



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 159**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07747965 .7**

96 Fecha de presentación : **23.03.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2004688**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.12.2008**

54

Título: **Anticuerpos selectivos de protofibrillas mejorados y su uso.**

30

Prioridad: **23.03.2006 SE 0600662**
30.11.2006 SE 0602591

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.04.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.04.2011

73

Titular/es: **BIOARTIC NEUROSCIENCE AB.**
Warfvinges Vag 39
112 51 Stockholm, SE

72

Inventor/es: **Gellerfors, Pär;**
Lannfelt, Lars;
Sehlin, Dag;
Ekholm Pettersson, Frida y
Englund, Hillevi

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 356 159 T3

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

Anticuerpos selectivos de protofibrillas mejorados y su uso.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a la prevención, tratamiento y diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas, en particular enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades similares. Más exactamente, a anticuerpos de elevada afinidad 10^{-7} M, preferiblemente 10^{-8} M, incluso menos de 10^{-9} M o menos de 10^{-10} M o 10^{-11} M, selectivos para la proteína beta amiloide ($A\beta$) en su conformación protofibrilar y de clase IgG y subclases IgG1 o IgG4 o sus combinaciones o sus mutaciones, que conservan elevada unión al receptor de Fc y baja unión a C1 (C1q), eficaces en la eliminación de protofibrillas $A\beta$ y con riesgo de inflamación reducido.

Antecedentes

15 La enfermedad de Alzheimer (AD) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva e irreversible que causa trastornos cognitivos, de memoria y de comportamiento. Es la causa más común de demencia en la población de la tercera edad que afecta aproximadamente al 5% de la población mayor de 65 años y al 20% mayor de 80 años. La AD se caracteriza por la aparición gradual y deterioro progresivo en múltiples funciones cognitivas. La neuropatología implica depósitos proteínicos argirófilos extracelulares e intracelulares. Los depósitos extracelulares, denominados placas neuríticas, consisten principalmente en proteína beta amiloide ($A\beta$) rodeada de neuritas distróficas (procesos neuronales inflamatorios, deformados). En el interior de estos depósitos extracelulares la $A\beta$ tiene un carácter fibrilar con una estructura de lámina β plegada. En estos depósitos la $A\beta$ puede teñirse con diferentes colorantes, por ejemplo, rojo Congo, y muestra una ultra estructura fibrilar. Estas características, adoptadas por la $A\beta$ en su estructura fibrilar en placas neuríticas, son la definición del término genérico amiloide. La clásica lesión patológica intracelular de la AD es el ovillo neurofibrilar (NFT) que consiste en estructuras filamentosas denominadas filamentos helicoidales pareados (PHF), compuestos por cadenas retorcidas de proteína tau hiperfosforilada asociada a microtúbulos. Las placas neuríticas y los depósitos en ovillo neurofibrilares frecuentes en el cerebro son criterios de diagnóstico para la AD, según autopsias realizadas. Cerebros con AD también presentan atrofia cerebral macroscópica, pérdida de neuronas, inflamación local (microgliosis y astrocitosis) y a menudo angiopatía amiloide cerebral (CAA) en las paredes de los vasos cerebrales.

En la AD, las placas neuríticas presentan dos formas de péptidos $A\beta$, como especies dominantes, $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$, siendo la $A\beta_{40}$ la especie destacada en el amiloide cerebrovascular asociada con la AD. Las actividades enzimáticas permiten que la $A\beta$ se forme de manera continua a partir de una proteína más grande denominada proteína precursora amiloide (APP) tanto en individuos sanos como en individuos que padecen la AD en todas las células del cuerpo. Dos eventos principales de procesamiento de la APP mediante actividades β y γ -secretasa permiten la producción de $A\beta$, mientras que una tercera enzima denominada α -secretasa, impide la generación de $A\beta$ por escisión dentro de la secuencia $A\beta$ (*Selkoe, 1994; Ester 2001; US5604102*). La $A\beta_{42}$ es un péptido de cuarenta y dos aminoácidos de longitud, es decir, una longitud de dos aminoácidos más en el extremo C- terminal, en comparación con la $A\beta_{40}$. La $A\beta_{42}$ es más hidrófoba y se agrega más fácilmente dentro de estructuras más largas de péptidos de $A\beta$ (*Jarret 1993*) tales como dímeros $A\beta$, trímeros $A\beta$, tetrámeros $A\beta$, oligómeros $A\beta$, protofibrillas $A\beta$ o fibrillas $A\beta$. Las fibrillas $A\beta$ son hidrófobas e insolubles, mientras que las otras estructuras son menos hidrófobas y solubles. Todas estas estructuras moleculares más grandes de péptidos $A\beta$ se definen individualmente basándose en su aspecto biofísico y estructural, por ejemplo, a microscopía electrónica y sus características bioquímicas, por ejemplo, por análisis de cromatografía de exclusión por tamaño/transferencia de Western. Estos péptidos $A\beta$, particularmente $A\beta_{42}$, se ensamblarán gradualmente dentro de una diversidad de estructuras moleculares más grandes de $A\beta$ durante el periodo de vida. La AD, que es un trastorno fuertemente dependiente de la edad, se producirá en etapas tempranas de la vida si este proceso de ensamblaje se produce más rápidamente. Éste es el fundamento de la "hipótesis de la cascada amiloide" de la AD que reivindica que el procesamiento de la APP, los niveles de $A\beta_{42}$ y su ensamblaje en estructuras moleculares más grandes son una causa central de la AD. El resto de neuropatologías de cerebros con AD y los síntomas de la AD, tales como demencia, están de alguna manera producidos por la $A\beta$ o sus formas ensambladas.

La $A\beta$ puede tener diferentes longitudes, es decir, 1-39, 1-40, 1-42 y 1-43 y tamaños de fragmentos, es decir, 1-28 y 25-35. Los truncamientos pueden producirse en el extremo N del péptido. Todos estos péptidos pueden agregarse y formar intermedios solubles y fibrillas insolubles, teniendo cada forma molecular una conformación estructural y propiedades biofísicas únicas. Por ejemplo, la $A\beta_{1-42}$ monomérica, es un péptido de 42 aminoácidos de longitud soluble y no tóxico, que se supone que está implicado en las funciones normales de sinapsis. En determinadas condiciones, la $A\beta_{1-42}$ puede agregarse en dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros hasta 12 oligómeros y formas oligoméricas más grandes, todas con sus propiedades fisicoquímicas diferentes tales como tamaño molecular, estructura EM y forma molecular AFM (microscopio de fuerzas atómicas). Un ejemplo de una forma $A\beta$ oligomérica soluble de mayor peso molecular es la protofibrilla (*Walsh 1997*), que tiene un peso molecular aparente > 100 kDa y una estructura curvilínea de 4-11 nm de diámetro y < 200 nm de longitud. Recientemente se ha demostrado que los péptidos $A\beta$ oligoméricos solubles tales como protofibrillas $A\beta$ perjudican la potenciación a largo plazo (LTP) una medida de la plasticidad sináptica que se cree que refleja la formación de memoria en el hipocampo (*Walsh 2002*). Por otro lado, los péptidos $A\beta$ Árticos oligoméricos presentan efecto inhibitorio mucho más profundo que los $A\beta$ s (de tipo silvestre) en la LTP en el cerebro, probablemente debido a su fuerte tendencia para formar protofibrillas $A\beta$ (*Klyubin 2003*).

