



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 345 746**

51 Int. Cl.:
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **99923260 .6**
96 Fecha de presentación : **21.05.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1078005**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.01.2000**

54 Título: **Métodos para la eliminación de amiloide usando anticuerpos antiamiloides.**

30 Prioridad: **21.05.1998 US 86198 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.09.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.09.2010

73 Titular/es:
**University of Tennessee Research Foundation
1534 White Avenue
Knoxville, Tennessee 37996, US**

72 Inventor/es: **Solomon, Alan;
Hrncic, Rudi y
Wall, Jonathan, S.**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para la eliminación de amiloide usando anticuerpos anti-amiloide.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere generalmente a composiciones para el uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el amiloide. Específicamente, la presente invención proporciona usos terapéuticos relacionados con anticuerpos para efectuar la eliminación de fibrillas de amiloide por el propio sistema inmunofagocitario del
10 paciente.

Antecedentes de la invención

Amiloidosis se refiere a la deposición patológica de proteínas en forma de fibrillas birrefringentes verdes congofílicas cuando se tiñen con rojo Congo, bien dispersadas o bien en forma de amiloidomas localizados. Tales depósitos son
15 sintomáticos de varias enfermedades, por ejemplo la enfermedad de Alzheimer, amiloide asociado con la inflamación, diabetes tipo II, encefalopatía espongiiforme bovina (BSE, por sus siglas en inglés), enfermedad de Creutzfeld-Jakob (CJD, por sus siglas en inglés), escrapie y amiloidosis primaria.

Las amiloidosis se clasifican generalmente en tres grupos: amiloidosis sistémicas principales, amiloidosis localizadas principales y amiloidosis heterogéneas. Las amiloidosis sistémicas principales incluyen: afecciones inflamatorias crónicas (p. ej., tuberculosis, osteomielitis, etc.); afecciones no infecciosas tales como artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante y enfermedad de Crohn, etc.; fiebre mediterránea familiar, discrasia de células plasmáticas (amiloidosis primaria) y diversas polineuropatías y cardiomiopatías familiares. Las amiloidosis localizadas principales incluyen: diálisis crónica habitualmente durante más de 8 años, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria (holandesa) y hemorragia cerebral no traumática de la tercera edad. Las amiloidosis heterogéneas incluyen: polineuropatía familiar (Iowa), amiloidosis familiar (finlandesa), hemorragia cerebral hereditaria (islandesa), CJD, carcinoma medular del tiroides, amiloide auricular y diabetes mellitus (insulinomas). Otras amiloidosis incluyen las mencionadas en Louis W. Heck, "The Amyloid Diseases" en Cecil's Textbook of Medicine
20 1504-6 (W.B. Saunders & Co., Filadelfia, PA; 1996).

Encefalopatías espongiiformes transmisibles que provocan CJD y enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) son descritas por B. Chesebro *et al.*, "Transmissible Spongiform Encephalopathies: A Brief Introduction" en FIELD'S VIROLOGY 2845-49 (3ª Edición; Raven Publishers, Filadelfia, PA; 1996) y en D.C. Gajdusek, "Infectious amyloids: Subacute Spongiform Encephalopathies as Transmissible Cerebral Amyloidoses", 2851-2900 en FIELDS VIROLOGY (1996). Muchas de estas enfermedades probablemente están mediadas por priones, una proteína infecciosa. Véanse S.B. Prusiner, "Prions" en FIELDS VIROLOGY 2901-50 (1996) y las referencias contenidas allí. Las formas hereditarias de amiloidosis se describen en Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/dispim?. Cada una de las anteriores se incorpora en la presente memoria mediante referencia.
30

Muy raramente los pacientes con amiloidosis clínicamente probada alcanzan espontáneamente una remisión completa, quizá debido a que las propias fibrillas de amiloide son no inmunogénicas. Se han investigado diversas terapias para la amiloidosis, tales como quimioterapia en altas dosis, esteroides, doxorubicina yodada y terapia de sustitución con células pluripotenciales. Sin embargo, en solo un tipo de enfermedad amiloidea, la amiloidosis mediterránea familiar, el tratamiento farmacológico (con colchicina) ha resultado ser eficaz.
45

Se conoce el uso de anticuerpos monoclonales (mAb) para inducir o modular la eliminación inmunológica de una entidad por lo demás no reconocida. Se han usado satisfactoriamente mAb para tratar linfoma no Hodgkins y cáncer de mama, por ejemplo.
50

Previamente, una variedad de estudios han caracterizado anticuerpos que se unen a proteínas amiloideas o fibrillas de amiloide. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N° 5.714.471, 5.693.478, 5.688.651, 5.652.092, 5.593.846, 5.536.640, 5.385.915, 5.348.963, 5.270.165, 5.262.332, 5.262.303, 5.164.295 y 4.782.014. Además, varias publicaciones han sugerido que podrían usarse anticuerpos anti-amiloide para estudiar el avance de la beta-amiloidosis y para diversas opciones terapéuticas. Véanse, por ejemplo, Bellotti *et al.*, Scand. J. Immunol. (1992) 36(4):607-615; Bellotti *et al.*, Ren. Fail. (1993) 15(3):365-371; Walker *et al.* J. Neuropathol. Exp. Neurol. (1994) 53(4):377-383; y Bickel *et al.*, Bioconjug. Chem. (1994) 5(2):119-125. Sin embargo, no se ha demostrado que ningún anticuerpo terapéutico detenga o invierta la deposición de fibrillas de amiloide en un paciente. Así, existe una necesidad de un método para
60 tratar amiloidosis usando formulaciones de anticuerpo que contengan anticuerpos que se unan a fibrillas de amiloide.

WO 96/25435 divulga métodos *in vitro* para marcar placas amiloideas presentes en el cerebro de un paciente humano, usando técnicas inmunohistoquímicas que implican anticuerpos monoclonales que se unen a péptido beta-A4.
65

"Bioconjugate Chem.: volumen 5, páginas 119-125, (1994)" divulga la unión *in vitro* de anticuerpos monoclonales a capilares cerebrales aislados.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona el uso de:

- a) una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo o polipéptido de inmunoglobulina o un fragmento del mismo, en donde el anticuerpo o polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo se une a fibrilla de amiloide de IgLC humana; y
- b) un vehículo farmacéuticamente aceptable; para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad por deposición de amiloide en un paciente humano.

Además, de acuerdo con la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo o polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo, en la que el anticuerpo o polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo se une a fibrilla de amiloide de IgLC humana y es eficaz para potenciar la respuesta inmunitaria celular de un paciente para eliminar depósitos de amiloide del paciente.

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A y 1B. Las figuras 1A y 1B son fotografías reproducidas de un ratón Balb/c justo después de que se realice una inyección de amiloide (1A) y 14 días después de la inyección (1B). La zona de inyección estaba afeitada para ilustrar mejor la "joroba" provocada por la inyección del material amiloideo.

Figuras 2A-2B. Las Figuras 2A y 2B son fotografías reproducidas de neutrófilos humanos (núcleos multilobulados) que se adhieren a amiloide humano opsonizado *in vitro*.

