 79).

Z-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-Z, (SEQ ID NO: 79).

QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-Z, (SEQ ID NO: 79)

Z-QYIKANSKFIGITEL, (SEQ ID NO: 71) en una resina 2 ramificada: los fragmentos pueden ser iguales entre sí o diferentes.



Se pueden usar las mismas proteínas vehículo o similares y los métodos de enlace para generar inmunógenos a ser usados en la generación de

anticuerpos contra AA o un fragmento inmunogénico de AA, AL o un fragmento X_1EDX_2 . Por ejemplo, AA o un fragmento inmunogénico de AA, AL o un fragmento X_1EDX_2 enlazado a un vehículo puede ser administrado a un animal de laboratorio en la producción de anticuerpos monoclonal a AA o un fragmento inmunogénico de AA, AL o un fragmento X_1EDX_2 .

VIII. Ácido Nucleico que Codifica los Agentes Terapéuticos

Los agentes terapéuticos de la invención también incluyen ácidos nucleicos. Las respuestas inmunes contra depósitos amiloides también pueden ser inducidas mediante la administración de ácidos nucleicos que codifican segmentos de péptido AA, y fragmentos de los mismos, otros inmunógenos de péptido tales como fragmentos X_1EDX_2 , o anticuerpos y sus cadenas componentes, tales como anticuerpos 2A4, 8G9 y 7D8, usados para inmunización pasiva. Tales agentes para uso en los métodos de la invención incluyen ácidos nucleicos que codifican péptidos AA que a la administración a un paciente generan anticuerpos que se unen específicamente a uno o más epítopos entre los residuos 70-76 de AA, AL o ácidos nucleicos que codifican péptidos que comprenden fragmentos X_1EDX_2 . Tales agentes para uso en los métodos de la invención también incluyen ácidos nucleicos que codifican anticuerpos que se unen especialmente a un neoepítopo C-terminal de AA o a X_1EDX_2 . En particular, tales ácidos nucleicos codifican anticuerpos que se unen específicamente a la isoforma alfa de HAA1 entre los residuos 70-76 (GHGAEDS, (SEQ ID NO: 4), isoforma beta de HAA1 entre los residuos 70-76 (GHDAEDS, (SEQ ID NO: 5), isoforma gamma de HAA1 entre los residuos 70-76 (GHDAEDS, (SEQ ID NO: 5), isoformas alfa y beta de HAA2 entre los residuos 70-76 (GHGAEDS, (SEQ ID NO: 4), HAA3 entre los residuos 70-76 (GDHAEDS, (SEQ ID NO: 7), HAA4 entre los residuos 78-84 (STVIEDS, (SEQ ID NO: 8), AA1 de ratón (MAA1) entre los residuos 69-75 (GRGHEDT, (SEQ ID NO: 9), MAA2 entre los residuos 69-75 (GRGHEDT, (SEQ ID NO: 9), MAA3

entre los residuos 62-68 (GHGAEDS, (SEQ ID NO: 4), y MAA4 entre los residuos 76-82 (NHGLETL, (SEQ ID NO: 11). Tales ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN. Ácidos nucleicos preferidos adicionales codifican anticuerpos que se unen específicamente a HEDT, (SEQ ID NO: 12), AEDS, (SEQ ID NO: 13), AEDT, (SEQ ID NO: 14), HEDA, (SEQ ID NO: 15) o TEDE, (SEQ ID NO: 16) u otros péptidos X_1EDX_2 listados anteriormente. Un segmento de ácido nucleico A que codifica un inmunógeno está enlazado típicamente a elementos reguladores, tales como un promotor y mejorador, que permite la expresión del segmento de ADN en las células objetivo destinadas de un paciente. Para la expresión en células sanguíneas, como es deseable para inducción de una respuesta inmune, son adecuados los elementos promotores y mejoradores de genes de inmunoglobulina de cadena ligera o pesada o el promotor y mejorador inicial intermediario mayor de CMV. Los elementos reguladores enlazados y las secuencias de codificación son a menudo clonadas en un vector. Para administración de anticuerpos de cadena doble, las dos cadenas pueden ser clonadas en el mismo vector o separadas. Los ácidos nucleicos que codifican agentes terapéuticos de la invención también pueden codificar al menos un epítipo de célula T. Las revelaciones presentes que se relacionan con el uso de adyuvantes y el uso de vehículos se aplican *mutatis mutandis* a su uso con los ácidos nucleicos que codifican los agentes terapéuticos de la presente invención.

Un número de sistemas de vectores virales está disponible incluyendo sistemas retrovirales (*ver, p.e.,* Lawrie y Tumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3, 102-109 (1993)); vectores adenovirales (*ver, p.e.,* Bett et al, *J. Virol.* 67, 5911 (1993)); vectores de virus adeno-asociados (*see, p.e.,* Zhou et al, *J. Exp. Med.* 179, 1867 (1994)), vectores virales de la familia de la viruela incluyendo el virus de vaccinia y los virus de viruela aviar, vectores virales del género alfa virus tales como los derivados de los Virus Sindbis y del Bosque Semliki (*ver, p.e.,* Dubensky et al., *J. Virol.* 70, 508-519 (1996)), virus de la encefalitis equina

venezolana (ver US 5,643,576) y rabdo virus, tal como virus de estomatitis vesicular (ver WO 96/34625) y papilomavirus (Ohe et al., *Human Gene Therapy* 6, 325-333 (1995); Woo et al, WO 94/12629 y Xiao & Brandsma, *Nucleic Acids Res.* 24, 2630-2622 (1996)).

El ADN que codifica un inmunógeno, o un vector que lo contiene, puede estar empacado en liposomas. Lípidos adecuados y análogos relacionados se describen en US 5,208,036, 5,264,618, 5,279,833 y 5,283,185. Los vectores y el ADN que codifica un inmunógeno también puede ser adsorbido en o asociado con vehículos particulados, cuyos ejemplos incluyen polímeros de polimetil metacrilato y poliláctidos y poli(lactida-co-glicólidos), ver, p.e., McGee et al., *J. Micro Encap.* (1996).

Los vectores de terapia de geno ADN desnudo pueden ser liberados in vivo mediante administración a un paciente individual, típicamente mediante administración sistémica (p.e., intravenosa, intraperitoneal, nasal, gástrica, intradérmica, intramuscular, subdérmica, o infusión intracraneal) o aplicación tópica (ver p.e., US 5,399,346). Tales vectores pueden además incluir agentes facilitadores tales como bupivacina (US 5,593,970). El ADN también puede ser administrado usando una pistola de genes. (Ver Xiao & Brandsma, *supra*). El ADN que codifica un inmunógeno es precipitado en la superficie de perlas de metal microscópicas. Los microproyectiles son acelerados con una onda de choque o gas helo en expansión, y penetran tejidos hasta una profundidad de varias capas celulares. Por ejemplo, El dispositivo de Liberación de Gen Accel™ fabricado por Agacetis, Inc. Middleton WI es adecuado. Alternativamente, el ADN desnudo puede pasar a través de la piel al torrente sanguíneo simplemente manchando el ADN sobre la piel con irritación química o mecánica (ver WO 95/05853).

En una variación adicional, los vectores que codifican inmunógenos pueden ser liberados a células ex vivo, tales como células explantadas extraídas de un paciente individual (p.e., linfocitos, aspirados de médula espinal, biopsia de tejido) o células madre hematopoyéticas donadoras universales, seguida por reimplantación de las células en un paciente, usualmente después de la selección para células que tienen el vector incorporado.

IX. Adyuvantes

Los agentes inmunogénicos de la invención, tales como péptidos, son algunas veces administrados en combinación con un adyuvante. El adyuvante aumenta el título de anticuerpos inducidos y/o la afinidad de unión de anticuerpos inducidos con relación a la situación si el péptido se usara solo. Se puede usar una variedad de adyuvantes en combinación con un fragmento inmunogénico de AA, para producir una respuesta inmune. Los adyuvantes preferidos aumentan la respuesta intrínseca a un inmunógeno sin causar cambios conformacionales en el inmunógeno que afecten la forma cualitativa de la respuesta. Adyuvantes preferidos incluyen hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, lípido A monofosforil 3 des-O-acilado (MPL™) (ver GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, ahora parte de Corixa), RC-529 (Corixa, Hamilton, Montana). STIMULON™ QS-21 es un triterpeno glicósido o saponina aislada de la corteza del árbol de Quillaja Saponaria Molina encontrado en Sur América (ver Kensil et al, in *Vaccine Design: The Subunit y Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); Patente US No. 5,057,540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA). Otros adyuvantes son emulsiones aceite en agua (tales como escualeno o aceite de maní), opcionalmente en combinación con estimulantes inmunes, tales como lípido A monofosforilo (ver Stoute et al, *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)), polímeros plurónicos, y micobacterias eliminadas. Otro adyuvante es

CpG (WO 98/40100). Los adyuvantes pueden ser administrados como un componente de una composición terapéutica con un agente activo, o pueden ser administrados por separado antes, concurrentemente con, o después de la administración del agente terapéutico.

Una clase preferida de adyuvantes son las sales de aluminio (alumbre), tal como hidróxido de alum, fosfato de alum, sulfato de alum. Tales adyuvantes se pueden usar con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos tales como MPL o 3-DMP, QS-21, amino ácidos poliméricos o monoméricos tales como ácido poliglutámico o polilisina. Otra clase de adyuvantes son las formulaciones de emulsiones aceite-en-agua. Tales adyuvantes se pueden usar con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos tales como muramil péptidos (*p.e.*, N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforilo)etilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi propilamida (DTP-DPP) THERAMIDE™), u otros componentes de pared celular bacteriana. Las emulsiones aceite-en-agua incluyen (a) MF59 (WO 90/14837), que contiene 5% de escualeno, 0.5% de Tween 80, y 0.5% de Span 85 (que contiene opcionalmente varias cantidades de MTP-PE) formulaas en partículas de submicrón usando un microfluidizador tal como microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, que contiene 10% de Escualeno, 0.4% de Tween 80, 5% de plurónico-polímero L121 bloqueado, y thr-MDP, ya sea microfluidizadoo en una emulsión de submicron o vorticeado para generar una emulsión con tamaño de partícula más grande, y (c) sistema de adyuvante RIBI™ (RAS), (Ribi ImmunoChem, Hamilton, MT) que contiene 2% de escualeno, 0.2% de Tween 80, y uno o más componentes de pared celular bacteriana del grupo que consiste de monofosforillípico A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM), y esqueleto de pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (DETOX™).

Otra clase de adyuvantes preferidos son los adyuvantes de saponina, tales como STIMULON™ (QS- 21, Aquila, Framingham, MA) o partículas generadas a partir de estos tales como ISCOM (complejos inmunoestimuladores) e ISCOMATRIX. Otros adyuvantes incluyen RC-529, GM-CSF y Adyuvante de Freund Completo (CFA) y Adyuvante de Freund Incompleto (IFA). Otros adyuvantes incluyen citoquinas, tales como interleucinas (*p.e.*, péptidos de IL-1 α y β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL13, e IL-15), factor de estimulación de colonia macrófaga (M-CSF), factor de estimulación de colonia macrófaga de granulocito (GM-CSF), factor de necrosis de tumor (TNF), quimioquinas, tales como MIP1 α y β y RANTES. Otra clase de adyuvantes son los análogos de glicolípido que incluyen N-glicosilamidas, N-glicosilúreas y N-glicosilcarbamatos, cada uno de los cuales está sustituido en el residuo de azúcar por un amino ácido, como inmuno-moduladores o adyuvantes (ver Pat. US No. 4,855,283). Las proteínas de choque al calor, *p.e.*, HSP70 y HSP90, también se pueden usar como adyuvantes.

Un adyuvante puede ser administrado con un inmunógeno como una sola composición, o puede ser administrado antes, concurrente con, o después de la administración del inmunógeno. El inmunógeno y adyuvante pueden ser empacados y suministrados en el mismo vial o pueden ser empacados en viales separados y mezclados antes de uso. El inmunógeno y adyuvante son empacados típicamente con una etiqueta que indica la aplicación terapéutica destinada. Si el inmunógeno y el adyuvante están empacados por separado, el empaque incluye típicamente instrucciones para mezclar antes de uso. La elección de un adyuvante y/o vehículo depende de la estabilidad de la formulación inmunogénica que contiene el adyuvante, la ruta de administración, el esquema de dosificación, la eficacia del adyuvante para las especies que están siendo vacunadas, y, en humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable es uno que ha sido aprobado o puede ser aprobado para

administración humana por los organismos reguladores pertinentes. Por ejemplo, el adyuvante de Freund completo no es adecuado para administración humana. Se prefieren alum, MPL y QS-21. Opcionalmente, se pueden usar simultáneamente dos o más adyuvantes diferentes. Las combinaciones preferidas incluyen alum con MPL, alum con QS-21, MPL con QS-21, MPL o RC-529 con GM-CSF, y alum, QS-21 y MPL juntos. También se puede usar adyuvante de Freund Incompleto (Chang *et al.*, *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 173-186 (1998)), opcionalmente en combinación con cualquiera de alum, QS-21, y MPL y todas las combinaciones de los mismos.

X. Administración Pasiva de Anticuerpos

Los agentes terapéuticos de la presente invención incluyen anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo que comprende X_1EDX_2 en una proteína amiloide agregada, en donde X_1 es H, T, F, S, P, A o cualquier otro residuo de amino ácido que precede inmediatamente ED en tal proteína amiloide agregada; y en donde X_2 es T, S, E, R, I, V, F, A o cualquier otro residuo de amino ácido inmediatamente después de ED en tal proteína amiloide agregada, incluyendo epítopos entre péptidos amiloides tales como AA. Los anticuerpos usados para administración pasiva pueden ser anticuerpos que se unen a epítopos C-terminales o N-terminales de AA. Otras proteínas amiloide, además de la proteína A amiloide en suero, incluyen proteína A amiloide en suero, proteína de cadena ligera de inmunoglobulina, tal como, por ejemplo, V λ 6 Wil o VK, polipéptido precursor de amiloide de islote humano (IAPP), péptido beta amiloide, transtiretina (TTR) y ApoA1, así como otras listadas en la Tabla 1 anterior.

AA se forma mediante clivado proteolítico de SAA. Los anticuerpos preferidos se unen específicamente a neoepítopos de AA que se forman en el clivado proteolítico de SAA. Los anticuerpos se unen especialmente a un

neoepítopo C-terminal de AA, especialmente, tales anticuerpos se unen específicamente a la isoforma alfa de HAA1 entre los residuos 70-76 (GHGAEDS, SEQ ID NO:4), isoforma beta de HAA1 entre los residuos 70-76 (GHDAEDS, SEQ ID NO:5), isoforma gamma de HAA1 entre los residuos 70-76 (GHDAEDS, SEQ ID NO: 5), isoformas alfa y beta de HAA2 entre los residuos 70-76 (GHGAEDS, SEQ ID NO: 10), HAA3 entre los residuos 70-76 (GDHAEDS, SEQ ID NO:7), HAA4 entre los residuos 78-84 (STVIEDS, SEQ ID NO:8), AA1 de ratón (MAA1) entre los residuos 69-75 (GRGHEDT, SEQ ID NO:9), MAA2 entre los residuos 69-75 (GRGHEDT, SEQ ID NO: 9), MAA3 entre los residuos 62-68 (GHGAEDS, SEQ ID NO: 10), y MAA4 entre los residuos 76-82 (NHGLETL, SEQ ID NO: 11). Algunos anticuerpos se unen solamente a un epítopo entre uno de estos péptidos. Otros anticuerpos se unen a epítopos entre más de uno de estos péptidos. Por ejemplo, algunos anticuerpos se unen específicamente a un péptido GHGAEDS, (SEQ ID NO: 4) y un péptido GHDAEDS, SEQ ID NO: 5). Algunos anticuerpos se unen a un péptido GHGAEDS, SEQ ID NO: 4) sin unirse específicamente a un péptido GHDAEDS, SEQ ID NO: 5). Se prefiere la unión a al menos uno de los péptidos AA humanos. La unión a al menos uno de los péptidos AA humano y un péptido de ratón correspondiente es útil porque el mismo anticuerpo puede ser evaluado en un modelo de ratón y posteriormente usado en humanos. Algunos anticuerpos preferidos se unen específicamente a epítopos entre los residuos de la isoforma alfa de HAA1 71-76, 72-76, 73-76, 74-76, 70-75, 70-74, 70-73, 70-72, 71-75, 72-75, 73-75, 71-74, 71-73, 72-74, o residuos de MAA1 70-75, 71-75, 72-75, 73-75, 69-74, 69-73, 69-72, 69-71, 70-74, 71-74, 72-74, 70-73, 70-72. Tales anticuerpos típicamente se unen específicamente a depósitos amiloides pero pueden o no unirse a AA soluble. Cuando se dice que un anticuerpo se une específicamente a un epítopo entre residuos especificados, tales como los residuos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1, por ejemplo, significa que el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que contiene los residuos especificados (p.e., residuos 70-76 de la isoforma

alfa de HAA1 en este ejemplo). Tal anticuerpo no necesariamente contacta vada residuo entre los residuos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1. No necesariamente cada una de las sustituciones o deleciones entre los residuos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 afecta significativamente la afinidad de unión. Tales anticuerpos de neoepítipo se unen a AA pero no a SAA. La especificidad de epítipo de un anticuerpo puede ser determinada, por ejemplo, como se describe en WO 00/72880.

Los anticuerpos usados para administración pasiva pueden ser anticuerpos a epítomos N-terminales de AA. Los anticuerpos preferidos se unen específicamente a un neoepítipo N-terminal de AA, especialmente, tales anticuerpos se unen específicamente a los residuos de HAA1 1-15 (RSFFSFLGEAFDGAR, SEQ ID NO. 80), residuos de HAA2 1-15 (RSFFSFLGEAFDGAR, SEQ ID NO. 80), residuos de HAA3 1-15 (QGWLTFLKAAGQGAK, SEQ ID NO: 81), residuos de HAA4 1-15 (ES WRSFFKEA, (SEQ ID NO: 82), residuos de MAA1 1-15 (GFFSFVHEAFQGAGD, SEQ ID NO: 83), residuos MAA2 1-15 (GFFSFVHEAFQGAGD, SEQ ID NO: 83), residuos MAA3 1-9 (EAGQGSRD, (SEQ ID NO: 84), y residuos de MAA4 1-14 (WYSFFREAVQGTWD, SEQ ID NO: 85). Algunos anticuerpos se unen solamente a un epítipo entre uno de estos péptidos. Otros anticuerpos se unen a epítomos entre más de uno de estos péptidos. Por ejemplo, algunos anticuerpos se unen específicamente a un péptido RSFFSFLGEAFDGAR, SEQ ID NO: 80) y un péptido QGWLTFLKAAGQGAK, SEQ ID NO: 81). Algunos anticuerpos se unen a un péptido RSFFSFLGEAFDGAR, SEQ ID NO: 80) sin unirse específicamente a un péptido QGWLTFLKAAGQGAK, SEQ ID NO: 81). La unión a al menos uno de los péptidos AA humaos y un péptido de ratón correspondiente es útil porque el mismo anticuerpo puede ser evaluado en un modelo de ratón y posteriormente usarse en humanos.

Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo que consiste de tal X_1EDX_2 . Preferiblemente tales anticuerpos se unen específicamente a dicho epítipo en una proteína amiloide agregada. Algunos de tales anticuerpos se unen de manera preferente específicamente a una proteína amiloide agregada con relación a la forma monomérica de tal dicha proteína amiloide. En algunos anticuerpos, X_1 es H, T, F, S, P, o A y X_2 es T, S, E, D, R, I, V, F o A. En algunos de tales anticuerpos, cuando X_1 es H, X_2 es T o A; cuando X_1 es A, X_2 es S, T, E o V; cuando X_1 es T, X_2 es E; X_1 es F, X_2 es D; cuando X_1 es S, X_2 es E, F o A; y cuando X_1 es P, X_2 es E, I o F. En algunos anticuerpos, X_1 es H, T, F, S, P, o A y X_2 es T, S, E, D, R, I, V, F o A, con la condición que si X_1 es A, X_2 no es V. En algunos anticuerpos, cuando X_1 es A, X_2 es S, T o E.

Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo que comprende la secuencia de amino ácido GHEDT, (SEQ ID NO 3), HEDT, (SEQ ID NO: 12), AEDS, (SEQ ID NO: 13), AEDT, (SEQ ID NO: 14), HEDA, (SEQ ID NO: 15), TEDE, (SEQ ID NO: 16), FEDD, (SEQ ID NO: 17), SEDE, (SEQ ID NO: 18), AEDE, (SEQ ID NO: 19), PEDE, (SEQ ID NO: 20), PEDI, (SEQ ID NO: 21), PEDF, (SEQ ID NO: 22), AEDV, (SEQ ID NO: 23), SEDF, (SEQ ID NO: 24) o SEDA, (SEQ ID NO: 25).

Algunos anticuerpos se unen específicamente a un péptido que comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de GHEDT, (SEQ ID NO: 3), HEDT, (SEQ ID NO: 12), AEDS, (SEQ ID NO: 13), AEDT, (SEQ ID NO: 14), HEDA, (SEQ ID NO: 15), TEDE, (SEQ ID NO: 16), FEDD, (SEQ ID NO: 17), SEDE, (SEQ ID NO: 18), AEDE, (SEQ ID NO: 19), PEDE, (SEQ ID NO: 20), PEDI, (SEQ ID NO: 21), PEDF, (SEQ ID NO: 22), SEDF, (SEQ ID NO: 24) y SEDA, (SEQ ID NO: 25). Algunos anticuerpos se unen específicamente a un péptido que comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de GHEDT, (SEQ ID NO: 3), HEDT,

(SEQ ID NO: 12), AEDS, (SEQ ID NO: 13), AEDT, (SEQ ID NO: 14), HEDA, (SEQ ID NO: 15) y TEDE, (SEQ ID NO: 16).

Algunos anticuerpos son elevados a un péptido que comprende GHEDT, (SEQ ID NO: 3), tal como, por ejemplo, 2A4, 7D8 y 8G9, o son versiones humanizadas o quiméricas de los mismos.

Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Los sueros policlonales contienen típicamente poblaciones mezcladas de anticuerpos que se unen específicamente a varios epítomos a lo largo de AA. Sin embargo, los sueros policlonales pueden ser específicos a un segmento particular de AA, tal como los residuos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1. Los anticuerpos preferidos son quiméricos o humanizados (ver Queen et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989) y WO 90/07861, US 5,693,762, US 5,693,761, US 5,585,089, US 5,530,101 y Winter, US 5,225,539), o humanos (Lonberg et al., WO93/12227 (1993); US 5,877,397, US 5,874,299, US 5,814,318, US 5,789,650, US 5,770,429, US 5,661,016, US 5,633,425, US 5,625,126, US 5,569,825, US 5,545,806, *Nature* 148, 1547-1553 (1994), *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10741 (1991)). Un enfoque alternativo para humanizar un anticuerpo, también conocido como enchapado (veneering), se describe en US 6,797,492. Varios anticuerpos de ratón de diferentes especificidades están disponibles como materiales de partida para preparar anticuerpos humanizados.

Los anticuerpos humanizados representativos son el anticuerpo 7D8 de versión humanizada (Número de Acceso ATCC _____), anticuerpo 7D29 de versión humanizada, anticuerpo 7D19 de versión humanizada, anticuerpo 7D47 de versión humanizada, anticuerpo 7D39 de versión humanizada , anticuerpo 7D66 de versión humanizada , anticuerpo 8G9 de versión humanizada, anticuerpo 8G3 de versión humanizada, anticuerpo 8G4 de versión

humanizada, anticuerpo 8G51 de versión humanizada, anticuerpo 8G22 de versión humanizada, anticuerpo 8G30 de versión humanizada, anticuerpo 8G46 de versión humanizada, anticuerpo 2A4 de versión humanizada (Número de Acceso ATCC _____), anticuerpo 2A20 de versión humanizada, anticuerpo 2A44 de versión humanizada, anticuerpo 2A77 de versión humanizada, anticuerpo 2A13 de versión humanizada, y anticuerpo 2A14 de versión humanizada. Los hibridomas que producen el anticuerpo 7D8 (JH80 7D8.29.19.47) y el anticuerpo 2A4 (JH80 2A4.20.44077) se depositaron en Septiembre 4 de 2008, y en Diciembre 17 de 2008, respectivamente, con La Colección de Cultivo Tipo Americana (ATCC), actualmente localizada en 10801 University Boulevard, Manassas, VA20110-2209, bajo las provisiones del Tratado de Budapest para el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con el Propósito de Procedimiento de Patente ("Tratado de Budapest"). El ATCC ha asignado al hibridoma que produce 7D8 el No. De Acceso _____, y al hibridoma que produce 2A4 el No. De Acceso ATCC _____.

Se prefiere el isotipo IgG1 humano para anticuerpos a la región C terminal de AA porque tienen la afinidad más alta de los isotipos humanos para el receptor FcRI en células fagocíticas. Algunos anticuerpos se unen específicamente a AA con una afinidad de unión mayor de o igual a aproximadamente 10^7 , 10^8 , 10^9 , o 10^{10} M⁻¹.

La inmunización activa con fragmentos de AA puede ser combinada con la administración pasiva de of anticuerpos. Ejemplos de combinaciones específicas incluyen fragmentos AA que comprenden los residuos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente a epítipo entre los residuos 70-76 de la isoforma alfa HAA1; los fragmentos AA que comprenden los residuos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente a epítipo entre los residuos 71-76 de la isoforma

alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden residuos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente a epítipo entre los residuos 72-76 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los residuos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente a epítipo entre los residuos 73-76 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los residuos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente a epítipo entre los residuos 74-76 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los residuos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente a epítipo entre los residuos 70-75 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los residuos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente a epítipo entre los residuos 70-74 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los residuos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 comprising con anticuerpos que se unen específicamente a epítipo entre los residuos 70-73 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los residuos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente a epítipo entre los residuos 70-72 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los residuos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente a epítipo entre los residuos 71-75 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los residuos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente a epítipo entre los residuos 72-75 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los residuos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente a epítipo entre los residuos 73-75 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los residuos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente a epítipo entre los residuos 73-75; fragmentos AA que comprenden los residuos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente a epítipo entre los residuos 71-74 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que

comprenden los residuos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente a epítipo entre los residuos 71-73 de la isoforma alfa de HAA1; fragmentos AA que comprenden los residuos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1 con anticuerpos que se unen específicamente a epítipo entre los residuos 72-74 de la isoforma alfa de HAA1. Adicionalmente, los fragmentos AA que comprenden los residuos de isoforma alfa de HAA1 71-76, 72-76, 73-76, 74-76, 70-75, 70-74, 70-73, 70-72, 71-75, 72-75, 73-75, 71-74, 71-73, 72-74 se pueden combinar con anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo entre los residuos de isoforma alfa de HAA1 71-76, 72-76, 73-76, 74-76, 70-75, 70-74, 70-73, 70-72, 71-75, 72-75, 73-75, 71-74, 71-73, 72-74. Los fragmentos AA que comprenden los residuos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1, residuos 70-76 de la isoforma beta de HAA1, residuos 70-76 de la isoforma gamma de HAA1, residuos 70-76 de las isoformas alfa y beta de HAA2, residuos 69-75 de MAA1, residuos 69-75 de MAA2, o residuos 62-68 MAA3, se pueden combinar con anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo entre los residuos 70-76 de la isoforma alfa de HAA1, residuos 70-76 de la isoforma beta de HAA1, residuos 70-76 de la isoforma gamma de HAA1, residuos 70-76 de las isoformas alfa y beta de HAA2, residuos 69-75 de MAA1, residuos 69-75 de MAA2, o residuos 62-68 de MAA3.

Algunos de los anticuerpos descritos anteriormente no se unen específicamente a la forma precursora o monomérica de la proteína amiloide. Algunos de estos anticuerpos se unen específicamente a un neoepítipo generado al clivado de una proteína precursor produciendo una proteína amiloide. Por ejemplo, algunos anticuerpos se unen específicamente a los residuos C-terminales de fibrilos AA de ratón -HEDT, (SEQ ID NO: 12), pero no se unen específicamente a un péptido que se extiende en la porción no amiloide de SAA (GHEDTMADQE, SEQ ID NO: 61). Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo conformacional. Algunos de dichos epítopos

conformacionales son lineales. Algunos de tales epítopos conformacionales son expuestos cuando una proteína amiloide entra a una estructura agregada (p.e., fibrilar) o se vuelve parcialmente desnaturalizado. Ejemplos de tales anticuerpos incluyen los anticuerpos monoclonales murinos 2A4 (Número de Acceso ATCC _____), 8G9 (Número de Acceso ATCC _____) y 7D8 (Número de Acceso ATCC _____), formas humanas, humanizadas y quiméricas de los mismos, otros anticuerpos que se unen específicamente a el mismo epítipo que 2A4, 8G9 o 7D8, y fragmentos de unión a antígeno de cualquiera de dichos anticuerpos. Algunos anticuerpos se unen específicamente a una proteína amiloide que comprende la secuencia de amino ácido ED. Algunos anticuerpos se unen específicamente a una proteína amiloide seleccionada del grupo que consiste de proteína de cadena ligera de inmunoglobulina, polipéptido precursor de amiloide de islote humano (IAPP), péptido beta amiloide, transtiretina (TTR) y ApoA1.

La unidad estructural básica del anticuerpo es conocida por comprender un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más amino ácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígeno. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora.

1. Anticuerpos

La invención incluye anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, así como anticuerpos pegilados y fragmentos de anticuerpo, también anticuerpos con función efectora alterada (p.e., reducida o eliminada), por ejemplo, anticuerpos que comprenden mutaciones o residuos sustituidos en

la región Fc. Ejemplos de porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')₂ tri-Fab', Fab', Fv, scFv, di-Fab' que pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima tal como pepsina, o producidos mediante técnicas de ingeniería recombinante conocidas en la técnica. Los fragmentos de unión a antígeno adicionales de los anticuerpos de la invención incluyen fragmentos de anticuerpo terapéuticos, incluyendo fragmentos de anticuerpo pegilados, tal como Fab' PEGilado y di-Fab' PEGilado. Ejemplos de mutantes de función efectora se describen en la Patente U.S. No. 5,624,821, que está incorporada aquí mediante referencia en su totalidad. Algunos anticuerpos tienen afinidad de unión reducida para el receptor RI gamma Fc. Los anticuerpos mutantes de función efectora incluyen anticuerpos que comprenden mutaciones en la región bisagra. Algunos anticuerpos IgG mutantes comprenden una mutación en la región constante de cadena pesada en una o más de las posiciones 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322. En algunos anticuerpos uno o más de los residuos 234, 236 y 237 están sustituidos con alanina. En algunos anticuerpos, el residuo 235 está sustituido con glutamina. En algunos anticuerpos, el residuo 297 está sustituido con alanina. En algunos anticuerpos, los residuos 318, 320 y 322 están sustituidos con alanina. En algunos anticuerpos, el residuo 318 está sustituido con valina. En algunos anticuerpos, el residuo 322 está sustituido con glutamina. Los anticuerpos con función efectora mejorada incluyen anticuerpos mutantes sencillos S239D y I332E y los S239D/I332E y S239D/I332E/A330L doble y triple mutantes (numeración Kabat).

2. Anticuerpos Policlonales

Los anticuerpos policlonales se pueden preparar como se describió anteriormente inmunizando un sujeto adecuado con un inmunógeno. El título de anticuerpo en el sujeto inmunizado puede ser monitoreado en el tiempo por medio de técnicas estándar, tales como con un ensayo inmunosorbente ligado

a enzimas (ELISA) usando antígeno objetivo inmovilizado. Si se desea, las moléculas de anticuerpo dirigidas contra el antígeno objetivo pueden ser aisladas del mamífero (p.e., de la sangre) y purificadas adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tal como cromatografía de Sefarosa proteína A para obtener el anticuerpo, p.e., fracción IgG. En un momento apropiado después de la inmunización, p.e., cuando los títulos de anticuerpo anti-antígeno son los más altos, las células que producen anticuerpo pueden ser obtenidas del sujeto y usadas para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas estándar, tales como la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497) (ver también, Brown et al. (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh et al. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:2927-31; y Yeh et al. (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75). Para la preparación de anticuerpos policlonales quiméricos, ver Buechler et al. Patente U.S. No. 6,420,113.

3. Anticuerpos Monoclonales

Cualquiera de los muchos protocolos bien conocidos usados para fusionar linfocitos y líneas celulares inmortalizadas se pueden aplicar con el fin de generar un anticuerpo monoclonal (see, p.e., G. Galfre et al. (1977) *Nature* 266:55052; Geffer et al. *Somatic Cell Genet.*, citado *supra*; Lerner, Yale *J. Biol. Med.*, citado *supra*; Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, citados *supra*). Más aún, el tramabajor de conocimiento medio apreciará que existen muchas variaciones de tales métodos que también serían útiles. Típicamente, la línea celular inmortal (p.e., una línea celular de mieloma) se deriva de la misma especie mamífera que los linfocitos. Por ejemplo, los hidridomas murinos se pueden hacer fusionando linfocitos de un ratón inmunizado con una preparación inmunogénica de la presente invención con una línea celular de ratón inmortalizada. Las líneas celulares inmortales preferidas son las líneas celulares de mieloma de ratón que son sensibles a medio de cultivo que

contiene hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"). Se puede usar cualquiera de un número de líneas celulares de mieloma como un compañero de fusión de acuerdo con técnicas estándar, p.e., las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/0-Ag14. Estas líneas de mieloma están disponibles en ATCC. Típicamente, las células de mieloma de ratón sensibles a HAT están fusionadas con esplenocitos usando polietileno glicol ("PEG"). Las células de hibridoma resultantes de la fusión son entonces seleccionadas usando medio HAT, que elimina células de mieloma no fusionadas y fusionadas no productivas (esplenocitos no fusionados mueren después de varios días porque no son transformados). Las células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal de la invención son detectadas mediante selección de los sobrenadantes del cultivo de hibridoma para anticuerpos que se unen a un antígeno objetivo, p.e., A β , usando un ensayo de ELISA estándar.

4. Anticuerpos Recombinantes

Alternativo a preparar hibridomas que secretan anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal puede ser identificado y aislado mediante selección de una librería de inmunoglobulina combinacional recombinante (p.e., un alibrearía de despliegue del fago de anticuerpo) con un antígeno objetivo para así aislar los miembros de la librería de inmunoglobulina que se unen al antígeno objetivo. Los kits para generar y seleccionar librerías de despliegue del fago están disponibles comercialmente (p.e., El sistema de Anticuerpo de Fago Recombinante de Pharmacia, No. De Catálogo 27-9400-01; y el kit de Despliegue del Fago Stratagene SurfZAP™, No. De Catálogo 240612). Adicionalmente, ejemplos de métodos y reactivos particularmente adecuados para uso en la generación y selección de librería de despliegue de anticuerpo se pueden encontrar en, por ejemplo, Ladner et al. Patente U.S. No. 5,223,409; Kang *et al.* Publicación Internacional PCT No. WO 92/18619; Dower *et al.* Publicación Internacional PCT No. WO 91/17271; Winter *et al.* Publicación

Internacional PCT WO 92/20791; Markland *et al.* Publicación Internacional PCT No. WO 92/15679; Breitling *et al.* Publicación Internacional PCT WO 93/01288; McCafferty *et al.* Publicación Internacional PCT No. WO 92/01047; Garrard *et al.* Publicación Internacional PCT No. WO 92/09690; Ladner *et al.* Publicación Internacional PCT No. WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.*, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137; Barbas *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982; y McCafferty *et al.* *Nature* (1990) 348:552-554.

5. Anticuerpos Quiméricos y Humanizados

Adicionalmente, anticuerpos recombinant, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden porciones humanas y no humanas, que se pueden preparar usando técnicas de ADN recombinante, están dentro del alcance de la invención.