Además existen otras formas oligoméricas solubles descritas en la bibliografía que son claramente diferentes de las protofibrillas. Una de dichas formas oligoméricas es el ADDL (Ligando Difusible Derivado de Amiloides) (Lambert 1998). Análisis AFM del ADDL revelaron especies globulares predominantemente pequeñas de 4,7-6,2 nm a lo largo del eje z con pesos moleculares de 17-42 kDa (Stine 1996). Otra forma se denomina ASPD (esferas amiloides) (Hoshi 2003). Las ASPD son oligómeros esféricos de A β 1-40. Estudios de toxicidad demostraron que las ASPD esféricas > 10 nm eran más tóxicas que las formas moleculares más pequeñas (Hoshi 2003). Esta idea ganó apoyo a partir del reciente descubrimiento de la mutación Ártica de la APP (E693), que produce aparición temprana de la AD (documento US 2002/0162129 A1; Nilsberth *et al.*, 2001). La mutación se localiza dentro de la secuencia peptídica de la A β . Los transportadores de la mutación generarán por lo tanto variantes de péptidos de A β , por ejemplo A β 40 Ártica y A β 42 Ártica. Tanto la A β 40 Ártica como la A β 42 Ártica se ensamblarán mucho más fácilmente dentro de estructuras moleculares más grandes, es decir, protofibrillas. Por tanto, el mecanismo patógeno de la mutación Ártica sugiere que las protofibrillas solubles de moléculas más grandes son causantes de la AD y contienen un epítipo específico único, es decir, “el epítipo de la enfermedad de AD”.

En el cerebro que presenta la enfermedad de Alzheimer (AD), las placas amiloides extracelulares se encuentran típicamente en el parénquima y en las paredes de los vasos. Las placas están compuestas de amiloide (péptidos auto-agregantes e hidrófobos de A β de 38-43 aminoácidos de longitud) que se polimerizan gradualmente antes de la deposición de la placa. Se ha propuesto que especies oligoméricas de A β solubles se correlacionan mejor con la enfermedad que las propias placas amiloides (McLean *et al.*, 1999; Näslund *et al.*, 2000). Entre estas especies A β intermedias pre-fibrilares, se han observado formas oligoméricas que provocan efectos biológicos adversos tanto *in vitro* como *in vivo* (Walsh *et al.*, 2002) y pueden, por tanto, desempeñar un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad. Se conocen diversas especies A β oligoméricas de diversos tamaños moleculares. De manera significativa, la conformación de formas monoméricas, oligoméricas y fibrilares de la A β es diferente y puede dirigirse por anticuerpos selectivos conformacionales. La identidad del principal patógeno de la A β es incierta, aunque algunas pruebas sugieren oligómeros A β de elevado peso molecular que son especialmente neurotóxicos (Hoshi *et al.*, 2003).

Se han descrito mutaciones patógenas en el gen de la *proteína precursora amiloide (APP)*, que causa la aparición temprana de la AD. Una de éstas, la mutación *Sueca de la APP (Mullan et al., 1992)*, produce niveles aumentados de A β . Se observó que la otra mutación *Ártica de la APP (E693G)* localizada dentro del dominio A β , potenciaba la formación de protofibrillas, oligómeros A β largos, sugiriendo que estos intermedios de A β son particularmente patógenos (documento US 2002/0162129 A1; Nilsberth *et al.*, 2001). La identificación de la mutación *Ártica de APP* y el esclarecimiento de efectos tóxicos para protofibrillas A β han aumentado el interés sobre los oligómeros A β en la patogénesis de la AD.

La inmunización activa como una estrategia terapéutica para la enfermedad de Alzheimer la describen por primera vez (Schenk *et al.*, 1999). La diana de la estrategia de inmunización fue la forma fibrilar de A β encontrada en placas de Alzheimer. Un reciente experimento clínico en fase I/II de vacunación activa con A β usando A β fibrilar como una vacuna (AN-1792) tuvo que interrumpirse debido al desarrollo de meningoencefalitis en un pequeño número de pacientes (Bayer *et al.*, 2005). Los efectos secundarios observados en este estudio se produjeron probablemente por anticuerpos anti-A β que reaccionaban contra el amiloide fibrilar en las paredes de los vasos. El amiloide fibrilar en la CAA (angiopatía amiloide cerebral) está muy cerca de la barrera hematoencefálica (BHE) y la reacción antígeno-anticuerpo puede por tanto generar lesiones en la BHE conduciendo a infiltración de linfocitos T dentro del SNC (Pfeifer *et al.*, 2002; Racke *et al.*, 2005). Por otra parte, sólo una minoría de los pacientes participantes mostró una respuesta inmunitaria a la vacuna contra A β . Aunque el estudio terminó antes de tiempo, parece dar a entender que la inmunización activa contra A β puede ser beneficiosa solamente en un subconjunto de pacientes con AD.

Se han descrito anticuerpos monoclonales selectivos de protofibrillas A β humanas (documento US 2002/0162129 A1). El método para generar protofibrillas A β humanas muy puras y estables, implica el uso de péptidos A β 42 sintéticos con la mutación Ártica (Glu22Gly). La mutación facilita inmunización y exploración de hibridomas para anticuerpos selectivos de protofibrillas A β . Es importante destacar que estos anticuerpos se unen tanto a protofibrillas A β de tipo silvestre como a protofibrillas A β -Arc (documento WO 2005/123775).

Se han descrito anticuerpos que son selectivos contra otras conformaciones de A β tales como fibrillas A β (O’Nuallain 2002), A β micelar (Kayed 2003), ADDL (Lambert 2001). Sin embargo, ninguno de estos es selectivo de protofibrillas A β .

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos mejorados, es decir, anticuerpos selectivos de protofibrillas A β de elevada afinidad (menos de 10⁻⁷ M) de clase IgG y subclase IgG1 o IgG4 o sus combinaciones o sus mutaciones, con riesgo de inflamación reducido, para la prevención, tratamiento y diagnóstico mejorado de la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down u otros trastornos neurodegenerativos. Dichos anticuerpos se han desarrollado por técnicas de hibridoma clásicas y modificación de anticuerpos por ingeniería genética.

La invención describe la secuencia consenso de aminoácidos de las regiones CDR1-3 de las cadenas VL y VH de anticuerpos que se unen selectivamente a formas A β oligoméricas, es decir protofibrillas A β que constituyen el “epítipo de la enfermedad de Alzheimer”, en combinación con modificaciones de la región Fc para reducir la unión al factor de complemento C1q, reduciendo el riesgo de activación e inflamación del complemento.

ES 2 356 159 T3

La región constante de un anticuerpo tiene muchas funciones importantes en particular la unión a receptores Fc y al factor del complemento C1q. La última función se ha inactivado para evitar reacciones inflamatorias.

En resumen, este tipo de anticuerpos selectivos de protofibrillas de elevada afinidad tienen las siguientes ventajas distintivas en comparación con otras modalidades de tratamiento inmunoterapéuticas conocidas:

- 1) dirigen la enfermedad produciendo protofibrillas A β con elevada afinidad
- 2) reducen el riesgo de efectos secundarios inflamatorios es decir meningoencefalitis, sin unirse o uniéndose muy poco al factor del complemento C1q
- 3) la elevada afinidad del anticuerpo reduce la dosis clínica necesaria para un tratamiento eficaz
- 4) proporciona una modalidad de dosificación exacta
- 5) se une menos a fibrillas A β en la pared de los vasos sanguíneos es decir CAA, reduciendo el riesgo de efectos secundarios inflamatorios.
- 6) en la periferia se unen menos anticuerpos, por lo tanto atravesarán más la barrera hematoencefálica y estarán disponibles para la unión y eliminación de formas oligoméricas A β en el cerebro.