Figuras 3A-3D. Las Figuras 3A-3D son fotografías reproducidas de muestras tisulares cargadas de amiloide teñidas inmunohistoquímicamente (20 aumentos). La Figura 3A es una muestra tisular procedente de un paciente con amiloidosis κ 1 teñida con rojo Congo; los depósitos de amiloide, observados bajo luz polarizada, aparecen como partículas de color verde azulado. La Figura 3B es una muestra tisular teñida con fosfatasa alcalina después de marcar con mAb anti- κ I (57-18-H12). La Figura 3C es una muestra tisular teñida como en la Figura 3B, pero con mAb anti- κ IV (11-1F4). La Figura 3D es una muestra tisular teñida como en la Figura 3B, pero con mAb anti- λ VIII (31-8c7).

Figura 4. La Figura 4 es una fotografía reproducida que muestra un mAb κ 4 fluoresceinado (FITC) unido a amiloide humano implantado en un ratón Balb/c. El mAb se inyectó en el muslo del ratón. El amiloidoma se extirpó 72 horas después de la inyección y se observó usando un microscopio de epifluorescencia (20 aumentos).

Modos para llevar a cabo la invención

Descripción general

La presente invención utiliza polipéptidos de inmunoglobulina para modular y para potenciar la degradación y la eliminación de depósitos no deseados de fibrillas de amiloide en un huésped o paciente. Se prevé que la invención se use, por ejemplo, para tratar a seres humanos que sufren una enfermedad o afección caracterizada por una deposición no deseada de fibrillas de amiloide. Sin pretender limitarse a ningún mecanismo de acción particular, se cree que la administración de péptidos de inmunoglobulina usada en la presente invención opsoniza las fibrillas de amiloide depositadas en un paciente que sufre amiloidosis, ayudando de ese modo a su eliminación del paciente por el propio sistema inmunitario del paciente. Se cree que el sistema inmunitario del paciente solo es incapaz de eliminar las fibrillas de amiloide en condiciones moduladas por fibrillas de amiloide sin tal intervención terapéutica, presumiblemente debido a que las fibrillas de amiloide son por sí mismas relativamente no inmunogénicas.

Para tratar a un paciente con amiloidosis, una dosis terapéuticamente eficaz de polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo se administra junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente adecuado. Al unirse o adherirse tales polipéptidos de inmunoglobulina a depósitos no deseados de fibrillas de amiloide, se cree que las últimas se opsonizan.

Pueden llevarse a cabo administraciones simples o múltiples de las composiciones de la presente invención en dosificaciones y mediante protocolos de administración conocidos por los expertos en la especialidad para la administración de otros productos terapéuticos de anticuerpo. Estos parámetros pueden ser seleccionados y/u optimizados por el médico que trata a un paciente particular.

Preferiblemente, una dosis terapéuticamente eficaz de una formulación farmacéutica de la presente invención debe aportar una cantidad de polipéptido de inmunoglobulina anti-amiloide de IgLC suficiente para inhibir sustancialmente la deposición no deseada de fibrillas de amiloide o para inhibir sustancialmente el grado de cualquier deposición no deseada de fibrillas de amiloide. Más preferiblemente, las formulaciones deben reducir la carga global de fibrillas de amiloide depositadas en un paciente. Además, la administración de tales formulaciones debe comenzar poco después de la diagnosis de amiloidosis y continuar hasta que los síntomas se reduzcan sustancialmente y durante un período posteriormente. En casos bien establecidos de enfermedad, pueden requerirse dosis en exceso seguidas por dosis de mantenimiento.

Definiciones

Los términos “péptido”, “polipéptido” o “proteína” se usan intercambiamente en la presente memoria. El término “identidad sustancial”, cuando se refiere a polipéptidos, indica que el polipéptido o la proteína en cuestión es al menos aproximadamente 30% idéntico a una proteína completa presente en la naturaleza o una porción de la misma, habitualmente al menos aproximadamente 70% idéntico, y preferiblemente al menos aproximadamente 95% idéntico.

Según se usan en la presente memoria, los términos “aislada”, “sustancialmente pura” y “sustancialmente homogénea” se usan intercambiamente y describen una proteína que se ha separado de componentes que la acompañan en la naturaleza. Una proteína sustancialmente purificada comprenderá típicamente por encima de aproximadamente 85% a 90% de una muestra de proteína, más habitualmente aproximadamente 95%, y preferiblemente será por encima de aproximadamente 99% pura. La pureza u homogeneidad de la proteína puede indicarse mediante un número de medios bien conocidos en la especialidad, tales como una electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de proteína, seguido por visualizar una sola banda de polipéptido en un gel de poliacrilamida al teñir. Para ciertos propósitos, se necesitará alta resolución y se utilizará HPLC o un medio similar para la purificación.

Las proteínas pueden purificarse hasta homogeneidad sustancial mediante técnicas estándar bien conocidas en la especialidad, incluyendo precipitación selectiva con sustancias tales como sulfato amónico, cromatografía en columna, métodos de inmunopurificación y otros. Véase, por ejemplo, Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag: Nueva York (1982).

Las técnicas de purificación de anticuerpos son bien conocidas en la especialidad. Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1988), 288-318 describe, por ejemplo, la purificación usando precipitación con sulfato amónico, ácido caprílico, DEAE, cromatografía con hidroxipatita, cromatografía de filtración en gel, cuentas de proteína A e inmovinoafinidad.

Los ácidos nucleicos, según se usan en la presente memoria, pueden ser DNA o RNA. Cuando se hace referencia a ácidos nucleicos, el término “identidad sustancial” indica que las secuencias de dos ácidos nucleicos, o porciones indicadas de los mismos, cuando se alinean óptimamente y se comparan, son idénticas, con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas, en al menos aproximadamente 80% de los nucleótidos, habitualmente al menos aproximadamente de 90% a 95%, y más preferiblemente al menos aproximadamente de 98% a 99,5% de los nucleótidos.

Alternativamente, existe una identidad de secuencias de ácidos nucleicos sustancial cuando un segmento de ácido nucleico se hibrida bajo condiciones de hibridación selectivas a un complemento de otra hebra de ácido nucleico.

De forma similar, “sustancialmente complementario” significa que un ácido nucleico se hibrida selectivamente a, o es idéntico a, otro ácido nucleico. Típicamente, la hibridación selectiva se producirá cuando haya al menos aproximadamente 55% de identidad a lo largo de un tramo de al menos 14-25 nucleótidos, preferiblemente al menos aproximadamente 65% de identidad, más preferiblemente al menos aproximadamente 75%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 90% de identidad. Véase M. Kanehisa *Nucleic Acids Res.* 12:203 (1984).

Condiciones de hibridación restrictivas incluirán típicamente concentraciones de sal de menos de aproximadamente 1 M, más habitualmente menos de aproximadamente 500 mM y preferiblemente menos de aproximadamente 200 mM. Las condiciones de temperatura serán típicamente mayores de 22°C, típicamente mayores de aproximadamente 30°C y preferiblemente por encima de aproximadamente 37°C. Puesto que otros factores pueden afectar drásticamente a la restricción de la hibridación, incluyendo la composición de bases y el tamaño de las hebras complementarias, la presencia de disolventes orgánicos y la extensión de la discordancia de bases, la combinación de parámetros es más importante que la medida absoluta de uno cualquiera solo.