El término "inmunoglobulina humanizada" o "anticuerpo humanizado" se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo que incluye al menos una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo humanizada (p.e., al menos una cadena ligera o pesada humanizada). El término "cadena de inmunoglobulina humanizada" o "cadena de anticuerpo humanizada" (p.e., una "cadena ligera de inmunoglobulina humanizada" o "cadena pesada de inmunoglobulina humanizada") se refiere a una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo (p.e., una cadena ligera o pesada, respectivamente) que tiene una región variable que incluye una región de marco variable sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano y regiones determinantes de

complementariedad (CDRs) (p.e., al menos una CDR, preferiblemente dos CDR, más preferiblemente tres CDR) sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano, y que incluye además regiones constantes (p.e., al menos una región constante o porción de la misma, en el caso de una cadena ligera, y tres regiones constantes en el caso de una cadena pesada). El término "región variable humanizada" (p.e., "región variable de cadena ligera humanizada" o "región variable de cadena pesada humanizada") se refiere a una región variable que incluye una región de marco variable sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano y regiones determinantes de complementariedad (CDR) sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano.

La frase "sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano" o "sustancialmente humano" significa que, cuando se alinean a una secuencia de inmunoglobulina o anticuerpo humano para propósitos de comparación, la región comparte al menos 80-90%, 90-95%, o 95-99% de identidad (p.e., identidad de secuencia local) con secuencia de la región de marco o constante humana, permitiendo, por ejemplo, sustituciones conservativas, sustituciones de secuencia de consenso, sustituciones de línea germinal, retromutaciones, y similares. La introducción de sustituciones conservativas, sustituciones de secuencia de consenso, sustituciones de línea germinal, retromutaciones, y similares, es a menudo referida como "optimización" de un anticuerpo o cadena humanizada. La frase "sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano" o "sustancialmente no humano" significa que tiene una secuencia de inmunoglobulina o anticuerpo al menos 80-95%, preferiblemente al menos 90-95%, más preferiblemente, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la de un organismo no humano, p.e., un mamífero no humano.

En consecuencia, todas las regiones o residuos de una inmunoglobulina o anticuerpo humanizado, o de una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo

humanizada, excepto las CDR, son sustancialmente idénticas a las regiones o residuos correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulina humana nativas. El término "región correspondiente " o "residuo correspondiente" se refiere a una región o residuo en una segunda secuencia de amino ácido o nucleótido que ocupa la misma posición (p.e., equivalente) que una región o residuo en una primera secuencia de amino ácido o nucleótido, cuando la primera y segunda secuencias son alineadas óptimamente para propósitos de comparación.

El término "identidad significativa" significa que dos secuencias de polipéptido, cuando se alinean óptimamente, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de intervalos por omisión, comparten al menos 50-60% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 60-70% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 70-80% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 80-90% de identidad de secuencia, incluso más preferiblemente al menos 90-95% de identidad de secuencia, e incluso más preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia o más (p.e., 99% de identidad de secuencia o más). El término "identidad sustancial" significa que dos secuencias de polipéptido, cuando se alinean óptimamente, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de intervalos por omisión, comparten al menos 80-90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 90-95% de identidad de secuencia, y más preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia o más (p.e., 99% de identidad de secuencia o más). Para comparación de secuencia, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia con la cual se comparan las secuencias de prueba. Al usar un algoritmo de comparación de secuencia, las secuencias de prueba y referencia son ingresadas a una computadora, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia entonces calcula el

porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de prueba con relación a la secuencia de referencia, con base en los parámetros de programa designados.

La alineación óptima de secuencias para comparación puede ser conducida, p.e., mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (*ver generalmente Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology*). Un ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990). El software para realizar los análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional para Información de Biotecnología (accesible públicamente a través de los servidores de Internet de los Institutos Nacionales de Salud NCBI). Típicamente, se pueden usar los parámetros del programa por defecto para realizar la comparación de secuencia, aunque también se pueden usar parámetros especificados. Para las secuencias de amino ácido, el programa BLASTP usa como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (*ver Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)).

Preferiblemente, las posiciones de residuo que no son idénticas difieren por sustituciones de amino ácido conservativas. Para propósitos de clasificar las sustituciones de amino ácidos como conservativas o no conservativas, los

amino ácidos son agrupados de la siguiente forma: Grupo I (cadenas laterales hidrofóbicas): leu, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrofílicas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gin, his, lys, arg; Grupo V (residuos que influencias la orientación de la cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservativas involucran sustituciones entre amino ácidos de la misma clase. Las sustituciones no conservativas constituyen el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

Preferiblemente, las inmunoglobulinas o anticuerpos humanizados se unen a antígeno con una afinidad que está dentro de un factor de tres, cuatro, o cinco de la del anticuerpo no humanizado correspondiente. Por ejemplo, si el anticuerpo no humanizado tiene una afinidad de unión de 10^{-9} M, los anticuerpos humanizados tendrán una afinidad de unión de al menos 3×10^{-8} M, 4×10^{-8} M, 5×10^{-8} M, o 10^{-9} M. Al describir las propiedades de una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo, la cadena puede describirse con base en su habilidad para "dirigir la unión a antígeno (p.e., A β)". Se dice que una cadena "dirige la unión a antígeno" cuando le confiere a una inmunoglobulina o anticuerpo intacto (o fragmento de unión a antígeno del mismo) una propiedad de unión o afinidad de unión específica. Se dice que una mutación (p.e., una retromutación) afecta sustancialmente la habilidad de una cadena pesada o ligera para unión a antígeno si afecta (p.e., disminuye) la afinidad de unión de una inmunoglobulina o anticuerpo intacto (o fragmento de unión a antígeno del mismo) que comprende dicha cadena en al menos un orden de magnitud comparado con el del anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo) que comprende una cadena equivalente que carece de dicha mutación. Una mutación "no afecta sustancialmente (p.e., disminuye) la habilidad de una cadena para dirigir la unión a anticuerpo" si esta afecta (p.e., disminuye) la afinidad de unión de una inmunoglobulina o anticuerpo intacto (o fragmento de

unión a antígeno del mismo) que comprende dicha cadena en solamente un factor de dos, tres o cuatro el del anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno) que comprende una cadena equivalente que carece de dicha mutación.

El término "inmunoglobulina" o anticuerpo "quimérico" se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo cuyas regiones variables se derivan de una primera especie y cuyas regiones constantes se derivan de una segunda especie. Las inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos pueden ser contruidos, por ejemplo, mediante ingeniería genética, a partir de segmentos de gen de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Los términos "inmunoglobulina humanizada" o "anticuerpo humanizado" no pretenden abarcar inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, definidos *infra*. Aunque las inmunoglobulinas o anticuerpos humanizados son quiméricos en su construcción (p.e., comprenden regiones de más de una especie de proteína), incluyen características adicionales (p.e., regiones variables que comprenden residuos de CDR donadoras y residuos de marco aceptores) no encontrados en las inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, aquí definidos.

Tales anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo usando métodos descritos en Robinson *et al.*, Solicitud Internacional No. PCT/US86/02269; Akira, *et al.* Solicitud De Patente Europea 184,187; Taniguchi, M., Solicitud de Patente Europea 171,496; Morrison *et al.* Solicitud De Patente Europea 173,494; Neuberger *et al.* Publicación Internacional PCT No. WO 86/01533; Cabilly *et al.* Patente U.S. No. 4,816,567; Cabilly *et al.* Solicitud De Patente Europea 125,023; Better *et al.* (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214- 218; Nishimura *et al.* (1987) *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314:446-449; y Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-

1559); Morrison, S.L. (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) *BioTechniques* 4:214; Winter Patente U.S. 5,225,539; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321 :552-525; Verhoeyan *et al.* (1988) *Science* 239:1534; y Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060. Los agentes terapéuticos también incluyen imitadores de anticuerpo tales como imitadores de región determinante de complementariedad (CDR).

6. Anticuerpos Humanos a partir de Animales Transgénicos y Despliegue del Fago

Alternativamente, ahora es posible producir animales transgénicos (p.e., ratones) que son capaces, a la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en la presencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal produce inhibición completa de la producción de anticuerpo endógena. La transferencia del arreglo de gen de inmunoglobulina de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal resulta en la producción de anticuerpos humanos a la exposición del antígeno. Ver, p.e., Patentes U.S. Nos. 6,150,584; 6,114,598; y 5,770,429.

Los anticuerpos totalmente humanos también pueden ser derivados de librerías de despliegue del fago (Hoogenboom *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)). Los anticuerpos policlonales quiméricos también pueden ser obtenidos de librerías de despliegue del fago (Buechler *et al.* Patente U.S. No. 6,420,113).

7. Anticuerpos Biespecíficos, Polipéptidos de Fusión a Anticuerpo y Anticuerpos de Cadena Sencilla

Los anticuerpos biespecíficos (BsAbs) son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Tales anticuerpos pueden ser derivados de anticuerpos de longitud total o fragmentos de anticuerpo (p.e., anticuerpos biespecíficos F(ab)'₂). Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud total se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein *et al*, Nature, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diferentes moléculas de anticuerpo (ver, WO 93/08829 y en Traunecker *et al*, EMBO J., 10:3655-3659 (1991)).

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede estar acoplado a avidina, el otro a biotina u otra carga. Los anticuerpos heteroconjugados se pueden preparar usando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Los agentes de entrecruzamiento adecuados son bien conocidos en la técnica, y se revelan en la Patente U.S. No. 4,676,980, junto con un número de técnicas de entrecruzamiento.

En aún otro aspecto, el anticuerpo puede estar fusionado, químicamente o genéticamente, a una carga tal como una mitad reactiva, detectable, o funcional, por ejemplo, una inmunotoxina para producir un polipéptido de fusión a anticuerpo. Tales cargas incluyen, por ejemplo, inmunotoxinas, quimioterapéuticos, y radioisótopos, todos los cuales son bien conocidos en la técnica.

Los anticuerpos de cadena sencilla también son adecuados para estabilización de acuerdo con la invención. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) con un enlazante, que permite que cada región variable se conecte entre sí y recree el sitio de unión a antígeno del anticuerpo base del cual se derivan las regiones VL y VH. Ver Gruber et al, J. Immunol, 152:5368 (1994).

Se entiende que cualquiera de las moléculas de polipéptido anteriores, solas o en combinación, son adecuadas para la preparación como formulaciones estabilizadas de acuerdo con la invención.

XI. Sujetos Susceptibles a Tratamiento

Los sujetos o pacientes susceptibles a tratamiento incluyen individuos en riesgo de enfermedad pero que no muestran síntomas, así como pacientes que al presente muestran síntomas. Por lo tanto, los métodos presentes pueden ser administrados profilácticamente a la población en general sin la necesidad de ninguna evaluación del riesgo del paciente sujeto. Los métodos presentes son específicamente útiles para individuos que si tienen un riesgo genético conocido de trastornos autoinmunes. Tales individuos incluyen aquellos que tienen familiares que han experimentado esta enfermedad y aquellos cuyo riesgo es determinado mediante análisis de marcadores genéticos o bioquímicos.

Los pacientes que sufren de amiloidosis AA pueden ser asintomáticos por un período de tiempo prolongado. Por lo tanto, el diagnóstico clínico de la amiloidosis AA es a menudo retardado o no se hace hasta que los depósitos amiloides son extensos. Para aquellos pacientes que son asintomáticos, se

estima que solamente el 53% de los casos son diagnosticados. Ver L. E. K. Consulting, Independent Market Research (2003).

La invención provee métodos útiles para tratar o efectuar profilaxis de una enfermedad caracterizada por la deposición de una proteína amiloide, tal como, por ejemplo, las enfermedades descritas anteriormente, incluyendo aquellas listadas en la Tabla 1. Algunos métodos son útiles para tratar o efectuar profilaxis de una enfermedad caracterizada por la deposición de una proteína amiloide que comprende la secuencia de amino ácido ED. En algunos métodos, si la proteína amiloide comprende la secuencia de amino ácido AEDV, entonces el anticuerpo no es administrado para tratar o efectuar profilaxis de la enfermedad de Alzheimer o Deterioro Cognitivo Leve. La proteína amiloide puede ser cualquiera de las proteínas amiloides descritas anteriormente, incluyendo las listadas en la Tabla 1, tal como, por ejemplo, proteína A amiloide en suero, proteína de cadena ligera de inmunoglobulina, tal como, por ejemplo, Vλ6 Wil o VK, polipéptido precursor de amiloide de islote humano (IAPP), péptido beta amiloide, transtiretina (TTR) o ApoA1.

Los métodos presentes son especialmente útiles para individuos que no tienen un riesgo conocido, se sospecha que tienen, o han sido diagnosticados con amiloidosis AA o amiloidosis AL. Tales individuos incluyen, pero no se limitan a aquellos que tienen enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades inflamatorias heredadas, e infecciones microbianas crónicas, tales como artritis reumatoide, artritis juvenil crónica, espondilitis anquilosante, soriasis, artropatía soriática, síndrome de Reiter, Enfermedad de Still del Adulto, síndrome de Behcet, enfermedad de Crohn, Fiebre Mediterránea Familiar, lepra, tuberculosis, bronquiéctasis, úlceras por decúbito, pielonefritis crónica, osteomielitis, enfermedad de Whipple, mieloma, macroglobulinemia, discrasia de inmunocito, gammopatía monoconal, discrasia oculta. Las condiciones inflamatorias e infecciosas crónicas son prerequisite para el

desarrollo de amiloidosis AA y amiloidosis AL manifestadas por amiloidosis nodular local pueden estar asociadas con enfermedades inflamatorias crónicas. Los individuos que si tienen un riesgo conocido de amiloidosis AA también incluyen, pero no se limitan a aquellos que tienen neoplasmas malignos como linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas de intestino, pulmón y tracto urogenital, carcinoma de célula basal, y leucemia de célula vellosa. Adicionalmente, los individuos que si tienen un riesgo conocido de amiloidosis AA también incluyen, pero no se limitan, a aquellos que tienen trastornos linfoproliferativos tal como la Enfermedad de Castleman.

Tanto en pacientes asintomáticos como sintomáticos, el tratamiento puede empezar en cualquier momento antes o después del diagnóstico de la enfermedad amiloide AA o AL subyacente. El tratamiento típicamente involucra múltiples dosificaciones durante un período de tiempo. El tratamiento puede ser monitoreado ensayando el anticuerpo, las respuestas de célula T (un efecto secundario) o célula B activadas al agente terapéutico (p.e., péptido AA), o empleando Cintigrafía SAP radiomarcada en el tiempo. Si la respuesta falla, se indica una dosificación de refuerzo.

XII. Regímenes de Tratamiento

En general, los regímenes de tratamiento involucran la administración de un agente efectivo para inducir una respuesta inmunogénica a una proteína amiloide, y preferiblemente a una forma agregada de tal proteína amiloide, tal como, por ejemplo, AA o AL. Preferiblemente, un fragmento inmunogénico de AA o AL o un fragmento X_1EDX_2 es administrado a un paciente. En las aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o medicamentos son administrados a un paciente susceptible a, o de otra forma en riesgo de amiloidosis, tal como Amiloidosis AA o amiloidosis AL, en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la severidad, o retrasar la

aparición de la enfermedad, incluyendo los síntomas fisiológicos, bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, se administra un agente a un paciente que se sospecha o que ya sufre de tal enfermedad, en un régimen que comprende una cantidad y frecuencia de administración del agente suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, o inhibir el deterioro de los síntomas de la enfermedad (fisiológicos, bioquímicos, histológicos y/o conductuales), incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad. En algunos métodos, la administración del agente reduce o elimina la sintomatología temprana en pacientes que aún no han desarrollado la patología característica de la Amiloidosis AA o AL. Una cantidad adecuada para realizar tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis terapéuticamente o profilácticamente efectiva. Una combinación de cantidad y frecuencia de dosis adecuada para realizar el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como un régimen terapéuticamente o profilácticamente efectivo. En ambos regímenes profiláctico y terapéutico, los agentes son usualmente administrados en varias dosificaciones hasta que se haya logrado una respuesta inmune suficiente. Una dosificación y frecuencia de administraciones adecuadas para realizar el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como un régimen terapéuticamente o profilácticamente efectivo. Típicamente, la respuesta inmune del paciente es monitoreada y se administran dosis repetidas si la respuesta inmune empieza a decaer. La respuesta inmune puede ser monitoreada detectando anticuerpos, por ejemplo, a AA o AL en la sangre del paciente o detectando niveles de, por ejemplo, AA o AL.

La dosis efectiva de los agentes y composiciones de la presente invención, para el tratamiento de las condiciones descritas anteriormente varía dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo el medio de

administración, el sitio objetivo, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otras medicaciones administradas, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Usualmente, el paciente es un humano pero también se pueden tratar mamíferos no humanos incluyendo mamíferos transgénicos. Las dosificaciones de tratamiento requieren ser tituladas para optimizar la seguridad y eficacia. La cantidad de inmunógeno depende si también se administra el adyuvante, requiriéndose mayores dosis en la ausencia de adyuvante. La cantidad de un inmunógeno para administración algunas veces varía de 1-500 μg por paciente, y más usualmente de 5-500 μg por inyección para administración humana. Ocasionalmente se usa una dosis mayor de 1-2 mg por inyección. Típicamente, al menos 10, 20, 50 o 100 μg se usan para cada inyección humana. La masa de inmunógeno también depende de la relación en masa de epítipo inmunogénico en el inmunógeno a la masa de inmunógeno como un todo. Típicamente se usan 10^{-3} a 10^{-5} micromoles de epítipo inmunogénico por microgramo de inmunógeno. El esquema de inyecciones puede variar significativamente desde una vez al día, a una vez al año, a una vez por década. En cualquier día dado en que se administra una dosificación de inmunógeno, la dosificación es mayor de 1 μg /paciente y usualmente mayor a 10 μg /paciente si también se administra adyuvante, y mayor de 10 μg /paciente, y usualmente mayor de 100 μg /paciente en la ausencia de adyuvante. Un régimen típico consiste de una inmunización seguida por inyecciones de refuerzo en intervalos de tiempo, tal como intervalos de 6 semanas. Otro régimen consiste en una inmunización seguida por inyecciones de refuerzo 1, 2 y 12 meses después. Otro régimen implica una inyección cada dos meses de por vida. Alternativamente, las inyecciones de refuerzo pueden ser en una base irregular indicada al monitorear la respuesta inmune.

Las dosis para ácidos nucleicos que codifican inmunógenos varía de aproximadamente 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 mg, 1 μg a 10 mg, o 30-300 μg de

ADN por paciente. Las dosis para vectores virales infecciosos varían de 10-100, o más viriones por dosis.

Para inmunización pasiva con un anticuerpo (en terapias de combinación), la dosificación varía de aproximadamente 0.0001 a 100 mg/kg, 0.5 a menos de 5 mg/kg, y más usualmente 0.01 a 5 mg/kg, 0.5 a 3 mg/kg, de peso corporal del hospedero. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal, o en el rango de 1-10 mg/kg o en otras palabras, 70 mg o 700 mg o en el rango de 70-700 mg, respectivamente, para un paciente de 70 kg. Como un ejemplo adicional, las dosificaciones pueden ser de menos de 5 mg/kg de peso corporal o 1.5 mg/kg de peso corporal o en el rango de 0.5 a 1.5 mg/kg, preferiblemente al menos 1.5 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración una vez cada dos semanas o una vez cada 3 a 6 meses. En algunos métodos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonal con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado está en los rangos indicados. El anticuerpo es usualmente administrado en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones únicas pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares indicados midiendo los niveles de anticuerpo AA en sangre del paciente. En algunos métodos, la dosificación es ajustada para lograr una concentración de anticuerpo en plasma de 1-1000 µg/ml y en algunos métodos 25-300 µg/ml. Alternativamente, el anticuerpo puede ser administrado como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere de administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida media más larga, seguida por anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos no humanos. La dosificación y frecuencia de administración pueden variar dependiendo si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, una dosis

relativamente baja es administrada a intervalos relativamente poco frecuentes en un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento por el resto de sus vidas. En las aplicaciones terapéuticas, algunas veces se requiere una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduzca o termine la progresión de la enfermedad, y preferiblemente hasta que el paciente muestre mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, el paciente puede ser administrado en un régimen profiláctico.

Los agentes para inducir una respuesta inmune pueden ser administrados por medios parenterales, tópicos, intravenosos, orales, subcutáneos, intraarteriales, intracraneales, intraperitoneales, intranasales o intramusculares para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. La ruta de administración más típica de un agente inmunogénico es la subcutánea aunque otras rutas pueden ser igualmente efectivas. La siguiente ruta más común es la inyección intramuscular. Este tipo de inyección se realiza más típicamente en los músculos del brazo o la pierna. En algunos métodos, los agentes son inyectados directamente en un tejido particular donde los depósitos se han acumulado, p.e., inyección intracraneal. Se prefiere la inyección intramuscular o infusión intravenosa para administración del anticuerpo (en terapias de combinación). En algunos métodos, los anticuerpos terapéuticos particulares son administrados directamente en el cráneo. En algunos métodos, los anticuerpos son administrados como una composición o dispositivo de liberación sostenida, tal como un dispositivo MEDIPAD™.

Los agentes de la invención son a menudo administrados como composiciones farmacéuticas que comprenden un agente terapéutico activo, p.e., y una variedad de otros componentes farmacéuticamente aceptables. Ver *Remington's Pharmaceutical Science* (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980). La forma preferida depende del modo de

administración previsto y la aplicación terapéutica. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, vehículos o diluyentes no tóxicos, farmacéuticamente aceptables, que se definen como vehículos usados comúnmente para formular composiciones farmacéuticas para administración animal o humana. El diluyente se selecciona con el fin de no afectar la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica amortiguada con fosfato, soluciones de Ringer, solución de dextrosa, solución de Hank. En adición, la composición o formulación farmacéutica puede también incluir otros vehículos, adyuvantes, o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmuno'genicos y similares.

Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir macromoléculas grandes, lentamente metabolizadas tales como proteínas, polisacáridos tales como quitosan, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (tales como SEPHAROSE™ latex funcionalizada, agarosa, celulosa, y similares), amino ácidos poliméricos, copolímeros de amino ácido, y agregados lípidos (tales como gotas de aceite o liposomas). Adicionalmente, estos vehículos pueden funcionar como agentes inmunoestimuladores (p.e., adyuvantes).

Para administración parenteral, los agentes de la invención pueden ser administrados como dosis inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable, con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril tales como agua, aceites, solución salina, glicerol, o etanol. Adicionalmente pueden estar presentes en las composiciones sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsificantes, surfactantes, sustancias amortiguadoras de pH y similares. Otros componentes de las composiciones farmacéuticas son aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal, o sintético, por ejemplo, aceite de maní, aceite de

soja, y aceite mineral. En general, los glicoles tales como propileno glicol o polietileno glicol son vehículos líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. Los anticuerpos pueden ser administrados en la forma de una inyección de depósito o preparación de implante que puede ser formulada de tal manera que permita una liberación sostenida del ingrediente activo. Una composición ejemplar comprende anticuerpo monoclonal a 5 mg/mL, formulado en amortiguador acuoso que consiste de L-histidina 50 mM, NaCl 150 mM, ajustada hasta pH 6.0 con HCl. Las composiciones para administración parenteral son típicamente sustancialmente estériles, isotónicas y manufacturadas bajo condiciones GMP de la FDA u organismo similar.

Típicamente, las composiciones se preparan como inyectables, ya sea soluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede ser emulsificada o encapsulada en liposomas o micro partículas tales como polilactida, poliglicólido, o copolímero de efecto adyuvante mejorado, discutidas anteriormente (ver Langer, *Science* 249, 1527 (1990) y Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 97-119 (1997)). Los agentes de esta invención pueden ser administrados en la forma de una inyección de depósito o preparación de implante que pueden ser formuladas de manera que permitan una liberación sostenida o pulsátil del ingrediente activo.

Formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales, intranasales, y pulmonares, supositorios, y aplicaciones transdérmicas.

Para supositorios, los aglutinantes y vehículos incluyen, por ejemplo, polialquilen glicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden ser formados de mezclas que contienen el ingrediente activo en el rango de 0.5% a 10%,

preferiblemente 1%-2%. Las formulaciones orales incluyen excipientes, tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, y carbonato de magnesio. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, tabletas, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos, y contienen 10%-95% de ingrediente activo, preferiblemente 25%-70%.

La aplicación tópica puede producir liberación transdérmica o intradérmica. La administración tópica puede ser facilitada por la coadministración del agente con toxina del cólera o o derivados desintoxicados o subunidades de la misma u otras toxinas bacterianas similares (Ver Glenn et al., *Nature* 391, 851 (1998)). La coadministración se puede ligar usando los componentes como una mezcla o como moléculas enlazadas obtenidas por reticulación química o expresión como una proteína de fusión.

Alternativamente, la liberación transdérmica se puede lograr usando un parche de piel o usando transferosomas (Paul et al., *Eur. J. Immunol.* 25, 3521-24 (1995); Cevc et al., *Biochem. Biophys. Acta* 1368, 201-15 (1998)).

XIII Regímenes de Tratamiento de Terapia de Fármaco Combinacional

La terapia de combinación de acuerdo con la invención se puede realizar sola o en conjunción con otra terapia para tratar o efectuar profilaxis de amiloidosis AA. La terapia de combinación de acuerdo con la invención puede también realizarse en conjunción con otra terapia que trata o efectúa profilaxis de una enfermedad amiloide subyacente tales como enfermedades inflamatorias, infecciones microbianas crónicas, neoplasmas malignos, enfermedades inflamatorias heredadas, y trastornos linfoproliferativos. Existe gran cantidad de tratamientos disponibles en uso comercial, en evaluación clínica y en desarrollo pre-clínico, que se podrían seleccionar para uso con la

invención revelada en la presente para efectuar profilaxis y tratamiento de amiloidosis AA mediante terapia de combinación de fármaco. Tales tratamientos pueden ser uno o más compuestos seleccionados de, pero sin limitarse a varias categorías importantes, a saber, (i) fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES; p.e., detoprofeno, diclofenaco, diflunisal, etodolac, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, meclofenamato, ácido mefenámico, meloxicam, nabumeona, naproxen sodio, oxaprozin, piroxicam, sulindac, tolmetina, celecoxib, rofecoxib, aspirina, salicilato de colina, salsalte, y salicilato de sodio y magnesio); (ii) esteroides (p.e., cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona); (iii) DMARDs, p.e., fármacos antireumáticos que modifican la enfermedad (p.e., ciclosporina, azatioprina, metotrexato, leflunomida, ciclofosfamida, hidroxicloroquina, sulfasalazina, D-penicilamina, minociclina, y oro); o (iv) proteínas recombinantes (p.e., ENBREL® (etanercept, un receptor de TNF soluble) y REMICADE® (infliximab) un anticuerpo anti-TNF monoclonal quimérico).

La duración de la terapia de combinación depende del tipo de enfermedad subyacente que se está tratando, la edad y condición del paciente, el estado y tipo de enfermedad del paciente, y cómo el paciente responde al tratamiento. El doctor puede observar los efectos de la terapia de manera cercana y hacer cualquier ajuste que sea necesario. Adicionalmente, una persona que tiene mayor riesgo de desarrollar Amiloidosis AA (p.e., una persona que está genéticamente predispuesta o que previamente tuvo un trastorno inflamatorio u otra enfermedad subyacente) o amiloidosis AL, puede recibir tratamiento profiláctico para inhibir o retrasar el desarrollo de los agregados AA o AL tales como fibrilos. La dosificación, frecuencia y modo de administración de cada componente de la combinación pueden ser controlados de manera independiente. Por ejemplo, un compuesto puede ser administrado oralmente tres veces al día, mientras que el segundocompuesto puede ser

administrado intramuscularmente una vez al día. La terapia de combinación puede ser dada en ciclos de encendido-y-apagado que incluyen períodos de descanso. Los compuestos también pueden ser formulados juntos de forma que una administración libere ambos compuestos. La combinación de la invención puede también ser proporcionada como componentes de un paquete farmacéutico. Los fármacos pueden ser formulados juntos o por separado y en cantidades de dosificación individuales. Cada compuesto es mezclado con una sustancia vehículo adecuada, y está generalmente presente en una cantidad de 1-95% en peso del peso total de la composición.

La composición puede ser proporcionada en una forma de dosificación que es adecuada para administración oral, parenteral (p.e., intravenosa, intramuscular, subcutánea), rectal, transdérmica, nasal, vaginal, inhalada, u ocular. Así, la composición puede estar en forma de, p.e., tabletas, cápsulas, píldoras, polvos, granulados, suspensiones, emulsiones, soluciones, geles incluyendo hidrogeles, pastas, ungentos, cremas, emplastos, empapados, dispositivos de liberación, supositorios, enemas, inyectables, implantes, atomizadores, o aerosoles. Las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional (ver, p.e., Remington: The Science y Practice of Pharmacy, (19th ed.) ed. A. R. Gennaro, 1995, Mack Publishing Company, Easton, Pa. y Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick y J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, N.Y.

XIV. Métodos de Monitoreo y Diagnóstico de Amiloidosis AA o AL

Los métodos de monitoreo o diagnóstico amiloidosis AA o AL incluyen medir las concentraciones en plasma de proteína SAA y C-reactiva, realizando biopsia de tejido (renal, rectal, gástrico, gingival, graso, salivar, glándulas labiales) e histología con tinción de rojo congo y/o inmunotinción con

anticuerpos específicos dirigidos a agregados AA o AL tales como fibrilos. La invención provee métodos para detectar una respuesta de anticuerpo contra péptido AA en un paciente que sufre de o es susceptible a Amiloidosis AA. Los métodos son particularmente útiles para monitorear un curso de tratamiento que es administrado a un paciente. Los métodos se pueden usar para monitorear tratamiento terapéutico en pacientes sintomáticos y tratamiento profiláctico en pacientes asintomáticos. Algunos métodos implican determinar un valor de línea basal de una respuesta de anticuerpo en un paciente antes de administrar una dosis de agente inmunogénico, y comparar esta con un valor para la respuesta inmune después del tratamiento. Un aumento significativo (p.e., mayor de el margen típico de error experimental en medidas repetidas de la misma muestra, expresado como una desviación estándar de la media de tales medidas) del valor de la respuesta de anticuerpo señala un resultado de tratamiento positivo (p.e., esa administración del agente ha logrado o aumentado una respuesta inmune). Si el valor para la respuesta de anticuerpo no cambia significativamente, o disminuye, se indica un resultado de tratamiento negativo. En general, se espera que los pacientes que se someten a un curso inicial de tratamiento con un agente inmunogénico muestren un aumento de la respuesta de anticuerpo con dosificaciones sucesivas, que eventualmente alcanzan una meseta. La administración del agente generalmente continúa mientras que la respuesta de anticuerpo aumenta. El logro de la meseta es un indicador que la administración del tratamiento puede ser descontinuada o reducida en dosis o frecuencia.

En otros métodos, se determina un valor de control (p.e., una media y una desviación estándar) de una respuesta de anticuerpo para una población de control. Típicamente, los individuos en la población de control no han recibido tratamiento previo. Los valores medidos de la respuesta de anticuerpo en un paciente después de administrar un agente terapéutico son entonces comparados con el valor de control. Un aumento significativo con relación al

valor de control (p.e., mayor de una desviación estándar de la media) indica un resultado de tratamiento positivo. Una falta de aumento significativo o una disminución indica un resultado de tratamiento negativo. La administración del agente generalmente continua mientras que la respuesta de anticuerpo aumenta con relación al valor de control. Como antes, el logro de una meseta con respecto a los valores de control es un indicador que la administración del tratamiento puede ser descontinuada o reducida en dosificación o frecuencia.

En otros métodos, se determina un valor de control de respuesta de anticuerpo (p.e., una media y desviación estándar) a partir de una población de control de individuos que se han sometido a tratamiento con un agente terapéutico y cuyas respuestas de anticuerpo han alcanzado una meseta al tratamiento. Los valores medidos de respuesta de anticuerpo en un paciente son comparados con el valor de control. Si el nivel medido en un paciente no es significativamente diferente (p.e., más de una desviación estándar) del valor de control, el tratamiento puede ser descontinuado. Si el nivel en un paciente está significativamente por debajo del valor de control, se garantiza la administración continuada del agente. Si el nivel en el paciente persiste por debajo del valor de control, entonces se puede indicar un cambio del régimen de tratamiento, por ejemplo, uso de un adyuvante diferente, fragmento o cambio a administración pasiva.

En otros métodos, un paciente que no está recibiendo actualmente tratamiento pero se ha sometido a curso de tratamiento previo es monitoreado para respuesta de anticuerpo para determinar si se requiere una reanudación del tratamiento. El valor medido de la respuesta de anticuerpo en el paciente puede ser comparado con un valor de respuesta de anticuerpo lograda previamente en el paciente después de un curso previo de tratamiento. Una disminución significativa con relación a la medida previa (p.e., mayor que el margen típico de error en medidas repetidas de la misma muestra) es una

indicación que el tratamiento puede ser reanudado. Alternativamente, el valor medido en un paciente puede ser comparado con un valor de control (media más desviación estándar) determinado en una población de pacientes después de someterse a un curso de tratamiento. Alternativamente, el valor medido en un paciente puede ser comparado con un valor de control en poblaciones de pacientes tratados profilácticamente que permanecen libres de síntomas de la enfermedad, o poblaciones de pacientes tratados terapéuticamente que muestran mejora de las características de la enfermedad. En todos estos casos, una disminución significativa con relación al nivel de control (p.e., más de una desviación estándar) es un indicador que el tratamiento debe ser reanudado en un paciente.

Algunos métodos emplean Cintigrafía de componente P amiloide de suero marcado con yodo-123 o yodo-125 (^{123}I -SAP o ^{125}I -SAP). ^{123}I -SAP o ^{125}I -SAP es inyectado intravenosamente en pacientes y observado con cámara gamma. La Cintigrafía SAP Radiomarcada es un método útil para monitorear la progresión de amiloidosis en pacientes y evaluar tratamientos. Es específica para amiloide y se puede usar para monitorear cuantitativamente la ubicación y cantidad de depósitos amiloides en pacientes. ^{123}I -SAP y ^{125}I -SAP no se acumula en sujetos saludables o en pacientes no amiloides. La sintigrafía SAP radiomarcada se puede usar para monitorear el recambio dinámico de amiloide, y puede evaluar la eficacia de los tratamientos destinados a retroceder los depósitos amiloides. Adicionalmente, la Cintigrafía SAP radiomarcada es no invasiva y provee barrido a todo el cuerpo. Los métodos de la invención implican determinar un valor de línea basal de una respuesta de anticuerpo en un paciente antes de administrar una dosis del agente, y comparar este con un valor para la respuesta inmune después del tratamiento en un paciente. Un aumento significativo (p.e., mayor que el margen típico de error experimental en mediciones repetidas de la misma muestra expresadas como una desviación estándar de la media de dichas mediciones) del valor de

la respuesta de anticuerpo indica un resultado de tratamiento positivo (p.e., que la administración del agente ha alcanzado o aumentado una respuesta inmune). Si el valor para la respuesta de anticuerpo no cambia significativamente, o disminuye, se indica un resultado de tratamiento negativo. En general, se espera que los pacientes que se someten a un curso inicial de tratamiento con un agente inmunogénico muestren un aumento de la respuesta de anticuerpo con dosificaciones sucesivas, lo cual eventualmente alcanza una meseta. La administración del agente generalmente continua mientras que la respuesta de anticuerpo aumenta. El logro de la meseta es un indicador que la administración de tratamiento puede ser descontinuada o reducida en dosis o frecuencia.