Un aspecto de la invención es el descubrimiento de la secuencia consenso de aminoácidos del anticuerpo de las regiones CDR que se unen a protofibrillas A β humanas de tipo silvestre (Ejemplo 1). Éste descubrimiento define los sitios de unión (regiones CDR) que confieren elevada afinidad y elevada selectividad para protofibrillas A β humanas de tipo silvestre para su uso como agentes terapéuticos o de diagnóstico.

La estructura básica de una molécula de inmunoglobulina (IgG) comprende dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas unidas entre sí por puentes de disulfuro (Figura 1). La cadena ligera, que es lambda o kappa, tiene una región variable (VL) y una región constante (CL) de aproximadamente 110 restos aminoácidos cada una. La cadena pesada tiene una región variable (VH) de aproximadamente 110 restos aminoácidos, pero una región constante (CH) mucho más larga de 300-400 restos aminoácidos, que comprende las regiones o dominios CH γ 1, CH γ 2 y CH γ 3.

La región constante (Fc) activa el sistema del complemento y se une a un receptor de Fc en macrófagos, microglia y neutrófilos, que ingieren y destruyen microorganismos infecciosos o antígenos extraños/no propios. Esta función es particularmente importante ya que es parte del principio terapéutico del anticuerpo, es decir fagocitosis microglial y eliminación de protofibrillas A β mediada por el receptor de Fc. Otros mecanismos de eliminación mediados por anticuerpos también funcionan, es decir, propiedades anti-agregado de anticuerpos contra A β y eliminación de protofibrillas A β en la periferia, de acuerdo con la hipótesis de drenaje.

La región variable de las cadenas pesada y ligera contiene 3 regiones hiper-variables denominadas regiones determinantes de la complementariedad o CDR. Las regiones CDR son cortos tramos de aproximadamente 13-23 aminoácidos de longitud, localizadas en las regiones VL y VH. Las seis regiones CDR en un "brazo" del anticuerpo forman la "cavidad" que se une al antígeno. La figura 1 muestra la estructura básica de una inmunoglobulina IgG y sus subdominios.

Otro aspecto de la invención se refiere a anticuerpos selectivos de protofibrillas de elevada afinidad. Se describen afinidades en el intervalo de 10^{-7} M preferiblemente 10^{-8} M, incluso menores de 10^{-9} M, menores de 10^{-10} M, o menores de 10^{-11} M para protofibrillas (Ejemplo 2). Éstos anticuerpos tienen la ventaja de que pueden administrarse a dosis reducidas en comparación con anticuerpos con afinidades en el intervalo de 10^{-6} M. Esto tiene la ventaja clínica significativa de que estos anticuerpos de elevada afinidad, que se administran por inyección, pueden proporcionarse por vía subcutánea ya que solamente se necesita una pequeña cantidad del anticuerpo para conseguir la eficacia. Las modalidades de administración no se limitan a inyecciones subcutáneas. Por otro lado, las dosis reducidas necesarias para la eficacia reducirán costes de los productos para la producción del anticuerpo.

Otro aspecto de la invención es que los anticuerpos son de la clase IgG, adecuados para el uso terapéutico ya que puede atravesar la barrera hematoencefálica. La eliminación de las protofibrillas A β en el parénquima cerebral se consigue por fagocitosis por células microgliales mediada por el receptor de Fc. Probablemente también funcionan otros mecanismos de eliminación anti-A β . Esta eliminación de protofibrillas A β solubles es un mecanismo central del tratamiento. Se considera que las protofibrillas A β son muy neurotóxicas, iniciando y dirigiendo el proceso de la enfermedad. La eliminación de protofibrillas A β en el cerebro tiene un valor clínico significativo. Además de la eliminación de protofibrillas A β , otras formas oligoméricas A β incluyendo fibrillas A β , se reducirán indirectamente mediante la eliminación de protofibrillas A β ya que diferentes formas agregadas A β , es decir dímeros, trímeros, tetrameros y formas oligoméricas superiores, incluyendo protofibrillas y fibrillas, están en equilibrio. En un modelo de ratón transgénico con Alzheimer (APPsue) se muestra un ejemplo de reducción de placas, que contienen fibrillas A β , 72 horas después del tratamiento con un anticuerpo selectivo de protofibrillas de elevada afinidad (mAb 158)

ES 2 356 159 T3

(Ejemplo 3). Por lo tanto, la eliminación de protofibrillas $A\beta$ por dicho anticuerpo también tendrá la ventaja de reducir indirectamente otras formas agregadas u oligoméricas de $A\beta$.

5 Otro aspecto más de la invención es un anticuerpo selectivo de protofibrillas $A\beta$ humanas de elevada afinidad de subclase IgG1, que tiene una elevada afinidad por receptores de $Fc\gamma RI$ humanos presentes en las células microgliales en el cerebro. Un anticuerpo de elevada afinidad dará lugar a una eliminación eficaz de protofibrillas $A\beta$ que será de valor terapéutico significativo. Por lo tanto, los anticuerpos presentarán eliminación de protofibrillas $A\beta$, tanto en el SNC como en el periférico en comparación con otras estrategias inmunoterapéuticas tales como vacunación activa o
10 tratamientos con anticuerpos monoclonales con otros anticuerpos monoclonales de subclase IgG1 que dirigen otras formas $A\beta$. Es importante destacar que, el tratamiento será eficaz al inicio del proceso de la enfermedad cuando especies $A\beta$ solubles tóxicas, tales como protofibrillas $A\beta$, están presentes a niveles elevados, aunque también más adelante en el proceso de la enfermedad. Se han descrito niveles elevados de formas $A\beta$ oligoméricas en un modelo de ratón transgénico que presenta la APPsueart, mutaciones Sueca y Ártica (*Lord A. et al., 2006*).

15 Otro aspecto más de la invención es que la elevada afinidad de anticuerpos selectivos de protofibrillas $A\beta$ puede reducir o inhibir la agregación $A\beta$ reduciendo por lo tanto niveles de formas $A\beta$ oligoméricas solubles en el cerebro.

Incluso, otro aspecto de la invención es que los anticuerpos selectivos de protofibrillas $A\beta$ de elevada afinidad pueden unirse a formas oligoméricas de $A\beta$, es decir, a protofibrillas $A\beta$ fuera del SNC también, modificando por
20 tanto el equilibrio de dichas formas $A\beta$ a través de la barrera hematoencefálica de tal manera que se reducen los niveles de dichas formas $A\beta$ en el SNC (drenaje).