“Aislados” o “sustancialmente puros”, cuando se hace referencia a ácidos nucleicos, se refieren a los que se han purificado de otros componentes celulares u otros contaminantes, p. ej., otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándar, incluyendo tratamiento alcalino/con SDS, formación de bandas con CsCl, cromatografía en columna y otras bien conocidas en la especialidad. Véase F. Ausubel, *et al.*, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York (1987), incorporada en la presente memoria mediante referencia.

Un ácido nucleico está “conectado operativamente” cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está conectado operativamente a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia. Generalmente, conectadas operativamente significa que las secuencias de ácido nucleico que están conectadas son contiguas y, cuando es necesario enlazar dos regiones de codificación de proteína, contiguas y en el marco de lectura.

Técnicas para la manipulación de ácidos nucleicos, tales como subclonar secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos en vectores de expresión, marcaje de sondas, hibridación de DNA, etc., se describen generalmente, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, o Ausubel *et al.*, ed. (1987) *ob. cit.*, las cuales se incorporan ambas en la presente memoria mediante referencia.

Los “vectores de expresión”, “vectores de clonación” o “vectores” son a menudo plásmidos u otras moléculas de ácido nucleico que son capaces de replicarse en una célula huésped dada. Los vectores de expresión pueden replicarse autónomamente, o pueden replicarse al ser insertados en un genoma de la célula huésped, mediante métodos bien conocidos en la especialidad. Los vectores que se replican autónomamente tendrán un origen de replicación o secuencia de replicación autónoma (“ARS”, por sus siglas en inglés) que es funcional en la célula o las células elegidas. A menudo, es deseable que un vector sea utilizable en más de una célula huésped, p. ej., en *E. coli* para clonación y construcción, y en una célula de mamífero para la expresión.

Se usan a menudo líneas celulares de mamífero como células huésped para la expresión de polipéptidos derivados de eucariotas. La propagación de células de mamífero en cultivo es conocida de por sí. Véase Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, ed. (1973). Líneas de células huésped también pueden incluir organismos tales como bacterias (p. ej., *E. coli* o *B. subtilis*), levaduras, hongos filamentosos, células vegetales o células de insecto, entre otros.

“Transformación” se refiere a la introducción de vectores que contienen los ácidos nucleicos de interés directamente en células huésped mediante métodos bien conocidos. Métodos de transformación, que varían dependiendo del tipo de célula huésped, incluyen electroporación; transfección empleando cloruro cálcico, cloruro de rubidio, fosfato cálcico, DEAE-dextrano u otras sustancias; bombardeo con microproyectiles; lipofección; infección (donde el vector es un agente infeccioso); y otros métodos. Véase generalmente Sambrook *et al.*, (1989) ob. cit. La referencia a células en las que se han introducido los ácidos nucleicos descritos anteriormente pretende incluir además la progenie de tales células.

Según se usa en la presente memoria, “polipéptido de inmunoglobulina” se refiere a moléculas que se derivan de inmunoglobulinas naturales (p. ej., anticuerpos) que tienen una actividad inmunorreactiva específica contra una diana particular, p. ej., contra fibrillas de amiloide. Los anticuerpos son típicamente tetrámeros de polipéptidos de inmunoglobulina. Según se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo” también se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Genes de inmunoglobulina incluyen los que codifican para las cadenas ligeras, que pueden ser de los tipos kappa o lambda, y los que codifican para las cadenas pesadas. Tipos de cadena pesada son alfa, gamma, delta, épsilon y mu. Las porciones carboxiterminales de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina son regiones constantes, mientras que las porciones aminoterminales son codificadas por los múltiples genes de regiones variables de inmunoglobulina. Las regiones variables de una inmunoglobulina son las porciones que proporcionan especificidad de reconocimiento de antígenos. En particular, la especificidad reside en las regiones que determinan la complementariedad (“CDR”, por sus siglas en inglés), también conocidas como regiones hipervariables, de las inmunoglobulinas.

Las inmunoglobulinas pueden existir en una variedad de formas fragmentarias incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab, F(ab’), F(ab’)₂, SvFv y otros fragmentos, así como cadenas simples (p. ej., Huston, *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 85:5879-5883 (1988) y Bird, *et al.*, Science 242: 423-426 (1988). (Véase, generalmente, Hood, *et al.*, “Immunology”, Benjamin, N.Y., 2ª ed. (1984), y Hunkapiller y Hood, Nature, 323:15-16 (1986)). También pueden usarse anticuerpos monocatenarios, en los que los genes para una cadena pesada y una cadena ligera se combinan en una sola secuencia de codificación. Polipéptido de inmunoglobulina también abarca una cadena de inmunoglobulina truncada, por ejemplo, una cadena que contiene menos dominios de región constante que en el polipéptido natural. Tales polipéptidos truncados pueden producirse mediante métodos estándar tales como introducir un codón de parada en la secuencia génica 5’ de las secuencias de dominio que han de someterse a delección. Los polipéptidos truncados pueden ensamblarse a continuación en anticuerpos truncados. Anticuerpos, según se usa en la presente memoria, también incluye anticuerpos biespecíficos que pueden producirse tal como mediante los métodos descritos en las siguientes referencias: Glennie *et al.*, J. Immunol., 139:2367-2375 (1987); Segal *et al.*, Biologic Therapy of Cancer Therapy of Cancer Updates 2(4):1-12 (1992); y Shalaby *et al.*, J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992).

Los “anticuerpos monoclonales” pueden obtenerse mediante diversas técnicas familiares para los expertos en la especialidad. En resumen, células de bazo procedentes de un animal inmunizado con un antígeno deseado se immortalizan, comúnmente mediante fusión con una célula de mieloma (véase, Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol, 6:511-519 (1976)). Métodos alternativos de immortalización incluyen transformación con virus de Epstein Barr, oncogenes o retrovirus, u otros métodos bien conocidos en la especialidad. Colonias que surgen de células inmortalizadas simples se rastrean con respecto a la producción de anticuerpos de la especificidad y afinidad deseadas para el antígeno, y el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producidos por tales células puede potenciarse mediante diversas técnicas, incluyendo inyección en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado.

Inmunoglobulinas mono-específicas y biespecíficas también pueden producirse mediante técnicas recombinantes en células huésped procarióticas o eucarióticas.

Los anticuerpos “quiméricos” son codificados por genes de inmunoglobulina que se han sometido a ingeniería genética de modo que los genes de las cadenas ligeras y pesadas estén compuestos por segmentos de gen de inmunoglobulina pertenecientes a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables (V) de los genes procedentes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden enlazarse a segmentos constantes (C) humanos. Es probable que tal anticuerpo quimérico sea menos antigénico para un ser humano que anticuerpos con regiones constantes de ratón así como regiones variables de ratón.

Según se usa en la presente memoria, el término anticuerpo quimérico también se refiere a un anticuerpo que incluye una inmunoglobulina que tiene un armazón humanoide y en el que cualquier región constante presente tiene al menos aproximadamente 85%-90%, y preferiblemente aproximadamente 95% de identidad de secuencia de polipéptidos con una región constante de inmunoglobulina humana, la llamada inmunoglobulina “humanizada” (véase, por ejemplo, la Publicación PCT WO 90/07861). De ahí que todas las partes de tal inmunoglobulina “humanizada”, excepto posiblemente las regiones de determinan la complementariedad (CDR), sean sustancialmente idénticas a partes correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulina humana natural. Cuando sea necesario, los residuos del armazón también pueden reemplazarse por aquellos dentro o a través de especies, especialmente si se encuentra que ciertos residuos del armazón afectan a la estructura de las CDR. Un anticuerpo quimérico también puede contener regiones variables o constantes truncadas.