La muestra de tejido para análisis es típicamente sangre, plasma, suero, moco o fluido cerebroespinal del paciente. La muestra es analizada para indicación de una respuesta inmune a cualquier forma de péptido AA o AL. La respuesta inmune puede ser determinada a partir de la presencia de anticuerpos que se unen específicamente a péptido AA o AL. Los anticuerpos pueden ser detectados en un ensayo de unión a un ligando que se une específicamente a los anticuerpos. Típicamente, el ligando está inmovilizado. La unión puede ser detectada usando un anticuerpo anti-idiotípico marcado.

En regímenes de combinación que emplean administración activa y pasiva, se pueden usar enfoques análogos para monitorear los niveles de anticuerpo resultantes de la administración pasiva.

Los métodos de diagnóstico de amiloidosis también se pueden emplear, p.e., administrando a un sujeto un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que está unido a un marcador detectable, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo se une específicamente a un epítipo que incluye X_1EDX_2 en una proteína amiloide agregada, en donde X_1 y X_2 son cualquier amino

ácido, y detectar la presencia o ausencia del anticuerpo o fragmento del mismo unido. La detección del anticuerpo o fragmento unido soporta un diagnóstico de amiloidosis. Los anticuerpos y fragmentos útiles en el diagnóstico de amiloidosis incluyen los anticuerpos de la invención revelados.

Los anticuerpos o fragmentos de diagnóstico de la invención pueden ser administrados, mediante p.e., inyección intravenosa en el cuerpo de un paciente, o directamente al cerebro mediante inyección intracranial. La dosificación de anticuerpo es fácilmente determinada por el experto en la técnica. Típicamente, el anticuerpo está marcado, aunque en algunos métodos, el anticuerpo no está marcado y se usa un agente de marcado secundario para unirse al anticuerpo. La elección del marcador depende del medio de detección. Por ejemplo, un marcador fluorescente es adecuado para detección óptica. El uso de marcadores paramagnéticos es adecuado para detección tomográfica sin intervención quirúrgica. Se pueden usar radiomarcadores que incluyen ^{211}At , ^{212}Bi , ^{67}Cu , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{32}P , ^{212}Pb , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, o ^{90}Y . Tales marcadores pueden ser detectados usando PET o SPECT u otra técnica adecuada. El diagnóstico también se puede realizar comparando el número, tamaño, y/o intensidad de los puntos marcados, con valores de línea basal correspondientes. Los valores de línea basal pueden representar los niveles medios en una población de individuos no enfermos. Los valores de línea basal también pueden representar niveles previos determinados en el mismo paciente. Por ejemplo, los valores de línea basal pueden ser determinados en un paciente, y los valores medidos posteriormente, comparados con los valores de línea basal. Un aumento de los valores con relación a la línea basal soporta un diagnóstico de amiloidosis AA.

Los métodos de diagnóstico de la invención se pueden usar para diagnosticar enfermedades amiloidosis incluyendo amiloidosis AA, amiloidosis AL, enfermedad de Alzheimer, Deterioro Cognitivo Leve, polineuropatía

amiloide, fiebre Mediterránea, síndrome de Muckle-Wells, amiloidosis sistémica reactiva con enfermedades inflamatorias sistémicas, mieloma o amiloidosis asociada con macroglobulinemia, amiloidosis asociado con discrasia de inmunocito, gammopatía monoclonal, discrasia oculta, o amiloidosis nodular local con enfermedades inflamatorias crónicas.

XV. Modelos de Animal de Amiloidosis AA

La amiloidosis AA puede ser inducida experimentalmente en ratones en los cuales las concentraciones de SAA están marcadamente aumentadas por inyección de nitrato de plata, caseína, o lipopolisacárido. Estos agentes estimulan la producción de citoquinas. Ver Skinner et al. *Lab Invest.* 36:420-427 (1997) y Kisilevsky et al. *Bailliere 's Clin. Immunol. Immunopathol.* 8(3) 613-626 (1994). Entre las semanas 2 o 3 después de el estímulo inflamatorio, los animales desarrollan depósitos AA sistémicos, como los encontrados en pacientes con Amiloidosis AA. Esta fase de retraso es dramáticamente acortada cuando los ratones son administrados, concomitantemente, con una inyección intravenosa de proteína extraída de bazo o hígado de ratón cargado con amiloide AA. Ver Axelrad et al. *Lab Invest.* 47(2): 139-46 (1982). La actividad amiloidogénica acelerante de tales preparaciones fue denominada "factor amiloide mejorador" (AEF). Lundmark et al. reporta que el principio activo del AEF es inequívocamente la fibra AA en sí. Adicionalmente, demostraron que este material es extremadamente potente, siendo activo en dosis de menos de 1 ng, y que retuvo su actividad biológica durante un tiempo considerable. De manera notable, el AEF también fue efectivo cuando se administró oralmente. Concluyeron que AA y tal vez otras formas de amiloidosis son enfermedades transmisibles, similar a los trastornos asociados con el prión. Ver Lundmark et al. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99: 6979-6984 (2002).

El amiloide AA también puede ser inducido en cepas transgénicas de ratones que portan el gen de interleucina 6 humana bajo el control del promotor de metalotioneina-1 produciendo concentraciones marcadamente aumentadas de SAA y desarrollando amiloide en el bazo, hígado y riñones a los 3 meses de edad. Al momento de la muerte a aproximadamente los 8-9 meses, los órganos de estos ratones transgénicos tienen depósitos amiloides extensos. Ver Solomon et al., *Am. J. Pathol.* 154(4):1267-1272 (1999).

El modelo de ratón transgénico de Enfermedad Amiloide Transgénica Inducida Rápidamente (TRIAD) es un mejoramiento del modelo de ratón transgénico descrito anteriormente. Los ratones TRIAD portan el gen de interleucina 6 humana bajo el control del promotor de histocompatibilidad H-2L^D. La administración de AEF a ratones TRIAD de 8 semanas produce depósitos amiloides AA esplénicos y hepáticos prominentes en 3 a 4 semanas. Posteriormente, este proceso progresa a otros órganos, conduciendo a la muerte 4-6 semanas después. El desarrollo de la amiloidosis sistémica es acelerado comparado con el modelo de ratón transgénico descrito anteriormente. Ver University of Tennessee Research Corporation, WO 01/77167, Pharmacopeia, WO 95/35503 y Scripps, WO 95/30642 Wall et al. *Amyloid* 12(3): 149-156 (2005) (cada uno de los cuales está incorporado mediante referencia para todos los propósitos). El mono tití común (*Callithrix jacchus*) es un primate del Nuevo Mundo nativo del Brasil que ha sido usado bastante en investigación biomédica. Ludlage et al., reporta que se encontró que el mono tití común tiene depósitos amiloides en uno o más órganos, incluyendo el hígado, glándulas adrenales, riñones, e intestino. Los autores proponen que factores hereditarios pueden ser los responsables del desarrollo de amiloidosis AA en este primate. En este aspecto, el mono tití común podría servir como un modelo experimental único para estudio de la patogénesis y terapia de AA y otros trastornos amiloides sistémicos. Ver Ludlage et al. *Vet Pathol* 42: 117-124 (2005).

Las especies Shar Pei de perro, una raza que tiene una secuencia de AA con el motivo -AEDS y que es particularmente susceptible a amiloidosis AA, provee un modelo que se encuentra naturalmente de AA sistémica en la cual evaluar aplicaciones diagnósticas y terapéuticas novedosas de anticuerpos específicos de amiloide AA y otros compuestos.

EJEMPLOS

Ejemplo I. Fragmentos AA.

Los péptidos correspondientes a los amino ácidos 71-75 - GHEDT, descritos por Yamamoto y Migita *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:2915-2919 fueron sintetizados por AnaSpec, San Jose, CA, USA. Se elevaron anticuerpos policlonales (Pab) AA y se aisló la fracción de inmunoglobulina, como se describió previamente en Bard, F. et al., (2000) *Nat. Med.* 6, 916-919.

Ejemplo II. Inmunógeno para Preparación de Anticuerpos Murinos.

Se usó el epítipo GHEDT, (SEQ ID NO: 3) con un enlazante CG en su terminal N. El péptido EPRB-39, que contiene el epítipo es acoplado a anticuerpo de oveja anti-ratón. El EPRB-39 s obtenido de Anasec, San Jose, CA. Los anticuerpos producidos parecen ser neoepítipo específico porque no se unen específicamente a un péptido que se extiende en la región GHEDTIADQE, (SEQ ID NO: 89).

Ejemplo III. Procedimientos de Inmunización.

Ratones A/J de seis semanas fueron inyectados intraperitonealmente con 50 ug de IgG EPRB-39/oveja anti-ratón con Adyuvante de Freund

Completo (CFA) seguido por adyuvante de Freund Incompleto (IFA) semana por medio para un total de tres inyecciones. Tres días antes de la fusión, la vena de la cola fue inyectada con 50 ug de IgG SAM EPRB-39 en 90 ul de PBS. El título se estimó a 1/10000 a partir de ELISA con alto fondo

JH80 es el número de fusión para EPRB-39. La siguiente es una lista de los clones y los clones de dilución limitante que son activos:

7D8.29.19.47*, 39,66	IgG2b k
8G9.3.4.51.22*, 30,46	IgG2b k
2A4.20.44.77*, 13,14	IgG2b k

7D47, 8G9 y 2A77 indican subclones preferidos. Los anticuerpos producidos parecen ser neoepítipo específico porque no reaccionan con un péptido que se extiende en el sitio de clivado del terminal C de SAA.

Ejemplo IV. Unión de Anticuerpo a AA Agregado y Soluble.

Se realizaron títulos en suero (determinados mediante dilución serial) y unión de anticuerpo monoclonal a AA agregado mediante ELISA como se describe brevemente en Schenk D. et al, (1999) *Nature* 400, 173-177. El AA soluble se refiere a los fibrilos AA sonicados en dimetil sulfóxido. Las diluciones seriales de anticuerpo se incubaron con 50,000 cpm de ¹²⁵I-AA durante la noche a temperatura ambiente. 50 µl de una suspensión que contiene 75 mg/ml de proteína A sefarosa (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)/200 µg IgG anti-ratón de conejo (H+L) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) se incubaron con los anticuerpos diluidos por 1 hr a temperatura ambiente, se lavaron dos veces, y contaron en un contador gamma Wallac gamma (PerkinElmer Life Science, Grove, IL, USA). Todos los pasos se realizaron en

amortiguador de radioinmunoensayo que consiste de Tris 10 mM, NaCl 0.5 M, 1 mg/ml de gelatina, y 0.5% de Nonidet P-40, pH 8.0.

Ejemplo V. Análisis de la Estructura V λ 6 Wil.

Las secuencias de los genes de línea germinal de cadena ligera de inmunoglobulina V κ y V λ se ilustran en las Figuras 21 y 22. Con excepción de los subgrupos κ 1a, λ 1a, λ 3a, y λ 3c, hay un residuo Glu-Asp emparejado en las posiciones 81 y 82 en todas las secuencias de gen de línea germinal V κ y V λ (Figuras 21 y 22). En adición, un segundo emparejamiento Glu-Asp codificado en una segunda línea germinal en las posiciones 50 y 51 es único para el gen de línea germinal V λ 6. Así, V λ 6 Wil contiene ambos pares Glu-Asp 50-51 y 81-82. Las cadenas laterales de los residuos 50 y 51 son ambas accesibles en la superficie de V λ 6 Wil, como se muestra en la cristalografía de Rayos X (Figura 24). En contraste, solamente la cadena latera de Glu81 está expuesta en la superficie y la cadena lateral de Asp82 está parcialmente enterrada y parece interactuar (ya sea mediante inreracciones electrostáticas o unión con H) con las cadenas laterales de Lys79 y Arg61 (Figura 25).

Con base en estos análisis de la estructura de crystal de rayos X, y la disponibilidad relativa de las cadenas laterales de Giu-Asp, Los solicitantes concluyen que el Glu81 enterrado se vuelve accesible a medida que en dominio entra a una estructura agregada (p.e., fibrillar) (o se vuelve parcialmente desnaturalizado), exponiendo así lo que de otra forma está oculto, un epítipo críptico.

Ejemplo VI. Análisis de Unión de Anticuerpo Monoclonal Anti-AA a V λ 6.

A. Resonancia de Plasmón Superficial

La resonancia de plasmón superficial se usó para establecer la cinética de unión de varios anticuerpos monoclonales con fibrilos y monómeros V λ 6 Wil y. A una concentración de 6.6 nM todos los 3 anticuerpos unidos a los fibrilos de V λ 6 Wil sintéticos inmovilizados con un KD de ~ 1 nM – un valor comparable con el encontrado para su reactividad con fibrilos AA murinos (Figura 26). La desviación (expresada en RU) durante la fase de unión fue similar para los mAbs 7D8 y 2A4 pero fue 50% menor para 8G9. Esto sugiere que la densidad de este anticuerpo sobre los fibrilos fue menor que los otros 2 reactivos, porque las afinidades calculadas eran similares para los 3 anticuerpos. Un mAb IgG1 sirvió como un control y no mostró unión a fibrilos V λ 6 Wil.

La titulación del mAb 7D8 en el rango de 6.6 nM a 33.3 nM produjo la disminución esperada de la desviación máxima asociada con *kon* (Figura 27). En general, las cinéticas de unión fueron similares en cada concentración, aunque en estos experimentos piloto el valor de KD para 7D8 a 26.6 nM difirió del obtenido a otras concentraciones.

Para evaluar la especificidad de la reacción y asegurar que la unión de los mAbs con los fibrilos ocurrió por medio de la interacción clásica F(ab)-antígeno (contraria a la unión mediada por Fc o la adsorción no específica), los datos de unión fueron adquiridos en la presencia del péptido inmunógeno (p39) a 20 y 1 μ g/mL (Fig. 8). El péptido p41 que no se une al mAb 7D8 a bajas concentraciones, sirvió como un control. En la presencia de 20 μ g/mL de péptido p41, la cinética de unión para mAb 7D8 con fibrilos V λ 6 Wil fue idéntica al 7D8 solo. En contraste, el péptido inmunógeno p39 a 1 μ g/mL causó una disminución > 2 veces en la magnitud de la unión determinada por la desviación de la señal medida (Figura 28). La inhibición de unión a fibrilo de 7D8 fue casi completamente cuando se usaron 20 μ g/mL de péptido p39. Estos datos indicaron que el 7D8 se unió a fibrilos mediante la región F(ab) de la

molécula puesto que esta interacción podría ser completamente inhibida por el péptido inmunógeno.

La reactividad del mAb 7D8 con monómero V λ 6 inmovilizado en un chip se examinó usando el BIAcore. El anticuerpo no reaccionó con la proteína monomérica. Estos datos indican que el sitio de unión reconocido por el mAb 7D8 está presente en fibrilos, pero no en la proteína precursora soluble, implicando que el antígeno es de naturaleza conformacional o críptica.

B. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se realizó de la siguiente manera: secciones de 6 μ m de espesor, cortadas de bloques incrustados en parafina, fijados en formalina, fueron sometidos a recuperación de antígeno mediante incubación con CitraPlus (BioGenex, San Ramon, CA) por 30 min a 90°C. Los tejidos fueron inmunoteñidos con una solución de 3 μ g/mL de mAbs 2A4, 7D8, o 8G9. El mAb TY111 IgG2a sirvió como un control. Se usó un anticuerpo Ig anti-ratón de cabello conjugado a HRPO (ImmPRESS Universal Reagent, Vector Labs, Burlingame, CA) como el reactivo secundario. Las muestras se desarrollaron usando 3,3'-diaminobezideno (Vector Labs) y se examinaron usando un microscopio Leica DM500. La interacción de los anticuerpos monoclonales con depósitos de tejidos amiloides AL κ y AL λ también se estudió usando inmunohistoquímica. Como se ilustra en la Figura 29, los depósitos amiloides en la glándula tiroides de un paciente que estaban compuestos de fragmentos λ 2, fueron inmunoteñidos por 7D8, 2A4 y 8G9. Las áreas de reactividad se correlacionaron con los depósitos amiloides, indicados por la birrefringencia verde oro vista en la sección de tejido teñida con rojo Congo. La reactividad más admirable se logró con los mAbs 7D8 y 2A4 mAbs mientras que 8G9, aunque positivo, fue considerablemente más débil. Estos datos cualitativos corresponden bien con los análisis BIAcore en los cuales 8G9 se unió menos a

los fibrilos V λ 6 Wil que los otros 2 reactivos (Figura 26). El isotipo coincidente mAb TY11 que sirvió como un control no exhibió inmunoreactividad amiloide.

La secuencia de amino ácido de esta proteína λ 2 (SEQ ID NO: 86) (mostrada a continuación) contiene los residuos Glu y Asp condicionados de línea germinal en la posición 81 y 82, respectivamente.

```

1      11      21      27d     35
GSVVTQPPS VSGAPQTVV ISCSGSSSI GMIAVN WYQQLPGHAP
45      55      65      73      83
KVLIIYDDL PAGVSDRESG SKSGTSAS LAIRGLQSED EGDYYCAAND
93
DSLSAL

```

El examen de un depósito de tejido amiloide ALK reveló que 2A4, y en un menor grado, 7D8 y 8G9, tienen reactividad positiva. De nuevo, hubo concordancia entre el inmunoteñido y birrefringencia, regiones amiloides congófilas. El mAb TY11 fue no reactivo.

C. Representación radiográfica de Amiloidoma AL Usando 7D8 ^{125}I -Marcado

Se usó el modelo *in vivo* experimental de amiloidoma AL para estudiar si el mAb 7D8 radiomarcado representaría el amiloide AL humano. La eficiencia de radiomarcado de 7D8, determinada mediante SDS-PAGE, reveló que ambas cadenas IgH e IgL incorporaron el marcador I-125, y no se observaron bandas asociadas con fragmentación o agregación. La representación gráfica SPECT/CT de un ratón que porta un amiloidoma reveló que el anticuerpo ^{125}I -marcado localizó la masa amiloide inducida, ubicada dorsalmente, evidenciada por la acumulación de los anticuerpos radiomarcados en el amiloide, con relación a tejidos libres de amiloide (p.e., hígado, corazón, bazo, y riñones). El mAb IgG irrelevante radiomarcado no se acumuló en la masa; sin embargo, se observó acumulación del radioyoduro libre en la tiroides, indicativa del

catabolismo y halogenación del anticuerpo IgG. La distribución del mAb ^{125}I -7D8 en los ratones que portan amiloidoma fue cuantificada midiendo la actividad asociada con la masa amiloide comparada con la del hígado, bazo, riñón, estómago, corazón y pulmón. Estos datos confirmaron el estudio de representación gráfica SPETC/CT. A las 72-h después de la inyección (tiempo al cual las imágenes fueron adquiridas y los tejidos recolectados), el amiloidoma contenía ~8% ID que es ~ 4 veces mayor que el visto en el hígado – el sitio de catabolismo de mAb - y el corazón donde se esperaría que la actividad en conjunto de sangre residual fuera alta. La actividad mostrada en el pulmón se debió al modo de eutanasia (datos no mostrados).

Para confirmar los datos de biodistribución, el amiloidoma así como el hígado, bazo, corazón y riñones fueron recolectados y se prepararon secciones de tejido para análisis autoradiográfico. El radiomarcado se realizó de la siguiente forma: El anticuerpo 7D8 fue marcado con 2 mCi de ^{125}I libre de reductor (Perkin Elmer) usando cantidades limitantes de Cloramina T y se suspendió en PBS que contiene 5 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA/PBS). El isotipo no unido y los agregados de proteína fueron removidos mediante cromatografía líquida de exclusión de tamaño a través de una columna Ultrogel AcA34 (Amersham Pharmacia). Las fracciones que contienen monómero IgG fueron recolectadas para experimentos de representación gráfica. El rendimiento radioquímico fue ~ 50%, proporcionando una actividad específica de ~ 25 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

El mAb ^{125}I -marcado fue sometido a SDS/PAGE (10% de geles) en la presencia o ausencia de un agente reductor y se analizó con un ciclón phosphor-imager. De acuerdo con las mediciones de representación SPECT y biodistribución, las autoradiografías confirmaron la acumulación significativa de ^{125}I -7D8 en el amiloidoma, con relación al hígado. No hubo evidencia de captación de anticuerpo ^{125}I -7D8 radiomarcado en ningún otro órgano (diferente

a la actividad hepática asociada con el catabolismo del anticuerpo). Aunque el mAb 7D8 estaba relativamente distribuido de manera uniforme en toda la masa amiloide, se observó una densidad moderadamente mayor en las áreas periféricas en el límite abdomen-amiloide. No hubo captación de IgG de control radiomarcado en ningún órgano.

D. Resumen y Conclusiones

La resonancia de plasmón superficial, inmunohistoquímica y la representación radiográfica *in vivo* establece que los anticuerpos 2A4, 7D8, y 8G9 reactivos con AA se unen al amiloide AL y los fibrilos ($K_d \sim 1$ nM) derivados de cadenas ligeras de inmunoglobulina. Esta interacción ocurre probablemente en los residuos de amino ácido Glu y Asp altamente conservados en la posición 81 y 82, respectivamente, lo que forma un epítipo lineal críptico expuesto solamente cuando la cadena ligera amiloidogénica es incorporada en los fibrilos.

Ejemplo VII. El Análisis de ELISA Demuestra la Unión de Anticuerpo a los Péptidos X_1EDX_2 .

Se realizó el análisis BIAcore para evaluar la unión de los anticuerpos 2A4, 7D8 y 8G4 sobre péptidos de varias secuencias. Como se muestra en la siguiente Tabla 4, se encontró que los anticuerpos reaccionan con péptidos que tienen la secuencia X_1EDX_2 . De manera interesante, los anticuerpos no reaccionan con péptidos que tienen residuos C-terminales adicionales. Esto sugiere que los anticuerpos se unen específicamente a un neoepítipo generado al clivado de SAA para generar un final de terminal C libre. Sin embargo, como se demuestra en el Ejemplo V, el final libre no es esencial para la unión de estos anticuerpos a V λ 6 Wil, sino que el dominio de X_1EDX_2 adopta una conformación favorable a la unión a los anticuerpos a medida que entran a

una estructura agregada (p.e., fibrilar) (o se vuelven parcialmente desnaturalizados), exponiendo un epítipo críptico que de otra forma está oculto.

Tabla 4

Péptido Anticuerpo		pos/neg
2A4(39)	CGGHEDT, (SEQ ID NO: 87)	POS
40	CGGAEDS, (SEQ ID NO: 88)	pos
41	GHEDTIADQE, (SEQ ID NO: 89)	NEG
64	CGGAEDT, (SEQ ID NO: 90)	POS
65	CGGHADT, (SEQ ID NO: 91)	WEAK
66	CGGHEAT, (SEQ ID NO: 92)	NEG
67	CGGHEDA, (SEQ ID NO: 93)	POS
68	CGGHEDTM, (SEQ ID NO: 94)	NEG
69	CGGHEDTMA, (SEQ ID NO: 95)	NEG
70	CGGHEDTMAD, (SEQ ID NO: 96)	NEG
71	CGGHED, (SEQ ID NO: 97)	POS FALSA?'
7d8 (39)	CGGHEDT, (SEQ ID NO: 87)	POS
40	CGGAEDS, (SEQ ID NO: 88)	POS
41	GHEDTIADQE, (SEQ ID NO: 89)	NEG
64	CGGAEDT, (SEQ ID NO: 90)	POS
65	CGGHADT, (SEQ ID NO: 91)	NEG
66	CGGHEAT, (SEQ ID NO: 92)	NEG
67	CGGHEDA, (SEQ ID NO: 93)	POS
68	CGGHEDTM, (SEQ ID NO: 94)	NEG
69	CGGHEDTMA, (SEQ ID NO: 95)	NEG
70	CGGHEDTMAD, (SEQ ID NO: 96)	NEG
71	CGGHED, (SEQ ID NO: 97)	NEG

8g4 (39)	CGGHEDT, (SEQ ID NO: 87)	POS
40	CGGAEDS, (SEQ ID NO: 88)	POS
41	GHEDTIADQE, (SEQ ID NO: 89)	NEG
64	CGGAEDT, (SEQ ID NO: 90)	POS
65	CGGHADT, (SEQ ID NO: 91)	NEG
66	CGGHEAT, (SEQ ID NO: 92)	NEG
67	CGGHEDA, (SEQ ID NO: 93)	DÉBIL
68	CGGHEDTM, (SEQ ID NO: 94)	FALSA+?
69	CGGHEDTMA, (SEQ ID NO: 95)	FALSA+?
70	CGGHEDTMAD, (SEQ ID NO: 96)	NEG
71	CGGHED, (SEQ ID NO: 97)	NEG

Ejemplo VIII. Análisis Inmunohistoquímico de AA de ratón.

La reactividad de los sobrenadantes de hibridomas que expresan anticuerpos 2A4, 8G9 y 7D8 a depósitos amiloides esplénicos y hepáticos AA murinos (los sitios principales de deposición amiloide) fue documentada inmunohistoquímicamente. Para estos estudios, se cultivaron secciones de tejido de un ratón TRIAD con amiloide AA extenso en el hígado y bazo (evidenciado por los depósitos congofílicos de birrefringencia verde) que fueron teñidas con los sobrenadantes que contienen el mAb. Los 3 se unieron al amiloide hepático y esplénico. En contraste, no hubo reactividad con los sobrenadantes del cultivo derivados de hidridomas irrelevantes. Se evaluó la capacidad del amiloide usando 2A4, 8G9 y 7D8 para inmunotear amiloide hígado y bazo murino incrustado con OTC fresco (no fijado). Hubo evidencia que los mAbs retuvieron su capacidad de unirse a amiloide AA en el sinusoide hepático. Adicionalmente, la reactividad de anticuerpo con tejido esplánico fue más fácil de interpretar, y el amiloide perifolicular fue inmunotear intensamente. Para demostrar que los mAbs se unieron específicamente a

amiloide AA, los sobrenadantes de mAb a una dilución de 1:25 fueron preincubados con 50 µg/mL de cualquiera entre péptido #39 (p#39) o #41 (p#41) por 1h a temperatura ambiente. Con tejido fijado en formalina como un sustrato, el péptido p#39 (50 µg/mL) inhibió significativamente la reactividad amiloide de los mAbs 2A4 y 7D8 (los resultados con 8G9 están pendientes). En contraste, el péptido p#41 no fue efectivo. Se obtuvieron resultados comparables con tejidos frescos.

Ejemplo IX. Análisis Inmunohistoquímico de AA Humano.

La comparación de la secuencia de amino ácido de SAA ratón y humana en la posición 73-76 revela 2 residuos idénticos, una sustitución Ser a Thr conservada, y un intercambio Ala a His no conservado. Para probar si los mAbs 2A4, 8G9 y 7D8 reaccionarían cruzadamente con depósitos amiloides AA humanos, probamos su reactividad con riñón, adrenal, ovario e hígado que contienen AA humano. En todos los casos, los sobrenadantes de mAb inmunotifñeron los depósitos amiloides. En tejido de ovario, el péptido p#39 bloqueó efectivamente la unión de los mAbs al amiloide AA perivascular, mientras que el péptido p#41 no inhibió esta reacción.

Ejemplo X. Interacción de Anti-AA de Sobrenadantes de Cultivo con Fibrilos AA Derivados de Murino.

La interacción de mAbs 2A4, 8G9 y 7D8 con amiloide AA fue inicialmente evaluada mediante ELISA y luego los datos, dados en la Figura 31, fueron analizados usando SigmaPlot (SPSS Inc.). Cada punto representa la media $\pm$ SE (n = 3). Se usó un sobrenadante de cultivo de hibridoma irrelevante como un control (Ctrl Culture Sup). Hubo una relación señal-ruido extremadamente baja y los resultados mostraron que la primera cosecha contenía más mAb con relación a la segunda, evidenciada por la mayor señal

de absorbancia con relación al sobrenadante de control. (Adicionalmente, la reactividad inmunohistoquímica del material en el día 1 fue mayor que las muestras del día 2). Aunque los valores de SE fueron grandes, parecía, a partir de estos datos, que la afinidad de unión de 2A4, 8G9 y 7D8 era aproximadamente equivalente con la ausencia de reactividad después de dilución de ~ 1:64. Los datos de unión también sugieren que la capacidad, p.e., la cantidad del mAb unido, varió con 7D8>8G9>2A4; sin embargo, estos datos no fueron corregidos para la concentración de mAb y en estudios posteriores esta tendencia no se observó. Debido a la baja señal y la alta variabilidad encontrada con los sobrenadantes de cultivo, y para determinar con mayor precisión la afinidad de unión relativa de los mAbs para fibrilos amiloides AA murinos y humanos (así como para proporcionar material para estudios de biodistribución in vivo) fue necesario aislar los mAbs mediante cromatografía de afinidad de proteína A. La pureza de los mAbs aislados se estableció por SDS-PAGE usando 10% de geles de acrilamida bajo condiciones reductoras y no reductoras (Figura 32). Las muestras en los carriles 1-4 se trataron con mercaptoetanol, carriles 5-9 sin este. El gel fue teñido con azul de Coomassie: mAb 8G9, carriles 1 y 6; mAb 2A4, carriles 2 y 7; mAb 7D8, carriles 3 y 8; sobrenadante de control SP2/0, carriles 4 y 9; blanco, carril 5. Los marcadores de Proteína Mr (Std) son, de arriba hacia abajo: 176, 119, 75, 49, 39, 25 y 19 kDa. LA interacción de los mAbs purificados con péptido p#39 inmunizante, péptido de control (p#41), extractos de AA murino y humano fueron determinados mediante ELISA como se describió anteriormente. Estos datos fueron analizados ajustando una curva sigmoideal usando el software SigmaPlot y se determinó la concentración de mAb a 50% de saturación (EC50), (Tabla 5).

Tabla 5
Valores de EC₅₀ para la unión de mAb purificado

mAb	<i>Sustrato</i>			
	AA Humano	AA de ratón (AEF)	Péptido 39	Péptido 41
8G9	31.7 nM	5.64 nM	4.0 nM	>> 100 nM
2A4	26.4 nM	4.09 nM	3.4 nM	>> 100 nM
7D8	13.3 nM	1.84 nM	2.3 nM	>> 100 nM

La interacción de los 3 mAbs con el péptido p#39 exhibió unión saturable con valores de EC₅₀ en el rango nanomolar bajo (ver Tabla 5 anterior). En contraste, incluso a la concentración más alta de mAb usada (100 nM) hubo poca unión detectable al péptido p#41 (Figura 33 – Cada punto representa la media $\pm$ SE, (n = 3 en cada concentración)). Estos datos confirmaron los resultados inmunohistoquímicos descritos anteriormente, p.e., que el péptido p#39 era capa de bloquear completamente la unión de los mAbs a los tejidos cargados con amiloide AA. Los EC₅₀ calculados para la unión de cada mAb con péptido p#39 fueron esencialmente idénticos al caso cuando se usó un extracto amiloide AA murino como el sustrato (Figura 34 – Cada punto representa la media $\pm$ SE (n = 3 en cada concentración)). Los valores EC₅₀ calculados para la unión de mAbs a extracto AA de ratón fueron esencialmente idénticos a los obtenidos cuando se usó el péptido p#39 como el sustrato (Figura 34; Tabla 5). En contraste, cuando el extracto de amiloide AA humano se secó sobre los pozos de la microplaca, los valores de EC₅₀ fueron entre 5 y 7^x menores que los observados para AA de ratón y péptido p#39 (Figura 35 – cada punto representa la media $\pm$ SE (n = 3 en cada concentración); Tabla 5). Debido a que el valor de EC₅₀ para la unión del mAb 7D8 fue el más bajo de los 3 anticuerpos evaluados, los Solicitantes seleccionaron este reactivo para los estudios de co-localización in vivo y representación gráfica. Las 2 sustituciones de amino ácido en la secuencia de SAA humana con respecto a

la proteína murina afectaron los valores de EC50. Aunque no desean estar ligados por una teoría particular, los Solicitantes atribuyen el mayor EC50 para el AA humano a un "ajuste" más pobre de las cadenas laterales de amino ácido en el sitio de unión a antígeno, sin embargo, este efecto corresponde solamente a una disminución de 5 veces la afinidad relativa cuando los extractos amiloides son adsorbidos en la superficie, como en la ELISA. Adicionalmente, estos datos soportan la observación que los 3 mAbs se unen a depósitos amiloides AA de tejido murino y humano.

Ejemplo XI. Unión Competitiva de mAbs a Amiloide AA de Ratón u Humano.

Para determinar el efecto, si lo hay, de desnaturalización potencial cuando son adsorbidos a la superficie del pozo microtitulador, se evaluó la reactividad de 2A4, 8G9 y 7D4 usando una ELISA de competencia en la cual se usó extracto amiloide AA murino o humano como un competidor soluble para la interacción de los mAbs con extracto AA unido a la superficie.

En todos los casos, los fibrilos amiloides AA solubles (no adsorbidos) de origen humano y de ratón fueron capaces de competir para los 3 mAbs, indicando que el epítipo reconocido por los reactivos no es dependiente de la desnaturalización parcial que resulta de la adsorción superficial. En general, el extracto AA murino (AEF) fue mejor competido que el AA humano (Tabla 6).

Tabla 6
Valores de IC₅₀ (µg/mL) para unión de mAb a amiloide AA

mAb	AA Humana ⁺	AA de ratón (AEF) [‡]
8G9	>119.5	17.3
2A4	>211.7	14.7
7D8	>881.1	26.8

- + Amiloide AA humano en solución que compete para AA de ratón adsorbido (AEF);
- ‡ AA de ratón (AEF) en solución que compete para extracto amiloide Aa humano adsorbido en placa.

Los valores de IC₅₀ (concentración de AA (en peso) que redujo la unión de mAb en 50%) para AEF murino en solución fueron ~ 20 µg/mL, mientras que para AA humana los valores fueron 6 a 44 veces mayores (en contraste, los EC₅₀ para AA humana fueron solamente 7 veces menores que aquellos para Aa de ratón). Esto puede reflejar el hecho que, cuando está en solución, el epítipo en los fibrilos amiloides es menos accesible en preparaciones de AA humana comparadas con AA murino.

Como se esperaba, el mAb 7D8 que exhibió la más alta afinidad relativa para los fibrilos AA humanos y murinos cuando están adsorbidos en superficie, requirió la más alta concentración de amiloide AA para lograr competencia.

Ejemplo XII. MAb 7D8 Radiomarcado.

La eficiencia de radiomarcado de 7D8 se determinó mediante SDS-PAGE. Se analizaron mAb reducido y nativo y las proteínas se visualizaron usando un representador gráfico phosphor. Tanto la cadena IgH como la IgL incorporó el marcador I-125, y no se observaron bandas asociadas con fragmentación o agregación.

Ejemplo XIII. Representación gráfica de amiloide AA usando 7D8 ¹²⁵I-marcado.

Para estudiar la localización *in vivo* del mAb 7D8 radiomarcado, se usaron tres grupos de ratones: IL-6 transgénicos; inducidos con AgNO₃/AEF, y controles que carecen de amiloide (WT). La representación gráfica con SPECT/CT reveló que el mAb ¹²⁵I-7D8 localizó depósitos AA murinos en el

bazo e hígado, evidenciado por la acumulación del mAb radiomarcado en estos tejidos con relación al ratón de control, que mostró solamente baja actividad de recolección de sangre en el hígado y libre de yoduro en la glándula tiroides.

En contraste con estos ratones, el ratón inducido con inyección de AgNO₃ mostró captación tiroide de yoduro libre, alguna actividad hepática, pero el mayor sitio de unión de ¹²⁵I-7D8 se vio en el sitio de inyección s.c. de AgNO₃ (el área dorsal baja derecha). La actividad en esta área está claramente circunscrita por la solución de plata atenuadora de rayos X como se ve mediante CT. Se ha mostrado que el mAb 7D8 se une a depósitos amiloides AA tanto en el hígado como bazo en la presencia de sAA circulante en el ratón TRIAD, evidenciado por las imágenes SPECT.