Como se ha comentado anteriormente, el estudio clínico Elan usando una vacuna contra $A\beta$ (AN-1792) selectiva para fibrillas $A\beta$ para tratar pacientes con Alzheimer da como resultado un efecto secundario, es decir meningoencefalitis, en el 6% de los casos. La estrategia para dirigir fibrillas $A\beta$, que son el núcleo de las placas amiloides presentes
25 en el parénquima cerebral aunque importantes también en las paredes de los vasos sanguíneos, da como resultado graves efectos secundarios. Estos efectos secundarios se produjeron más probablemente por la unión de los anticuerpos a CAA (Angiopatía Amiloide Cerebral) en las paredes de los vasos sanguíneos del cerebro, iniciando un proceso inflamatorio. Los anticuerpos selectivos de protofibrillas de elevada afinidad mejorados impiden este problema clínico significativo disminuyendo la actividad de activación del complemento. Estos anticuerpos conservarán elevada eficacia de eliminación de protofibrillas $A\beta$ con riesgo reducido de efectos secundarios, es decir meningoencefalitis.

Otro aspecto de la invención es que los anticuerpos selectivos de protofibrillas de elevada afinidad tienen una baja unión a fibrillas $A\beta$ (véase el ejemplo 2), reduciendo el riesgo de efectos secundarios, uniéndose menos a fibrillas $A\beta$
35 presentes en CAA.

Otro aspecto adicional de la invención es que los anticuerpos de IgG selectivos de protofibrillas $A\beta$ de elevada afinidad, se modifican por ingeniería genética para reducir la unión del factor del complemento C1q al dominio CH2 de la IgG1 y reducir la activación del complemento y el riesgo de inflamación. Esta modificación puede realizarse
40 de diferentes maneras. Una manera es preparar un anticuerpo quimérico en el que se haya delecionado el dominio $CH\gamma 2$ de la región constante de IgG1 e intercambiado por el dominio de IgG4 correspondiente o parte del dominio que confiere la unión a C1q. Está bien establecido que la IgG4 no se une a C1q y por lo tanto no activa la cascada del complemento. Para conseguir esto la región constante de la cadena pesada (CH) se modifica por ingeniería genética de manera que se combina el dominio del receptor de Fc de elevada afinidad ($CH\gamma 3$) en la IgG1 con el dominio de
45 IgG4 ($CH\gamma 2$) que no tiene unión para el factor del complemento C1q. Este nuevo anticuerpo que contiene la cadena pesada constante quimérica (IgG1: $CH\gamma 1$, $CH\gamma 2$:IgG4, $CH\gamma 3$:IgG1) tendrá las propiedades trascendentales tanto de eliminación eficaz de protofibrillas $A\beta$ mediante fagocitosis mediada por el receptor de Fc como de riesgos reducidos de efectos secundarios, es decir, inflamación tal como meningoencefalitis.

Otra manera más de reducir el riesgo de inflamación es modificar la estructura de los oligosacáridos del anticuerpo
50 lo que reducirá la unión del factor del complemento C1q y la activación del complemento. En la IgG1 humana, se han descrito 30 estructuras diferentes de los oligosacáridos biantenarios complejos en Asn-297. Se cree que la ausencia de hidratos de carbono asociados con CH2 produce un cambio conformacional en la región "bisagra" del anticuerpo, reduciendo eficacias de interacción con moléculas efectoras y pérdida de la función de la activación del complemento y la unión al C1q.

55 La modificación de un anticuerpo selectivo de protofibrillas $A\beta$ humanas de elevada afinidad por mutagénesis dirigida del Asn-297 a cualquier otro aminoácido generará un anticuerpo de unión al receptor de Fc conservada con menos unión a C1q y por lo tanto riesgo de inflamación reducido en particular en la barrera hematoencefálica. Una alternativa para modificar la glucosilación en el anticuerpo es expresar el anticuerpo en un tipo de célula en el que se haya inactivado la enzima N-acetilglucosaminil-transferasa I. Esto producirá un anticuerpo con estructura de hidratos de carbono modificada en Asn-297. Se forma una estructura $Man_5GlcNAc_2$, pero no limitado a esta estructura. Esta modificación de hidratos de carbono reducirá la unión al factor del complemento C1q e inhibirá la inflamación (*Wright et al., 1998*). Como alternativa, pueden obtenerse anticuerpos selectivos de protofibrillas glucosilados culti-
60 vando células que expresen anticuerpos en presencia de tunicamicina, que inhibe la glucosilación. Estos anticuerpos tendrán modificada la actividad de activación del complemento así como la función del receptor de Fc (*Leatherbarrow et al., 1985*). La selección de clones que expresen anticuerpos con baja activación del complemento y elevada unión al receptor de Fc, generarán anticuerpos selectivos de protofibrillas que presentaran elevada eliminación, mediada por Fc, de protofibrillas $A\beta$ y baja unión a C1q.

Otro aspecto adicional de la invención es un anticuerpo selectivo de protofibrillas A β humanas de elevada afinidad, de subclase IgG1, en el que se ha modificado el sitio de unión al factor del complemento C1q, es decir Pro331>Ser331 (Xu *et al.*, 1994), de tal manera que se reduce o se inhibe la unión del factor del complemento C1q, para el tratamiento o prevención de AD. El resto de prolina en la posición 331 en la IgG1 humana también puede cambiarse por una treonina o glicina o por cualquier otro aminoácido polar. Esta modificación puede conseguirse por técnicas de biología molecular convencionales tales como mutagénesis dirigida o deleciones de ADN.

Otro aspecto adicional de la invención es el uso de anticuerpos de IgG selectivos de protofibrillas A β humanas de elevada afinidad para determinar específicamente niveles de protofibrillas en tejidos humanos, particularmente en el líquido cefalorraquídeo (LCR), sangre, orina o saliva como una herramienta de diagnóstico o biomarcador para la enfermedad de Alzheimer. Los niveles de protofibrillas A β humanas en el LCR o en la sangre son probablemente diferentes en comparación con un grupo de control correspondiente de personas de edad avanzada que no presentan la enfermedad de Alzheimer. Es probable que una persona que está desarrollando la enfermedad de Alzheimer tenga niveles aumentados de protofibrillas A β en el LCR o en la sangre. Por lo tanto, determinando los niveles de protofibrillas A β en el LCR o en la sangre puede realizarse un diagnóstico precoz de la enfermedad. Esto puede lograrse con los nuevos anticuerpos selectivos de protofibrillas A β de alta afinidad en combinación con un método ELISA de tipo sándwich (Ejemplo 2A), en el que las protofibrillas A β se han determinado por debajo del nivel de 10 pM. La interferencia de otras formas A β tales como fibrillas A β , monómeros A β y fragmentos A β (1-16; 17-40) en el ensayo, es del 10% o menor.

Adicionalmente la invención se refiere al uso de anticuerpos específicos de protofibrillas de elevada afinidad para determinaciones de protofibrillas A β en tejidos de seres humanos y de animales, por ejemplo, líquido cefalorraquídeo, sangre, suero, orina y tejido cerebral, pero sin limitarse a estos tejidos, proporcionando un método de diagnóstico posible para la enfermedad de Alzheimer. Los métodos adecuados para ensayar protofibrillas A β en estos tejidos así como en cultivos celulares usando un anticuerpo anti- protofibrilla A β son inmunoensayos tales como ELISA, RIA, transferencia de Western o transferencia puntual. El método sería adecuado para seguir la eficacia del tratamiento (reducción de protofibrillas) en estudios clínicos y adecuado como un ensayo de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer o el síndrome de Down.