El término “región de armazón”, según se usa en la presente memoria, se refiere a aquellas porciones de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina que están relativamente conservadas (es decir, distintas de las CDR) entre diferentes inmunoglobulinas en una sola especie, según se definió por Kabat, *et al.*, (1987); Sequences of Proteins of Immunologic Interest, 4ª Ed., U.S. Dept. Health and Human Services). Según se usa en la presente memoria, una “región de armazón humanoide” es una región de armazón que en cada cadena existente comprende al menos aproximadamente 70 o más residuos de aminoácido, típicamente de 75 a 85 o más residuos, idénticos a los de una inmunoglobulina humana.

Secuencias de DNA de la región constante humanas pueden aislarse de acuerdo con procedimientos bien conocidos a partir de una variedad de células humanas, pero preferiblemente a partir de células B inmortalizadas. Las regiones variables o CDR para producir las inmunoglobulinas quiméricas de la presente invención pueden derivarse de forma similar de anticuerpos monoclonales capaces de unirse al amiloide tipo humano, y se producirán en cualquier sistema mamífero conveniente, incluyendo ratones, ratas, conejos, líneas celulares humanas o cualesquiera otros vertebrados capaces de producir anticuerpos mediante métodos bien conocidos. Las regiones variables o CDR pueden producirse sintéticamente, mediante métodos recombinantes estándar, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (“PCR”, por sus siglas en inglés) o a través de bibliotecas de presentación en fagos. Para los métodos de presentación en fagos, véanse, por ejemplo, McCafferty *et al.*, Nature 348:552-554 (1990); Clackson *et al.*, Nature 352:624-628 y Marks *et al.*, Biotechnology 11:1145-1149 (1993). Pueden emplearse sistemas procarióticos adecuados, tales como una bacteria, una levadura y un fago.

Células originarias adecuadas para las secuencias de DNA y células huésped para la expresión y secreción de inmunoglobulinas pueden obtenerse de un número de fuentes, tales como the American Type Culture Collection (“Catalogue of Cell Lines and Hybridomas”, Quinta edición (1985) Rockville, Maryland, EE. UU. de A.).

Además de las inmunoglobulinas quiméricas y “humanizadas” descritas específicamente en la presente memoria, otras inmunoglobulinas modificadas esencialmente idénticas pueden diseñarse y fabricarse fácilmente utilizando diversas técnicas de DNA recombinante bien conocidas por los expertos en la especialidad. En general, pueden efectuarse fácilmente modificaciones de los genes mediante una variedad de técnicas bien conocidas, tales como PCR y mutagénesis dirigida al sitio (véanse Gillman y Smith, Gene 8:81-97 (1979) y S. Roberts *et al.*, Nature 328:731-734 (1987)).

Alternativamente, pueden producirse fragmentos de polipéptido que comprenden solo una porción de la estructura primaria de inmunoglobulina. Por ejemplo, puede ser deseable producir fragmentos de polipéptido de inmunoglobulina que posean una o más actividades de inmunoglobulina además del, o distintas del, reconocimiento de antígenos (p. ej., fijación del complemento).

Los genes de inmunoglobulina, enteros o en parte, también pueden combinarse con regiones funcionales procedentes de otros genes (p. ej., enzimas), o con otras moléculas tales como toxinas, marcadores y restos orientadores para producir proteínas de fusión (p. ej., “inmunotoxinas”) que tienen nuevas propiedades. En estos casos de fusión génica, los dos componentes están presentes dentro de la misma cadena polipeptídica. Alternativamente, la inmunoglobulina o el fragmento de la misma puede unirse químicamente a la toxina o el marcador mediante cualquiera de una variedad de procedimientos químicos bien conocidos. Por ejemplo, cuando el marcador o el agente citotóxico es una proteína y el segundo componente es una inmunoglobulina intacta, la conexión puede ser por medio de reticuladores heterobifuncionales, p. ej., SPDP, carbodiimida, glutaraldehído o similares.

Marcadores adecuados incluyen, por ejemplo, radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, sustancias fluorescentes, sustancias quimioluminiscentes, partículas magnéticas. Véanse, para ejemplos de patentes que muestran el uso de tales marcadores, las Patentes de EE. UU. N° 3.817.837, 3.850.752, 3.939.350, 3.996.345, 4.277.437, 4.275.149 y 4.366.241.

Las inmunotoxinas, incluyendo las moléculas monocatenarias, también pueden producirse por medios recombinantes. La producción de diversas inmunotoxinas es bien conocida en la especialidad, y pueden encontrarse métodos, por ejemplo, en “Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet”, Thorpe *et al.*, Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press, pp. 168-190 (1982); E. Vitetta, Science (1987) 238:1098-1104; y G. Winter y C. Milstein, Nature (1991) 349:293-299.

Técnicas adicionales para preparar inmunoglobulinas y fragmentos de inmunoglobulina se describen en V.S. Malik *et al.*, Antibody Techniques (Academic Press, 1994); C.A.K. Borrebaeck, Antibody Engineering: Breakthroughs in Molecular Biology (Oxford Univ. Press, 1995); y P.J. Delves *et al.*, Antibody Production: Essential Techniques (John Wiley & Sons, 1997).

“Opsonizar”, según se usa en la presente memoria, se refiere a la unión de un polipéptido de inmunoglobulina a una diana particular, particularmente epítopos encontrados en depósitos de fibrillas de amiloide, de modo que el anticuerpo y las dianas juntos son reconocidos como “extraños” por el sistema inmunitario celular del huésped. En otras palabras, la unión de la inmunoglobulina de la presente invención potencia la fagocitación de las fibrillas de amiloide.

“Amiloidosis”, según se usa en la presente memoria, pretende referirse a cualquier afección que esté caracterizada por la presencia de material amiloideo. Tal material puede estar en la forma de un amiloidoma o depósitos de amiloide más dispersos o fibrillas.

Composiciones Farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas para el tratamiento terapéutico de acuerdo con la presente invención están destinadas a la administración parenteral, oral o local. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran parenteralmente, p. ej., intravenosamente, subcutáneamente, intradérmicamente o intramuscularmente. Como la barrera sangre-cerebro es impermeable a IgG (véase U. Bickel *et al.*, 1994 Bioconjug. Chem. 5: 119-25), el aporte de anticuerpos para vencer la barrera sangre-cerebro (BBB, por sus siglas en inglés) puede alcanzarse a través de aporte liposómico o micelar del anticuerpo a la zona deseada. Alternativamente, los agentes de esta invención pueden aportarse directamente al fluido cerebroespinal (véase, por ejemplo, L.C. Walker *et al.*, 1994 J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53: 377-83). Para otros mecanismos de aporte, se hace referencia a P.M. Friden, 1996 Patente de EE. UU. N° 5.527.527 y W.M. Pardridge, 1991 Patente de EE. UU. N° 5.004.697.