A. Biodistribución de ¹²⁵I-7D8 en Ratones.

48 h después de la inyección de ¹²⁵I-7D8 había radiactividad en la recolección de sangre, que explicaba la captación relativamente alta en el pulmón (que están llenos de sangre cuando los ratones son sacrificados). Es de notar que la acumulación de mAb hepatoesplénico en el ratón IL-6 mouse es indicadora de la presencia de amiloide. Las imágenes SPECT/CT confirmaron la distribución del mAb en estos órganos. 72 h después de la inyección, los valores de recolección en sangre habían cambiado poco según lo evidencia el no cambio de actividad en el corazón y pulmón con relación a los ratones sacrificados a las 48 h, debido a lo relativamente largo para este mAb (~60 h). Hubo acumulación significativa del mAb radiomarcado en el ratón IL-6, que se correlaciona con las imágenes SPECT que fueron adquiridas mostrando captación esplénica, y en menor grado, hepática. De los demás órganos, el más importante fue el hígado (que es el sitio de catabolismo de IgG y la fuente de sAA durante la respuesta de fase aguda). En los ratones WT, sin estimulación inflamatoria o amiloide, el hígado contenía < 6% de ID/g, que es

comparable con el riñón y el corazón en donde la recolección de sangre contribuye casi exclusivamente con la señal.

B. Análisis autoradiográficos e histoquímicos.

Con el fin de determinar si la acumulación hepática aumentada de ^{125}I -7D8 en los ratones IL-6 y AgNO_3 resultó de la captación amiloide, depuración catalítica o unión a sAA nuevamente sintetizada, el hígado y otros tejidos fueron sometidos a análisis autoradiográficos.

Con base en la representación gráfica SPECT y las mediciones de distribución, se presumió que la cantidad más grande de amiloide en los ratones IL-6 transgénicos estaba en el hígado y bazo. Esta suposición fue confirmada por las secciones teñidas con rojo Congo en las cuales se observó amiloide significativo en toda la pulpa roja así como en las regiones perivasculares y sinusoides del hígado. Adicionalmente, mpas depósitos birrefringentes estaban presentes en los riñones y corazón. La distribución del ^{125}I -7D8 en estos tejidos se correlaciona bien con el rojo Congo y el material reactivo de AA. No hubo acumulación en hepatocitos desprovistos de amiloide.

Con base en los datos de biodistribución, el ratón tratado con AgNO_3 tenía más captación de ^{125}I -7D8 en el hígado que en el bazo, lo que fue inesperado porque este no es un patrón normal de acumulación de AA en estos animales. El teñido con rojo Congo reveló pequeñas cantidades de amiloide en una sola región perifolicular en el bazo (esquina superior derecha) y depósitos perivasculares hepáticos extensos que fueron evidentes en las autoradiografías. Adicionalmente, se vió en las imágenes SPECT que el sitio s.c. de inyección de AgNO_3 se tiene una concentración significativa de ^{125}I -7D8 (también hemos observado esto cuando se usó SAP radioyodado como agente de representación gráfica). Este sitio no contiene amiloide (p.e., material

birrefringente rojo Congo); sin embargo, fue inmunoteñido por el mAb anti-AA. Sin desear estar ligado a una teoría particular, es posible que el mAb 7D8 se localice en los sitios de inflamación o "pre-amiloide" (así como depósitos amiloides maduros). En contraste con la acumulación impresionante de 7D8 en los órganos del ratón IL-6, se encontró que los tejidos de los ratones de control tienen poco o no tienen trazador en ningún órgano diferente a la recolección de sangre. No se encontró amiloide en las secciones teñidas con rojo Congo de ninguno de los órganos de estos controles.

C. Farmacocinética de ^{125}I -7D8.

Después de la inyección del anticuerpo 7D8 radiomarcado, se determinó la tasa de desaparición de la molécula y las determinaciones de vida media se resumen en la Tabla 7. Estos resultados indicaron que la $T_{1/2 \text{ bio}}$ de 7D8 fue de ~ 60 h, consistente con la de un mAb murino IgG2b (notar que 7D8 es de la subclase IgG2b). La depuración ligeramente mas rápida del ^{125}I -7D8 en los ratones IL-6 (TRIAD) no se consideró significativa. Con base en estos datos, la retención del mAb por el amiloide de tejido, evidenciado en los datos SPECT, durante 72 h no influencia la tasa de excreción.

Tabla 7
Análisis de Vida Media para ratones ^{125}I -7D8

Ratón	A (S.E.)	K (S.E. $\times 10^{-4}$)	R ²	$t_{1/2 \text{ bio}}$	$t_{1/2 \text{ ex}}$
IL-6, 48h	191.7 (2.96)	0.0117 (7.0)	0.98	59.2 h	56.2
IL-6, 72h	175.2 (3.99)	0.012 (8.9)	0.97	57.7 h	
AgNO ₃ , 48h	181.0 (1.99)	0.0106 (4.9)	0.99	65.3 h	61.1
AgNO ₃ , 72h	174.1 (2.97)	0.0112 (5.8)	0.98	62.2 h	
Ctrl, 48h	185.1 (3.19)	0.0108 (7.6)	0.98	64.3 h	61.3
Ctrl, 72h	185.1 (3.09)	0.0109 (5.6)	0.98	63.7 h	

1. Método para Identificar Agentes que Previenen o Tratan la Amiloidosis Usando Ratón Transgénico o TRIAD. Los procedimientos para la preparación de agentes se describen en Schenk et al. *Nature* 400:173-177. Los agentes son emulsificados 1:1 (v/v) con adyuvante de Freund completo para la primera inmunización de ratones transgénicos, seguida por un refuerzo en adyuvante de Freund completo a las 2 semanas y mensualmente posteriormente. Las inyecciones de PBS siguieron el mismo esquema y los ratones fueron inyectados con mezcla 1:1 de PBS/adyuvante para control. La extensión de vida de los ratones transgénicos se compara para determinar si los agentes son efectivos para prevenir la Amiloidosis AA aumentando la vida del animal.
2. Histopatología. Para microscopía de luz y polarizada, secciones de tejido de 4 a 6 μm de espesor fueron cortadas y teñidas con hematoxilina y eosina (HE) y una solución de rejo Congo alcalina recién preparada, respectivamente. Para microscopía de electrón, las secciones fueron incrustadas en Epon (Ted Pella, Redding, CA), seccionadas y examinadas con un microscopio electrónico de transmisión JEOL 100S. Ver Ludlage et al. *Vet Pathol* 42: 117-124 (2005).
3. Inmunohistoquímica. Secciones de tejido incrustadas en parafina (espesor de 6 μm) fueron cortadas en un micrótomos, montadas en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina, secadas durante la noche a temperatura ambiente, y desparafinizadas. La inmunotinción se realizó usando la técnica de complejo avidinbiotina (ABC-elite) descrita anteriormente. Los anticuerpos primarios fueron anti-amiloide A humano de ratón (Accurate Chemical y Scientific Corporation, Westbury, NY) y antisuero policlonal anti-SAA de ratón. Como anticuerpos secundarios se usaron conjugado de inmunoglobulina-G (IgG) anti ratón de caballo purificado para afinidad peroxidada de rábano picante (Vector Laboratories, Burlingame, CA) o conjugados de IgG anti-conejo, anti-ratón o

anti-rata de cabra peroxidada de rábano picante (BioRad Laboratories, Richmond, CA).

4. Cuantificación de SAA mediante ELISA. Se midieron las concentraciones de SAA mediante un ensayo inmunsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando el kit ELISA de SAA de multiespecies de acuerdo con las direcciones suministradas por el fabricante (Biosource, Camarillo, CA). Se prepararon curvas estándar usando cantidades conocidas de proteína SAA humana y se midió la absorbancia at 405 nm con un lector de placa BioRad modelo 4450 (Fullerton, CA).

5. Estudios de Recambio de Cintigrafía de SAP Radiomarcada en Ratones. La SAP fue oxidativamente yodada con ^{125}I (2-5 MBq/mg) usando N-bromosuccinimida. Ratones de 6-12 semanas de edad recibieron 2-10 μg de ^{125}I -SAP en 200 μL intravenosamente. Se tomaron sangrados de cola medidos en forma precisa (0.01-0.04 g) a intervalos de tiempo específicos y se contó la radiactividad precipitable por ácido tricloroacético en la misma corrida el final de cada experimento, junto con alícuotas estándar del trazador inyectado. Pepys et al. *Proc Natl Acad. Sci. USA* 91:5602-5606 (1994).

6. Recambio de Cintigrafía de SAP Radiomarcado y Estudios de Representación Gráfica en el Hombre. Se asiló SAP para uso en el hombre a partir de plasma de un solo donador acreditado y fue oxidativamente yodada con ^{125}I (2-5 MBq/mg) o ^{123}I (110 MBq/50 μg de proteína) usando N-bromosuccinimida. Después de la inyección de ^{123}I SAP, se adquirieron datos y se procesaron en una cámara gamma IGE Starcam (IGE Medical Systems, Slough, U.K. La depuración de SAP ^{125}I -marcado se estudió en individuos saludables y pacientes que sufren de amiloidosis AA. Pepys et al. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 91:5602-5606 (1994)

7. Extracción y Purificación de Amiloide. Los métodos usados para extraer amiloide de tejido fueron como se describe en Pras et al. Ver Pras et al. *J. Clin. Invest.* 47:924-933 (1968). En resumen, una porción del hígado o tejidos de otros órganos obtenidos al momento de la necropsia y mantenidos a -80 °C fue homogenizada con solución salina fría en un baño con hielo usando un Mezclador Omni (Omni International, Waterbury, CT). El extracto fue centrifugado a 10,000 rpm por 30 minutos a 4 °C y el sedimento se reextrajo dos veces más con solución salina fría, una vez con citrato de sodio 0.1 M solución salina amortiguada con, pH 8.0, y luego de nuevo con solución salina hasta que A280 del sobrenadante era < 0.10. El sedimento resultante fue homogenizada con agua destilada fría, y la mezcla centrifugada a 35,000 rpm por 3 horas a 4 °C. El sedimento obtenido del extracto de agua fue entonces liofilizado.

8. Resonancia de Plasmón Superficial. Las cinéticas de unión se midieron en un instrumento BIAcore X. Los fibrilos preparados de V λ 6 Wil fueron sonicados brevemente con un sonicador de sonda y luego acoplados a un chip CM-5 usando química de amina, según el protocolo de BIAcore. Este proceso utiliza EDC y NHS para activar los grupos carboxilo en el chip para acoplamiento con grupos amino libres en los fibrilos. El acoplamiento se condujo en un amortiguador de NaOAc, pH 4.0 a una concentración de 100 μ g/mL. El canal de control fue "acoplado de manera fingida" y ambos canales reaccionaron con etanolamina para saturar los sitios no reaccionados. Se acoplaron aproximadamente 16,000 RU de fibrilos de V λ 6 Wil.

Los sensogramas fueron corridos en amortiguador de HBS-EP de BIAcore a 20 μ L/min en el modo Fc1 (fibrilos de V λ 6 Wil) menos Fc-2 (control). Las muestras que contienen mAb o mAb más inhibidores de péptido fueron inyectadas (70 μ L) y los sensogramas fueron recolectados usando la función de lavado retardado por 200 seg. Los datos fueron analizados en el software de

BIAevaluation, usando el modelo de Langmuir 1:1 con corrección de acción de masa.

9. MicroSPECT/CT. Dos cohortes de 3 ratones cada una, fueron inyectadas s.c. con 50 mg de extracto de amiloide AL humano entre la escápula. Después de 7 días, un grupo de ratones recibió una inyección iv en la vena de la cola de ~ 300 μ Ci de mAb 7D8 125 I-marcado. El segundo grupo fue administrado con una cantidad igual de mAb MOPC 31C murino como control. Después de 72 hr, los ratones fueron sacrificados por sobredosis de isoflurano y se adquirieron las imágenes SPECT/CT. Para proveer mejoramiento de contraste vascular en las imágenes CT, los ratones fueron administrados con una dosis iv de 200- μ L de Fenestra VC™ (Advanced Research Technologies, Montreal, Canada) 5 min antes del barrido.

Los datos de SPECT fueron recolectados con una plataforma de representación gráfica de modo dual microCAT II + SPECT (Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN), capaz de proporcionar resolución espacial de submilímetros cuando está equipada con un colimador de agujero de diámetro de poro de 0.5 mm. Al momento de la representación gráfica, los 2 detectores (compuestos de un tubo foto-multiplicador de ánodo múltiple Hamamatsu R2486-02 de 50 mm de diámetro acoplado a un arreglo de cristal de 1 x 1 x 8 mm CsI (TI) dispuesto en una rejilla de 1.2 mm) fueron posicionados ~45 mm del centro de rotación. Cada conjunto de datos SPECT comprendía 45 proyecciones recolectadas en 360° durante el curso de ~50 min. Las imágenes fueron reconstruidas usando una implementación del algoritmo de probabilidad de maximización esperada-máximo (EM-ML).

Después de la recolección de datos SPECT, se obtuvieron imágenes CT de alta resolución. El escáner microCAT II tiene una geometría de haz de cono en órbita circular, equipado con una fuente de rayos X de microfoco de 20-80

kVp, y captura un campo de 90 mm x 60 mm de visión usando un detector de arreglo de 2048 x 3072 CCD, ópticamente acoplado a una phosphor pantalla minR mediante un paquete de fibra óptica. Cada conjunto de datos CT, compuesto de 360 proyecciones a azimuth de 1°, fue adquirido en 8 min. Las imágenes fueron reconstruidas en tiempo real en voxeles isotrópicos de 77µm usando una implementación del algoritmo de retroproyección de Feldkamp. Para facilitar el co-registro de las imágenes SPECT y CT reconstruidas, fuentes selladas de Co-57 fueron colocadas en el lecho de imagen. Los conjuntos de datos de microSPECT y CT fueron visualizados y co-registrados manualmente con un paquete de software de análisis de imágenes 3D (Amira, Versión 3.1: Mercury Computer Systems).

10. Biodistribución. Las muestras de hígado, bazo, riñón, corazón, pulmón y tumores amiloides implantados (p.e., amiloidoma) fueron recolectadas de los ratones y colocadas en viales tarados, pesados y se midió la radiactividad. Los valores de índice primario se expresaron como % de dosis inyectada/g de tejido (% ID/g).

11. Autoradiografía. Secciones de 6 µm de espesor, cortadas de blorques de tejido incrustados en parafina, fijados en formalina, obtenidos de ratones sacrificados 72 h después de inyección de ¹²⁵I-7D8 se colocaron en portaobjetos de microscopio Probond (Fisher Scientific), se sumergieron en emulsión de NTB-2 (Eastman Kodak), se almacenaron en la oscuridad y se desarrollaron después de una exposición de 24 h. Las secciones fueron contadas-teñidas con hematoxilina y eosina (H&E), el portaobjetos fue cubierto usando Permount (Fisher Scientific), y examinadas mediante microscopía de luz. Además, portaobjetos consecutivos fueron teñidas con rojo Congo alcalino y observadas bajo iluminación polarizada cruzada. Finalmente, un tercer portaobjetos fue inmunoteñido usando como reactivo primario nuestro mAb AA-reactivo. Las imágenes microscópicas de cámara digital se tomaron y

evaluaron usando un paquete de software de análisis de imágenes (Image Pro Plus, Media, Cybernetics).

Ejemplo XIV. Preparación de Anticuerpos 2A4 y 7D8 Humanizados.

Los anticuerpos 2A4, 7D8, y 8G9 humanizados se prepararon injertando CDR de 2A4, 7D8, y 8G9 murinas en marcos aceptores humanos de acuerdo con técnicas conocidas en el arte. Se hicieron retro mutaciones para reducir la antigenicidad preservando la afinidad de unión. Las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de 2A4 murino están indicadas como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 152 y como los residuos 20-138 de la SEQ ID NO: 154, respectivamente. Las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de 7D8 están indicadas como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 153 y como los residuos 20-138 de la SEQ ID NO: 154, respectivamente. Las regiones variables de cadena ligera de 2A4 y 8G9 murino son idénticas entre sí y difieren de la región variable de cadena ligera de 7D8 en un solo residuo en CDR1. Las regiones variables de cadena pesada de cada uno de 2A4, 7D8, y 8G9 son idénticas.

La kappa variable (Vk) de 2A4 y 7D8 pertenece al subgrupo 2 de ratón, que corresponde al subgrupo 2 humano y la pesada variable (Vh) al subgrupo 3c de ratón 3c que corresponde con el subgrupo 3 humano (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242). La CDR-L1 incluye 16 residuos y pertenece a la clase canónica 4 en Vk. La CDR-L2 incluye 7 residuos y pertenece a la clase 1 en Vk. La CDR-L3 incluye 9 residuos y pertenece a la clase 1 en Vk. Ver Martin AC, Thornton JM. (1996) *J Mol Biol.* 263, 800-15. La leucina en la posición 27 en el 7D8 es más bien inusual, y la glutamina en 2A4 es más usual. Un modelo muestra que la cadena lateral está en la superficie del sitio de unión, y por lo tanto debe ser importante para la unión a antígeno. La CDR-H1 incluye 5 residuos y pertenece

a la clase 1, y la CDR-H2 incluye 19 residuos y pertenece a la clase 4 (Martin & Thornton, 1996). La CDR-H3 no tiene clases canónicas, pero el asa del 8 residuo tiene probablemente una base curva de acuerdo con las reglas de Shirai et al. (1999) FEBS Lett. 455, 188-97. Esta está conservada en un modelo aunque la conformación del ápice de CDR-H3 puede ser diferente. Los residuos en la interfaz entre los dominios Vk y Vh son las encontradas comúnmente para 2A4 Vk, 7D8 Vk y 2A4 Vh.

Se hizo una búsqueda de las bases de datos de PDB (Deshpande et al. (2005) Nucleic Acids Res. 33: D233-7) para encontrar estructuras que guiarían la elección de las retro mutaciones. Una búsqueda de la base de datos de secuencia de proteína no redundante de NCBI permitió la selección de marcos humanos adecuados en los cuales injertar las CDR murinas. Para Vk, se eligió una cadena ligera kappa humana con código de acceso NCBI BAC01562 (gi:21669075) (SEQ ID NO: 166). Esta tiene la misma longitud de CDR-L3 y pertenece a la línea germinal humana VKIIA 19/A3 y el subgrupo 2 kappa humano. También se encontró un marco similar que solo difiere en la región J con código de Acceso NCBI BAC01733 (gi:21669417) (SEQ ID NO: 167). Se usó BAC01562 como un marco para 2A4 Vk, y se usó BACO 1733 como un marco para 7D8 Vk. Para Vh, se usó AAC51024 de cadena pesada de Ig humano (gi: 1791061) (SEQ ID NO: 165). Ver Glas et al. (1997) *Clin. Exp. Immunol.* 107:372-380. Este pertenece a la línea germinal humana VH3-72 y el subgrupo 3 pesada humana.

Las regiones variables de cadena ligera de 2A4 humanizado representativas están indicadas como las SEQ ID NOs: 155, 156, y 157. Las regiones variables de cadena ligera de 7D8 humanizado representativas están indicadas como las SEQ ID NOs: 158, 159, 160, 174, 175, y 176. Las regiones variables de cadena pesada de 2A4/7D8 humanizado representativas están indicadas como las SEQ ID NOs: 161, 162, y 163. Ver las Figuras 36A- 36E.

Los anticuerpos humanizados representativos de la invención incluyen anticuerpos que tienen una región variable de cadena ligera seleccionada de una de residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 152, residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 153, y SEQ ID NOs: 155, 156, 157, 157, 159, 160, 174, 175, y 176; y una región variable de cadena pesada seleccionada de una de residuos 20-138 de la SEQ ID NO: 154 y SEQ ID NOs: 161, 162, y 163.

Ejemplo XV. Efectos Terapéuticos de MAb 2A4 En Ratones con Amiloidosis AA Sistémica Severa.

Se evaluó la eficacia terapéutica de mAb 2A4 en ratones H2/huIL-6 con amiloidosis sistémica severa. Los ratones H2/huIL-6 transgénicos, que expresan constitutivamente un transgen IL-6 humano, son probados para amiloidosis AA sistémica rápida e irreversible. En un primer y segundo estudio, los ratones tratados con mAb TY-11 emparejado de isotipo, que no tiene actividad reportada en ratones, fueron usados como control. Antes de administrar el factor potenciador amiloide para inducir AA, los ratones H2/huIL-6 fueron muestreados y sangrados mediante el seno retro-orbital, se preparó suero, y se determinó la concentración de sAA usando un kit de ELUSa disponible comercialmente. Los valores representativos fueron los siguientes: 2196.7 µg/mL, 823.91 µg/mL, 1415.00 µg/mL, 1673.01 µg/mL, 814.53 µg/mL, 1088.18 µg/mL, 736.34 µg/mL, 1546.35 µg/mL, 953.70 µg/mL, 886.46 µg/mL, media = 1213.4 ± 478 µg/mL.

Al inicio del segundo estudio (semana 0), los ratones H2/huIL-6 fueron inyectados iv con 100 µg de factor potenciador amiloide (AEF). Después de la inducción de la patología AA por inyección de AEF, los ratones fueron administrados con 5 inyecciones de 100 µg subcutáneamente en miembros alternos de mAb 2A4 (13 animales) o TY11 (11 animales). La terapia se inició a

aproximadamente 1 semana después de la inyección de AEF. La supervivencia de los animales en cada grupo de tratamiento fue graficada y analizada. Los resultados se muestran en la Tabla 7. Solamente el 45% de los ratones tratados con mAb TY11 sobrevivieron hasta el final del estudio. En contraste, ninguno de los ratones tratados con 2A4 se perdieron durante el curso del estudio. El análisis de los datos de supervivencia usando métodos estándar mostró una diferencia significativa en las curvas de supervivencia ($P < 0.0025$) en ambos grupos. Se calculó que la supervivencia media de los ratones tratados con TY11 se calculó era de 41 días, comparable con la observada en un estudio previo (38.5 días).

Tabla 7

Porcentaje de animales sobrevivientes		
Días después de la inyección	Tratados con TY-11	Tratados con 2A4
0	100.00	100.00
22	81.82	100.00
33	72.73	100.00
37	63.64	100.00
41	45.45	100.00
42	45.45	100.00

En la semana 6, después de AEF, los ratones fueron sangrados y sacrificados, y sus órganos recolectados para análisis adicionales. Para cuantificación de amiloide en hígado y bazo, se visualizó la birrefringencia de rojo Congo microscópicamente bajo iluminación polarizada cruzada y se grabó digitalmente. El área del material birrefringente se determinó seleccionando (usando un método de segmentación espectral) y cuantificando los píxeles asociados con amiloide. El índice de carga de amiloide (ABI), una medida del

contenido de amiloide, se expresó como el porcentaje de área ocupado por amiloide en cada órgano. La cuantificación de amiloide en los hígados y bazo de ratones tratados con 2A4 y TY11 no reveló diferencia significativa entre los dos tratamientos. Sin embargo, los ratones tratados con TY11 que sobrevivieron hasta el día 42 para comparación con ratones tratados con 2A4 fueron aquellos que no desarrollaron un grado mórbido o distribución de amiloide AA para así producir morbilidad. La carga amiloide hepatoesplénica también es monitoreada durante el curso del estudio de supervivencia para evaluar un aumento de la carga amiloide que se correlaciona con la morbilidad.

En un tercer estudio, mAb 2A4 se comparó con el mAb JH70 de isotipo emparejado, que no tiene reactividad reportada en ratones. Además, la química en sangre y otros parámetros fueron monitoreados a lo largo del período de tratamiento. Se usaron en este estudio ratones H2/huL-6 machos y hembras nacidos entre 8/1/08 y 9/7/08. Veintitres ratones hembra y 16 ratones macho fueron sangrados por el seno retro-orbital. Se usó sangre entera para la caracterización química del nitrógeno ureico en sangre (BUN) y alanina aminotransferasa (ALT) para medir la función renal y hepática usando el VetScan VS2 (Abaxis, Unión City, CA). La concentración en suero de 12 proteínas diferentes y analitos se midió simultáneamente. Se realizó un conteo de sangre completo (CBC) usando la plataforma VetScan HM5. Adicionalmente, cada ratón fue administrado con una dosis baja (~ 50-60 μ Ci) de componente P amiloide en suero humano radioyodado (125 I-SAP) en 5 mg/mL de albúmina de suero bovina para evaluar la carga amiloide de los ratones antes de iniciar el proceso de la enfermedad. El porcentaje de 125 I-SAP retenido a las 24 h después de la inyección (pi) fue medido colocando cada ratón en un calibrador de dosis. La retención de 125 I-SAP mayor que la observada en ratones no transgénicos (control) era indicativa de enfermedad amiloide. Finalmente, se usó suero para medir la concentración de proteína A

amiloide en suero (sAA) usando ensayo de ELISA comercial. Un resumen de estos datos de pretratamiento, valores de química de sangre seleccionados y los tratamientos dados a cada ratón se muestran a continuación en las Tablas 8 y 9.

Tabla 8
Resumen de Datos de Pre-Tratamiento y
Terapia de MAb para Cada Animal

Ratón #	conc. de sAA ($\mu\text{g/mL}$)	Sexo	DOB	retención de ^{125}I -SAP (%)	Terapia (Grupo No.)
3488	360	F	8/1/08	9	2A4 (1)
3489	996	F	8/1/08	29	2A4 (1)
3490	472	F	8/1/08	10	2A4 (1)
3492	2068	M	8/1/08	13	2A4 (1)
3493	1740	M	8/1/08	11	JH70 (1)
3494	1272	M	8/1/08	10	JH70 (1)
3495	1436	M	8/1/08	13	JH70 (1)
3496	2080	M	8/1/08	9	2A4 (1)
3498	268	M	8/1/08	9	2A4 (1)
3500	700	F	8/11/08	11	JH70 (1)
3501	ND	F	8/11/08	9	JH70 (1)
3503	1040	F	8/11/08	11	JH70 (1)

3504	960	F	8/11/08	10	JH70 (1)
3513 ¹	4400	M	8/13/08	60	2A4 (1)
3514 ¹	4400	M	8/13/08	40	2A4 (1)
3515	2800	M	8/13/08	13	2A4 (1)
3521	1480	M	8/18/08	11	2A4 (1)
3524	1680	M	8/18/08	9	2A4 (1)
3549	720	F	9/6/08	9	2A4 (2)
3550	760	F	9/6/08	9	2A4 (2)
3552 ²	0	F	9/6/08	11	2A4 (2)
3553	1160	F	9/6/08	12	2A4 (2)
3558	1660	M	9/6/08	9	JH70 (2)
3559	3520	M	9/6/08	12	JH70 (2)
3562	1312	F	9/6/08	11	JH70 (2)
3563	1120	M	9/6/08	9	JH70 (2)
3564	2512	M	9/6/08	11	2A4 (2)
3565	1960	M	9/6/08	10	2A4 (2)
3567	1880	F	9/6/08	12	2A4 (2)
3570	792	F	9/7/08	13	2A4 (2)
3573	700	F	9/7/08	8	2A4 (2)
3577 ²	0	F	9/7/08	10	2A4 (2)
3578 ²	0	F	9/7/08	9	2A4 (2)
3579	1120	F	9/7/08	10	2A4 (2)
3580 ²	0	F	9/7/08	8	JH70 (2)
3581	700	F	9/7/08	9	JH70 (2)
3582	1680	F	9/7/08	9	JH70 (2)
3583	804	F	9/7/08	9	JH70 (2)
3584	1040	F	9/7/08	14	JH70 (2)

1, animales IL-6 homocigóticos con altos niveles de sAA y enfermedad amiloide temprana en vida.

2, ratones tipo salvaje sin sAA circulante y sin enfermedad amiloide. Retención de ¹²⁵I-SAP en estos animales se considera normal y no refleja carga amiloide.

Tabla 9
Valores Normales para Parámetros de Química de
Sangre en Ratones H2/huL-6

	BUN (mg/dL)		GLU (mg/dL)		ALT (U/L)		ALB (g/dL)		TP (g/dL)		GLOB (g/dL)	
	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M
Media	21.1	23.8	144.7	151.2	37.6	42.3	2.5	1.9	5.6	6.2	3.1	4.4
DE	4.0	2.7	14.0	17.6	16.3	24.3	0.3	0.4	0.2	0.6	0.4	0.6
n	18	13	18	13	18	13	18	13	18	13	18	13
Alto	28.0	30.0	184.0	179.0	79.0	105.0	3.0	2.6	6.0	7.4	3.7	5.8
Bajo	15.0	20.0	126.0	119.0	21.0	23.0	2.0	1.2	5.1	5.5	2.6	3.4
Medio	20.0	24.0	143.0	154.0	32.5	32.0	2.4	1.9	5.6	6.0	3.2	4.3

BUN, nitrógeno ureico en sangre; GLU, glucosa; ALT, alanina aminotransferasa; ALB, albúmina; TP, proteína total en suero; GLOB, inmunoglobulina; H, hembra; M, macho; DE, desviación estándar; n número de ratones usados para determinar los valores.

Al inicio del tercer estudio (semana 0), todos los ratones H2/huL-6 recibieron 100 µg iv de factor potenciador amiloide (1 mg/mL). Una semana después, empezó la terapia y cada ratón fue administrado con 100 µg de mAb 2A4 o JH70 sc como se indica en la Tabla 8. Las inyecciones de mAb continuaron semanalmente por 7 semanas. En la semana 2 después de AEF, se hicieron mediciones de CBC, química de sangre, y sAA en suero usando sangre recolectada mediante el seno retro-orbital. En este tiempo también, los ratones en el grupo 1 fueron administrados con ~ 60 µCi de ¹²⁵I-SAP en BSA como antes, para evaluar la acumulación de amiloide evidenciada por la retención de SAP radiomarcado. Varios de los animales mostraron un efecto adverso de distrés extremo, y por lo tanto, la evaluación de carga burden usando ¹²⁵I-SAP fue descontinuada. Los resultados de parámetros en sangre seleccionados, adquiridos 2 semanas después de AEF se muestran en la Tabla 10

Tabla 10

	BUN (mg/dL)		GLU (mg/dL)		ALT (U/L)		ALB (g/dL)		TP (g/dL)		GLOB (g/dL)	
	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M
Media	31.4	52.1	145.1	129.8	33.9	63.3	2.3	1.8	6.5	8.1	4.2	6.2
DE	24.3	39.1	16.6	25.6	6.9	30.6	0.3	0.5	1.0	1.7	1.1	1.5
n	15	13	15	13	15	13	15	13	15	13	15	12
Alto	100.0	159.0	177.0	178.0	46.0	134.0	2.7	3.0	8.6	11.7	7.0	9.6
Bajo	16.0	20.0	104.0	82.0	22.0	32.0	1.7	1.0	5.2	6.0	3.1	4.5
Medio	22.0	31.0	150.0	120.0	32.0	54.0	2.3	1.7	6.5	7.5	4.0	6.0

BUN, nitrógeno ureico en sangre; GLU, glucosa; ALT, alanina aminotransferasa; ALB, albúmina; TP, proteína total en suero; GLOB, inmunoglobulina; H, hembra; M, macho; DE, desviación estándar; n número de ratones usados para determinar los valores.

A las 8 semanas después de AEF, los ratones fueron sangrados una última vez e inmediatamente posterior fueron administrados con ~ 200 μ Ci de 125 I-SAP usando 5% de suero de ratón normal como vehículo. En respuesta a este tratamiento, unos pocos animales mostraron un comportamiento inusual que se apaciguó en 30 min. Veinticuatro horas después, los ratones fueron inyectados con agente de contraste para CT de rayos X (~ 200 μ L iv en la vena de la cola) y fueron entonces sacrificados por sobredosis de isoflurano. Se adquirieron imágenes topográficas de emisión de fotón simple (SPECT) y rayos X (CT) de cada animal. Los órganos fueron recolectados y la cantidad de radiactividad de cada muestra se calculó y expresó como % de dosis inyectada por gramo de tejido. Adicionalmente, una porción de cada tejido fue fijada durante la noche en formalina amortiguada en preparación al seccionamiento y el análisis microscópico.

Durante la semana 7 del estudio de terapia, se encontraron muertos 2 ratones y 3 ratones fueron sacrificados porque se consideraba que no era probable que sobrevivieran la noche, y tenían un puntaje de condición corporal pobre (< 2; asociado con > 15% de pérdida de peso). Los ratones que

experimentaron una reacción adversa a la inyección de ^{125}I -SAP y 1 ratón que fue sacrificado debido a complicaciones que surgieron por un sangrado retro-orbital no fueron evaluados como parte del análisis de supervivencia. La supervivencia de los ratones en cada grupo de tratamiento con mAb se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11

Porcentaje de animales sobrevivientes		
Días después de la inyección	Tratados con TY-11	Tratados con 2A4
0	100.00	100.00
41		100.00
42		100.00
53	85.71	100.00
55	71.43	100.00
56	64.29	100.00
57	64.29	100.00

Aproximadamente el 65% de los ratones tratados con mAb JH70 que eran evaluables sobrevivieron hasta el final del estudio. En contraste, ninguno de los ratones 2A4 que fueron evaluables murieron durante los 57 días. El análisis de los datos de supervivencia usando métodos estándar demostraron una diferencia significativa en las curvas de supervivencia ($P=0.015$ usando la prueba de Mantel-Cox y $P=0.016$ usando la prueba de Grehan-Breslow-Wilcoxon).

Los datos de química de sangre finales se analizaron de acuerdo con la terapia que recibió cada ratón. Debido las diferencias en los valores de parámetro medios asociados associated los ratones H2/huLL-6 macho y hembra (al momento del sacrificio, los niveles de BUN en ratones hembra fue mayor

tanto para ratones tratados con 2A4 como JH70), solamente los ratones hembra que sobrevivieron están incluidos en la Tabla 12 siguiente.

Tabla 12

	BUN (mg/dL)		GLU (mg/dL)		ALT (U/L)		ALB (g/dL)		TP (g/dL)		GLOB (g/dL)	
	2A4	JH70	2A4	JH70	2A4	JH70	2A4	JH70	2A4	JH70	2A4	JH70
Media	60.7	73.3	107.8	100.1	45.5	119.7	2.3	2.2	9.2	9.1	7.0	7.1
DE	27.2	25.7	27.0	13.3	6.2	123.1	0.5	0.6	1.5	1.5	2.0	2.1
n	6.0	7.0	6.0	7.0	6.0	7.0	6.0	7.0	6.0	7.0	6.0	7.0
Alto	95.0	120.0	160.0	123.0	52.0	381.0	2.9	3.0	11.7	11.9	10.1	10.6
Bajo	17.0	36.0	83.0	83.0	35.0	33.0	1.5	1.2	7.2	7.5	4.3	5.3
Medio	66.5	70.0	99.5	98.0	46.5	65.0	2.2	2.1	9.1	8.9	7.1	6.2

Los ratones tratados con 2A4 mostraron nitrógeno ureico en suero (BUN) y niveles de alanina aminotransferasa (ALT) disminuidos cuando se comparan con ratones tratados con JH70. BUN y ALT son marcadores de la función hepática y renal, respectivamente, y sus niveles reducidos indican que la función de órgano puede haber estado bien preservada por el tratamiento con 2A4.

REIVINDICACIONES

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Un anticuerpo aislado humano, humanizado o quimérico, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo entre los residuos 70-76 de péptido A amiloide humano.
2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, que se une específicamente a un epítipo entre los residuos 70-76 de la SEQ ID NO: 2.
3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, que se une específicamente a un epítipo que comprende los residuos indicados como las SEQ ID NOs: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o 11.
4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, que compite para unión a péptido A amiloide humano con el anticuerpo 2A4 producido por el Número de Acceso ATCC PTA-9662.
5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, que compite para unión a péptido A amiloide humano con un anticuerpo que tiene una región variable de cadena ligera indicada como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 152 y una región variable de cadena pesada indicada como los residuos 20- 138 de la SEQ ID NO: 154.
6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, que compite para unión a péptido A amiloide humano con el anticuerpo 7D8 producido por el Número de Acceso ATCC PTA-9468.

7. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, que compite para unión a péptido A amiloide humano con un anticuerpo que tiene una región variable de cadena ligera indicada como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 153 y una región variable de cadena pesada indicada como los residuos 20- 138 de la SEQ ID NO: 154.

8. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, que es una versión humanizada o quimérica del anticuerpo 2A4 producido por el Número de Acceso ATCC PTA-9662 o una versión humanizada o quimérica del anticuerpo 7D8 producido por el Número de Acceso ATCC PTA-9468.

9. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 8, que comprende una región variable de cadena ligera que comprende una o más regiones de complementariedad de una región variable de cadena ligera de 2A4 indicada como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 152 o una o más regiones de complementariedad de una región variable de cadena ligera de 7D8 indicada como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 153.

10. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 9, que comprende una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones de complementariedad de una región variable de cadena ligera de 2A4 indicadas como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 152 o tres regiones de complementariedad de una región variable de cadena ligera de 7D8 indicadas como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 153.

11. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 10, que comprende al menos un residuo de marco de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste de L87 y L90 (convención de numeración Kabat) ocupado por Y y F, respectivamente, en donde el resto de la región variable de

cadena ligera es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana.

12. (Nueva) El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 10, que comprende al menos un residuo de marco de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste de +7, +14, +15, +17, +18, +50, +75, +88, + 92, y +109 (numeración lineal) ocupado por T, S, L, D, Q, K, Y, L, F, y L, respectivamente, en donde el resto de la región variable de cadena ligera es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana.

13. (Nueva) El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 12, que comprende al menos un residuo de marco de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste de +75 y +92 (numeración lineal) ocupado por Y y F, respectivamente, en donde el resto de la región variable de cadena ligera es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana.

14. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 11, en donde la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina aceptora humana es una región variable de cadena ligera del subgrupo 2 kappa humano (convención Kabat).

15. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 14, en donde la región variable de cadena ligera del subgrupo 2 humano es de la línea germinal VKIIA 19/A3 humana.

16. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 15, en donde la región variable de cadena ligera Vk comprende una secuencia indicada como la SEQ ID NO: 166 o 167.

17. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 8, en donde la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de amino ácido indicada como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 152, residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 153, o indicada como la SEQ ID NO: 155, 156, 157, 158, 159, 160, 174, 175, o 176.
18. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 8, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una o más regiones de complementariedad de una región variable de cadena pesada de 2A4 indicadas como los residuos 20-138 de la SEQ ID NO: 154.
19. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 18, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende dos regiones de complementariedad de una región variable de cadena pesada de 2A4 indicadas como los residuos 20-138 de la SEQ ID NO: 154.
20. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 19, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones de complementariedad de una región variable de cadena pesada de 2A4 indicadas como los residuos 20-138 de la SEQ ID NO: 154.
21. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 20, que comprende al menos un residuo de marco de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste de H37, H49, H70, y H93 (convención de numeración Kabat) ocupado por I, A, F, o V, respectivamente, en donde el resto de la región variable de cadena pesada es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana.

22. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 20, que comprende al menos un residuo de marco de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste de +10, +15, +19, + 37, +49, +73, +78, +79, +80, +87, +95, +99, +119 (numeración lineal) ocupado por R, K, K, I, A, F, Q, S, M, N, M, V, o A, respectivamente, en donde el resto de la región variable de cadena pesada es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana.

23. (Nueva) El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 22, que comprende al menos un residuo de marco de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste de +37, +49, +73, y +99 (numeración lineal) ocupado por I, A, F, o V, respectivamente, en donde el resto de la región variable de cadena pesada es ocupado por un residuo correspondiente en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana.

24. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 21, en donde la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina aceptora humana es una región variable de cadena pesada del subgrupo 3 gamma humano (convención Kabat).

25. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 24, en donde la región variable de cadena pesada de subgrupo 3 gamma humano comprende una secuencia indicada como la SEQ ID NO: 165.

26. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 8, en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de amino ácido indicada como los residuos 20-138 de la SEQ ID NO: 154 o indicada como la SEQ ID NO: 161, 162, o 163.

27. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 8, que comprende una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de una región variable de cadena ligera de 2A4 indicadas como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 152 o tres regiones de complementariedad de una región variable de cadena ligera de 7D8 indicadas como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 153, y una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones de complementariedad de una región variable de cadena pesada de 2A4 indicadas como los residuos 20-138 de la SEQ ID NO: 154.

28. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 8, que comprende una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad indicadas como las SEQ ID NOs: 168, 169, y 170, y una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones de complementariedad indicadas como las SEQ ID NOs: 171, 172, y 173.

29. (Nueva) El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 8, que comprende una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad indicadas como las SEQ ID NOs: 177, 169, y 170, y una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones de complementariedad indicadas como las SEQ ID NOs: 171, 172, y 173.

30. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 27, que comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como los residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 152 o residuos 20-131 de la SEQ ID NO: 153, y una región variable de cadena pesada comprende una secuencia de amino ácido indicada como los residuos 20-138 de la SEQ ID NO: 154.

31. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 27, que comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 155, 156, 157, 158, 159, 160, 174, 175, o 176; y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 161, 162, o 163.

32. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 31, en donde la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 155, y la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 161.

33. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 31, en donde la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 156, y la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 162.

34. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 31, en donde la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 157, y la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de amino ácido indicada como la SEQ ID NO: 163.

35. Un anticuerpo asilado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo que comprende X_1EDX_2 en una proteína amiloide agregada, en donde X_1 y X_2 son cualquier amino ácido.

36. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 35, en donde X_1 es H, T, F, S, P, A, L, C, Q, R, E, K, D, G, V, Y, I, o W, y en donde X_2 es T, S, E, R, I, V, F, D, A, G, M, L, N, P, C, K, Y, o Q.

37. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 36, en donde X_1 es H, T, F, o A.
38. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 36, en donde X_2 es T, S, E, D, o A.
39. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 37, en donde X_1 es H o A y X_2 es T, S, o A.
40. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 37, en donde X_1 es T y X_2 es E.
41. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 37, en donde X_1 es F y X_2 es D.
42. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 36, en donde X_1 es S y X_2 es E, F o A.
43. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 36, en donde X_1 es P y X_2 es E, I o F.
44. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 36, en donde el epítipo consiste de una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de GHEDT (SEQ ID NO: 3), HEDT (SEQ ID NO: 12), AEDS (SEQ ID NO: 13), AEDT (SEQ ID NO: 14), HEDA (SEQ ID NO: 15), y TEDE (SEQ ID NO: 16).

45. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 44, que se une específicamente a una proteína amiloide agregada en un epítipo que comprende una secuencia de amino ácido GHGAEDS (SEQ ID NO:4).
46. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 35, en donde el anticuerpo se une a la proteína amiloide en forma monomérica con una afinidad de menos de aproximadamente 10^7 M^{-1} .
47. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 35, en donde la proteína amiloide es proteína A amiloide en suero (SAA).
48. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 35, en donde la proteína amiloide es seleccionada del grupo que consiste de proteína de cadena ligera de inmunoglobulina, polipéptido precursor amiloide de islote humano (IAPP), péptido beta amiloide, transtiretina (TTR) y ApoA1.
49. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 48, en donde la proteína amiloide es proteína de cadena ligera de inmunoglobulina.
50. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 49, en donde la proteína de cadena ligera de inmunoglobulina es V λ 6 Wil.
51. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 49, en donde la proteína de cadena ligera de inmunoglobulina es V κ .
52. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 48, en donde la proteína amiloide es polipéptido precursor amiloide de islote humano (IAPP).

53. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 48, en donde la proteína amiloide es péptido beta amiloide.
54. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 48, en donde la proteína amiloide es transtiretina (TTR).
55. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 48, en donde la proteína amiloide es ApoA1.
56. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 35, que es un anticuerpo humano, humanizado, o quimérico o fragmento de unión a antígeno.
57. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 56, que se une específicamente a un epítipo entre los residuos 70-76 de péptido A amiloide humano.
58. Un método para tratar terapéuticamente un sujeto que tiene amiloidosis AA, que comprende administrar al sujeto una dosificación efectiva del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 para de este modo tratar la amiloidosis AA en el sujeto.
59. El método de la reivindicación 58, en donde el sujeto es un humano.
60. El método de la reivindicación 58, en donde tratar terapéuticamente comprende ralentizar la progresión de amiloidosis AA.
61. El método de la reivindicación 58, en donde tratar terapéuticamente comprende inhibir la deposición de agregados de fibrilo amiloide AA.

62. El método de la reivindicación 58, en donde tratar terapéuticamente comprende depurar de agregados de fibrilo amiloide AA.

63. El método de la reivindicación 58, en donde el sujeto sufre de una enfermedad amiloide seleccionada del grupo que consiste de artritis reumatoide, artritis juvenil crónica, espondilitis anquilosante, soriasis, artropatía soriática, síndrome de Reiter, Enfermedad de Still del Adulto, síndrome de Behcet, enfermedad de Crohn, lepra, tuberculosis, bronquiéctasis, úlceras por decúbito, pielonefritis crónica, osteomielitis, enfermedad de Whipple, linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas de intestino, pulmón y tracto urogenital, carcinoma de célula basal, leucemia de célula vellosa, Fiebre Mediterránea Familiar, y Enfermedad de Castleman.

64. Un método para tratar profilácticamente un sujeto susceptible a amiloidosis AA, que comprende administrar al sujeto una dosificación efectiva del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 para de este modo efectuar profilaxis de amiloidosis AA en el sujeto.

65. El método de la reivindicación 64, en donde el sujeto es un humano.

66. El método de la reivindicación 64, en donde tratar profilácticamente es retrasar la aparición de amiloidosis AA.

67. El método de la reivindicación 64, en donde tratar profilácticamente es reducir un riesgo de amiloidosis AA.

68. Un método para tratar teraéuticamente un sujeto que sufre de una amiloidosis asociada con una proteína amiloide agregada que comprende la secuencia de amino ácido ED, que comprende administrar al sujeto un

anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 30 para de esta forma tratar la amiloidosis.

69. El método de la reivindicación 68, en donde el sujeto es un humano.

70. El método de la reivindicación 68, en donde tratar terapéuticamente es ralentizar la progresión de la amiloidosis.

71. El método de la reivindicación 68, en donde tratar terapéuticamente es inhibir la deposición de agregados de fibrilo amiloide.

72. El método de la reivindicación 68, en donde tratar terapéuticamente es depurar los agregados de fibrilo amiloide.

73. El método de la reivindicación 68, en donde la proteína amiloide comprende la secuencia AEDV (SEQ ID NO: 23), y la enfermedad amiloidogénica es amiloidosis AA, amiloidosis AL, polineuropatía amiloide, fiebre Mediterránea, síndrome de Muckle-Wells, amiloidosis sistémica reactiva asociada con enfermedades inflamatorias sistémicas, mieloma o amiloidosis asociada con macroglobulinemia, amiloidosis asociada con discrasia de inmunocito, gammopatía monoclonal, discrasia oculta, y amiloidosis nodular local asociada con enfermedades inflamatorias crónicas.

74. Un método para tratar profilácticamente un sujeto susceptible a una amiloidosis asociada con una proteína amiloide agregada que comprende la secuencia de amino ácido ED, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 30 para de este modo tratar la amiloidosis.

75. Un método para detectar un depósito amiloide asociado con amiloidosis AA en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 unido a un marcador detectable, y detectar el marcador detectable en el sujeto.

76. El método de la reivindicación 75, en donde el sujeto es un humano.

77. El método de la reivindicación 75, en donde el sujeto sufre de o es susceptible a una enfermedad amiloide seleccionada del grupo que consiste de artritis reumatoide, artritis juvenil crónica, espondilitis anquilosante, soriasis, artropatía soriática, síndrome de Reiter, Enfermedad de Still del Adulto, síndrome de Behcet, enfermedad de Crohn, lepra, tuberculosis, bronquiectasis, úlceras por decúbito, pielonefritis crónica, osteomielitis, enfermedad de Whipple, linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas de intestino, pulmón y tracto urogenital, carcinoma de célula basal, leucemia de célula vellosa, Fiebre Mediterránea Familiar, y enfermedad de Castleman.

78. El método de la reivindicación 75, en donde el marcador detectable es un radiomarcador.

79. El método de la reivindicación 78, en donde el radiomarcador es ^{125}I .

80. El método de la reivindicación 75, en donde la detección se realiza mediante representación gráfica de SPECT/CT.

81. El método de la reivindicación 75, en donde la detección se realiza mediante espectroscopía de RMN.

82. Un método para detectar un depósito amiloide en un sujeto que comprende administrar al sujeto el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno

de la reivindicación 30 que está unido a un marcador detectable y detectar el marcador detectable.

83. El método de la reivindicación 82, en donde el sujeto es un humano.

84. El método de la reivindicación 82, en donde la amiloidosis es amiloidosis AA, amiloidosis AL, enfermedad de Alzheimer, Deterioro Cognitivo Leve, polineuropatía amiloide, fiebre Mediterránea, síndrome de Muckle-Wells, amiloidosis sistémica reactiva asociada con enfermedades inflamatorias sistémicas, mieloma o amiloidosis asociada con macroglobulinemia, amiloidosis asociada con discrasia de inmunocito, gammopatía monoclonal, discrasia oculta, o amiloidosis nodular local asociada con enfermedades inflamatorias crónicas.

85. El método de la reivindicación 82, en donde el marcador detectable es un radiomarcador.

86. El método de la reivindicación 85, en donde el radiomarcador es ¹²⁵I.

87. El método de la reivindicación 82, en donde la detección se realiza mediante representación gráfica de SPECT/CT.

88. El método de la reivindicación 82, en donde la detección se realiza mediante espectroscopia de RMN.

89. Un método para tratar terapéuticamente un sujeto que tiene amiloidosis AA, que comprende administrar un agente que induce una respuesta inmune a los residuos 70-76 de péptido A amiloide, efectivo para inducir una respuesta inmune que comprende anticuerpos contra los residuos 70-76 de un péptido A amiloide, y de este modo tratar la amiloidosis AA en el sujeto.

90. Un método para tratar profilácticamente un sujeto susceptible a amiloidosis AA, que comprende administrar un agente que induce una respuesta inmune a los residuos 70-76 de péptido A amiloide efectivo para inducir una respuesta inmune que comprende anticuerpos contra los residuos 70-76 de un péptido A amiloide para de esta forma efectuar profilaxis de amiloidosis AA en el sujeto.

HSA1	(SEQ ID NO: 98)	1	MKLLTGLVFC	SIVLGVSSRS	FFSTLGEAFD	GARDMWRAYS	DMREANYIGS
HSA2	(SEQ ID NO: 99)	1	MKLLTGLVFC	SIVLSVSSRS	FFSTLGEAFD	GARDMWRAYS	DMREANYIGS
HSA3	(SEQ ID NO: 100)	1	MKLSGTGIIFC	SIVLGVSSQG	WLTFKAAGQ	GAKDMWRAYS	DMKEANYIKS
HSA4	(SEQ ID NO: 101)	1	MRLFTGIVFC	SIVMGVTSES	WRSTFKEALQ	GVGDMGRAYW	DIMISNHQNS
HSA1	(SEQ ID NO: 98)	51	DKYFHARGNY	DAAKRGPGGV	WAAEAISDAR	ENIQRTFGHG	A-----E
HSA2	(SEQ ID NO: 99)	51	DKYFHARGNY	DAAKRGPGGA	WAAEVISNAR	ENIQRLTGHG	A-----E
HSA3	(SEQ ID NO: 100)	51	DKYFHARGNY	DAVQRGPGGV	WATEVISDAR	ENVQRLTGdh	A-----E
HSA4	(SEQ ID NO: 101)	51	NRLYARGNY	DAAQRGPGGV	WAAKLISRSR	vylqglidyy	lfgnsstvle
HSA1	(SEQ ID NO: 98)	93	DSLADQAANE	WGRSGKDENVH	FRPAGLPEKY		
HSA2	(SEQ ID NO: 99)	93	DSLADQAANK	WGRSGRDENVH	FRPAGLPEKY		
HSA3	(SEQ ID NO: 100)	93	DSLACQATNK	WGQSGKDENVH	FRPAGLPEKY		
HSA4	(SEQ ID NO: 101)	101	DKSNEKAEE	WGRSGKDENVH	FRPDGLPKKY		

FIG. 1

2/40

HSAAL	(SEQ ID NO: 98)	1	mklltglvfc slvgvssrs ffsflgeafd gardmwrays dmreanyigs
HAA1	(SEQ ID NO: 102)	1	-----RS ffsflgeafd gardmwrays dmreanyigs
HSAAL	(SEQ ID NO: 98)	51	DKYFHARGNY DAAKRGPGV WAAEAIKDAR ENIQRFPGHG AEDsladqaa
HAA1	(SEQ ID NO: 102)	33	DKYFHARGNY DAAKRGPGV WAAEAIKDAR ENIQRFPGHG AEDS-----
HSAAL	(SEQ ID NO: 98)	101	newgrsgkdp nhfrpaglpe ky
HAA1	(SEQ ID NO: 102)		-----

FIG. 2

HSAA2 (alfa)	(SEQ ID NO: 99)	1	mklltglvfc slvlsvsrs	FFSFLGEAFD	GARDMWRAYS	DMEANYIGS
HAA2 (alfa)	(SEQ ID NO: 103)	1	-----RS	FFSFLGEAFD	GARDMWRAYS	DMEANYIGS
HSAA2 (alfa)	(SEQ ID NO: 99)	51	DKYFHARGNY DAAKRGPGGA	WAAEVISNAR	ENIQRLTGHG	AEDSladqaa
HAA2 (alfa)	(SEQ ID NO: 103)	33	DKYFHARGNY DAAKRGPGGA	WAAEVISNAR	ENIQRLTGHG	AEDS-----
HSAA2 (alfa)	(SEQ ID NO: 99)	101	nkwwgrsgrdp nhfrpaglpe	ky		
HAA2 (alfa)	(SEQ ID NO: 103)		-----	-----	--	

FIG. 3

HSAA3	(SEQ ID NO: 100)	1	mklsstglifc slvlgvssQG WLTFLKAAGQ GAKDMWRAYS DMKEANYKKS
HAA3	(SEQ ID NO: 104)	1	-----QG WLTFLKAAGQ GAKDMWRAYS DMKEANYKKS
HSAA3	(SEQ ID NO: 100)	51	DKYFHARGNY DAVQRGPGGV WATEVISDAR ENVQRLTGDH AEDslagqat
HAA3	(SEQ ID NO: 104)	33	DKYFHARGNY DAVQRGPGGV WATEVISDAR ENVQRLTGDH AEDS-----
HSAA3	(SEQ ID NO: 100)	101	nkwgsgskdp nhfrpaglpe ky
HAA3	(SEQ ID NO: 104)		-----

FIG. 4

HSAA4 (SEQ ID NO: 101)	1	mr1ftgi vfc slvmgvtseS WRSFFKEALQ GVGDMDGRAYW DIMISNHQNS
HAA4 (SEQ ID NO: 105)	1	-----ES WRSFFKEALQ GVGDMDGRAYW DIMISNHQNS
HSAA4 (SEQ ID NO: 101)	51	NRYYIYARGNY DAAQRGPGGV WAAKLISR SR VYLQGLIDYY LFGNSstvl e
HAA4 (SEQ ID NO: 105)	33	NRYYIYARGNY DAAQRGPGGV WAAKLISR SR VYLQGLIDYY LFGNS-----
HSAA4 (SEQ ID NO: 101)	101	dskenekae e wgrsgkdpdr frp dglpkk y
HAA4 (SEQ ID NO: 105)		-----

FIG. 5

HAA1	(SEQ ID NO: 102)	1	RSFFSFLGEA	FDGARDMWRA	YSDMREANYI	GSDKYFHARG	NYDAAKRGPG
HAA2	(SEQ ID NO: 103)	1	RSFFSFLGEA	FDGARDMWRA	YSDMREANYI	GSDKYFHARG	NYDAAKRGPG
HAA3	(SEQ ID NO: 104)	1	QGWLTFKAA	GQGAQDMWRA	YSDMKEANYK	KSDKYFHARG	NYDAVQRGPG
HAA4	(SEQ ID NO: 105)	1	ESWRSFFKEA	LQGVGDMGRA	YWDIMISNHQ	NSNRILYARG	NYDAAQRGPG
HAA1	(SEQ ID NO: 102)	51	GVWAAEAISD	ARENIQRF--	---FGHGA--	-EDS	
HAA2	(SEQ ID NO: 103)	51	GAWAAEVISN	ARENIQRL--	---TGHGA--	-EDS	
HAA3	(SEQ ID NO: 104)	51	GVWATEVISD	ARENVQRL--	---TGdha--	-EDS	
HAA4	(SEQ ID NO: 105)	51	GVWAAKLISR	SRVYLQGLId	yylFGNSStv	lEDS	

FIG. 6

HAA1	(SEQ ID NO: 102)	70	GHGAEDS
HAA2	(SEQ ID NO: 103)	70	GHGAEDS
HAA3	(SEQ ID NO: 104)	70	GdhaEDS
HAA4	(SEQ ID NO: 105)	78	stvLEDs

FIG. 7

SAA1 de Ratón	(SEQ ID NO: 106)	1	MKLLTSLVFC SLLLGVCCHGG FFSFVHEAFQ GAGDMWRAYT DMKEANWKNS
SAA2 de Ratón	(SEQ ID NO: 107)	1	MKLLTSLVFC SLLLGVCCHGG FFSFIGEAFQ GAGDMWRAYT DMKEAGWKDG
SAA3 de Ratón	(SEQ ID NO: 108)	1	MKPSIAIILC ILLIGVDSQR WVQFMKEAGQ GSRDMWRAYS DMKEANWKNS
SAA4 de Ratón	(SEQ ID NO: 109)	1	MRLATVIVLC SLFLGVSGDG WYSFFREAVQ GTWDLNRAYR DnLEANYQNA
SAA1 de Ratón	(SEQ ID NO: 106)	51	DKYFHARGNY DAAQRGPGGV WAAEKISDGR EAFQE----- FFG---RGHE
SAA2 de Ratón	(SEQ ID NO: 107)	51	DKYFHARGNY DAAQRGPGGV WAAEKISDAR ESFQE----- FFG---RGHE
SAA3 de Ratón	(SEQ ID NO: 108)	51	DKYFHARGNY DAARRGPGGA WAAKVISDAR EAVQK----- FTG---HGAE
SAA4 de Ratón	(SEQ ID NO: 109)	51	DQYFYARGNY EAQRGSGGI WAAKIISTSR KYFqgllnry YFGlnHGLE
SAA1 de Ratón	(SEQ ID NO: 106)	93	DTIADQEANR HGRSGKDPNY YRPPGLEDKY
SAA2 de Ratón	(SEQ ID NO: 107)	93	DTWADQEANR HGRSGKDPNY YRPPGLEPAKY
SAA3 de Ratón	(SEQ ID NO: 108)	93	DSRADQFANE WGRSGKDPNH FRPAGLEPKRY
SAA4 de Ratón	(SEQ ID NO: 109)	101	TLQATQKAEW WGRSGKNPNH FRPEGLEPEKF

FIG. 8

9/40

MSA1	(SEQ ID NO: 106)	1	mklltstlvfc slllgvchgG FFSFVHEAFQ GAGDMWRAYT DMKEANWKNS
MAA1	(SEQ ID NO: 110)	1	-----G FFSFVHEAFQ GAGDMWRAYT DMKEANWKNS
MSA1	(SEQ ID NO: 106)	51	DKYFHARGNY DAAQRGGGV WAAEKISDGR EAFQEFFGRG HEDTiadqea
MAA1	(SEQ ID NO: 110)	32	DKYFHARGNY DAAQRGGGV WAAEKISDGR EAFQEFFGRG HEDT-----
MSA1	(SEQ ID NO: 106)	101	nrhgrsgkdp nyypgglpd ky
MAA1	(SEQ ID NO: 110)		-----

FIG. 9

MSAA2	(SEQ ID NO: 107)	1	mklltstlvc	slilgvchgg	ffsfigeafq	gagdmwrayt	dnkeagwkdg
MAA2	(SEQ ID NO: 111)	1	-----	-----G	ffsfigeafq	gagdmwrayt	dnkeagwkdg
MSAA2	(SEQ ID NO: 107)	51	dkyfhargny	daaqrpggv	waaekisdar	esfqeffgrg	hEDTmadqea
MAA2	(SEQ ID NO: 111)	32	dkyfhargny	daaqrpggv	waaekisdar	esfqeffgrg	HEDT-----
MSAA2	(SEQ ID NO: 107)	101	nrhgrsgkdp	nyytpgglpa	ky		
MAA2	(SEQ ID NO: 111)		-----	-----			

FIG. 10

11/40

MSAA3 (SEQ ID NO: 108)	1	wkpsiaillc	illlgvdsqr	wvqfmkeagq	GSRDMWRAYS	DMKKANWKNS
MAA3 (SEQ ID NO: 112)	1	-----	-----	-----EAGQ	GSRDMWRAYS	DMKKANWKNS
MSAA3 (SEQ ID NO: 108)	51	DKYFHARGNY	DAARRGPGGA	WAAKVISDAR	EAVQKFTGHG	AEDSradqfa
MAA3 (SEQ ID NO: 112)	25	DKYFHARGNY	DAARRGPGGA	WAAKVISDAR	EAVQKFTGHG	AEDS-----
MSAA3 (SEQ ID NO: 108)	101	newgrsgkdp	nhfrpaglpk	ry		
MAA3 (SEQ ID NO: 112)		-----	-----	--		

FIG. 11

12/40

MSAA4 (SEQ ID NO: 109)	1	mrlatvivlc slflgvsgdg	WYSEFFREAVQ	GTWDLWRAYR	DNLEANYQNA
MAA4 (SEQ ID NO: 113)	1	-----	WYSEFFREAVQ	GTWDLWRAYR	DNLEANYQNA
MSAA4 (SEQ ID NO: 109)	51	DQYFYARGNY EAQQRGSGGI	WAAKIISTSR	KYFQGLINRY	YFGIRNHGLE
MAA4 (SEQ ID NO: 113)	31	DQYFYARGNY EAQQRGSGGI	WAAKIISTSR	KYFQGLINRY	YFGIRNHGLE
MSAA4 (SEQ ID NO: 109)	101	TLqatqkaee wgrsgknph	frpeglpekf		
MAA4 (SEQ ID NO: 113)	81	TL-----	-----		

FIG. 12

13/40

MAA1	(SEQ ID NO: 110)	1	GFFSFVHEAF QGAGDMWRAY TDMKEANWKN SDKYPHARGN YDAAQRGPGG
MAA2	(SEQ ID NO: 111)	1	GFFSFIGEAF QGAGDMWRAY TDMKEAGWKD GDKYPHARGN YDAAQRGPGG
MAA3	(SEQ ID NO: 112)	1	-----EAG QGSRDWWRAY SDMKKANWKN SDKYPHARGN YDAAARRGPGG
MAA4	(SEQ ID NO: 113)	1	-WYSFFREAV QGTWDLWRAY RDNLEANYQN ADQYFYARGN YEAQQRGSGG
MAA1	(SEQ ID NO: 110)	51	VWAAEKISDG REAFQE----- -FFG---RGH EDT
MAA2	(SEQ ID NO: 111)	51	VWAAEKISDA RESFQE----- -FFG---RGH EDT
MAA3	(SEQ ID NO: 112)	44	AWAAKVISDA REAVQK----- -FTG---HGA EDS
MAA4	(SEQ ID NO: 113)	50	IWAAKIISTS RKYFQgllnr yYFGirrhGL ETL

FIG. 13

MAA1	(SEQ ID NO: 110)	69	GRGHEDT
MAA2	(SEQ ID NO: 111)	69	GRGHEDT
MAA3	(SEQ ID NO: 112)	62	GHGAEDS
MAA4	(SEQ ID NO: 113)	76	nHGLETTL

FIG. 14

HSA1	(SEQ ID NO: 98)	1	MKLLTGLVFC	SLVLGVSSRS	FFSFLGEAFD	GARDMWRAYS	DMREANYIGS
MSA1	(SEQ ID NO: 106)	1	MKLLTSLVFC	SLLLGVCHGG	FFSFVHEAFQ	GAGDMWRAYT	DMKEANWKNS
HSA1	(SEQ ID NO: 98)	51	DKYFHARGNY	DAAKRGPGGV	WAAEAISDAR	eniQRFFGHG	AEDSLADQAA
MSA1	(SEQ ID NO: 106)	51	DKYFHARGNY	DAAQRGPGGV	WAAEKISDGR	eafQEFFGRG	HEDTIADQEA
HSA1	(SEQ ID NO: 98)	101	NEWGRSGKDP	NHFFPAGLPE	KY		
MSA1	(SEQ ID NO: 106)	101	NRHGRSGKDP	NYRPPFGLPD	KY		

FIG. 15

HAA1 (SEQ ID NO: 102)	1	rSFPSFLGEA	FDGARDMWRA	YSDMREANYI	gSDKYFFHARG	NYDAAKRGPG
MAA1 (SEQ ID NO: 110)	1	g-FPSFVHEA	FQGAGDMWRA	YDMMKEANWK	nSDKYFFHARG	NYDAAQRGPG
HAA1 (SEQ ID NO: 102)	51	GVWAAEAISD	AREniQRFFG	HGAEDS		
MAA1 (SEQ ID NO: 110)	50	GVWAAEKISD	GREafQEFFF	RGHEDT		

FIG. 16

17/

HAAL	(SEQ ID NO: 102)	1	GHGAEDS
MAAL	(SEQ ID NO: 110)	1	GRGHEDT

FIG. 17

HSAA1 alfa	(SEQ ID NO: 114)	1	mkllltglvfc	slvlgvssrs	ffsflgeafd	garmwrrays	dmreanyigs
HSAA1 beta	(SEQ ID NO: 115)	1	mkllltglvfc	slvlgvssrs	ffsflgeafd	garmwrrays	dmreanyigs
HSAA1 gamma	(SEQ ID NO: 116)	1	mkllltglvfc	slvlgvssrs	ffsflgeafd	garmwrrays	dmreanyigs
HSAA1 alfa	(SEQ ID NO: 114)	51	dkyfhargny	daakegpggv	waaeaisdar	eniqrffghg	aedsladqaa
HSAA1 beta	(SEQ ID NO: 115)	51	dkyfhargny	daakegpgga	waaevisdar	eniqrffghd	aedsladqaa
HSAA1 gamma	(SEQ ID NO: 116)	51	dkyfhargny	daakegpggv	waaeaisdar	eniqrffghd	aedsladqaa
HSAA1 alfa	(SEQ ID NO: 114)	101	newgrsgkdp	nhfrpaglpe	ky		
HSAA1 beta	(SEQ ID NO: 115)	101	newgrsgkdp	nhfrpaglpe	ky		
HSAA1 gamma	(SEQ ID NO: 116)	101	newgrsgkdp	nhfrpaglpe	ky		

18/40

FIG. 18

HSAA2 alfa	(SEQ ID NO: 114)	1	mKLLTGIVFC SLVLSVSSRS FFSFLGEAFD GARDMWRRAYS DmREANYIGS
HSAA2beta	(SEQ ID NO: 115)	1	mKLLTGIVFC SLVLSVSSRS FFSFLGEAFD GARDMWRRAYS DmREANYIGS
HSAA2alfa	(SEQ ID NO: 114)	51	DKYFHARGNY DAAKRGPGGA WAAEVISNAR ENIQRLTGHG AEDSLADQAA
HSAA2beta	(SEQ ID NO: 115)	51	DKYFHARGNY DAAKRGPGGA WAAEVISNAR ENIQRLTGRG AEDSLADQAA
HSAA2alfa	(SEQ ID NO: 114)	101	NKWGRSGRDP NHFRPAGLPE KY
HSAA2beta	(SEQ ID NO: 115)	101	NKWGRSGRDP NHFRPAGLPE KY

FIG. 19

Humano	(SEQ ID NO: 119): RSFFSFLGEA	10	20	30	40
Ratón	(SEQ ID NO: 120): G FFSFIDGEA		FDGARDMWRA	YSDMEANYI	GSDKYFHARG
Shar Pei	(SEQ ID NO: 121): E WYSFVGEA		FQGAGDMWRA	YTDMEAGWK	DGDKYFHARG
			AQGANDMLRA	YSDMEANYK	NSDKYFHARG
Humano	(SEQ ID NO: 119): NYDAAKRGPG	50	60	70	80
Ratón	(SEQ ID NO: 120): NYDAAQRGPG		GVWAAEAISD	ARENIQRFFG	HGAEDSLADQ
Shar Pei	(SEQ ID NO: 121): NYDAAQRGPG		GVWAAEKISD	ARESFQEFFG	RGHEDTMADQ
			CAWAAKVISD	ARENSQRDSG	HGAEDSKADQ
			<u>ITDLLRFG</u>		
Humano	(SEQ ID NO: 119): AANEWGRSGK	90	100	104	
Ratón	(SEQ ID NO: 120): EARNHGRSGK		DPNHFRPAGL	PEKY	
Shar Pei	(SEQ ID NO: 121): AANEWG		DPNYRPPGL	PAKY	

FIG. 20

21/40

	0	1	2	3	4	5
	1	1	1	0	5	4
	1	1	1	0	5	4
kp1a (SEQ ID NO:123)	DIQMTQSPST	LSASVGRVT	ITCRASQSI*	*****SSWLA	WYQOKPGKAP	KLLIYKASSL
kp1b (SEQ ID NO:124)	S	S	..Q..D..	NY.N		D.N.
kp1c (SEQ ID NO:125)	S	S	G..	Y.N		A....
kp1d (SEQ ID NO:126)	S	S	G..	RND.G		R...A....
kp1e (SEQ ID NO:127)	S	S	G..	NY..	F.....	S...A....
kp1f (SEQ ID NO:128)	A..L.....S	S	G..	A..		D....
kp1g (SEQ ID NO:129)	S	V.....S	G..			A....
kp2a (SEQ ID NO:130)	..V...T..LS	PVTP.EPAS	..S..S..LL	DSDDNTY.D	..L...QS.	Q...TL.YR
kp2b (SEQ ID NO:131)	..V...T..LS	PVTP.EPAS	..S..S..LL	HS.NGYNY.D	..L...QS.	Q...LG.NR
kp2c (SEQ ID NO:132)	..V...T..LS	..VTP.OPAS	..S.KS..LL	HS.DGKTY.Y	..L...QP.	Q...EV.NR
kp3a (SEQ ID NO:133)	E.V...A..	..V.P.E.A.	LS.....V.	N..	R...G..TR	
kp3b (SEQ ID NO:134)	E.VL...A.	..L.P.E.A.	LS.....VS	Y..	Q..R...G..R	
kp3c (SEQ ID NO:135)	E.VL...A.	..L.P.E.A.	LS.....VS	Y..	Q..R...D..NR	
kp4 (SEQ ID NO:136)	..V...DS	AV.L.E.A.	..N.KS..VL	YSSNNKNY..	QP.	W..TR
kp5 (SEQ ID NO:137)	ETTL.....AF	M..TP..K.N	..S.K...D..	DDDMN	E.A	IFI.QE.TT.