Dado que los niveles de protofibrillas A β son muy bajos en el LCR y en la sangre, para poder medir niveles bajos de protofibrillas A β , se necesita un anticuerpo selectivo de protofibrillas A β de elevada afinidad en un ensayo de diagnóstico basado en un método ELISA. Para aumentar la sensibilidad, pueden usarse otros métodos extremadamente sensibles, tales como, ligamiento por proximidad (Ejemplo 4) (Gullberg 2004) o sistemas de amplificación similares o técnicas de Biacore o similar. La técnica de ligamiento por proximidad se basa en el descubrimiento de que diferentes anticuerpos, sensibilizados contra diferentes epítomos en un analito, (en este caso una proteína), pueden unirse cerca entre sí en dicho analito. Si dichos anticuerpos diferentes se conjugan con oligonucleótidos, la distancia entre dichos oligonucleótidos será suficientemente corta para un oligonucleótido conector, con la ayuda de componentes de ligamiento, para formar un puente entre los oligonucleótidos. También se añaden componentes de amplificación, después de lo cual puede realizarse RT-PCR. Mediante este principio, se genera una secuencia de ADN amplificable, que refleja la identidad y la cantidad de la proteína diana. Esta técnica hace posible obtener una respuesta de señal potenciada y por lo tanto detectar menores concentraciones de analito.

Sorprendentemente, los presentes inventores descubrieron que también podía usarse una técnica de ligamiento por proximidad modificada con sus anticuerpos específicos de protofibrillas A β , para detectar bajas concentraciones de estructuras peptídicas A β más grandes, es decir protofibrillas A β pero no monómeros de A β . Estos descubrieron que los péptidos A β , en la conformación protofibrilar, presentaban una estructura (unidades repetitivas) que hacía posible que dos anticuerpos, de acuerdo con la presente invención, se uniesen suficientemente cerca entre sí en la protofibrilla. Si dichos anticuerpos se conjugan con oligonucleótidos, dichos oligonucleótidos pueden formar puentes de unión usando un oligonucleótido conector. La PCR se realizó usando componentes de amplificación. Mediante este principio, se genera una secuencia de ADN amplificable, que refleja la identidad y la cantidad de la protofibrilla diana (véase la Figura 4).

El ligamiento por proximidad o una versión de la técnica denominada "círculo rodante", es una técnica muy sensible y particularmente muy adecuada para la detección de estructuras poliméricas con secuencias repetidas, tales como protofibrillas A β para usar en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos.

La invención también se refiere al uso de anticuerpos específicos de protofibrillas de elevada afinidad en la formación de imágenes para la detección, localización y cuantificación de protofibrillas A β en tejidos de seres humanos y animales. El anticuerpo podría marcarse con un ligando radiactivo tal como I¹³¹, C¹⁴, H³ o Galio⁶⁸, pero sin limitarse a estos radioisótopos, con fines de detección. El método sería adecuado como una herramienta de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer o el síndrome de Down.

Otro aspecto adicional de la invención consiste en prepara especies de anticuerpos específicas para su uso en medicina veterinaria. Los métodos de diagnóstico indicados también son adecuados para el uso veterinario.

Otro aspecto de la invención es la humanización de dichos anticuerpos para impedir efectos secundarios, es decir impedir una respuesta inmunológica contra dichos anticuerpos en seres humanos cuando se usan como un agente de diagnóstico o terapéutico.

ES 2 356 159 T3

Otro aspecto adicional es a una formulación del anticuerpo en un tampón fisiológico, por ejemplo en PBS, pero sin limitarse al PBS, adecuado para la administración a seres humanos y animales. El producto del anticuerpo puede liofilizarse para conseguir una mejor estabilidad. La formulación liofilizada puede contener un excipiente tal como manitol, pero sin limitarse al manitol, para estabilizar el producto después de la liofilización.

5

El producto del anticuerpo puede contener un agente antibacteriano.

Los anticuerpos o fragmentos de acuerdo con las invenciones pueden presentar deleciones, sustituciones e inserciones de aminoácidos dentro de dichas regiones CDR y/o sus armazones. Los aminoácidos insertados o sustituidos también pueden ser aminoácidos derivados, siempre que la afinidad y especificidad del anticuerpo permanezca intacta.

10

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan con objeto de ilustrar sin pretender limitar la invención a estos ejemplos específicos.

15

Ejemplo 1

20

Se clonaron y se secuenciaron anticuerpos monoclonales selectivos de protofibrillas A β de tipo silvestre humanas. En la Tabla 1 se muestra la secuencia de aminoácidos de la región de cadena pesada variable (VH) y la región de cadena ligera variable (VL). En las Tablas 2 y 3 también se destacan y se muestran las posiciones de las regiones CDR 1-3. Las secuencias de aminoácidos de las regiones CDR forman la base estructural para la unión a protofibrillas A β de tipo silvestre humanas constituyendo el “epítipo de la enfermedad de Alzheimer”.

25

En las Tablas 1, 2 y 3 se muestra la secuencia de aminoácidos de las regiones CDR 1-3 de las cadenas VL y VH para un anticuerpo específico de protofibrillas de elevada afinidad BA9/158.

30

Los datos de secuenciación de otros anticuerpos selectivos de protofibrillas (BA2, BA3, BA4 y BA7) proporcionan secuencias de aminoácidos alternativas de las regiones CDR pero sin limitarse a estas.

35

Las secuencias de aminoácidos combinadas de las regiones CDR 1-3 de las cadenas VH y VL crean la “cavidad” molecular que une protofibrillas de tipo silvestre A β humanas con elevada especificidad y afinidad. Esta “cavidad” forma la base estructural del “epítipo de la enfermedad de Alzheimer”. Las variaciones observadas en la longitud de la secuencia de aminoácidos de las CDR, tanto en la cadena VH como en la VL, son compatibles con la unión a protofibrillas A β humanas (Tablas 2 y 3). Una región CDR más corta proporciona una estructura tridimensional más restrictiva de la cavidad de unión del anticuerpo, mientras que una más larga es más flexible.

40

Los inventores reivindican las secuencias de las CDR como se muestra en las Tablas 1, 2 y 3 así como las secuencias de aminoácidos en las regiones “flanqueantes de ratón” de las cadenas VH y VL, es decir, fuera de las regiones CDR así como las regiones flanqueantes VH y VL humanas para anticuerpos específicos de protofibrillas como se muestra en las Tablas 4 y 5, pero sin limitarse a estas.

45

En las tablas 4 y 5 se muestra la secuencia de aminoácidos de la región flanqueante de las regiones 1-3 VL y VH de las cadenas VL y VH de un anticuerpo específico de protofibrillas de elevada afinidad BA9/158.

50

En las regiones CDR, otra sustitución de aminoácidos distinta a la mostrada en las Tablas 1, 2 y 3 son compatibles con afinidad y especificidad elevadas, a unirse a protofibrillas A β de tipo silvestre humanas. Cuando un aminoácido polar está presente en una posición particular en una región CDR este aminoácido particular puede sustituirse por otro aminoácido polar, conservando y mejorando la elevada afinidad y especificidad de unión a protofibrillas A β . Del mismo modo, si un aminoácido no polar o cargado negativa o positivamente está presente en una determinada posición, este aminoácido puede sustituirse por un aminoácido similar del mismo grupo.

55

Además, un aminoácido o aminoácidos particulares se intercambian en cualquier posición en las regiones CDR por equivalentes funcionales que confieren al anticuerpo una función y estructura similares.