Así, la invención proporciona composiciones para administración parenteral que comprenden una solución del polipéptido de inmunoglobulina anti-fibrilla de amiloide de IgLC humana disuelto o suspendido en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso. Puede usarse una variedad de vehículos acuosos, p. ej., agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3%, ácido hialurónico y similares. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas, o pueden filtrarse estérilmente. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para usar según están, o pueden liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una solución estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y tamponadores, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc.

La concentración de polipéptidos de inmunoglobulina antiamiloides en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, es decir, de menos de aproximadamente 1%, habitualmente a o al menos aproximadamente 10-15%, hasta tanto como 50% en peso o más, y se seleccionará principalmente por los volúmenes de fluido, las viscosidades, etc., de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado.

Sin una experimentación excesiva, un experto normal en la técnica podría determinar la cantidad de polipéptidos de inmunoglobulina que sería eficaz para opsonizar adecuadamente un amiloidoma. Las cantidades eficaces para este uso dependerán, p. ej., de la naturaleza de la composición de polipéptido de inmunoglobulina antiamiloides, el modo de administración, el estadio y la gravedad de la enfermedad que se trata, el peso y el estado de salud general del paciente y el juicio del médico que prescribe. Podría usarse generalmente una dosis simple típica de 0,5 mg/kg. Debe tenerse en cuenta que el polipéptido de inmunoglobulina antiamiloides y las composiciones peptídicas derivadas del mismo pueden emplearse en estados patológicos graves, esto es, situaciones que amenazan la vida o que potencialmente amenazan la vida. En tales casos, es posible y puede ser considerado deseable por el médico que trata administrar excesos sustanciales de estas composiciones.

El tratamiento de seres humanos con amiloidosis también podría aplicarse a animales susceptibles de amiloidosis, tales como vacas o pollos. Así, las referencias a pacientes humanos en la presente memoria se aplican también a pacientes no humanos.

Los polipéptidos de inmunoglobulina, según se definen en la presente memoria, son mAb antiamiloides dirigidos hacia un amiloidoma o componentes o precursores del mismo. Los mAb también pueden producirse contra dominios de la región variable de IgLC o, preferiblemente, contra los subconjuntos de IgLC $\kappa 1$, $\kappa 4$, $\lambda 8$ o combinaciones de los mismos. La administración a seres humanos de polipéptidos de inmunoglobulina que son sustancialmente humanos puede provocar respuestas antianticuerpo. Así, puede ser deseable preparar polipéptidos de inmunoglobulina anti-IgLC que sean sustancialmente humanos. Por “sustancialmente humano” se entiende un anticuerpo o fragmento de unión del mismo comprendido por secuencias de aminoácidos que son al menos aproximadamente 50% de origen humano, al menos de 70 a 80% más preferiblemente, y aproximadamente 95-99% o más humanos, lo más preferiblemente, particularmente para administraciones repetidas durante un período prolongado, según pueda ser necesario para tratar casos establecidos de amiloidosis. Según se usa en la presente memoria, se entiende que anticuerpo humano incluye

anticuerpos de origen totalmente humano así como los que son sustancialmente humanos, a no ser que el contexto indique otra cosa.

Los anticuerpos monoclonales también pueden producirse contra fibrillas de amiloide sintéticas. Péptidos de la región variable de una cadena ligera recombinantes se aíslan y se purifican *in vitro* usando técnicas estándar. Se preparan a continuación fibrillas sintéticas a partir de los péptidos usando técnicas tales como las descritas por Wall *et ál.*, “*In vitro* Immunoglobulin Light Chain Fibrillogenesis”, METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 309 (En prensa). Se producen a continuación anticuerpos contra las fibrillas sintéticas usando técnicas de inmunización estándar, típicamente en ratones o conejos. Líneas celulares monoclonales que secretan anticuerpos antifibrillas se producen usando técnicas de hibridoma estándar.

Los polipéptidos de inmunoglobulina anti-amiloide pueden prepararse mediante cualquiera de un número de técnicas bien conocidas. Por ejemplo, pueden prepararse inmunizando a un animal con amiloide humano purificado o parcialmente purificado. Los animales inmunizados pueden ser uno de una variedad de especies que son capaces de reconocer inmunológicamente epítopos característicos del dominio extracelular de amiloide de tipo humano, tales como múridos, lagomorfos, equinos, etc.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse inmortalizando células que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos de inmunoglobulina o porciones de los mismos que se unen específicamente a determinantes antigénicos característicos del dominio extracelular del amiloide de tipo humano. El procedimiento de inmortalización puede llevarse a cabo mediante técnicas de fusión de hibridomas, mediante transformación viral de linfocitos productores de anticuerpos, técnicas de DNA recombinante o mediante técnicas que combinan fusión celular, transformación viral y/o metodologías de DNA recombinante. Inmunógenos para producir los anticuerpos monoclonales incluyen fibrillas de amiloide sintéticas como las descritas, por ejemplo, por A. Lomakin *et ál.*, 1997 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 94: 7942-7.

Como la generación de anticuerpos monoclonales anti-amiloide humanos puede ser difícil con técnicas de inmortalización convencionales, puede ser deseable elaborar en primer lugar anticuerpos no humanos y a continuación transferir a través de técnicas de DNA recombinante las regiones que se unen a antígeno de los anticuerpos no humanos, p. ej., el Fab, regiones que determinan la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables, a regiones constantes humanas (Fc) o regiones de armazón según sea apropiado para producir moléculas sustancialmente humanas. Tales métodos se conocen generalmente en la especialidad y se describen, por ejemplo, en U.S. 4.816.397, la publicación PCT WO 90/07861 y las publicaciones EP 173494 y 239400. Sin embargo, pueden producirse anticuerpos completamente humanos en animales transgénicos. Los genes o segmentos génicos de inmunoglobulina humana deseados pueden aislarse, por ejemplo mediante PCR, de células B humanas, el DNA puede clonarse en vectores apropiados para la expresión en células eucarióticas y el DNA clonado puede introducirse en animales para producir transgénicos. Animales adecuados para la producción de transgénicos que expresan inmunoglobulina humana incluyen ratones, ratas, conejos y cerdos. Con los roedores, los transgénicos que expresan inmunoglobulinas humanas deben tener preferiblemente uno o más de sus loci de inmunoglobulina endógenos inactivados o “noqueados” para facilitar la identificación y el aislamiento de los anticuerpos humanos (Véase, p. ej., Lonberg, *et ál.* Nature 368:856-859 (1994)).

Los anticuerpos quiméricos o polipéptidos de inmunoglobulina quiméricos resultantes que se unen a amiloide humano también están dentro del alcance de la presente invención. Un anticuerpo quimérico terapéutico típico sería una proteína híbrida que consiste en el dominio variable (V) o de unión a antígeno procedente de una inmunoglobulina de ratón específica para un determinante antigénico de amiloide humano y el dominio constante (C) o efector procedente de una inmunoglobulina humana, aunque pueden usarse dominios procedentes de otras especies de mamífero para los dominios tanto variable como constante. Según se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo quimérico” también se refiere a anticuerpos codificados por genes de inmunoglobulina en los que solo las CDR se transfieren desde la inmunoglobulina que reconoce específicamente los determinantes antigénicos, derivándose el resto del gen de inmunoglobulina de un gen de inmunoglobulina humano (o de otro mamífero, según se desee). Según se analiza anteriormente, este tipo de anticuerpo quimérico se denomina un anticuerpo “humanizado” (en caso de que se esté usando un gen de inmunoglobulina humano). También se consideran anticuerpos humanos recombinantes que no contienen secuencias de otras especies.