	5	6	7	8	9
	5	5	3	3	3
	5	5	3	3	3
kp1a (SEQ ID NO:123)	ESGVPSRFSG	SG**SGTEFT	LTISLQDD	FATYCCQYN	SYS****
kp1b (SEQ ID NO:124)	..T.....	D..	E.	I.....	D.NLP....
kp1c (SEQ ID NO:125)	Q.....	D..	E.	E.	SY..TP....
kp1d (SEQ ID NO:126)	Q.....	D..	E.	E.	L.H..P....
kp1e (SEQ ID NO:127)	Q.....	D..	E.	E.	P....
kp1f (SEQ ID NO:128)	Q.....	D..	E.	E.	F..N.P....
kp1g (SEQ ID NO:129)	Q.....	D..	E.	E.	A..FP....
kp2a (SEQ ID NO:130)	A...D....	D..	..K..RVEAE	VGW...M.RI	EFF....
kp2b (SEQ ID NO:131)	A...D....	D..	..K..RVEAE	VGW...M.AL	QTP....
kp2c (SEQ ID NO:132)	F...D....	D..	..K..RVEAE	VGW...M.SI	QLP....
kp3a (SEQ ID NO:133)	AT.I.A...	D..	SE..	V.....	NWP....
kp3b (SEQ ID NO:134)	AT.I.D...	D..	R.E.E.	..V.....G	.SP....
kp3c (SEQ ID NO:135)	AT.I.A...	D..	E.E.	..V.....RS	NWP....
kp4 (SEQ ID NO:136)	D...	D..	AE.	V.V.....Y	.TP....
kp5 (SEQ ID NO:137)	VP.I.P...	Y.D..	NNIESE	A.Y.F.L.HD	NFP....

FIG 21

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

	0	1	2	3	4	5
	1	1	1	abc	def	0
lm1a (SEQ ID NO:138)	QSVLTQPPS*	VSAAPGQKVT	ISCSGSSNI	G***NNVVS	WYQQLPGTAP	KLLIYNNKR
lm1b (SEQ ID NO:139)		A.GT...R.		S...Y		R..Q.
lm1c (SEQ ID NO:140)	...V.....	...G...R..	...T.....	...A...GYD.H		G.SN.
lm2a (SEQ ID NO:141)	..A...A...	..GS...SI.	...T.T.DV	...S...Y.L.	...H..K.	...M...GS.
lm2b (SEQ ID NO:142)	..A...R...	..GS...VI.	...T.T.DV	...G...Y...	...H..K.	...M.DVS..
lm3a (SEQ ID NO:143)	SY.....	..V...KTAR	T.G.NNIG*	SKS.H	...K..Q.	V.VV.DDSD.
lm3b (SEQ ID NO:144)	SYE.....	..VS...TAR	T...DALP*	KQ.AY	...K..Q.	V.V..KDSE.
lm3c (SEQ ID NO:145)	SYE.....	..VS...TAS	T...DKLG*	DK.AC	...K..QS.	V.V..QDS..
lm4 (SEQ ID NO:146)	S.E...D.A.	..V.L..T.R	T.Q.D.LR*	SY.A.	...K..Q.	V.V..GK.N.
lm6 (SEQ ID NO:147)	NFM....H..	..ES...KT..	...TR.GS.	A....S...Q	R..SS.	TTV...D.Q.
lm7 (SEQ ID NO:148)	.T.V..E...	LTVS...GT..	LT.AS.TGAV	TS...GY.PN	F..K..Q..	RA...STSNK
lm8 (SEQ ID NO:149)	.L....S...	A..SL.AS.K	LT.TL..G**	*..HSSYAIA	H..Q.EKG.	RY.MKL.SDG

	5	6	7	8	9
	5	5	3	3	3
lm1a (SEQ ID NO:138)	PSGIPDRFSG	SK**SGTSAT	LGITGLQTGD	EADYYCGTWD	SSLSA**
lm1b (SEQ ID NO:139)	...V.....	S	A.S..RSE.	AA..	D...G..
lm1c (SEQ ID NO:140)	...V.....	S	A....AE.	QSY.	G..
lm2a (SEQ ID NO:141)	...VSN....	NT.S	T.S...AE.	CSYA	G.STL..
lm2b (SEQ ID NO:142)	...V.....	NT.S	T.S...AE.	CSYA	G.YTF..
lm3a (SEQ ID NO:143)	E....	N...NT..	T.SRVEA..	QV..	..SDH..
lm3b (SEQ ID NO:144)	E....	S...TV..	T.S.V.AE.	QSA.	..G**..
lm3c (SEQ ID NO:145)	E....	N...NT..	T.S.T.AM.	QA..	..TAH..
lm4 (SEQ ID NO:146)	E....	S...NT.S	T...A.AE.	NSR.	..GNH..
lm6 (SEQ ID NO:147)	...V.....	IDS.SN..S	T.S.K.E.	QSY.	..N**..
lm7 (SEQ ID NO:148)	H.WT.A....	L..L.GK.A	TLS.V.PE.	..E...LLY	GGAQ*..
lm8 (SEQ ID NO:149)	GD.....	S....AERY	T.SS..SE.	Q..G	TGI**..

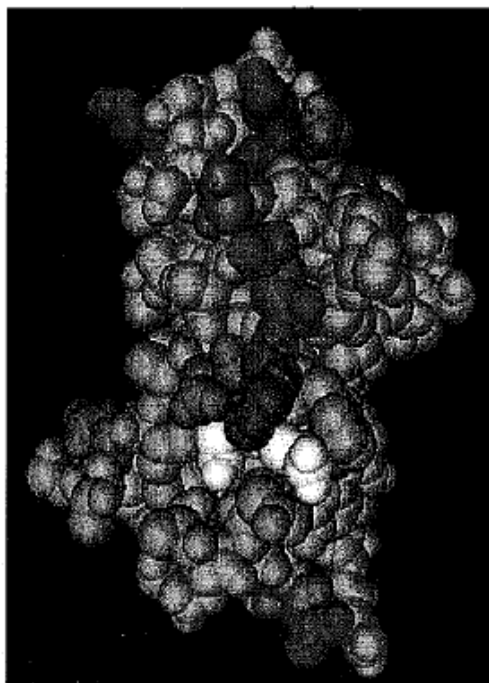
FIG. 22

1	10	21	31	35
NFLLTQPHS	VSESPGKTVT	ISCTRSSGSI	A***NNYVH	WYQORPGSSP
45	55	65AB	73	82
TTVIFEDDHR	PSGVPPDRFSG	SVDTSSNSAS	LTISGLKTED	EADYYCQSYD HNN
				93

V₁₆ WH (SEQ ID NO: 150)

FIG. 23

24/40

**FIG. 24**

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

25/40

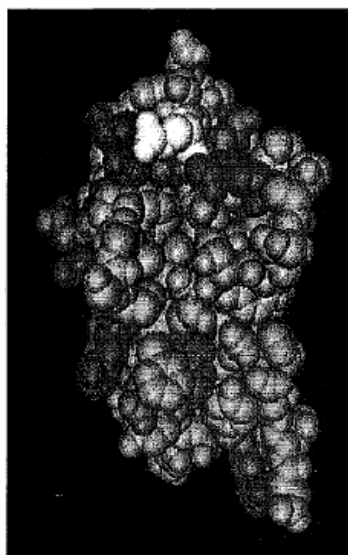
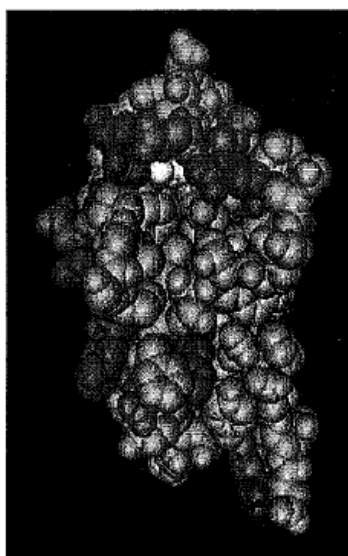
 V_6 Wil Glu81 V_6 Wil Asp82

FIG. 25

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

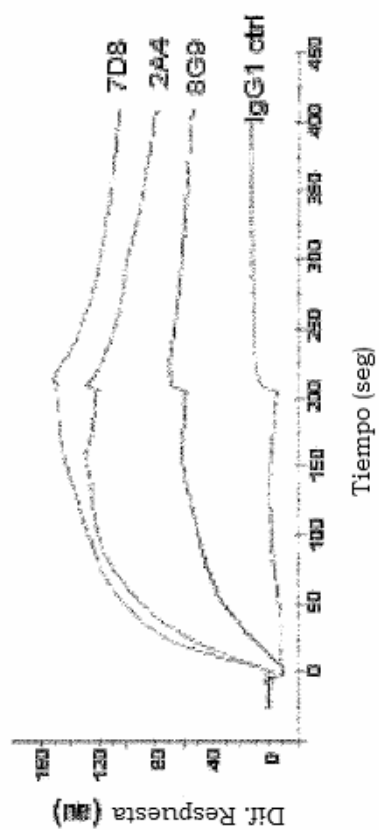


FIG. 26

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

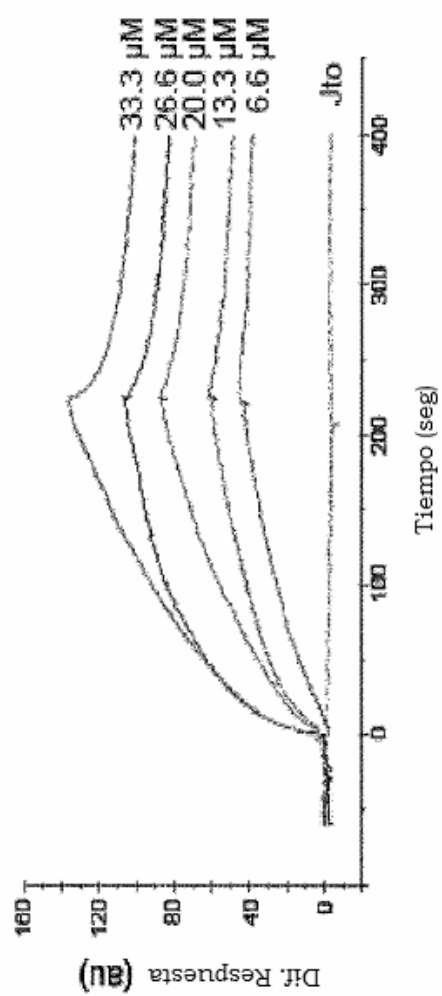


FIG. 27

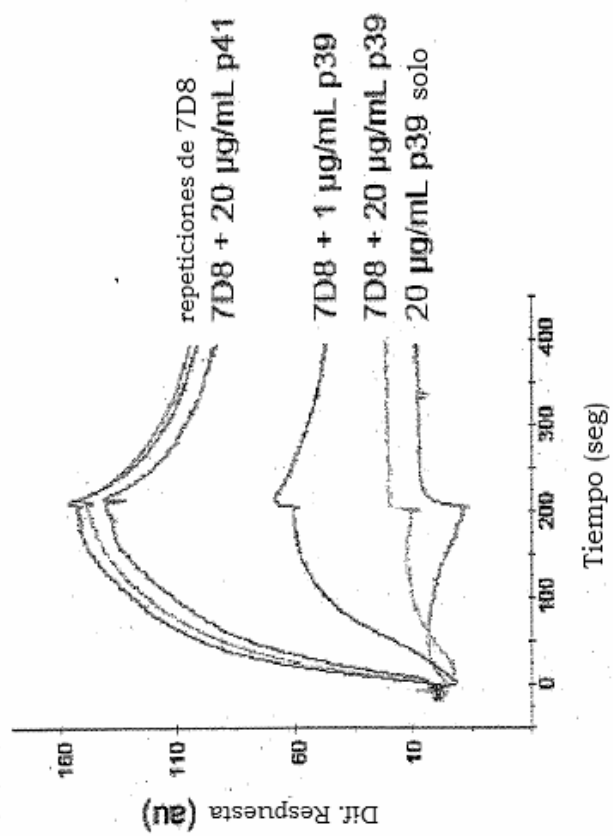
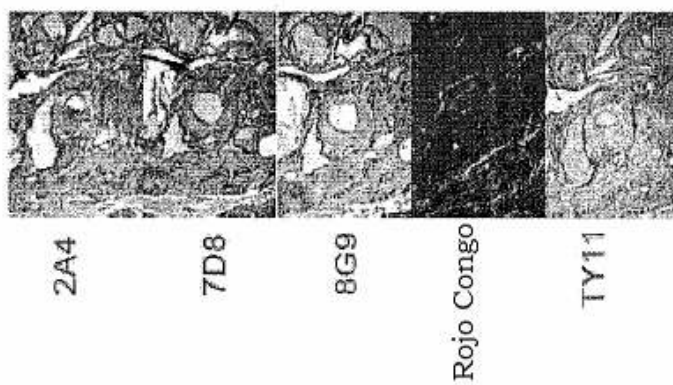


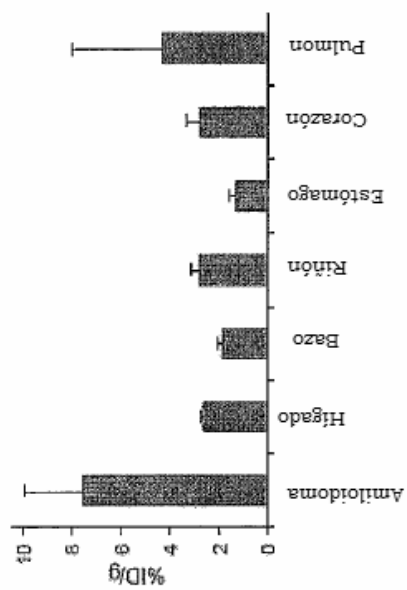
FIG. 28

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

29/40

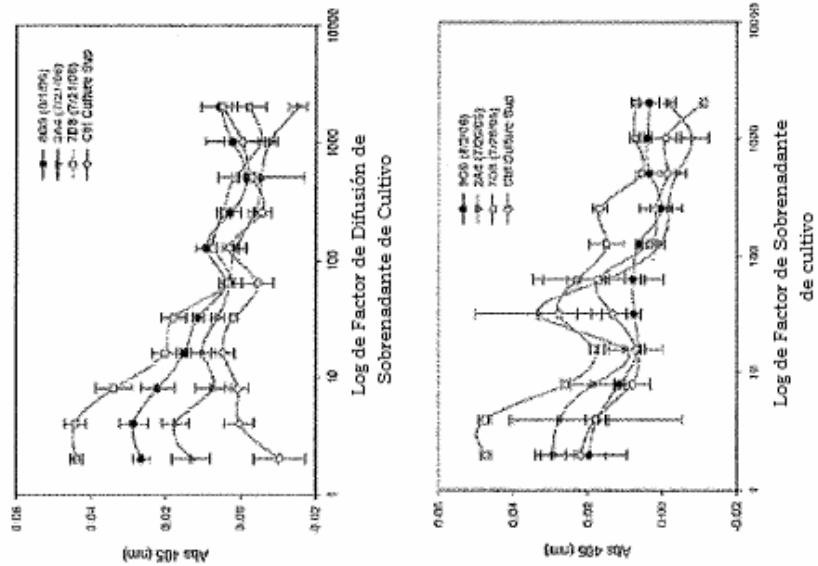
**FIG. 29**

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

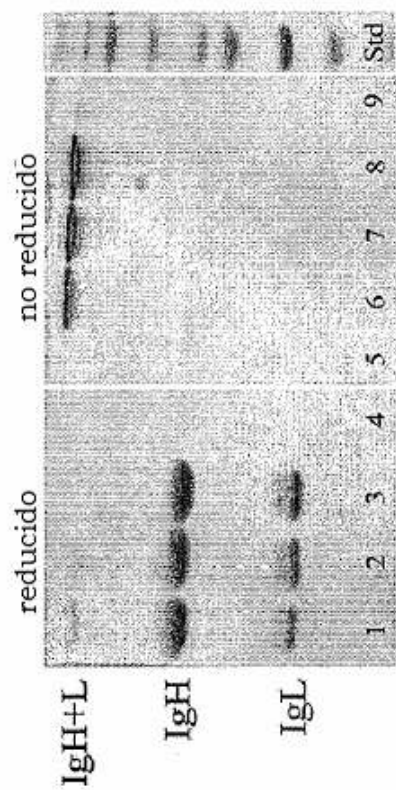
**FIG. 30**

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

31/40



HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

**FIG. 32**

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

33/40

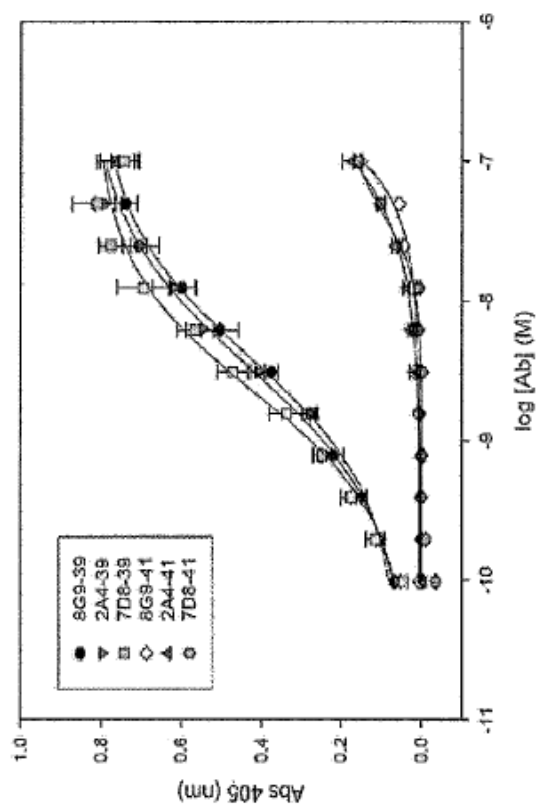


FIG. 33

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

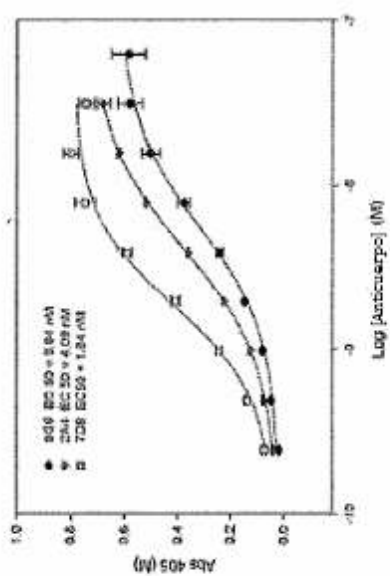


FIG. 34

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

35/40

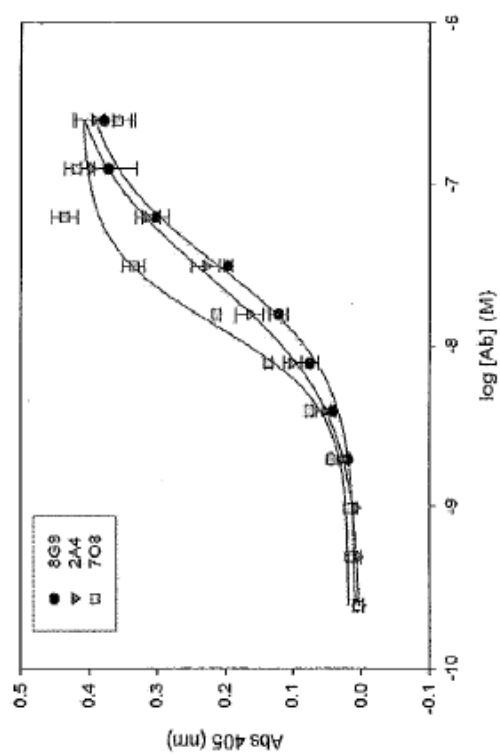


FIG. 35

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

36/40

VL Murino (2A4 y 8G9)
MKLPVRLLLVLMFWIPASSSDVVMTQTPLSLPVSLDQASISCRSSQSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNNRESGVPDRFSGS
GSGTYFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPEIFGGTKLEIK (SEQ ID NO: 152)

VL Murino (7D8)
MKLPVRLLLVLMFWIPASSSDVVMTQTPLSLPVSLDQASISCRSSQSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNNRESGVPDRFSGS
GSGTYFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPEIFGGTKLEIK (SEQ ID NO: 153)

VH Murino (2A4, 7D8, 8G9)
MVLGLKWVFEVEYOGVHCEVQLVESGGRLVOPKGSLKLSCASGFTENTYAMYWIRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYAIYADSVK
DRFTIRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRPYSDSFAYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 154)

FIG. 36A

Versión 1 de VL de Hum2A4
 DVVMTQSP_{LS}LPVTPGEPASISCRSSQSLVHSTGNTY_LHWY_LLQKPGQSPQLLIYK_VSNRFSGV_PDRFSGSGSGT_FTLKISRVEAEDVGV
 Y_FCSQSTHVP_FTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 155)
 Versión 2 de VL de Hum2A4
 DVVMTQSP_{LS}LPVTPGEPASISCRSSQSLVHSTGNTY_LHWY_LLQKPGQSPQLLIYK_VSNRFSGV_PDRFSGSGSGT_FTLKISRVEAEDVGV
 Y_FCSQSTHVP_FTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 156)
 Versión 3 de VL de Hum2A4
 DVVMTQSP_{LS}LPVTPGEPASISCRSSQSLVHSTGNTY_LHWY_LLQKPGQSPQLLIYK_VSNRFSGV_PDRFSGSGSGT_FTLKISRVEAEDVGV
 Y_FCSQSTHVP_FTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 157)

37/40

FIG. 36B

Versión 1 de VL de Hum7D8
 DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSLSLVHSTGNTYTLHWYLVKPGQSPQLLIYKVSNRFGVDPDRFSGSGGTyFTLKISRVEAEDVGV
 YfCSQSTHVPTFGGQTKLEIK (SEQ ID NO: 158)

Versión 2 de VL de Hum7D8
 DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSLSLVHSTGNTYTLHWYLVKPGQSPQLLIYKVSNRFGVDPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGV
 YfCSQSTHVPTFGGQTKLEIK (SEQ ID NO: 159)

Versión 3 de VL de Hum7D8
 DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSLSLVHSTGNTYTLHWYLVKPGQSPQLLIYKVSNRFGVDPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGV
 YYCSQSTHVPTFGGQTKLEIK (SEQ ID NO: 160)

Versión 4 de VL de Hum7D8
 DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSLSLVHSTGNTYTLHWYLVKPGQSPQLLIYKVSNRFGVDPDRFSGSGGTyFTLKISRVEAEDVGV
 YfCSQSTHVPTFGGQTKLEIK (SEQ ID NO: 174)

Versión 5 de VL de Hum7D8
 DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSLSLVHSTGNTYTLHWYLVKPGQSPQLLIYKVSNRFGVDPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGV
 YfCSQSTHVPTFGGQTKLEIK (SEQ ID NO: 175)

Versión 6 de VL de Hum7D8
 DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSLSLVHSTGNTYTLHWYLVKPGQSPQLLIYKVSNRFGVDPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGV
 YYCSQSTHVPTFGGQTKLEIK (SEQ ID NO: 176)

FIG. 36C

Marco VL: No. de Acceso a Gen Bank BAC01562
DVVMTQSPSLPVP/TPGEPASISCRSSQSLHNSGYNLYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGGIDFTLKISRVEAEDVGV
YYCMQALQTPLTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 166)

Marco VL: No. de Acceso a Gen Bank BAC01733
MKYLLPTAAAGLLLLAAQFAMADVMTQSPSLPVP/TPGEPASISCRSSQSLHNSGYNLYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDPDR
FSGSGGIDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGGGTKLEIKRIVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECARQSTPTFVCEYQGQSSDLPQPPVN
AGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 167)

39/40

FIG. 36D

Versión 1 de VH de Hum2A4/7D8/8G9
 EVQLVESGGGLVQP~~GG~~SLRLSCAASGFTFTNTYAMYWIRQAPGKGLEWVaRIRSKSN~~NY~~AIYYADSVKDRFTIRDDSKNSLYLQMNSL
 KTEDTAVYYCVRPYSDSFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 161)

Versión 2 de VH de Hum2A4/7D8/8G9
 EVQLVESGGGLVQP~~GG~~SLRLSCAASGFTFTNTYAMYWIRQAPGKGLEWVaRIRSKSN~~NY~~AIYYADSVKDRFTIRDDSKNSLYLQMNSL
 KTEDTAVYYCVRPYSDSFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 162)

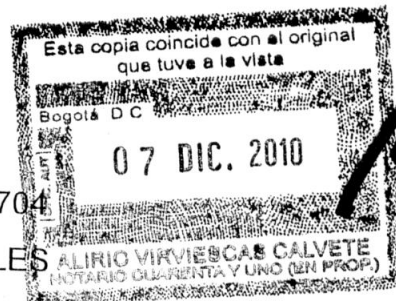
Versión 3 de VH de Hum2A4/7D8/8G9
 EVQLVESGGGLVQP~~GG~~SLRLSCAASGFTFTNTYAMYWIRQAPGKGLEWVaRIRSKSN~~NY~~AIYYADSVKDRFTIRDDSKNSLYLQMNSL
 KTEDTAVYYCARPYSDSFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 163)

2A4_8G9_7D8_H_chain_pro (VH de 2A4 Murino)
 EVQLVESGGRLVQPK~~GS~~SLKLSCAASGFTFTNTYAMYWIRQAPGKGLEWVaRIRSKSN~~NY~~AIYYADSVKDRFTIRDDSQSMLYLQMN~~N~~
 LKTEDTAMYYCVRPYSDSFAYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 164)

Marco VH No. de Acceso a Gen Bank AAC51024
 EVQLVESGGGLVQP~~GG~~SLRLSCAASGFTFSDHYMDWVRQAPGKGLEWVGRTRNKANSYTTTEYAAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMN
 SLKTEDTAVYYCARYVVGATLDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 165)

FIG. 36E

TRADUCCION OFICIAL No. 2010-12-03-704
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES



Sello

Esta Apostilla no es valida para ser usada dentro de los Estados Unidos de América, sus territorios o posesiones.

Esta Apostilla únicamente certifica la autenticidad de la firma y la competencia de la persona que ha firmado el documento público, y cuando sea apropiado, la identidad del sello o estampilla que lleva el documento público.

Esta Apostilla no certifica el contenido del documento para el cual se expidió.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. Distrito de Columbia, Estados Unidos de América
2. Este documento público ha sido firmado por Agus Sumarno
3. actuando como Notario Público en y para el Distrito de Columbia
4. lleva el sello/estampilla de Agus Sumarno, Notario Público, Distrito de Columbia

CERTIFICADO

5. en Washington, D.C.
6. el día 23 de noviembre de 2010
7. por el Secretario Interino del Distrito de Columbia
8. No. 241753
9. Sello/Estampilla
Distrito de Columbia
10. Firma: (ilegible)
Naomi N. Shelton

Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Certificado Notarial (Sociedad), documento escrito en inglés y en español.

(firma: Ilegible)

Mi Nombramiento: 7-2-12

Jeanette Lea Snider
Notario Público
Condado de Knox
Estado de Tennessee

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 3 de diciembre de 2010, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

b29829

Anita Escobar
CUYA FIRMA AGREGAR EN EL
DOCUMENTO DESEMPLEA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2010 DIC - 6 11 9:42

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.





This Apostille is not valid for use anywhere within the United States of America, its territories or possessions.

This Apostille only certifies the authenticity of the signature and the capacity of the person who has signed the public document, and, where appropriate, the identity of the seal or stamp which the public document bears.

This Apostille does not certify the content of the document for which it was issued.

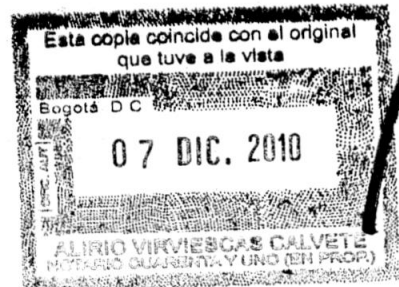
Apostille

(Convention of the de La Haye du 5 octobre 1961)

1. District of Columbia, United States of America
2. This public document has been signed by AGUS SUMARNO
3. acting in the capacity of Notary Public in and for the District of Columbia
4. bears the seal/stamp of AGUS SUMARNO, District of Columbia Notary Public

CERTIFIED

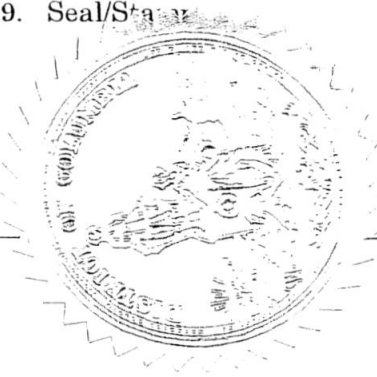
5. at Washington, D.C.
6. the 23rd day of November 2010
7. by *Interim Secretary of the District of Columbia*
8. No. 241753
9. Seal/Stamp



10. Signature:

N. Shelton

Naomi N. Shelton



Los abajo firmados,

University of Tennessee Research Foundation

con domicilio en

**600 Henle Street, Suite 211
Knoxville, Tennessee 37996
United States of America**

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

The undersigned,

University of Tennessee Research Foundation

domiciled at

**600 Henley Street, Suite 211
Knoxville, Tennessee 37996
United States of America**

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

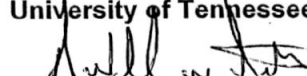
Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed

this 16th day of October 2010

University of Tennessee Research Foundation


Dr. Randall (Randy) W. Gentry
President

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Estados Unidos de América

Estado de Tennessee {ss

Condado de Knox

Hoy 6 de Octubre de 2000,

compareció Randall W. Gentry

, a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es el Presidente de U.T. Research Foundation la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes del Estado de Tennessee Estados Unidos de América, domiciliada en la ciudad de Knoxville, Condado de Knox Estado de Tennessee Estados Unidos de América,

legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes del Estado de Tennessee

Estados Unidos de América;

que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en Estado de Tennessee, con fecha abril 14, 2003 y certifica que de conformidad con la legislación de dicho Estado la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

United States of America

State of Tennessee

County of Knox

On this 6th day of October, 2010

Randall W. Gentry personally came, to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the President of U.T. Research Foundation

the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the State of Tennessee United States of America, domiciled at the City of Knoxville, County of Knox State of Tennessee United States of America,

legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of the State of Tennessee United States of America;

that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company. No Corporate Seal

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at

State of Tennessee under date of April 14, 2003

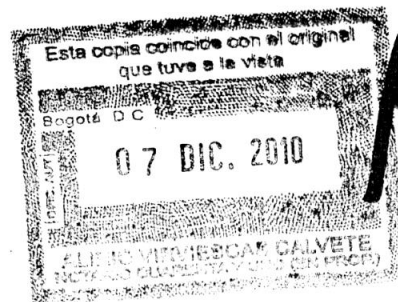
and hereby certifies that under the laws of said State the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.

Notary: Jeanette Lea Snider
Jeanette Lea Snider

My Commission



7.2.12



DINNA KENCANASARI

certify that this is the original of the

District of Columbia: 55

Subscribed and Sworn to by

the 22nd of NOVEMBER 2010

at San Juan

in commission on the 31st of 2012

TRADUCCION OFICIAL No. 2010-12-03-705
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

APOSTILLA

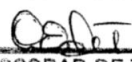
(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por T. Wallace
3. actuando como Funcionario que Certifica
4. lleva el sello/estampilla de la Oficina de Patentes y Marcas de los EE.UU.

Certificado

- | | |
|---|--|
| 5. en Washington, D.C. | 6. el 22 de noviembre de 2010 |
| 7. por el Funcionario Asistente de Autenticaciones, Departamento de Estado
de los Estados Unidos | |
| 8. No. 11006422-11 | |
| 9. Sello/Estampilla:
Departamento de Estado
Estados Unidos de América | 10. Firma: (ilegible)
Patrick O. Hatchett |

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA


ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

An'to
b 2982
CUYA FIRMA APOFECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2010 DIC - 6 9: 42
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
A TODOS AQUELLOS QUE VIEREN ESTOS PRESENTES:
DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS
Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

01 de noviembre de 2010

POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE ADJUNTO SE ENCUENTRA UNA COPIA
FIEL DE LOS REGISTROS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO
REGISTRADO EL 31 DE AGOSTO DE 2009.

Sello del Departamento de Comercio
Oficina de Patentes y Marcas de los
Estados Unidos

Por Autoridad del
Subsecretario de Comercio para
Propiedad Intelectual y Director de
la Oficina de Patentes y Marcas

(firma: ilegible)
T. WALLACE
Funcionario que Certifica

TRASPASO DE PATENTE	
Versión Electrónica v1.1	
Versión Hoja Estilo v1.1	
TIPO DE PRESENTACION	NUEVO TRASPASO
NATURALEZA DEL TRASPASO	TRASPASO
DATOS DE LA PARTE QUE TRASPASA	
Nombre	Fecha de Ejecución
Dale B Schenk	07/22/2009
Peter A Seubert	07/17/2009
DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE	
Nombre:	Elan Pharmaceuticals, Inc.
Dirección:	800 Gateway Boulevard
Ciudad:	South San Francisco
Estado/País:	CALIFORNIA
Código Postal:	94080
Total NUMEROS PROPIEDAD: 1	
Tipo de Propiedad	Número
Número de la Solicitud:	61095932
DATOS DE CORRESPONDENCIA	
Número Fax:	(703)770-7901
<i>La correspondencia será enviada vía US Mail cuando el intento por fax no sea exitoso.</i>	

Teléfono:	703-770-7944
Email:	thomas.cawley@pillsburylaw.com
Nombre Corresponsal:	Thomas A. Cawley Jr., Ph.D.
Dirección Línea 1:	Pillsbury Winthrop Shaw Pittman LLP
Dirección Línea 2:	1650 Tysons Blvd
Dirección Línea 4:	McLean, VIRGINA 22102
NUMERO EXPEDIENTE APODERADO:	021452-0373686
NOMBRE DEL PRESENTADOR:	Thomas A. Cawley Jr., Ph.D.
Total anexos: 6	
fuente=Traspaso – Elan inventores#page1.tif	
fuente=Traspaso – Elan inventores#page2.tif	
fuente=Traspaso – Elan inventores#page3.tif	
fuente=Traspaso – Elan inventores#page4.tif	
fuente=Traspaso – Elan inventores#page5.tif	
fuente=Traspaso – Elan inventores#page6.tif	

500950625

PATENTE

REEL: 023172 FRAME: 0649

Expediente No. 021452-0373686

Patente

Traspaso de Invención

En consideración del pago por parte del CESIONARIO al CEDENTE de una contraprestación buena y valiosa, el recibo de la cual se reconoce por el presente,

CEDENTE:

- (1) Nombre Completo del Inventor: Dale B. Schenk
Residencia: 1542 Los Altos Drive, Burlingame, California 94010
Estados Unidos de América
Ciudadanía: Estados Unidos de América

-
- (2) Nombre Completo del Inventor: Peter A. Seubert
Residencia: 801 Castro Street, San Francisco, California 94114
Estados Unidos de América
Ciudadanía: Estados Unidos de América

por el presente confirmo que con vigencia desde el 10 de septiembre de 2009, el CEDENTE vende, traspasa y transfiere al CESIONARIO:

Elan Pharmaceuticals, Inc.
800 Gateway Boulevard
South San Francisco
California 94080
Estados Unidos de América

y a los sucesores, cesionarios y representantes legales del CESIONARIO todo derecho, título e interés para los Estados Unidos y sus posesiones territoriales y en todos los países extranjeros, incluyendo todos los derechos para reivindicar prioridad, en y de la invención llamada:

TRATAMIENTO Y PROFILAXIS DE AMILOIDOSIS

e inventada por el CEDENTE y los siguientes inventores adicionales, si hubiese:

y la cual se encuentra en la Solicitud Provisional de los EE.UU. No. 61/095.932 presentada el 10 de septiembre de 2008.