Ejemplo 2

60

Caracterización por ELISA de un anticuerpo monoclonal selectivo de protofibrillas de tipo silvestre A β humanas de elevada afinidad

65

El Ejemplo 2 muestra un anticuerpo selectivo de protofibrillas de elevada afinidad que reacciona de manera cruzada 200-1000 veces menos con monómeros A β y menos de 40 veces con fibrillas A β , según mediciones realizadas mediante un ELISA de tipo sándwich (Figura 2A). A partir de experimentos ELISA competitivos, el anticuerpo tiene una fuerte afinidad por las protofibrillas de tipo silvestre A β 42 humanas, pero sólo una afinidad muy débil por la parte N-terminal del péptido A β y monómeros A β . No se observó unión con el fragmento C-terminal de A β (Figura 2B).

ES 2 356 159 T3

Además, el anticuerpo no reacciona de manera cruzada con otros tipos de amiloides, como medina o transtirretina. Además el anticuerpo no reconoce la APP humana, el cuantioso precursor de A β .

5 En la Figura 2A, se muestra un ELISA de tipo sándwich. El anticuerpo 158 se recubrió en los pocillos y después se añadieron, a los pocillos, diferentes formas de A β aumentando las concentraciones. La medición de formas A β unidas se realizó añadiendo mAb 158 biotinilado y estreptavidina marcada con HRP. El desarrollo del color se midió de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante.

10 En la figura 2B se muestra un ELISA competitivo. Se recubrió una placa ELISA con protofibrillas A β humanas. Posteriormente el anticuerpo 158 se incubó con cantidades en aumento de diferentes formas de A β (competición). La mezcla de incubación se añadió a los pocillos de la placa de microtitulación y se dejó que el anticuerpo libre se uniese a las protofibrillas inmovilizadas en los pocillos.

15 Usando procedimientos convencionales, con un segundo anticuerpo se midió el anticuerpo 158 unido.

Ejemplo 3

20 En un modelo de ratón transgénico (APP_{sue}) con Alzheimer, se determinó la eficacia del anticuerpo selectivo de protofibrillas A β de alta afinidad por inyección intracraneal aguda. Los ratones transgénicos usados para la evaluación de eficacia expresaban la APP humana, con la mutación sueca (APP_{sue}). En este paradigma, los anticuerpos se inyectaron directamente en regiones del parénquima cerebral ricas en placas y 72 horas después, se evaluaron los efectos sobre la neuropatología (Wilcock *et al.*, 2003). Otros estudios habían demostrado que la aplicación directa de anticuerpos anti-A β produjeron una rápida eliminación de depósitos amiloides *in vivo* (Bacskai *et al.*, 2001; Brendza *et al.*, 2005). La inyección del anticuerpo selectivo de protofibrillas A β de elevada afinidad conduce a una reducción significativa de placas en el modelo de ratón APP_{sue} (Figura 3).

30 En la Figura 3 se ensayó la eficacia terapéutica de un anticuerpo selectivo de protofibrillas de elevada afinidad en un modelo de ratón transgénico (APP_{sue}). A un ratón transgénico APP_{sue} de 14 meses, se le inyectó por vía intracraneal, A: PBS y B: anticuerpo selectivo de protofibrillas de elevada afinidad (158) a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se examinó 72 horas después de la inyección. En el subículo, cerca del sitio de la inyección (B; flecha), se aprecia una notable eliminación de carga de A β en comparación con control de al lado (A; flecha).

35 Ejemplo 4

Ligamiento por proximidad en combinación con el anticuerpo selectivo de protofibrillas de elevada afinidad para medir protofibrillas A β

40 Se detectaron protofibrillas A β de tipo silvestre humanas por debajo del intervalo de 10 pM mientras que en la preparación del monómero A β no se detectó del todo. La combinación del método de ligamiento por proximidad hipersensible y de un anticuerpo de elevada afinidad es particularmente ventajosa ya que proporciona un sistema para determinar solamente formas oligoméricas del analito, lo cual es particularmente adecuado cuando se diagnostica la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades de "agregamiento" de proteínas tales como enfermedades por priones, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, amiloidosis y Parkinson.

50 En la Figura 4 las protofibrillas A β humanas se miden a niveles pM con la técnica de ligamiento por proximidad. Ensayo de ligamiento por proximidad: descripción del método (de Gullberg *et al.*, 2004): Etapa 1, incubación de la muestra con un par de sondas de proximidad (≈ 1 h); etapa 2, adición de todos los componentes necesarios para el ligamiento y detección por PCR cuantitativa (tiempo de ligamiento ≈ 5 min). En el ensayo, se usó un anticuerpo monoclonal selectivo de protofibrillas de elevada afinidad; etapa 3, PCR cuantitativa (≈ 2 h). Se diluyeron preparaciones sintéticas de monómero A β y protofibrilla A β y se ensayaron para determinar su reactividad en el ensayo de ligamiento por proximidad descrito anteriormente.

55 Ejemplo 5

El mAb158 no reconoce un epítipo amiloide genérico

60 La conformación de A β descrita anteriormente, dependiente de anticuerpos, había demostrado que se une a oligómeros y fibrillas de otras proteínas amiloidogénicas, lo que sugiere que en todos los agregados amiloides, está presente un epítipo común. Debido a dificultades técnicas en cuanto a la generación de protofibrillas de otras proteínas amiloidogénicas distintas a A β , se ensayó el mAb158 en su lugar contra diferentes fibrillas amiloides. En estos experimentos se usó el ensayo de transferencia puntual ya que el ELISA de inhibición, en el que las reacciones anticuerpo-antígeno se realizan en solución, no es adecuado para antígenos insolubles de tipo fibrillas. Sin embargo, el ensayo de transferencia puntual no es adecuado para evaluar la especificidad de anticuerpos para determinadas formas A β , es decir para medir diferencias en cuanto a selectividad para protofibrillas y fibrillas. Sobre una membrana de nitrocelulosa, se inmovilizaron fibrillas de medina, polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) y α -sinucleína, para conservar sus

ES 2 356 159 T3

conformaciones originales. El mAb158 no presentó reactividad con ningún amiloide distinto a la fibrilla A β (Figura 5A). La unión de mAb158 a fibrillas A β sugiere que en la estructura de fibrilla A β también está presente parte del epítipo de protofibrilla A β . Como controles positivos se usaron los anticuerpos 6E10 (A β), pAb179 (medina), pAbA110 (IAPP) y mAb211 (α -sinucleína) (Figura 5B). Transferencias representativas de experimentos repetidos (n=3).

5

El mAb158 no se une a la APP

En muestras biológicas tales como LCR y homogeneizado de cerebro los niveles de APP y fragmentos de APP solubles comúnmente superan los niveles de A β y por lo tanto una reacción de manera cruzada de anticuerpos-A β con APP podría inhibir un tratamiento mediante la unión a APP, dando como resultado menos anticuerpo libre para la unión y eliminación de protofibrillas A β . Además, esto podría modificar las mediciones de protofibrillas A β en muestras biológicas mediante un ensayo ELISA de tipo sándwich de A β . Para aclarar si mAb158 se une a la APP original, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación. Se inmunoprecipitaron medios de cultivo de células HEK (simulado, APP_{Sue} y APP_{Art-Sue}) y homogeneizados de cerebro de ratón (no transgénico, APP_{Sue} y APP_{Art-Sue}) con mAb158 o 6E10, seguido de una transferencia de Western desnaturizante con 6E10 como anticuerpo de detección (Figura 5C). Como se observa en la figura 5C, el mAb158 no inmunoprecipita con las α APP de los medios de cultivo de células ni con la APP de longitud completa de los homogeneizados de cerebro de ratón, mientras que, como era de esperar, sí lo hizo 6E10. Las protofibrillas A β sintéticas usadas como control inmunoprecipitaron igualmente con los dos anticuerpos (Figura 5C). Transferencias representativas de experimentos repetidos (n=3).