Las regiones hipervariables de los dominios variables de los polipéptidos de inmunoglobulina anti-amiloide comprenden un aspecto relacionado de la invención. Las regiones hipervariables, o CDR, junto con las regiones de armazón (aquellas porciones de regiones variables de cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina que están relativamente conservadas entre diferentes inmunoglobulinas en una sola especie), permiten que los polipéptidos de inmunoglobulina anti-amiloide reconozcan y así se unan a amiloide humano. Las regiones hipervariables pueden clonarse y someterse a secuenciación. Una vez identificadas, estas regiones que confieren reconocimiento específico de amiloide humano pueden clonarse a continuación en un vector para la expresión en un huésped como parte de otra molécula de inmunoglobulina o como una proteína de fusión, p. ej., una molécula portadora que funciona para potenciar la inmunogenicidad del idiotipo clonado.

Los polipéptidos de inmunoglobulina anti-amiloide se usarán generalmente intactos, o como fragmentos inmunogénicos, tales como fragmentos Fv, Fab, F(ab')₂. Los fragmentos pueden obtenerse a partir de anticuerpos mediante técnicas convencionales, tales como mediante digestión proteolítica del anticuerpo usando, p. ej., pepsina, papaína u

otras enzimas proteolíticas, o mediante técnicas de DNA recombinante en las que un gen o una porción del mismo que codifica el fragmento deseado se clona o se sintetiza, y se expresa en una variedad de huéspedes.

Los expertos en la especialidad apreciarán que pueden producirse anticuerpos “antiidiotípicos” usando una inmunoglobulina específica como un inmunógeno de acuerdo con técnicas estándar. Por ejemplo, la infección o inmunización con una fibrilla de amiloide o fragmento de la misma induce una inmunoglobulina neutralizadora, que tiene en su sitio de combinación de la región variable de Fab una imagen del amiloide que es única para esa inmunoglobulina particular, es decir, un idiotipo. La inmunización con tal inmunoglobulina anti-amiloide induce un anticuerpo antiidiotípico, que tiene una conformación en su sitio de combinación que imita la estructura del antígeno amiloideo original. Por lo tanto, pueden usarse estos anticuerpos antiidiotípicos en lugar del antígeno amiloideo. Véase, por ejemplo, Nisonoff (1991) J. Immunol. 147:2429-2438.

Los siguientes ejemplos de trabajo apuntan específicamente a realizaciones preferidas de la presente invención, y no debe considerarse que limiten de ningún modo el resto de la divulgación. Otras configuraciones genéricas serán evidentes para un experto en la especialidad.

Ejemplo 1

Resolución no Asistida de Amiloide de IgLC Humana en un Huésped Múrido

Amiloide de IgLC humana se extrajo y se purificó de órganos infectados obtenidos durante una autopsia. Los primeros experimentos implicaban trasplantar 50-200 mg de este material amiloideo a un ratón Balb/c. La masa amiloidea, o “amiloidoma”, se preparó en PBS estéril mediante etapas de sonicación y trituración en serie para producir una suspensión fina de fibrillas de amiloide completadas con las moléculas auxiliares encontradas *in vivo*. Este procedimiento se realizó para permitir que el amiloide se inyectara en los ratones a través de una aguja hipodérmica de calibre ancho.

El material amiloideo, equivalente a 10% del peso corporal del animal, se inyectó en los ratones (bajo anestesia) entre la escápula, lo que daba como resultado que era visible una masa grande (véase la Figura 1A). El ratón requería 15-18 días para alcanzar la eliminación completa del amiloidoma (véase la Figura 1B), después de lo cual el animal parecía sano y vivía una vida normal. La eliminación del amiloidoma fue determinada subjetivamente por el experimentador; simplemente palpando la zona de inyección, un amiloidoma, como un guisante duro, puede apreciarse fácilmente bajo la piel.

Ejemplo 2

Implicación de la Inmunidad tanto Mediada por Anticuerpos como Celular en la Eliminación de Amiloidomas

La implicación de los anticuerpos anti-amiloide en la eliminación de amiloidomas se observó rastreando suero procedente de un ratón previamente inyectado con material amiloideo contra una muestra del material inyectado. Esto se realizó mediante análisis por transferencia Western usando diluciones adecuadas del suero de ratón como el anticuerpo primario. Se observó que había anticuerpos para cada componente de la matriz amiloidea, es decir, cada banda del gel era teñida por el suero del ratón, incluso con una dilución del suero de 10.000 veces (datos no mostrados).

La implicación de un componente celular se demostró mediante ensayos de unión a neutrófilos *in vitro* (véanse las Figuras 2A y 2B) y usando estirpes de ratones mutantes por noqueo (datos no mostrados). Las Figuras 2A y 2B muestran neutrófilos humanos que se adhieren a amiloide humano después de que el amiloide se trate con mAb anti-(IgLC humana) de ratón. Esto muestra que el mAb de ratón puede unirse a amiloide humano así como atraer neutrófilos humanos.

Estudios de estirpes de ratones mutantes por noqueo apoyan adicionalmente el hallazgo de la implicación de anticuerpos en la eliminación de amiloide. En primer lugar, ratones scid/scid, que carecen de linfocitos B y T, eran incapaces de eliminar un amiloidoma inyectado incluso después de tres meses (datos no mostrados). En segundo lugar, los animales noqueados en CD18 eran incapaces de eliminar el amiloidoma tan rápidamente como los animales normales. Los animales noqueados en CD18 eran 97% deficientes en CD 18, una integrina de la superficie celular encontrada en linajes de granulocitos/macrófagos. Aunque estas células no pueden abandonar la circulación, los animales son competentes en células B y T y por lo tanto pueden montar una respuesta de anticuerpos. En tercer lugar, los ratones desnudos, que no tienen glóbulos blancos, eran incapaces de eliminar el amiloidoma.

Por otra parte, un amiloide que ha sido incubado con suero reactivo con amiloide procedente de otro ratón, cuando se implantaba en el segundo ratón, se eliminaba en 4 días. En este experimento, un ratón Balb/c fue inyectado con 50 mg de amiloide de HIG y se dejó durante 1 semana, después de lo cual se sangró mediante pinzamiento en la vena de la cola. La sangre se centrifugó a 1500 rpm y las células se eliminaron mediante aspiración. El plasma se almacenó a 4°C hasta que se usaba. Otra preparación de amiloide de HIG (100 mg) se preparó suspendiendo en PBS estéril a la que se añadía 1 ml de plasma procedente del ratón previo. Esta preparación se inyectó a continuación en un segundo ratón (Balb/c) y el amiloide se eliminó en 4 días. Así, se concluyó que el procedimiento podía acelerarse opsonizando el material antes de la inyección.