- ☐ Yo/nosotros el CEDENTE que firmamos a continuación, por el presente autorizamos y solicitamos la inserción anterior del número y fecha de presentación de la solicitud, cuando se conozcan,
- ☒ y cualquier equivalente legal de la misma en un país extranjero,

incluyendo el derecho a reivindicar prioridad, incluyendo cualquiera y todas las mejoras reveladas en el presente, y en y para todas las Patentes de Invención que se obtengan para dicha invención por la solicitud anteriormente mencionada o cualquiera provisional, no provisional, continuación, divisional, renovación o sustituto de la misma, y en cuanto a Patente de Invención cualquier reexpedición o re-examen de la misma.

El CEDENTE por el presente conviene que ningún traspaso, venta, acuerdo o gravamen ha sido hecho o se hará o se celebrará que entre en conflicto con este traspaso.

El CEDENTE autoriza al CESIONARIO para hacer solicitudes por y a recibir Patente de Invención para dicha invención en cualquiera de dichos países en su propio nombre o en el nombre del CEDENTE, a su elección.

El CEDENTE conviene y acuerda ejecutar o procurar cualquier aseguramiento posterior necesario del título sobre dicha invención y, en cualquier Patente de Invención que pueda expedirse por lo tanto y, en cualquier momento, a solicitud y a expensas del CESIONARIO entregar cualquier testimonio en cualquier interferencia, litigio o procedimiento relacionado con ello y ejecutar todos los documentos que sean necesarios o deseables para perfeccionar el título sobre dicha invención o cualquier Patente de Invención que pudiese otorgarse por lo tanto al CESIONARIO, sus sucesores, cesionarios y representantes legales, y que, en cualquier momento, a solicitud y a expensas del CESIONARIO ejecutar cualquier continuación, continuación en parte, divisional, renovación o sustituto de la misma, y en cuanto a Patentes de Invención y reexpedición o reexamen de la misma, o cualquier solicitud adicional de Patente de Invención para dicha invención o parte de la misma, todas las solicitudes y cualquier Patente de Invención sobre ella por el presente se traspasa al CESIONARIO, y hará todos los juramentos o declaraciones legítimas y hará todos los actos legales requeridos para procurar las mismas, sin más compensación, pero a expensas del CESIONARIO, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales.

El CEDENTE autoriza y le solicita al Comisionado de Patentes que expida cualquiera y toda Patente de Invención de los Estados Unidos para dicha invención, que resulte de cualquiera de las solicitudes anteriormente mencionadas a su CESIONARIO.

(firma: ilegible)

17 de julio de 2009

Peter A. Seubert

Fecha

Traspaso de Invención
Solicitud Provisional

PATENTE

REEL: 023172 FRAME: 0652

(firma: ilegible)

22 de julio de 2009

Dale B. Schenk

Fecha

Traspaso de Invención
Solicitud Provisional

PATENTE

REEL: 023172 FRAME: 0653

RECONOCIMIENTO PARA TODOS LOS FINES DE CALIFORNIA.

Estado de California)
)
Condado de San Mateo)

El 17 de julio de 2009, ante mí, Elizabeth Risner, Notario Público, compareció personalmente Peter A. Seubert quien me demostró con base en evidencia

satisfactoria que es la persona cuyo nombre está suscrito en el documento adjunto y reconoció ante mí que él firmó el mismo como persona autorizada, y que por medio de su firma en el documento la persona o la entidad en nombre de quien la persona actúo, firmó el documento.

Elizabeth Risner
Nombramiento # 1643204
Notario Público – California
Condado de San Mateo
Mi Nombramiento Expira
4 de febrero de 2010

Certifico bajo PENA DE PERJURIO bajo las leyes del Estado de California que el párrafo anterior es fiel y correcto.

TESTIFICA mi firma y sello oficial.

(Colocar Sello Notarial Arriba) Firma: (ilegible)

Firma del Notario Público

----- OPCIONAL -----

Aunque la información que aparece a continuación no se requiere por ley, puede ser valiosa para las personas que dependan del documento y puede evitar la remoción y adhesión fraudulenta de esta forma a otro documento.

Descripción del Documento Adjunto

Título o Tipo de Documento: Traspaso

Fecha del Documento: _____ Número de Páginas: _____

Signatario(s) Diferente al Nombrado Arriba: _____

Competencia Reivindicada por el Signatario(s)

Nombre del Signatario: _____

- ☐ Persona Natural
- ☒ Funcionario Corporativo – Cargo(s): _____
- ☐ Socio – ☐ Limitado ☐ General
- ☐ Apoderado
- ☐ Fiduciario
- ☐ Guardián o Conservador
- ☐ Otro: _____

El Signatario es Representante de: _____

HUELLA PULGAR
DERECHO

Punta del pulgar acá

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 3 de diciembre de 2010, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by T. Wallace

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of U.S. Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

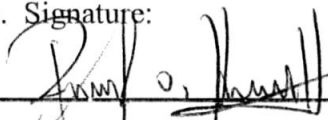
6. the twenty-second of November, 2010

7. by Assistant Authentication Officer, United States Department of State

8. No. 1100642?-11

9. Seal/Stamp:

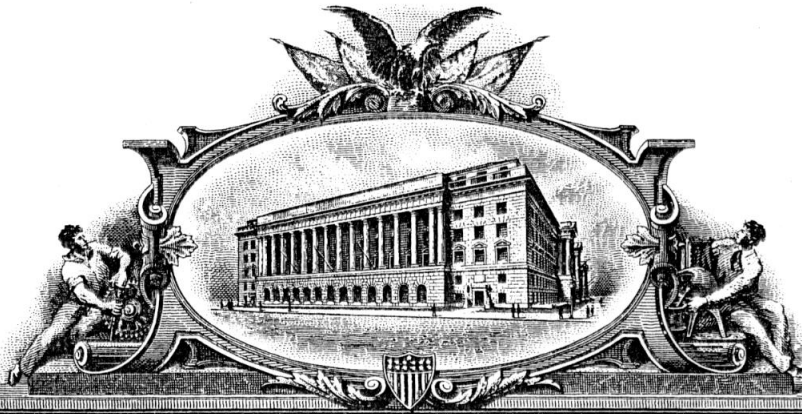
10. Signature:



Patrick O. Hatchett

COL

A 7265048



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

November 01, 2010

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
AUGUST 31, 2009.

By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office



T. Wallace
T. WALLACE
Certifying Officer

PATENT ASSIGNMENT

Version v1.1

et Version v1.1

SSION TYPE:

NEW ASSIGNMENT

RE OF CONVEYANCE:

ASSIGNMENT

VEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
B Schenk	07/22/2009
er A Seubert	07/17/2009

CEIVING PARTY DATA

ame:	Elan Pharmaceuticals, Inc.
street Address:	800 Gateway Boulevard
ity:	South San Francisco
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94080

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	61095932

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (703)770-7901

Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.

Phone: 703-770-7944

Email: thomas.cawley@pillsburylaw.com

Correspondent Name: Thomas A. Cawley Jr., Ph.D.

Address Line 1: Pillsbury Winthrop Shaw Pittman LLP

Address Line 2: 1650 Tysons Blvd

Address Line 4: McLean, VIRGINIA 22102

ATTORNEY DOCKET NUMBER:

021452-0373686

NAME OF SUBMITTER:

Thomas A. Cawley, Jr., Ph.D.

Total Attachments: 6

source=Assignment - Elan inventors#page1.tif

source=Assignment - Elan inventors#page2.tif

500950625

PATENT
REEL: 023172 FRAME: 0648

CH \$40.00 61095932

Assignment - Elan inventors#page3.tif
Assignment - Elan inventors#page4.tif
Assignment - Elan inventors#page5.tif
Assignment - Elan inventors#page6.tif

PATENT
REEL: 023172 FRAME: 0649

Assignment of Invention

In consideration of the payment by ASSIGNEE to ASSIGNOR of good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged,
ASSIGNOR:

(1) Full Name of Inventor: Dale B. Schenk
Residence: 1542 Los Altos Drive, Burlingame, California 94010
United States of America
Citizenship: United States of America

(2) Full Name of Inventor: Peter A. Seubert
Residence: 801 Castro Street, San Francisco, California 94114,
United States of America
Citizenship: United States of America

hereby confirms that, effective as of September 10, 2008, ASSIGNOR sells, assigns and transfers to ASSIGNEE:

Elan Pharmaceuticals, Inc.,
800 Gateway Boulevard
South San Francisco
California 94080
United States of America

and the successors, assigns and legal representatives of the ASSIGNEE the entire right, title and interest for the United States and its territorial possessions and in all foreign countries, including all rights to claim priority, in and to the invention entitled:
TREATMENT AND PROPHYLAXIS OF AMYLOIDOSIS

and invented by ASSIGNOR and the following additional inventors, if any:

which is found in U.S. Provisional Application No. 61/095,932 filed on September 10, 2008.

- ☐ I/we the ASSIGNOR signing below, hereby authorize and request insertion above of the application number and filing date, when they become known,
- ☒ and any legal equivalent thereof in a foreign country,

including the right to claim priority, including any and all improvements disclosed therein, and in and to all Letters Patent to be obtained for said invention by the above application or any subsequently filed provisional, nonprovisional, continuation, divisional, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patent any reissue or re-examination thereof.

ASSIGNOR hereby covenants that no assignment, sale, agreement or encumbrance has been or will be made or entered into which would conflict with this assignment.

ASSIGNOR authorizes ASSIGNEE to make applications for and to receive Letters patent for said invention in any of said countries in its own name, or in ASSIGNOR's name, at its election.

ASSIGNOR covenants and agrees to execute or procure any further necessary assurance of the title to said invention and any Letters Patent which may issue therefore and to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE deliver any testimony in any interference, litigation or proceeding related thereto and execute all papers that may be necessary or desirable to perfect the title to said invention or any Letters Patent which may be granted therefore in ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives, and that to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE execute any continuation, continuation-in-part, divisional, renewal or substitute thereof, and as to Letters Patent and reissue or re-examination thereof, or any other additional applications of Letters Patent for said invention or any part thereof, all of which applications and any Letters Patent issuing thereon are hereby assigned to ASSIGNEE, and will make all rightful oaths or declarations, and do all lawful acts requisite for procuring the same therein, without further compensation, but at the expense of ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives.

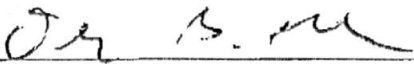
ASSIGNOR authorizes and requests the Commissioner of Patents to issue any and all Letters Patent of the United States for said invention, resulting from any of the aforesaid applications to its ASSIGNEE.

Docket No: 021452-0373686
Patent

Peter A. Seubert
Peter A. Seubert

July 17, 2009
Date

Docket No: 021452-0373686
Patent


Dale B. Schenk

7.22.2009
Date

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

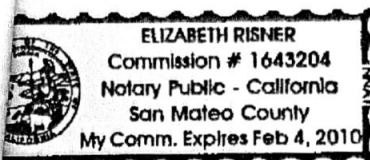
County of San Mateo

July 17, 2009
Date

before me, Elizabeth Risner, Notary Public, personally
Insert Name and Title of Officer

appeared

Peter A. Seubert
Name(s) of Signer(s)



who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

(Place Notary Seal Above)

Signature

Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document:

Assignment

Document Date:

Number of Pages:

Signer(s) Other Than Named Above:

Capacity(ies) Claimed by Signer(s)

Signer's Name:

☐ Individual

☐ Corporate Officer—Title(s):

☐ Partner— ☐ Limited ☐ General

☐ Attorney in Fact

☐ Trustee

☐ Guardian or Conservator

☐ Other:

Signer is Representing:

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER

Top of thumb here

Signer's Name:

☐ Individual

☐ Corporate Officer—Title(s):

☐ Partner— ☐ Limited ☐ General

☐ Attorney in Fact

☐ Trustee

☐ Guardian or Conservator

☐ Other:

Signer is Representing:

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER

Top of thumb here

PATENT
REEL: 023172 FRAME: 0654

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of San Mateo

July 22, 2009
Date

before me,

Elizabeth Risner, Notary
Insert Name and Title of Officer

, personally

appeared

Dale B. Schenk
Name(s) of Signer(s)

who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

(Place Notary Seal Above)

Signature

Elizabeth Risner
Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document:

Assignment

Document Date:

Number of Pages:

Signer(s) Other Than Named Above:

Capacity(ies) Claimed by Signer(s)

Signer's Name:

☐ Individual

☐ Corporate Officer—Title(s):

☐ Partner-- ☐ Limited ☐ General

☐ Attorney in Fact

☐ Trustee

☐ Guardian or Conservator

☐ Other:

Signer is Representing:

Signer's Name:

☐ Individual

☐ Corporate Officer—Title(s):

☐ Partner-- ☐ Limited ☐ General

☐ Attorney in Fact

☐ Trustee

☐ Guardian or Conservator

☐ Other:

Signer is Representing:

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER

Top of thumb here

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER

Top of thumb here

RECORDED: 08/31/2009

PATENT
REEL: 023172 FRAME: 0655

TRADUCCION OFICIAL No. 2010-12-03-709
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por T. Wallace
3. actuando como Funcionario que Certifica
4. lleva el sello/estampilla de la Oficina de Patentes y Marcas de los EE.UU.

Certificado

5. en Washington, D.C.
6. el 22 de noviembre de 2010
7. por el Funcionario Asistente de Autenticaciones, Departamento de Estado
de los Estados Unidos
8. No. 11006422-15
9. Sello/Estampilla:
Departamento de Estado
Estados Unidos de América
10. Firma: (ilegible)
Patrick O. Hatchett

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

629826

Anita Escobar
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPERA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2010 DIC 9: 44

JEFE DE REGULARIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
A TODOS AQUELLOS QUE VIEREN ESTOS PRESENTES:
DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS
Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

01 de noviembre de 2010

POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE ADJUNTO SE ENCUENTRA UNA COPIA
FIEL DE LOS REGISTROS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO
REGISTRADO EL 31 DE AGOSTO DE 2009.

Sello del Departamento de Comercio
Oficina de Patentes y Marcas de los
Estados Unidos

Por Autoridad del
Subsecretario de Comercio para
Propiedad Intelectual y Director de
la Oficina de Patentes y Marcas

(firma: ilegible)

T. WALLACE

Funcionario que Certifica

TRASPASO DE PATENTE	
Versión Electrónica v1.1	
Versión Hoja Estilo v1.1	
TIPO DE PRESENTACION	NUEVO TRASPASO
NATURALEZA DEL TRASPASO	TRASPASO
DATOS DE LA PARTE QUE TRASPASA	
Nombre	Fecha de Ejecución
Dale B Schenk	07/22/2009
Peter A Seubert	07/17/2009
Jose W Saldanha	07/15/2009

DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE	
Nombre:	Elan Pharmaceuticals, Inc.
Dirección:	800 Gateway Boulevard
Ciudad:	South San Francisco
Estado/País:	CALIFORNIA
Código Postal:	94080
Total NUMEROS PROPIEDAD: 1	
Tipo de Propiedad	Número
Número PCT:	US0888493
DATOS DE CORRESPONDENCIA	
Número Fax:	(703)770-7901
<i>La correspondencia será enviada vía US Mail cuando el intento por fax no sea exitoso.</i>	

Teléfono:	703-770-7944
Email:	thomas.cawley@pillsburylaw.com
Nombre Corresponsal:	Thomas A. Cawley Jr., Ph.D.
Dirección Línea 1:	Pillsbury Winthrop Shaw Pittman LLP
Dirección Línea 2:	1650 Tysons Blvd
Dirección Línea 4:	McLean, VIRGINA 22102
NUMERO EXPEDIENTE APODERADO:	021452-0376734
NOMBRE DEL PRESENTADOR:	Thomas A. Cawley Jr., Ph.D.
Total anexos: 5	
fuente=Traspaso#page1.tif	
fuente=Traspaso#page2.tif	
fuente=Traspaso#page3.tif	
fuente=Traspaso#page4.tif	
fuente=Traspaso#page5.tif	

PATENTE

REEL: 023172 FRAME: 0702

Expediente No. 021452-0376734

Patente

Traspaso de Invención

En consideración del pago por parte del CESIONARIO al CEDENTE de una contraprestación buena y valiosa, el recibo de la cual se reconoce por el presente,

CEDENTE:

(1) Nombre Completo del Inventor: Dale B. Schenk
Residencia: 1542 Los Altos Drive, Burlingame, California 94010
Estados Unidos de América
Ciudadanía: Estados Unidos de América

(2) Nombre Completo del Inventor: Peter A. Seubert
Residencia: 801 Castro Street, San Francisco, California 94114
Estados Unidos de América
Ciudadanía: Estados Unidos de América

(3) Nombre Completo del Inventor: Jose W. Saldanha
Residencia: 21 Fillebrook Avenue, Enfield, Middlesex EN1-3BD
Reino Unido
Ciudadanía: Reino Unido

por el presente confirma que con vigencia desde el 29 de diciembre de 2008, el CEDENTE vende, traspasa y transfiere al CESIONARIO:

Elan Pharmaceuticals, Inc.

800 Gateway Boulevard
South San Francisco
California 94080
Estados Unidos de América

y a los sucesores, cesionarios y representantes legales del CESIONARIO todo derecho, título e interés para los Estados Unidos y sus posesiones territoriales y en todos los países extranjeros, incluyendo todos los derechos para reivindicar prioridad, en y de la invención llamada:

TRATAMIENTO Y PROFILAXIS DE AMILOIDOSIS

e inventada por el CEDENTE y los siguientes inventores adicionales, si hubiese:

y la cual se encuentra en la Solicitud Internacional No. PCT/US2008/088493 presentada el 29 de diciembre de 2008.

- ☐ Yo/nosotros el CEDENTE que firmamos a continuación, por el presente autorizamos y solicitamos la inserción anterior del número y fecha de presentación de la solicitud, cuando se conozcan,
- ☒ y cualquier equivalente legal de la misma en un país extranjero,

incluyendo el derecho a reivindicar prioridad, incluyendo cualquiera y todas las mejoras reveladas en el presente, y en y para todas las Patentes de Invención que se obtengan para dicha invención por la solicitud anteriormente mencionada o cualquiera provisional, no provisional, continuación, divisional, renovación o sustituto de la misma, y en cuanto a Patente de Invención cualquier reexpedición o re-examen de la misma.

El CEDENTE por el presente conviene que ningún traspaso, venta, acuerdo o gravamen ha sido hecho o se hará o se celebrará que entre en conflicto con este traspaso.

El CEDENTE autoriza al CESIONARIO para hacer solicitudes por y a recibir Patente de Invención para dicha invención en cualquiera de dichos países en su propio nombre o en el nombre del CEDENTE, a su elección.

El CEDENTE conviene y acuerda ejecutar o procurar cualquier aseguramiento posterior necesario del título sobre dicha invención y, en cualquier Patente de Invención que pueda expedirse por lo tanto y, en cualquier momento, a solicitud y a expensas del CESIONARIO entregar cualquier testimonio en cualquier interferencia, litigio o procedimiento relacionado con ello y ejecutar todos los documentos que sean necesarios o deseables para perfeccionar el título sobre dicha invención o cualquier Patente de Invención que pudiese otorgarse por lo tanto al CESIONARIO, sus sucesores, cesionarios y representantes legales, y que, en cualquier momento, a solicitud y a expensas del CESIONARIO ejecutar cualquier continuación, continuación en parte, divisional, renovación o sustituto de la misma, y en cuanto a Patentes de Invención y reexpedición o reexamen de la misma, o cualquier solicitud adicional de Patente de Invención para dicha invención o parte de la misma, todas las solicitudes y cualquier Patente de Invención sobre ella por el presente se traspasa al CESIONARIO, y hará todos los juramentos o declaraciones legítimas y hará todos los actos legales requeridos para procurar las mismas, sin más compensación, pero a expensas del CESIONARIO, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales.

El CEDENTE autoriza y le solicita al Comisionado de Patentes que expida cualquiera y toda Patente de Invención de los Estados Unidos para dicha

invención, que resulte de cualquiera de las solicitudes anteriormente mencionadas a su CESIONARIO.

(firma: ilegible)

Dale B. Schenk

22 de julio de 2009

Fecha

Traspaso de Invención
Solicitud Provisional

PATENTE

REEL: 023172 FRAME: 0705

(firma: ilegible)

Peter A. Seubert

17 de julio de 2009

Fecha

Traspaso de Invención
Solicitud Provisional

PATENTE

REEL: 023172 FRAME: 0706

firma: ilegible)

Jose W. Saldanha

15 de julio de 2009

Fecha

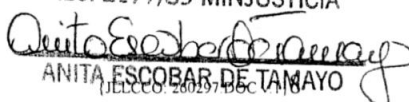
Traspaso de Invención
Solicitud Provisional

REGISTRADO: 08/31/2009

PATENTE

REEL: 023172 FRAME: 0707

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 3 de diciembre de 2010, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO
JUL 20 2010 10:18

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by T. Wallace

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of U.S. Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

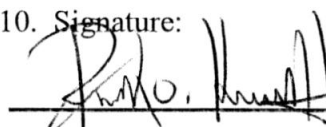
6. the twenty-second of November, 2010

7. by Assistant Authentication Officer, United States Department of State

8. No. 11006422-15

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Patrick O. Hatchett

COL

A 7265048



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

November 01, 2010

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
AUGUST 31, 2009.

By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office



T. Wallace
T. WALLACE
Certifying Officer

PATENT ASSIGNMENT

ersion v1.1
ersion v1.1

ON TYPE: NEW ASSIGNMENT

OF CONVEYANCE: ASSIGNMENT

NG PARTY DATA

Name	Execution Date
Schenk	07/22/2009
Seubert	07/17/2009
/ Saldanha	07/15/2009

ING PARTY DATA

e:	Elan Pharmaceuticals, Inc.
et Address:	800 Gateway Boulevard
:	South San Francisco
te/Country:	CALIFORNIA
stal Code:	94080

OPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
PCT Number:	US0888493

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (703)770-7901
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
Phone: 703-770-7944
Email: thomas.cawley@pillsburylaw.com
Correspondent Name: Thomas A. Cawley Jr., Ph.D.
Address Line 1: Pillsbury Winthrop Shaw Pittman LLP
Address Line 2: 1650 Tysons Blvd
Address Line 4: McLean, VIRGINIA 22102

ATTORNEY DOCKET NUMBER: 021452-0376734

NAME OF SUBMITTER: Thomas A. Cawley, Jr., Ph.D.

Total Attachments: 5
source=Assignment#page1.tif

500950637

PATENT
REEL: 023172 FRAME: 0701

CH \$40.00 US0888493

=Assignment#page2.tif
e=Assignment#page3.tif
e=Assignment#page4.tif
e=Assignment#page5.tif

PATENT
REEL: 023172 FRAME: 0702

Assignment of Invention

In consideration of the payment by ASSIGNEE to ASSIGNOR of good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged,
ASSIGNOR:

(1) Full Name of Inventor: Dale B. Schenk
Residence: 1542 Los Altos Drive, Burlingame, California 94010
United States of America
Citizenship: United States of America

(2) Full Name of Inventor: Peter A. Seubert
Residence: 801 Castro Street, San Francisco, California 94114,
United States of America
Citizenship: United States of America

(3) Full Name of Inventor: José W. Saldanha
Residence: 21 Fillebrook Avenue, Enfield, Middlesex EN1-3BD
United Kingdom
Citizenship: United Kingdom

hereby confirms that, effective as of December 29, 2008, ASSIGNOR sells, assigns and transfers to ASSIGNEE:

Elan Pharmaceuticals, Inc.
800 Gateway Boulevard
South San Francisco
California 94080
United States of America

and the successors, assigns and legal representatives of the ASSIGNEE the entire right, title and interest for the United States and its territorial possessions and in all foreign countries, including all rights to claim priority, in and to the invention entitled:
TREATMENT AND PROPHYLAXIS OF AMYLOIDOSIS

and invented by ASSIGNOR and the following additional inventors, if any:

a which are found in International Application No. PCT/US2008/088493 filed on December 29, 2008.

- ☐ I/we the ASSIGNOR signing below, hereby authorize and request insertion above of the application number and filing date, when they become known,
- ☒ and any legal equivalent thereof in a foreign country,

including the right to claim priority, including any and all improvements disclosed therein, and in and to all Letters Patent to be obtained for said invention by the above application or any subsequently filed provisional, nonprovisional, continuation, divisional, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patent any reissue or re-examination thereof.

ASSIGNOR hereby covenants that no assignment, sale, agreement or encumbrance has been or will be made or entered into which would conflict with this assignment.

ASSIGNOR authorizes ASSIGNEE to make applications for and to receive Letters patent for said invention in any of said countries in its own name, or in ASSIGNOR's name, at its election.

ASSIGNOR covenants and agrees to execute or procure any further necessary assurance of the title to said invention and any Letters Patent which may issue therefore and to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE deliver any testimony in any interference, litigation or proceeding related thereto and execute all papers that may be necessary or desirable to perfect the title to said invention or any Letters Patent which may be granted therefore in ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives, and that to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE execute any continuation, continuation-in-part, divisional, renewal or substitute thereof, and as to Letters Patent and reissue or re-examination thereof, or any other additional applications of Letters Patent for said invention or any part thereof, all of which applications and any Letters Patent issuing thereon are hereby assigned to ASSIGNEE, and will make all rightful oaths or declarations, and do all lawful acts requisite for procuring the same therein, without further compensation, but at the expense of ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives.

ASSIGNOR authorizes and requests the Commissioner of Patents to issue any and all Letters Patent of the United States for said invention, resulting from any of the aforesaid applications to its ASSIGNEE.

Docket No: 021452-0376734
Patent

M DB Schenk
Dale B. Schenk

7-22-2009
Date

Docket No: 021452-0376734
Patent

NA Peter A. Seubert
Peter A. Seubert

July 17, 2009
Date

Docket No: 021452-0376734
Patent



José W. Saldanha

Date

15th July 2009

TRADUCCION OFICIAL No. 2010-12-03-710
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

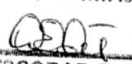
APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por T. Wallace
3. actuando como Funcionario que Certifica
4. lleva el sello/estampilla de la Oficina de Patentes y Marcas de los EE.UU.

Certificado

5. en Washington, D.C.
6. el 22 de noviembre de 2010
7. por el Funcionario Asistente de Autenticaciones, Departamento de Estado
de los Estados Unidos
8. No. 11006422-14
9. Sello/Estampilla:
Departamento de Estado
Estados Unidos de América
10. Firma: (ilegible)
Patrick O. Hatchett

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

b 29824

Anto Escobar
CUYA FIRMA APROBACION
DOCUMENTO DESEMPLEA
LAS FUNCIONES INDICADAS

HO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2010 DIC 01 9: 44

JEFE DE DELEGACIONES
BOGOTA D.C.

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
A TODOS AQUELLOS QUE VIEREN ESTOS PRESENTES:
DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS
Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

22 de septiembre de 2010

POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE ADJUNTO SE ENCUENTRA UNA COPIA FIEL DE LOS REGISTROS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO REGISTRADO EL 17 DE AGOSTO DE 2010.

Sello del Departamento de Comercio
Oficina de Patentes y Marcas de los
Estados Unidos

Por Autoridad del
Subsecretario de Comercio para
Propiedad Intelectual y Director de
la Oficina de Patentes y Marcas

(firma: ilegible)

T. WALLACE

Funcionario que Certifica

TRASPASO DE PATENTE	
Versión Electrónica v1.1	
Versión Hoja Estilo v1.1	
TIPO DE PRESENTACION	NUEVO TRASPASO
NATURALEZA DEL TRASPASO	TRASPASO
DATOS DE LA PARTE QUE TRASPASA	
Nombre	Fecha de Ejecución
Jonathan WALL	08/10/2010
DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE	
Nombre:	UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH FOUNDATION
Dirección:	600 HENLEY STREET
Dirección interna:	SUITE 211
Ciudad:	KNOXVILLE
Estado/País:	TENNESSEE
Código Postal:	37996
Total NUMEROS PROPIEDAD: 2	
Tipo de Propiedad	Número
Número de la Solicitud:	11966988
Número de la Solicitud:	61007544
DATOS DE CORRESPONDENCIA	
Número Fax:	(703)918-2240
<i>La correspondencia será enviada vía US Mail cuando el intento por fax no sea exitoso.</i>	

Teléfono:	703-394-2210
Email:	t.cawley@wcsr.com
Nombre Corresponsal:	Womble Carlyle Sandridge & Rice, PLLC
Dirección Línea 1:	P.O. BOX 7037
Dirección Línea 4:	Atlanta, GEORGIA 30357-0037
NUMERO EXPEDIENTE APODERADO:	E090 2020-P2
NOMBRE DEL PRESENTADOR:	Thomas A. Cawley Jr., Ph.D.
Total anexos: 3	
fuente=E090_1020_P2_UTRF_Trapaso#page1.tif	
fuente=E090_1020_P2_UTRF_Trapaso#page2.tif	
fuente=E090_1020_P2_UTRF_Trapaso#page3.tif	

PATENTE

REEL: 024849 FRAME: 0397

Expediente No. E090 1020.P2

Patente

Traspaso de Invención

En consideración del pago por parte del CESIONARIO al CEDENTE de una contraprestación buena y valiosa, el recibo de la cual se reconoce por el presente, CEDENTE:

Nombre Completo del Inventor: Jonathan Wall
Residencia: 1216 Harrington Drive
Knoxville, Tennessee 37922
Estados Unidos de América
Ciudadanía: Reino Unido

por el presente confirmo que con vigencia desde el 29 de diciembre de 2008, el CEDENTE vende, traspasa y transfiere al CESIONARIO:

University of Tennessee Research Foundation
600 Henley Street, Suite 211
Knoxville, Tennessee 37996
Estados Unidos de América

y a los sucesores, cesionarios y representantes legales del CESIONARIO todo derecho, título e interés para los Estados Unidos y sus posesiones territoriales y en todos los países extranjeros, incluyendo todos los derechos para reivindicar prioridad, en y de la invención llamada:

TRATAMIENTO Y PROFILAXIS DE AMILOIDOSIS

e inventada por el CEDENTE y los siguientes inventores adicionales, si hubiese:

y la cual se encuentra en la Solicitud No Provisional de los EE.UU. No. 11/966.988 presentada el 28 de diciembre de 2007 y la cual fue convertida a Solicitud Provisional de los EE.UU. No. 61/007.544.

- ☐ Yo/nosotros el CEDENTE que firmamos a continuación, por el presente autorizamos y solicitamos la inserción anterior del número y fecha de presentación de la solicitud, cuando se conozcan,
- ☒ y cualquier equivalente legal de la misma en un país extranjero,

incluyendo el derecho a reivindicar prioridad, incluyendo cualquiera y todas las mejoras reveladas en el presente, y en y para todas las Patentes de Invención que se obtengan para dicha invención por la solicitud anteriormente mencionada o cualquiera provisional, no provisional, continuación, divisional, renovación o sustituto de la misma, y en cuanto a Patente de Invención cualquier reexpedición o re-examen de la misma.

El CEDENTE por el presente conviene que ningún traspaso, venta, acuerdo o gravamen ha sido hecho o se hará o se celebrará que entre en conflicto con este traspaso.

El CEDENTE autoriza al CESIONARIO para hacer solicitudes por y a recibir Patente de Invención para dicha invención en cualquiera de dichos países en su propio nombre o en el nombre del CEDENTE, a su elección.

El CEDENTE conviene y acuerda ejecutar o procurar cualquier aseguramiento posterior necesario del título sobre dicha invención y, en cualquier Patente de Invención que pueda expedirse por lo tanto y, en cualquier momento, a solicitud y a expensas del CESIONARIO entregar cualquier testimonio en

cualquier interferencia, litigio o procedimiento relacionado con ello y ejecutar todos los documentos que sean necesarios o deseables para perfeccionar el título sobre dicha invención o cualquier Patente de Invención que pudiese otorgarse por lo tanto al CESIONARIO, sus sucesores, cesionarios y representantes legales, y que, en cualquier momento, a solicitud y a expensas del CESIONARIO ejecutar cualquier continuación, continuación en parte, divisional, renovación o sustituto de la misma, y en cuanto a Patentes de Invención y reexpedición o reexamen de la misma, o cualquier solicitud adicional de Patente de Invención para dicha invención o parte de la misma, todas las solicitudes y cualquier Patente de Invención sobre ella por el presente se traspasa al CESIONARIO, y hará todos los juramentos o declaraciones legítimas y hará todos los actos legales requeridos para procurar las mismas, sin más compensación, pero a expensas del CESIONARIO, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales.

El CEDENTE autoriza y le solicita al Comisionado de Patentes que expida cualquiera y toda Patente de Invención de los Estados Unidos para dicha invención, que resulte de cualquiera de las solicitudes anteriormente mencionadas a su CESIONARIO.

(firma: ilegible)

8/10/10

Jonathan Wall

Fecha

Traspaso de Invención

Solicitud Provisional

REGISTRADO: 08/17/2010

PATENTE

REEL: 024849 FRAME: 0400

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 3 de diciembre de 2010, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO
(JLLCCO: 260309.DOC v.1)

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by T. Wallace

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of U.S. Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

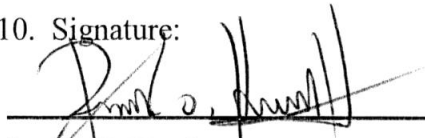
6. the twenty-second of November, 2010

7. by Assistant Authentication Officer, United States Department of State

8. No. 11006422-14

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Patrick O. Hatchett

col



A 7259077

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

September 22, 2010

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
AUGUST 17, 2010.

By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office



T. Wallace
T. WALLACE
Certifying Officer

PATENT ASSIGNMENT

Version v1.1

Version v1.1

SION TYPE:

NEW ASSIGNMENT

E OF CONVEYANCE:

ASSIGNMENT

GIVING PARTY DATA

Name	Execution Date
nan WALL	08/10/2010

IVING PARTY DATA

ie:	UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH FOUNDATION
et Address:	600 HENLEY STREET
mal Address:	SUITE 211
:	KNOXVILLE
ite/Country:	TENNESSEE
stal Code:	37996

PROPERTY NUMBERS Total: 2

Property Type	Number
Application Number:	11966988
Application Number:	61007544

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (703)918-2240

Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.

Phone: 703-394-2210

Email: tcawley@wcsr.com

Correspondent Name: Womble Carlyle Sandridge & Rice, PLLC

Address Line 1: P.O. Box 7037

Address Line 4: Atlanta, GEORGIA 30357-0037

ATTORNEY DOCKET NUMBER:

E090 1020.P2

NAME OF SUBMITTER:

Thomas A. Cawley, Jr., Ph.D.

Total Attachments: 3

source=E090_1020_P2_UTRF_Assignment#page1.tif

source=E090_1020_P2_UTRF_Assignment#page2.tif

501264827

PATENT

REEL: 024849 FRAME: 0396

CH \$80.00 11966988

090_1020_P2_UTRF_Assignment#page3.tif

PATENT
REEL: 024849 FRAME: 0397

Docket No: E090 1020.P2
Patent

Assignment of Invention

In consideration of the payment by ASSIGNEE to ASSIGNOR of good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged,
ASSIGNOR:

Full Name of Inventor: Jonathan Wall
Residence: 1216 Harrington Drive,
Knoxville, Tennessee 37922
United States of America
Citizenship: United Kingdom

hereby confirms that, effective as of December 28, 2007, ASSIGNOR sells, assigns and transfers to ASSIGNEE:

University of Tennessee Research Foundation
600 Henley Street, Suite 211
Knoxville, Tennessee 37996
United States of America

and the successors, assigns and legal representatives of the ASSIGNEE the entire right, title and interest for the United States and its territorial possessions and in all foreign countries, including all rights to claim priority, in and to the invention entitled:

TREATMENT AND PROPHYLAXIS OF AMYLOIDOSIS

and invented by ASSIGNOR and the following additional inventors, if any:

which is found in U.S. Non-Provisional Application No. 11/966,988 filed on December 28, 2007 and was converted to U.S. Provisional Application No. 61/007,544.