20

Ejemplo 6

25 *Establecimiento de un ELISA de tipo sándwich específico para protofibrillas A β*

Para poder realizar mediciones de protofibrillas A β en muestras biológicas se estableció un ELISA de tipo sándwich con mAb158 capturando y detectando el anticuerpo. Este ensayo mide las protofibrillas A β con un límite de detección de 1 pM y con un intervalo lineal de hasta 250 pM (en la Figura 6A, las líneas indican regresión lineal de las curvas patrón). Debido a incertidumbres con respecto al tamaño de las protofibrillas A β usadas en la curva patrón, la concentración 1 pM se basó en el peso molecular de un monómero A β (4514 g/mol). No obstante, dado que se había calculado que el peso molecular de una protofibrilla era al menos de 100 kDa, el límite de detección calculado como protofibrillas A β molar podría ser tan bajo como 50 fM. Una curva patrón de protofibrillas A β Art proporcionó una menor señal que las protofibrillas A β de tipo silvestre, posiblemente debido a diferencias en cuanto al tamaño de la protofibrilla A β (Figuras 6A, 6B). Se tituló A β -BPM sintética (A β de Bajo Peso Molecular). La expresión "A β de Bajo Peso Molecular", significa monómeros, dímeros y trímeros de A β que tienen un peso molecular de aproximadamente 4-12 kDa. Para validar la especificidad de conformación del ELISA, se usaron protofibrillas A β y A β 1-16 (Figura 6B), mientras que se usó el péptido hidrófilo A β 1-16 ya que no se esperaba agregar. Un ELISA compuesto de dos anticuerpos idénticos necesita al menos un dímero de una proteína para producir una señal y como estaba previsto, A β 1-16 no se detectó con el mAb158 en el ELISA de tipo sándwich incluso a concentraciones μ M (Figura 6B). Cuando se realizó el pre-tratamiento de la A β -BPM y las protofibrillas A β con ácido fórmico al 70% (AF), que se sabe que disocia A β agregados en monómeros, la señal del ELISA de tipo sándwich se perdió (datos no mostrados). Por tanto, la detección de A β -BPM a elevadas concentraciones nM (Figura 6B) se debe probablemente a un pequeño contenido de agregado de la preparación del péptido.

45

Un exceso grande de A β monomérica, holoAPP y fragmentos de APP, de origen natural en muestras biológicas, podría interferir con el análisis de protofibrillas A β ocupando sitios de unión del revestimiento del anticuerpo de captura, inhibiendo por tanto a las protofibrillas de la unión. Este problema se investigó añadiendo un exceso en aumento de A β 1-16 a una concentración fija de protofibrillas A β (50 pM, expresado como unidades monoméricas) y analizándolo con mAb158 y con 6E10-6E10 en un ELISA de tipo sándwich (Figura 6C). Un exceso molar de 500.000 veces de A β 1-16, en comparación con protofibrillas A β , no modificó las mediciones con el mAb158 en el ELISA de tipo sándwich, como se esperaba ya que A β 1-16 se une mal al anticuerpo de captura. En cambio, un exceso de 500 veces de A β 1-16 fue suficiente para disminuir la señal en el ELISA con 6E10-6E10, en el cual A β 1-16 se une con elevada afinidad al anticuerpo de captura (Figura 6C). Además, cuando se añadieron protofibrillas A β sintéticas a medios de cultivo de células HEK simulados o a homogeneizados de cerebro de ratón no transgénico, se recuperó el 90% de la señal (datos no mostrados).

55

Ejemplo 7

60

Medición de protofibrillas A β en muestras biológicas

Se ha sugerido la presencia de protofibrillas A β en células y modelos de ratón llevando la mutación Ártica, aunque esta ahora no ha habido ningún método para ensayar directamente las protofibrillas A β en muestras biológicas. Por lo tanto, el ELISA de tipo sándwich con mAb158 proporciona la primera oportunidad para medir niveles de protofibrillas A β en dichas células y modelos de ratón y compararlos con modelos sin esta mutación intra-A β . Se compararon muestras de células y de ratones que llevaban solo la mutación Sueca con la curva patrón de protofibrillas A β de tipo silvestre, mientras que las muestras de células y de ratones que expresaban A β con la mutación Ártica se compararon

65

con la curva patrón de protofibrillas A β Art (Figura 6A). Para garantizar que todas las A β medidas en este ensayo estaban en un estado soluble, y para excluir cualquier posible interferencia de fibrillas A β , todas las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 17900 x g antes del análisis. Se analizaron grupos de medios de células HEK transfectadas transitoriamente con APP_{Sue} y APP_{Art-Sue} y se compararon con medios de cultivo simulados de células HEK. A partir de curvas patrón, se calcularon los niveles de protofibrillas A β (Figura 6A) como el valor medio de triplicados y después se normalizaron a niveles de APP para compensar diferencias en los niveles de transfección (de acuerdo con Stenh *et al.*). La concentración de protofibrillas A β en el medio de cultivo de células HEK APP_{Art-Sue} era de 28 pM (± 2), significativamente superior ($p < 0,0001$) al 8,2 pM ($\pm 0,3$) observado en APP_{Sue} (Figura 7A). En el medio simulado no pudieron detectarse protofibrillas A β . También se midieron los niveles de protofibrillas A β en cerebros de ratones transgénicos APP_{Art-Sue} y APP_{Sue} de 10 meses con placas y patología A β intraneuronal (de acuerdo con Lord *et al.*). Los cerebros se homogeneizaron en TBS y se centrifugaron antes del análisis para recuperar la fracción A β soluble. De manera similar al análisis usando medios de cultivo de células, los niveles de protofibrillas A β difirieron significativamente ($p = 0,005$) entre los grupos, con 397 pM (± 59) en cerebros de ratones transgénicos APP_{Art-Sue} y 108 pM (± 14) en APP_{Sue} (Figura 7B).

En las figuras mencionadas anteriormente (Figuras 6 y 7), el número de muestras era; células simuladas (n=3) y transfectadas transitoriamente con APP_{Sue} (n=8) y APP_{Art-Sue} (n=11). Los niveles de protofibrillas A β en medios con APP_{Art-Sue} eran aproximadamente 9 veces superiores a los de los medios con APP_{Sue}, mientras que los medios simulados no proporcionaron ninguna señal (A). Las mediciones de los niveles de protofibrillas A β en la fracción soluble en TBS, de homogeneizados de cerebro de ratón no transgénico (n=6), se compararon con las de ratones transgénicos (APP_{Sue} n=3 y APP_{Art-Sue} n=6) (B) De manera similar a los medios de cultivo de células, los niveles de protofibrillas A β de ratones APP_{Art-Sue} fueron 7 veces superiores que los de ratones APP_{Sue}. Se muestran barras de error \pm DTM.