Ejemplo 3

Rastreo por ELISA de Subconjuntos de IgLC

Se realizó un estudio sistemático usando técnicas de ELISA para rastrear un gran número de muestras de amiloide extraídas de seres humanos usando mAb producidos contra los subconjuntos de IgLC ($\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$, $\lambda 4$, $\lambda 5$, $\lambda 6$, $\kappa 1$, $\kappa 2$, $\kappa 3$, $\kappa 4$, κ y λ libres y κ y λ totales). De forma interesante, se encontró que, más a menudo que no, los amiloides daban positivo con mAb específicos para su propio subtipo, los anticuerpos κ o λ totales y un mAb $\kappa 1$ (57-18H12), $\kappa 4$ (11-1F4) y $\lambda 8$ (31-8C7). Se encontró que estos tres últimos agentes reaccionaban de un modo no específico para el subgrupo, es decir, $\kappa 1$ reaccionaba con amiloides comprendidos por IgLC distintas de $\kappa 1$; y los otros dos mAb exhiben la misma calidad. Esto muestra que el epítipo reconocido por estos anticuerpos puede ser un rasgo general de fibrillas de amiloide, indicando la posibilidad de un epítipo de amiloide compartido que puede elegirse como diana.

Ejemplo 4

Tinción Inmunoquímica

Muestras tisulares procedentes de pacientes con amiloide se tiñeron usando técnicas inmunoquímicas estándar y se observó un fenómeno de unión similar. Las Figuras 3A-3D muestran que anti- $\kappa 1$ se une al amiloide de $\kappa 1$ y, sorprendentemente, que el anti- $\kappa 4$ reacciona con el amiloide de $\kappa 1$, sugiriendo un epítipo de amiloide que estos anticuerpos pueden reconocer. Adicionalmente, el anti- $\kappa 4$ reacciona con amiloide que contiene λ (no ilustrado). Este es un ejemplo de reactividad isotípica cruzada. Sin embargo, los resultados procedentes del ELISA y la inmunohistoquímica no siempre eran concordantes. Esto se debe probablemente a la diferencia inherente en lo que se está observando, es decir, el ELISA es un ensayo de unión en fase líquida que usa amiloide purificado extraído, mientras que la inmunohistoquímica se realiza sobre secciones de tejido fijadas sobre un portaobjetos.

Ejemplo 5

Estudios In Vivo de Subconjuntos de Anti-IgLC

0,1 mg de uno de tres anticuerpos - $\kappa 1$, $\kappa 4$ o $\lambda 8$, identificados anteriormente- se inyectó en el muslo de un ratón en el que se había introducido amiloide en la forma de un amiloidoma según se describe anteriormente. Los reaccionantes $\kappa 1$ y $\kappa 4$ daban como resultado la eliminación completa por el huésped de la mayoría de las especies de fibrillas de amiloide probadas en menos de 7 días (tan poco como 4 días para ciertas fuentes de amiloide). La Figura 4 muestra mAb $\kappa 4$ tratado con fluoresceína que se une a amiloide humano.

El reaccionante $\lambda 8$, que es reactivo en ciertos casos en ambos estudios *in vitro* (anteriormente), incrementaba la resolución de los amiloidomas en hasta aproximadamente 10% en los experimentos *in vivo*.

Ejemplo 6

Estudios In Vivo de Subgrupos de Anti-IgLC

Se aisló amiloide humano de un paciente con amiloide AA asociado con la inflamación y se preparó para la inyección en ratones Balb/C mediante sonicación y trituración repetidas para permitir su inyección en el ratón (véase el Ejemplo 1). Inmediatamente después de la inyección de 100 mg de extracto de amiloide AA humano, los ratones se trataron con 100 μ g de mAb $\kappa 4$, mAb anti-AA, sin mAb y mAb de control no específico (anti- κ libre). La resolución completa del material se observó con 48 horas en los animales que habían sido tratados con los mAb $\kappa 4$ y anti-AA. En contraste, los animales de control tenían una masa grande de amiloide que permanecía en la zona de inyección.

Ejemplo 7

Producción de mAb Anti-Fibrillas de Amiloide Específicos

Se prepararon fibrillas de amiloide sintéticas *in vitro* y se usaron como un inmunógeno en ratones para producir una primera generación de mAb anti-fibrilla de amiloide. En resumen, se produjeron péptidos de la región variables de la cadena ligera $\lambda 6$ recombinantes, se aislaron y se purificaron usando un sistema de expresión bacteriano y técnicas de purificación de proteínas estándar. Se prepararon fibrillas sintéticas a partir de estos péptidos mediante períodos prolongados de agitación en solución, según se describe, por ejemplo, en Wall *et al.*, "In vitro Immunoglobulin Light Chain Fibrillogenesis", METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 309 (En Prensa). Las fibrillas se concentraron mediante centrifugación a 17.000 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Las fibrillas concentradas se usaron a continuación para inmunizar ratones Balb/c durante un período de varias semanas. Líneas celulares monoclonales que secretan anticuerpos antifibrillas se produjeron usando técnicas de hibridación.

ES 2 345 746 T3

doma estándar. Los anticuerpos resultantes tienen una actividad antifibrillas demostrable basada en ensayos de ELISA, descritos en el Ejemplo 3. Estos anticuerpos reaccionaban con 99% de todos los extractos de amiloide de IgLC humana probados hasta la fecha independientemente de la naturaleza del isotipo o subgrupo de la proteína precursora cuando se ensayaban mediante ELISA. De forma similar, los anticuerpos reaccionaban en un formato de ELISA con amiloide AA múdo aislado y fibrillas sintéticas compuestas de un péptido derivado de la proteína de Alzheimer A β [A β (25-35)].

Debe entenderse que el análisis y los ejemplos precedentes presentan meramente una descripción detallada de ciertas realizaciones preferidas.

REIVINDICACIONES

1. El uso de:

- a) una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo o polipéptido de inmunoglobulina o un fragmento del mismo que se une a fibrilla de amiloide de IgLC humana; y
- b) un vehículo farmacéuticamente aceptable;

para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad por deposición de amiloide en un paciente humano.

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo se produce contra una cadena ligera de inmunoglobulina.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo o polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo es un anticuerpo monoclonal.

4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo completamente humano.

5. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado.

6. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico.

7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado.

8. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo marcado.

9. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el fragmento de anticuerpo o inmunoglobulina es un fragmento Fv, un fragmento Fab, un fragmento F(ab''), un fragmento F(ab')₂ o un fragmento SvFv.

10. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o polipéptido de inmunoglobulina o fragmento es un anticuerpo monocatenario.

11. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o polipéptido de inmunoglobulina o fragmento tiene reactividad isotópica cruzada.

12. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo se ha producido contra fibrillas de amiloide sintéticas.

13. Una composición que comprende una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo o polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo que se une a fibrilla de IgLC humana; y

- b) un vehículo farmacéuticamente aceptable;

para el uso en el tratamiento de cualquier enfermedad por deposición de amiloide en un paciente humano.

14. La composición de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el anticuerpo o polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo se produce contra una cadena ligera de inmunoglobulina.

15. La composición de acuerdo con la reivindicación 13 ó 14, en la que el anticuerpo o polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo es un anticuerpo monoclonal.

16. La composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo completamente humano.

17. La composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado.

18. La composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico.

19. La composición de acuerdo con la reivindicación 18, en la que el anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado.

ES 2 345 746 T3

20. La composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que el anticuerpo es un anticuerpo marcado.

21. La composición de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el fragmento de anticuerpo o inmunoglobulina es un fragmento Fv, un fragmento Fab, un fragmento F(ab''), un fragmento F(ab')₂ o un fragmento SvFv.