- ☐ I/we the ASSIGNOR signing below, hereby authorize and request insertion above of the application number and filing date, when they become known,
- ☒ and any legal equivalent thereof in a foreign country,

including the right to claim priority, including any and all improvements disclosed therein, and in and to all Letters Patent to be obtained for said invention by the above application or any subsequently filed provisional, nonprovisional, continuation, divisional, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patent any reissue or re-examination thereof.

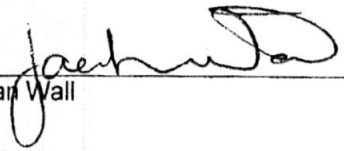
ASSIGNOR hereby covenants that no assignment, sale, agreement or encumbrance has been or will be made or entered into which would conflict with this assignment.

ASSIGNOR authorizes ASSIGNEE to make applications for and to receive Letters patent for said invention in any of said countries in its own name, or in ASSIGNOR's name, at its election.

ASSIGNOR covenants and agrees to execute or procure any further necessary assurance of the title to said invention and any Letters Patent which may issue therefore and to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE deliver any testimony in any interference, litigation or proceeding related thereto and execute all papers that may be necessary or desirable to perfect the title to said invention or any Letters Patent which may be granted therefore in ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives, and that to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE execute any continuation, continuation-in-part, divisional, renewal or substitute thereof, and as to Letters Patent and reissue or re-examination thereof, or any other additional applications of Letters Patent for said invention or any part thereof, all of which applications and any Letters Patent issuing thereon are hereby assigned to ASSIGNEE, and will make all rightful oaths or declarations, and do all lawful acts requisite for procuring the same therein, without further compensation, but at the expense of ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives.

ASSIGNOR authorizes and requests the Commissioner of Patents to issue any and all Letters Patent of the United States for said invention, resulting from any of the aforesaid applications to its ASSIGNEE.

Docket No: E090 1020.P2
Patent


Jonathan Wall

8/16/10
Date

TRADUCCION OFICIAL No. 2010-12-03-706
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

APOSTILLA

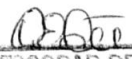
(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por T. Wallace
3. actuando como Funcionario que Certifica
4. lleva el sello/estampilla de la Oficina de Patentes y Marcas de los EE.UU.

Certificado

5. en Washington, D.C.
6. el 22 de noviembre de 2010
7. por el Funcionario Asistente de Autenticaciones, Departamento de Estado
de los Estados Unidos
8. No. 11006422-12
9. Sello/Estampilla:
Departamento de Estado
Estados Unidos de América
10. Firma: (ilegible)
Patrick O. Hatchett

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA


ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

b 29823

Anita Escobar
COTA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DE EMPLEO
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2010 DIC - 6 9:43

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
A TODOS AQUELLOS QUE VIEREN ESTOS PRESENTES:
DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS
Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

22 de septiembre de 2010

POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE ADJUNTO SE ENCUENTRA UNA COPIA
FIEL DE LOS REGISTROS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO
REGISTRADO EL 31 DE AGOSTO DE 2009.

Sello del Departamento de Comercio
Oficina de Patentes y Marcas de los
Estados Unidos

Por Autoridad del
Subsecretario de Comercio para
Propiedad Intelectual y Director de
la Oficina de Patentes y Marcas

(firma: ilegible)

T. WALLACE

Funcionario que Certifica

TRASPASO DE PATENTE	
Versión Electrónica v1.1	
Versión Hoja Estilo v1.1	
TIPO DE PRESENTACION	NUEVO TRASPASO
NATURALEZA DEL TRASPASO	TRASPASO
DATOS DE LA PARTE QUE TRASPASA	
Nombre	Fecha de Ejecución
Jonathan Wall	07/13/2009
DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE	
Nombre:	University of Tennessee Research Foundation
Dirección:	600 Henley Street, Suite 211
Ciudad:	Knoxville
Estado/País:	TENNESSEE
Código Postal:	37996
Total NUMEROS PROPIEDAD: 1	
Tipo de Propiedad	Número
Número de la Solicitud:	61095932
DATOS DE CORRESPONDENCIA	
Número Fax:	(703)770-7901
<i>La correspondencia será enviada vía US Mail cuando el intento por fax no sea exitoso.</i>	
Teléfono:	703-770-7944
Email:	thomas.cawley@pillsburylaw.com
Nombre Corresponsal:	Thomas A. Cawley Jr., Ph.D.
Dirección Línea 1:	Pillsbury Winthrop Shaw Pittman LLP
Dirección Línea 2:	1650 Tysons Blvd
Dirección Línea 4:	McLean, VIRGINIA 22102

Expediente No. 021452-0373686

Patente

Traspaso de Invención

En consideración del pago por parte del CESIONARIO al CEDENTE de una contraprestación buena y valiosa, el recibo de la cual se reconoce por el presente,

CEDENTE:

- (1) Nombre Completo del Inventor: Jonathan Wall
Residencia: 1216 Harrington Drive, Knoxville, Tennessee 37922
Estados Unidos de América
Ciudadanía: Reino Unido

por el presente confirmo que con vigencia desde el 10 de septiembre de 2009, el CEDENTE vende, traspasa y transfiere al CESIONARIO:

University of Tennessee Research Foundation
600 Henley Street, Suite 211
Knoxville, Tennessee 37996
Estados Unidos de América

y a los sucesores, cesionarios y representantes legales del CESIONARIO todo derecho, título e interés para los Estados Unidos y sus posesiones territoriales y en todos los países extranjeros, incluyendo todos los derechos para reivindicar prioridad, en y de la invención llamada:

TRATAMIENTO Y PROFILAXIS DE AMILOIDOSIS

e inventada por el CEDENTE y los siguientes inventores adicionales, si hubiese:

NUMERO EXPEDIENTE APODERADO:	021452-0373686
NOMBRE DEL PRESENTADOR:	Thomas A. Cawley Jr., Ph.D.
Total anexos: 3 fuente=Traspaso – UTRF#page1.tif fuente=Traspaso – UTRF#page2.tif fuente=Traspaso – UTRF#page3.tif	

500950633

PATENTE

REEL: 023172 FRAME: 0684

y la cual se encuentra en la Solicitud Provisional de los EE.UU. No. 61/095.932 presentada el 10 de septiembre de 2008.

- ☐ Yo/nosotros el CEDENTE que firmamos a continuación, por el presente autorizamos y solicitamos la inserción anterior del número y fecha de presentación de la solicitud, cuando se conozcan,
- ☒ y cualquier equivalente legal de la misma en un país extranjero,

incluyendo el derecho a reivindicar prioridad, incluyendo cualquiera y todas las mejoras reveladas en el presente, y en y para todas las Patentes de Invención que se obtengan para dicha invención por la solicitud anteriormente mencionada o cualquiera provisional, no provisional, continuación, divisional, renovación o sustituto de la misma, y en cuanto a Patente de Invención cualquier reexpedición o re-examen de la misma.

El CEDENTE por el presente conviene que ningún traspaso, venta, acuerdo o gravamen ha sido hecho o se hará o se celebrará que entre en conflicto con este traspaso.

El CEDENTE autoriza al CESIONARIO para hacer solicitudes por y a recibir Patente de Invención para dicha invención en cualquiera de dichos países en su propio nombre o en el nombre del CEDENTE, a su elección.

El CEDENTE conviene y acuerda ejecutar o procurar cualquier aseguramiento posterior necesario del título sobre dicha invención y, en cualquier Patente de Invención que pueda expedirse por lo tanto y, en cualquier momento, a solicitud y a expensas del CESIONARIO entregar cualquier testimonio en cualquier interferencia, litigio o procedimiento relacionado con ello y ejecutar todos

los documentos que sean necesarios o deseables para perfeccionar el título sobre dicha invención o cualquier Patente de Invención que pudiese otorgarse por lo tanto al CESIONARIO, sus sucesores, cesionarios y representantes legales, y que, en cualquier momento, a solicitud y a expensas del CESIONARIO ejecutar cualquier continuación, continuación en parte, divisional, renovación o sustituto de la misma, y en cuanto a Patentes de Invención y reexpedición o reexamen de la misma, o cualquier solicitud adicional de Patente de Invención para dicha invención o parte de la misma, todas las solicitudes y cualquier Patente de Invención sobre ella por el presente se traspasa al CESIONARIO, y hará todos los juramentos o declaraciones legítimas y hará todos los actos legales requeridos para procurar las mismas, sin más compensación, pero a expensas del CESIONARIO, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales.

El CEDENTE autoriza y le solicita al Comisionado de Patentes que expida cualquiera y toda Patente de Invención de los Estados Unidos para dicha invención, que resulte de cualquiera de las solicitudes anteriormente mencionadas a su CESIONARIO.

(firma: ilegible)

Jonathan Wall

13 de julio de 2009

Fecha

Traspaso de Invención

Solicitud Provisional

REGISTRADO: 08/31/2009

PATENTE

REEL: 023172 FRAME: 0687

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 3 de diciembre de 2010, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by T. Wallace

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of U.S. Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

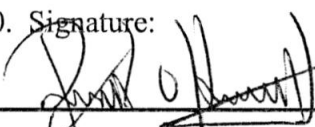
6. the twenty-second of November, 2010

7. by Assistant Authentication Officer, United States Department of State

8. No. 11006422-12

9. Seal/Stamp:

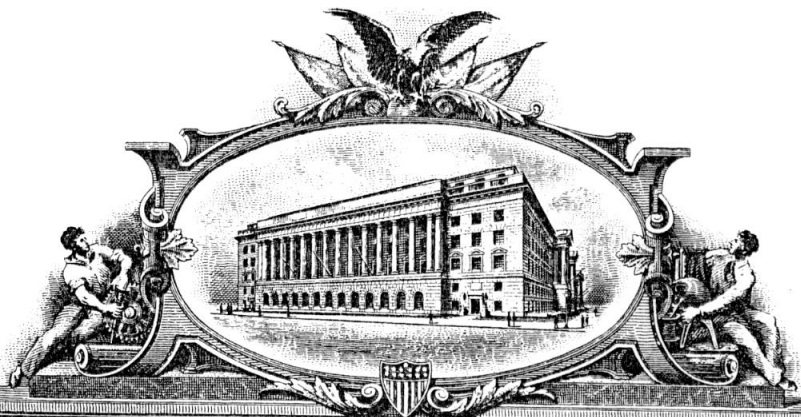
10. Signature:



Patrick O. Hatchett

col

A 7259077



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME;

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

September 22, 2010

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
AUGUST 31, 2009.

By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office



T. Wallace
T. WALLACE
Certifying Officer

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Worksheet Version v1.1

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
Jonathan Wall	07/13/2009

RECEIVING PARTY DATA

Name:	University of Tennessee Research Foundation
Street Address:	600 Henley Street, Suite 211
City:	Knoxville
State/Country:	TENNESSEE
Postal Code:	37996

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	61095932

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (703)770-7901
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
Phone: 703-770-7944
Email: thomas.cawley@pillsburylaw.com
Correspondent Name: Thomas A. Cawley Jr., Ph.D.
Address Line 1: Pillsbury Winthrop Shaw Pittman LLP
Address Line 2: 1650 Tysons Blvd
Address Line 4: McLean, VIRGINIA 22102

ATTORNEY DOCKET NUMBER:	021452-0373686
NAME OF SUBMITTER:	Thomas A. Cawley, Jr., Ph.D.

Total Attachments: 3
source=Assignment - UTRF#page1.tif
source=Assignment - UTRF#page2.tif
source=Assignment - UTRF#page3.tif

500950633

PATENT
REEL: 023172 FRAME: 0684

CH \$40.00 61095932

Assignment of Invention

In consideration of the payment by ASSIGNEE to ASSIGNOR of good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged,
ASSIGNOR:

(1) Full Name of Inventor: Jonathan Wall
Residence: 1216 Harrington Drive, Knoxville, Tennessee 37922
United States of America
Citizenship: United Kingdom

(2) Full Name of Inventor:
Residence:
Citizenship:

(3) Full Name of Inventor:
Residence:
Citizenship:

(4) Full Name of Inventor:
Residence:
Citizenship:

(5) Full Name of Inventor:
Residence:
Citizenship:

(6) Full Name of Inventor:
Residence:
Citizenship:

hereby confirms that, effective as of September 10, 2008, ASSIGNOR sells, assigns and transfers to ASSIGNEE:

University of Tennessee Research Foundation
600 Henley Street, Suite 211
Knoxville, Tennessee 37996
United States of America

and the successors, assigns and legal representatives of the ASSIGNEE the entire right, title and interest for the United States and its territorial possessions and in all foreign countries, including all rights to claim priority, in and to the invention entitled:

TREATMENT AND PROPHYLAXIS OF AMYLOIDOSIS

and invented by ASSIGNOR and the following additional inventors, if any:

which is found in U.S. Provisional Application No. 61/095,932 filed on September 10, 2008.

☐ I/we the ASSIGNOR signing below, hereby authorize and request insertion above of the application number and filing date, when they become known,

☒ and any legal equivalent thereof in a foreign country,

including the right to claim priority, including any and all improvements disclosed therein, and in and to all Letters Patent to be obtained for said invention by the above application or any subsequently filed provisional, nonprovisional, continuation, divisional, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patent any reissue or re-examination thereof.

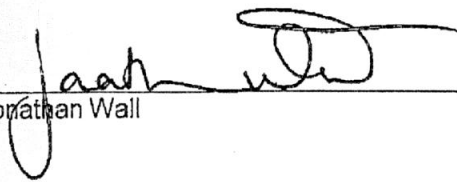
ASSIGNOR hereby covenants that no assignment, sale, agreement or encumbrance has been or will be made or entered into which would conflict with this assignment.

ASSIGNOR authorizes ASSIGNEE to make applications for and to receive Letters patent for said invention in any of said countries in its own name, or in ASSIGNOR's name, at its election.

ASSIGNOR covenants and agrees to execute or procure any further necessary assurance of the title to said invention and any Letters Patent which may issue therefore and to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE deliver any testimony in any interference, litigation or proceeding related thereto and execute all papers that may be necessary or desirable to perfect the title to said invention or any Letters Patent which may be granted therefore in ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives, and that to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE execute any continuation, continuation-in-part, divisional, renewal or substitute thereof, and as to Letters Patent and reissue or re-examination thereof, or any other additional applications of Letters Patent for said invention or any part thereof, all of which applications and any Letters Patent issuing thereon are hereby assigned to ASSIGNEE, and will make all rightful oaths or declarations, and do all lawful acts requisite for procuring the same therein, without further compensation, but at the expense of ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives.

ASSIGNOR authorizes and requests the Commissioner of Patents to issue any and all Letters Patent of the United States for said invention, resulting from any of the aforesaid applications to its ASSIGNEE.

Docket No: 021452-0373686
Patent


Jonathan Wall

Date

7/13/09

TRADUCCION OFICIAL No. 2010-12-03-708
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por T. Wallace
3. actuando como Funcionario que Certifica
4. lleva el sello/estampilla de la Oficina de Patentes y Marcas de los EE.UU.

Certificado

5. en Washington, D.C.
6. el 22 de noviembre de 2010
7. por el Funcionario Asistente de Autenticaciones, Departamento de Estado
de los Estados Unidos
8. No. 11006422-10
9. Sello/Estampilla:
Departamento de Estado
Estados Unidos de América
10. Firma: (ilegible)
Patrick O. Hatchett

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA


ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

b29825

Anita Escobar
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2010 DIC - 6 9:43

JEFE DE LEGACIONES
BOGOTÁ, C.

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
A TODOS AQUELLOS QUE VIEREN ESTOS PRESENTES:
DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS
Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

22 de septiembre de 2010

POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE ADJUNTO SE ENCUENTRA UNA COPIA
FIEL DE LOS REGISTROS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO
REGISTRADO EL 09 DE AGOSTO DE 2010.

Sello del Departamento de Comercio
Oficina de Patentes y Marcas de los
Estados Unidos

Por Autoridad del
Subsecretario de Comercio para
Propiedad Intelectual y Director de
la Oficina de Patentes y Marcas

(firma: ilegible)

T. WALLACE

Funcionario que Certifica

TRASPASO DE PATENTE	
Versión Electrónica v1.1	
Versión Hoja Estilo v1.1	
TIPO DE PRESENTACION	TRASPASO CORRECTIVO
NATURALEZA DEL TRASPASO	Traspaso Correctivo para corregir el NUMERO PCT de US0808849 a US0888493 anteriormente registrado en Reel 024791 Frame 0872. El Cedente(s) por el presente confirma el 501253444A.
DATOS DE LA PARTE QUE TRASPASA	
Nombre	Fecha de Ejecución
Jonathan WALL	07/30/2010
DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE	
Nombre:	UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH FOUNDATION
Dirección:	600 HENLEY STREET
Dirección interna:	SUITE 211
Ciudad:	KNOXVILLE
Estado/País:	TENNESSEE
Código Postal:	37996
Total NUMEROS PROPIEDAD: 1	
Tipo de Propiedad	Número
Número PCT:	US0888493
DATOS DE CORRESPONDENCIA	
Número Fax:	(703)918-2240
<i>La correspondencia será enviada vía US Mail cuando el intento por fax no sea exitoso.</i>	

Teléfono:	703-394-2210
Email:	t.cawley@wcsr.com
Nombre Corresponsal:	WOMBLE CARLYLE SANDRIDGE & RICE, PLLC
Dirección Línea 1:	P.O. BOX 7037
Dirección Línea 4:	ATLANTA, GEORGIA 30357-0037
NUMERO EXPEDIENTE APODERADO:	63413.0005.1
NOMBRE DEL PRESENTADOR:	Thomas A. Cawley Jr., Ph.D.
Total anexos: 6	
fuente=E090_1020PCT_TRASPASO_CORRECTIVO_PCTUS0888493#page1.tif	
fuente=E090_1020PCT_TRASPASO_CORRECTIVO_PCTUS0888493#page2.tif	
fuente=E090_1020PCT_TRASPASO_CORRECTIVO_PCTUS0888493#page3.tif	
fuente=E090_1020PCT_TRASPASO_CORRECTIVO_PCTUS0888493#page4.tif	
fuente=E090_1020PCT_TRASPASO_CORRECTIVO_PCTUS0888493#page5.tif	
fuente=E090_1020PCT_TRASPASO_CORRECTIVO_PCTUS0888493#page6.tif	

PATENTE

REEL: 024809 FRAME: 0526

Sello
Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

Subsecretario de Comercio para Propiedad Intelectual y
Director de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

05 de agosto de 2010

PTAS

501253444A

WOMBLE CARLYLE SANDRIDGE & RICE, PLLC
P.O. BOX 7037
ATLANTA, GA 30357-0037

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS
NOTIFICACION DE REGISTRO DE UN DOCUMENTO DE TRASPASO

EL DOCUMENTO ADJUNTO HA SIDO REGISTRADO POR LA DIVISION DE TRASPASOS DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS. UNA COPIA MICROFILMADA COMPLETA ESTA DISPONIBLE EN LA OFICINA DE BUSQUEDA DE TRASPASOS BAJO LOS NUMEROS DE REEL Y FRAME CUYAS REFERENCIAS SE MENCIONAN MAS ADELANTE.

POR FAVOR REVISE TODA LA INFORMACION CONTENIDA EN ESTA NOTIFICACION. LA INFORMACION QUE CONTIENE ESTA NOTIFICACION DE REGISTRO REFLEJA LOS DATOS QUE FIGURAN EN EL SISTEMA DE TRASPASOS DE PATENTES Y MARCAS. SI USTED ENCUENTRA ERRORES O TIENE ALGUNA PREGUNTA RELACIONADA CON ESTA NOTIFICACION, PUEDE COMUNICARSE CON EL EMPLEADO CUYO NOMBRE FIGURA EN ESTA NOTIFICACION EN EL TELEFONO 571-272-3350. POR FAVOR ENVIE SU SOLICITUD DE CORRECCION A: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE,

MAIL STOP: ASSIGNMENT DIVISION SERVICES, P.O. BOX 1450,
ALEXANDRIA, VA 22313.

FECHA DE REGISTRO: 08/05/2010

REEL /FRAME: 024791/0872

NUMERO DE PAGINAS: 4

RESUMEN: TRASPASO DEL INTERES DEL CEDENTE(S) (VER DOCUMENTO PARA
DETALLES).

CEDENTE:

WALL, JONATHAN

FECHA DEL DOCUMENTO: 07/30/2010

CESIONARIO:

UNIVERSITY OF TENNESEE RESEARCH FOUNDATION

600 HENLEY STREET

SUITE 211

KNOXVILLE, TENNESSEE 37996

NUMERO SERIAL:

FECHA DE PRESENTACIÓN: 07/21/2008

NUMERO DE PATENTE:

FECHA DE EXPEDICIÓN:

NUMERO PCT: US0888493

TITULO: COMPUESTOS QUIMICOS

TITULO: METODO DE ASIGNACION DE ANCHO DE BANDA PARA TRANSMISION
DE INFORMACION DE CALIDAD DE CANAL
SUCURSAL DE SERVICIOS DE TRASPASO
DIVISION DE REGISTROS PUBLICOS

PATENTE

REEL: 024809 FRAME: 0528

TRASPASO DE PATENTE	
Versión Electrónica v1.1	08/05/2010
Versión Hoja Estilo v1.1	501253444
TIPO DE PRESENTACION	NUEVO TRASPASO
NATURALEZA DEL TRASPASO	TRASPASO
DATOS DE LA PARTE QUE TRASPASA	
Nombre	Fecha de Ejecución
Jonathan WALL	07/30/2010
DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE	
Nombre:	University of Tennessee Research Foundation
Dirección:	600 Henley Street, Suite 211
Dirección interna:	Suite 211
Ciudad:	Knoxville
Estado/País:	TENNESSEE
Código Postal:	37996
Total NUMEROS PROPIEDAD: 1	
Tipo de Propiedad	Número
Número PCT:	US0888493
DATOS DE CORRESPONDENCIA	
Número Fax:	(703)918-2240
<i>La correspondencia será enviada vía US Mail cuando el intento por fax no sea exitoso.</i>	
Teléfono:	703-394-2210
Email:	t.cawley@wcsr.com
Nombre Corresponsal:	Womble Carlyle Sandridge & Rice, PLLC
Dirección Línea 1:	P.O. BOX 7037
Dirección Línea 4:	Atlanta, GEORGIA 30357-0037
NOMBRE DEL PRESENTADOR:	Thomas A. Cawley Jr., Ph.D.

Total anexos: 3

fuelle=E090_1020PCT2_TRASPASO_INVENTOR_A_UTRF_ejecutado#page1.tif

fuelle=E090_1020PCT2_TRASPASO_INVENTOR_A_UTRF_ejecutado#page2.tif

fuelle=E090_1020PCT2_TRASPASO_INVENTOR_A_UTRF_ejecutado#page3.tif

PATENTE

REEL: 024809 FRAME: 0529

Expediente No. E090 1020PCT2

Patente

Traspaso de Invención

En consideración del pago por parte del CESIONARIO al CEDENTE de una contraprestación buena y valiosa, el recibo de la cual se reconoce por el presente,

CEDENTE:

- (1) Nombre Completo del Inventor: Jonathan Wall
Residencia: 1216 Harrington Drive
Knoxville, Tennessee 37922
Estados Unidos de América
Ciudadanía: Reino Unido

por el presente confirmo que con vigencia desde el 29 de diciembre de 2008, el CEDENTE vende, traspasa y transfiere al CESIONARIO:

University of Tennessee Research Foundation
600 Henley Street, Suite 211
Knoxville, Tennessee 37996
Estados Unidos de América

y a los sucesores, cesionarios y representantes legales del CESIONARIO todo derecho, título e interés para los Estados Unidos y sus posesiones territoriales y en todos los países extranjeros, incluyendo todos los derechos para reivindicar prioridad, en y de la invención llamada:

TRATAMIENTO Y PROFILAXIS DE AMILOIDOSIS

e inventada por el CEDENTE y los siguientes inventores adicionales, si hubiese:

y la cual se encuentra en la Solicitud Internacional No. PCT/US2008/088493 presentada el 29 de diciembre de 2008.

- ☐ Yo/nosotros el CEDENTE que firmamos a continuación, por el presente autorizamos y solicitamos la inserción anterior del número y fecha de presentación de la solicitud, cuando se conozcan,
- ☒ y cualquier equivalente legal de la misma en un país extranjero,

incluyendo el derecho a reivindicar prioridad, incluyendo cualquiera y todas las mejoras reveladas en el presente, y en y para todas las Patentes de Invención que se obtengan para dicha invención por la solicitud anteriormente mencionada o cualquiera provisional, no provisional, continuación, divisional, renovación o sustituto de la misma, y en cuanto a Patente de Invención cualquier reexpedición o re-examen de la misma.

El CEDENTE por el presente conviene que ningún traspaso, venta, acuerdo o gravamen ha sido hecho o se hará o se celebrará que entre en conflicto con este traspaso.

El CEDENTE autoriza al CESIONARIO para hacer solicitudes por y a recibir Patente de Invención para dicha invención en cualquiera de dichos países en su propio nombre o en el nombre del CEDENTE, a su elección.

El CEDENTE conviene y acuerda ejecutar o procurar cualquier aseguramiento posterior necesario del título sobre dicha invención y, en cualquier Patente de Invención que pueda expedirse por lo tanto y, en cualquier momento, a solicitud y a expensas del CESIONARIO entregar cualquier testimonio en

cualquier interferencia, litigio o procedimiento relacionado con ello y ejecutar todos los documentos que sean necesarios o deseables para perfeccionar el título sobre dicha invención o cualquier Patente de Invención que pudiese otorgarse por lo tanto al CESIONARIO, sus sucesores, cesionarios y representantes legales, y que, en cualquier momento, a solicitud y a expensas del CESIONARIO ejecutar cualquier continuación, continuación en parte, divisional, renovación o sustituto de la misma, y en cuanto a Patentes de Invención y reexpedición o reexamen de la misma, o cualquier solicitud adicional de Patente de Invención para dicha invención o parte de la misma, todas las solicitudes y cualquier Patente de Invención sobre ella por el presente se traspasa al CESIONARIO, y hará todos los juramentos o declaraciones legítimas y hará todos los actos legales requeridos para procurar las mismas, sin más compensación, pero a expensas del CESIONARIO, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales.

El CEDENTE autoriza y le solicita al Comisionado de Patentes que expida cualquiera y toda Patente de Invención de los Estados Unidos para dicha invención, que resulte de cualquiera de las solicitudes anteriormente mencionadas a su CESIONARIO.

(firma: ilegible)

Jonathan Wall

30 de julio de 2010

Fecha

Traspaso de Invención

Solicitud Provisional

REGISTRADO: 08/09/2010

PATENTE

REEL: 024809 FRAME: 0532

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 3 de diciembre de 2010, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

(JLLCCO: 260285.DOC v.1) 11

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by T. Wallace

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of U.S. Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

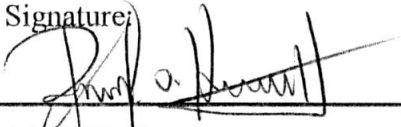
6. the twenty-second of November, 2010

7. by Assistant Authentication Officer, United States Department of State

8. No. 11006422-10

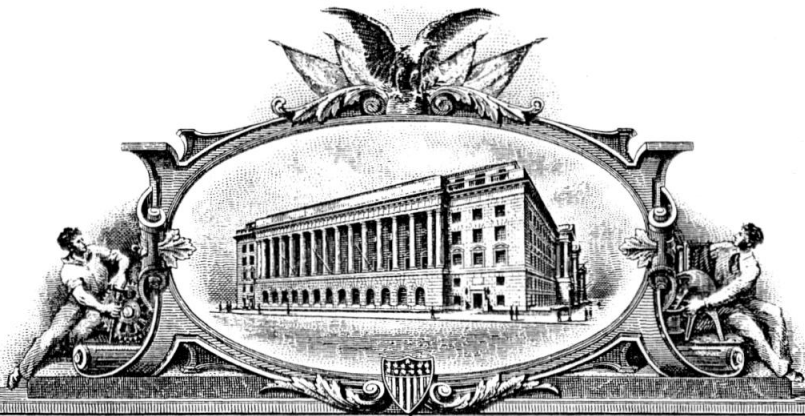
9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Patrick O. Hatchett

col



A 7259077

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

September 22, 2010

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
AUGUST 09, 2010.

By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office



T. Wallace
T. WALLACE
Certifying Officer

PATENT ASSIGNMENT

Version v1.1
t Version v1.1

SION TYPE:	CORRECTIVE ASSIGNMENT
E OF CONVEYANCE:	Corrective Assignment to correct the PCT NUMBER from US0808849 to US0888493 previously recorded on Reel 024791 Frame 0872. Assignor(s) hereby confirms the 501253444A.

RECEIVING PARTY DATA

Name	Execution Date
than WALL	07/30/2010

RECEIVING PARTY DATA

me:	UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH FOUNDATION
reet Address:	600 HENLEY STREET
ernal Address:	SUITE 211
ty:	KNOXVILLE
ate/Country:	TENNESSEE
ostal Code:	37996

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
PCT Number:	US0888493

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (703)918-2240
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
Phone: 703-394-2210
Email: tcawley@wcsr.com
Correspondent Name: WOMBLE CARLYLE SANDRIDGE & RICE, PLLC
Address Line 1: P.O. BOX 7037
Address Line 4: ATLANTA, GEORGIA 30357-0037

ATTORNEY DOCKET NUMBER:	63413.0005.1
NAME OF SUBMITTER:	Thomas A. Cawley, Jr., Ph.D.

Total Attachments: 6
source=E090_1020PCT_CORRECTIVE_ASSIGNMENT_PCTUS0888493#page1.tif

501256826

PATENT
REEL: 024809 FRAME: 0525

CH \$40.00 US0888493

=E090_1020PCT_CORRECTIVE_ASSIGNMENT_PCTUS0888493#page2.tif
=E090_1020PCT_CORRECTIVE_ASSIGNMENT_PCTUS0888493#page3.tif
=E090_1020PCT_CORRECTIVE_ASSIGNMENT_PCTUS0888493#page4.tif
=E090_1020PCT_CORRECTIVE_ASSIGNMENT_PCTUS0888493#page5.tif
=E090_1020PCT_CORRECTIVE_ASSIGNMENT_PCTUS0888493#page6.tif

PATENT
REEL: 024809 FRAME: 0526

TO 8/6/2010 6:09:32 PM PAGE 2/004 Fax Server
E CARLYLE SANDRIDGE & RICE, PLLC COMPANY:P.O. BOX 7037



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE



501253444

AUGUST 05, 2010

PTAS
WOMBLE CARLYLE SANDRIDGE & RICE, PLLC
P.O. BOX 7037
ATLANTA, GA 30357-0037

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 08/05/2010

REEL/FRAME: 024791/0872
NUMBER OF PAGES: 4

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

ASSIGNOR:
WALL, JONATHAN

DOC DATE: 07/30/2010

ASSIGNEE:
UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH
FOUNDATION
600 HENLEY STREET
SUITE 211
KNOXVILLE, TENNESSEE 37996

SERIAL NUMBER:

FILING DATE: 07/21/2008

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

PCT NUMBER: ~~US0808849~~ US0888493

TITLE: METHOD OF ALLOCATING BANDWIDTH FOR TRANSMISSION OF CHANNEL QUALITY INFORMATION

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 - www.USPTO.gov

PATENT
REEL: 024809 FRAME: 0527

TO

8/6/2010 8:09:32 PM PAGE 3/004 Fax Server

E CARLYLE SANDRIDGE & RICE, PLLC COMPANY:P.O. BOX 7037

24791/0872 PAGE 2

ASSIGNMENT SERVICES BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

PATENT
REEL: 024809 FRAME: 0528

PATENT ASSIGNMENT

ronic Version v1.1
sheet Version v1.1

08/05/2010
501253444

MISSION TYPE:

NEW ASSIGNMENT

ATURE OF CONVEYANCE:

ASSIGNMENT

ONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
Jonathan WALL	07/30/2010

RECEIVING PARTY DATA

Name:	UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH FOUNDATION
Street Address:	600 Henley Street
Internal Address:	Suite 211
City:	Knoxville
State/Country:	TENNESSEE
Postal Code:	37998

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
PCT Number:	US0808840 US0888493

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (703)918-2240
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
Phone: 703-394-2210
Email: tcawley@wcsr.com
Correspondent Name: Womble Carlyle Sandridge & Rice, PLLC
Address Line 1: P.O. Box 7037
Address Line 4: Atlanta, GEORGIA 30357-0037

NAME OF SUBMITTER:

Thomas A. Cawley, Jr., Ph.D.

Total Attachments: 3

source=E090_1020PCT2_ASSIGNMENT_INVENTOR_TO_UTRF_executed#page1.tif
source=E090_1020PCT2_ASSIGNMENT_INVENTOR_TO_UTRF_executed#page2.tif
source=E090_1020PCT2_ASSIGNMENT_INVENTOR_TO_UTRF_executed#page3.tif

US0808849
CH \$40.00

Docket No: E090 1020PCT2
Patent

Assignment of Invention

In consideration of the payment by ASSIGNEE to ASSIGNOR of good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged,
ASSIGNOR:

Full Name of Inventor: **Jonathan Wall**
Residence: 1216 Harrington Drive,
Knoxville, Tennessee 37922
United States of America
Citizenship: United Kingdom

hereby confirms that, effective as of December 29, 2008, ASSIGNOR sells, assigns and transfers to ASSIGNEE:

University of Tennessee Research Foundation
600 Henley Street, Suite 211
Knoxville, Tennessee 37996
United States of America

and the successors, assigns and legal representatives of the ASSIGNEE the entire right, title and interest for the United States and its territorial possessions and in all foreign countries, including all rights to claim priority, in and to the invention entitled:

TREATMENT AND PROPHYLAXIS OF AMYLOIDOSIS

and invented by ASSIGNOR and the following additional inventors, if any:

a which are found in

International Application No. PCT/US2008/088493 filed on December 29, 2008.

- ☐ I/we the ASSIGNOR signing below, hereby authorize and request insertion above of the application number and filing date, when they become known,
- ☒ and any legal equivalent thereof in a foreign country,

including the right to claim priority, including any and all improvements disclosed therein, and in and to all Letters Patent to be obtained for said invention by the above application or any subsequently filed provisional, nonprovisional, continuation, divisional, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patent any reissue or re-examination thereof.

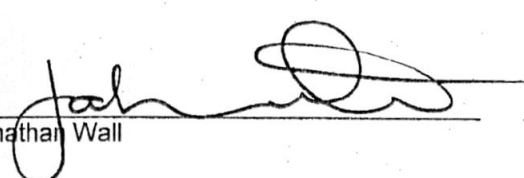
ASSIGNOR hereby covenants that no assignment, sale, agreement or encumbrance has been or will be made or entered into which would conflict with this assignment.

ASSIGNOR authorizes ASSIGNEE to make applications for and to receive Letters patent for said invention in any of said countries in its own name, or in ASSIGNOR's name, at its election.

ASSIGNOR covenants and agrees to execute or procure any further necessary assurance of the title to said invention and any Letters Patent which may issue therefore and to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE deliver any testimony in any interference, litigation or proceeding related thereto and execute all papers that may be necessary or desirable to perfect the title to said invention or any Letters Patent which may be granted therefore in ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives, and that to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE execute any continuation, continuation-in-part, divisional, renewal or substitute thereof, and as to Letters Patent and reissue or re-examination thereof, or any other additional applications of Letters Patent for said invention or any part thereof, all of which applications and any Letters Patent issuing thereon are hereby assigned to ASSIGNEE, and will make all rightful oaths or declarations, and do all lawful acts requisite for procuring the same therein, without further compensation, but at the expense of ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives.

ASSIGNOR authorizes and requests the Commissioner of Patents to issue any and all Letters Patent of the United States for said invention, resulting from any of the aforesaid applications to its ASSIGNEE.

Docket No: E090 1020PCT2
Patent


Jonathan Wall

Date

7/30/10