22. La composición de acuerdo con la reivindicación 13, en la que the anticuerpo o polipéptido de inmunoglobulina o fragmento es un anticuerpo monocatenario.

23. La composición de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el anticuerpo o polipéptido de inmunoglobulina o fragmento tiene reactividad isotípica cruzada.

24. La composición de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el anticuerpo o polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo se ha producido contra fibrillas de amiloide sintéticas.

25. Una composición farmacéutica para el uso en terapia, que comprende una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo o polipéptido de inmunoglobulina o un fragmento del mismo, en la que el anticuerpo o polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo se une a fibrilla de amiloide de IgLC humana y es eficaz para potenciar la respuesta inmunitaria celular de un paciente para eliminar depósitos de fibrillas de amiloide del paciente.

26. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 25, en la que el anticuerpo o polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo es un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo.

27. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 26, en la que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo completamente humano.

28. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 26, en la que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado.

29. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 26, en la que el anticuerpo es un anticuerpo marcado.

30. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 25, en la que el fragmento de anticuerpo o inmunoglobulina es un fragmento Fv, un fragmento Fab, un fragmento F(ab''), un fragmento F(ab')₂ o un fragmento SvFv.

31. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 25, en la que el anticuerpo o polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo es un anticuerpo monocatenario.

32. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 25, en la que el anticuerpo o polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo tiene reactividad isotípica cruzada.

33. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 32, en donde la composición comprende además un vehículo.



Día 1

A

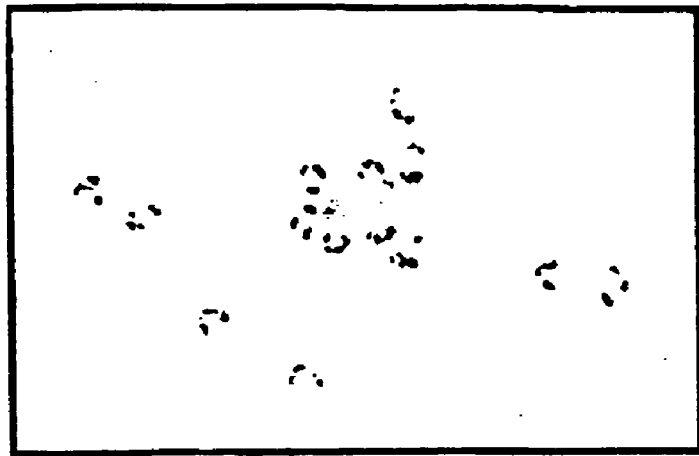


Día 14

B

Figura 1

A



B



Figura 2

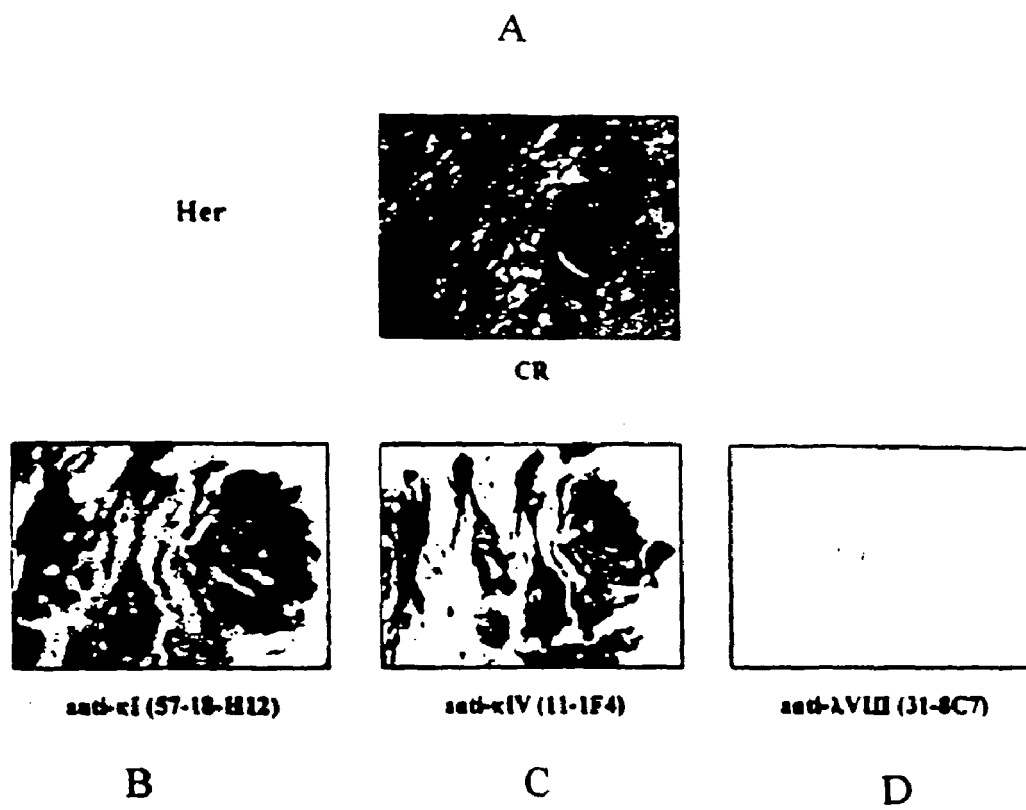


Figura 3

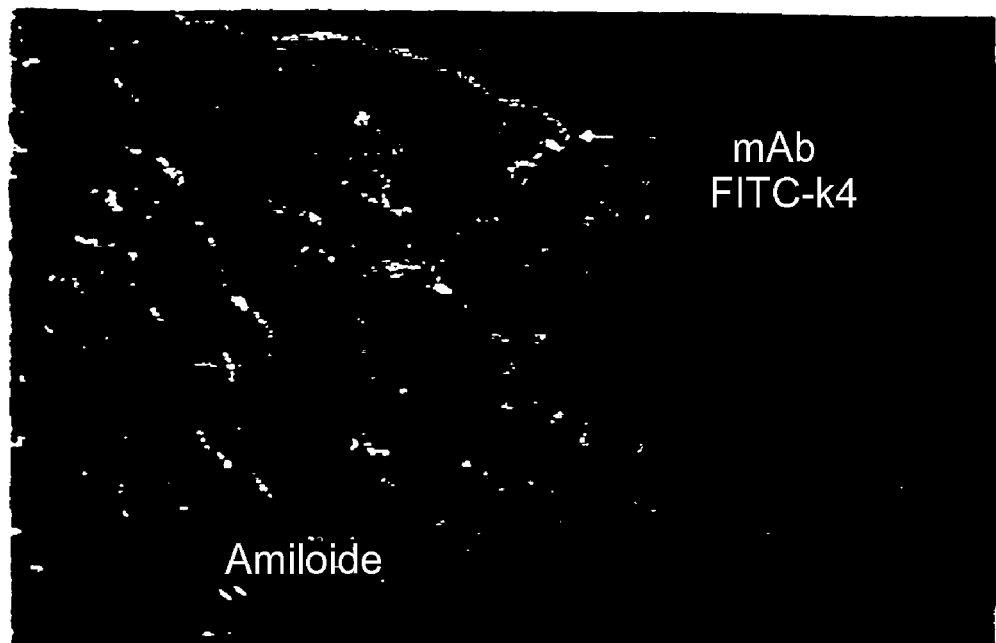


Figura 4