Ejemplo 8

El mAb158 disminuye significativamente las protofibrillas A β y A β total en ratones transgénicos APPsueart después de administración i.p.

A ratones APPsueart de 9-10 meses, se les inyectó, por vía i. p., el mAb158 (12 mg/kg) semanalmente durante 18 semanas. Después del estudio, los cerebros se aislaron y se homogeneizaron en TBS y posteriormente se centrifugaron para sedimentar el material insoluble. El material insoluble se disolvió en ácido fórmico. Por lo tanto, se obtuvieron dos fracciones procedentes de cerebros de ratón, es decir, una fracción en TBS y una fracción en ácido fórmico. Los niveles de protofibrillas A β en las fracciones en TBS se determinaron mediante un ELISA. Se encontró una reducción significativa de protofibrillas A β en el grupo de tratamiento con mAb158 en comparación con el grupo placebo (Figura 8). La Figura 8 muestra los niveles de protofibrillas A β en extractos de TBS con cerebro de ratón transgénico APPsueart 4 meses después del tratamiento con mAb158 o con placebo.

El nivel de A β total en la fracción de ácido fórmico se determinó mediante un ELISA (el ácido fórmico se usó para disolver todas las formas A β , para preparar todas las formas A β detectables). Se observó una reducción significativa de A β total en el grupo de tratamiento en comparación con el grupo placebo (Figura 9). La Figura 9 muestra los niveles de A β totales en extractos de ácido fórmico con cerebro de ratón transgénico APPsueart 4 meses después del tratamiento con mAb158 o con placebo.

Ejemplos 9-11

Abreviaturas

50	A	Adenina
	Protocolo Ab	protocolo biomédico AERES
55	BHK	riñón de cría de hámster
	pb	pares de bases
	C	Centígrado
60	C	Citosina
	CHO	Ovario de hámster Chino
65	CMF	Calcio y Magnesio Libre
	COS 7	Línea celular de fibroblastos de riñón de mono verde africano

ES 2 356 159 T3

	<i>dhfr</i>	dihidrofolato-reductasa
	DMEM	Medio de Eagle modificado con Dubelcco
5	DMSO	Dimetil sulfóxido
	ADN	Ácido desoxirribonucleico
10	ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
	SFT	Suero fetal de ternero
	g	gramos
15	G	Guanina
	hr	horas
	HRP	peroxidasa de rábano picante
20	IgG	Inmunoglobulina
	K	G o T (convención IUPAC)
25	LSAP	Producto Amiloide Soluble Grande
	mAb	anticuerpo monoclonal
	sec	segundo
30	min	minuto
	M	A o C (convención IUPAC)
35	MTX	Metotrexato
	NIMR	Instituto Nacional para la Investigación Médica (Reino Unido)
	nm	nanómetro
40	DO	densidad óptica
	PBS	Solución Salina Tamponada con Fosfato
45	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
	R	A o G (convención IUPAC)
	TA	Temperatura Ambiente
50	S	C o G (convención IUPAC)
	T	Timina
55	UV	Ultra Violeta
	V	variable
	V	A o C o G (convención IUPAC)
60	VH	región variable de cadena pesada de inmunoglobulina
	VK	región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina
65	W	A o T (convención IUPAC)
	Y	C o T (convención IUPAC)

ES 2 356 159 T3

Materiales

<i>Equipo</i>		
Equipo	Proveedor de Reino Unido	Número de Catálogo
Termociclador de ADN: GeneAmp 9600	Perkin Elmer	N801-0177
Un laboratorio de cultivo de tejidos diseñado que contiene un gabinete de seguridad microbiológico de clase II equipado con una lámpara UV	Walker Safety Cabinets Ltd.	N/a
Agitador de sobremesa para incubadora Innova®	New Brunswick Scientific	4000
Centrifugadora de sobremesa	Fisher Scientific	CEK-126-010N
Incubadora a 37°C con CO2 gasificado	RossLab plc	HS0-501TVBB
Incubadora microbiológica	Kendro / Heraeus	B6060
Modelo Electroporator: Gene Pulser II	Bio-Rad Laboratories Ltd.	341BR-3092
Lector ELISA: Lector de Microplaca 3550	Bio-Rad Laboratories Ltd.	3550
Paquete informático de análisis de datos Microplate Manager® 2.2 para ordenador Macintosh	Bio-Rad Laboratories Ltd.	N/a
Sistema PCR 9700 de GeneAmp de 96 pocillos	ABI	N8050200
Analizador Genético ABI PRISM 310	Applied Biosystems	310-00-100/120
Detector de resonancia de plasmón superficial T100	Biacore	

ES 2 356 159 T3

<i>Consumibles de plástico</i>		
Artículo	Proveedor de Reino Unido	Número de Catálogo
Matraz de cultivo de tejido de 175 cm ²	Sarstedt Ltd	83.1812.002
Matraz de cultivo de tejido de 25 cm ²	Coming Costar	3056
Envase universal de 30 ml	Sterilin	128C
Matraz de cultivo de tejido de 75 cm ²	Sarstedt Ltd	83.1813.002
Cubetas de electroporación	Bio-Rad Laboratories Ltd.	165-2088
Placas de ELISA: Nunc MaxiSorp	Invitrogen Life Technologies	43945 ^a
Tubos de reacción PCR GeneAmp™	Perkin Elmer	N801-0180
Portaobjetos de recuento de células desechable Glasstic®	Bio-stat Diagnostic	887144
Agujas de inoculación Nunc	Life Technologies	254399
Placa de Petri de cultivo de tejidos 100x20mm, multi-vent	Helena Biosciences	93100
Placa de cultivo de tejido: 6 pocillos + tapa	Corning	C3516
Placa de cultivo de tejido: 24 pocillos + tapa	Corning	C3526

ES 2 356 159 T3

<i>Reactivos inmunológicos y de biología molecular</i>			
Artículo	Proveedor de Reino Unido	Nº de catálogo	Nº de Lote
Kit de síntesis de 1ª cadena	Amersham Biosciences	27-9261-01	3375313
Kit para PCR Advantage®-HF 2	Clontech	639123	6040151
Agarosa (UltraPure™)	Invitrogen	15510-027	3019491
Albúmina de suero bovino (BSA)	Calbiochem	126575	B65755
Ampicilina	Sigma	A-9518	63H0992
<i>Apa</i> I	Promega	R636	16007003
Termoprime + ADN Polimerasa	Abgene	AB0301	014/0103/11 019/0607/13 020/1808/13
<i>Bam</i> HI	Promega	R602	15851606
Ciclo Terminador v3.0 BigDye®	ABI	4390242	0605143
Kit de reacción preparado para secuenciación			0608154
Bromuro de etidio (10 mg/ml)	Sigma	E-1510	43H9414
Anticuerpo anti IgG humana (fragmento específico de Fc) de cabra	Stratech Scientific	109-005-098	68215
Conjugado de peroxidasa de rábano picante con anti-cadena kappa humana de cabra	Sigma	A7164	032K9157
<i>Hind</i> III	Promega	R604	16834803
anticuerpo humano IgG1/kappa.	The Binding Site	BP078	223729
Sustrato K-Blue HRP	SkyBio	308176	060823
Oligonucleótidos	Sigma	n.a.	
Comprimidos PBS	Sigma	P4417	11 K8204
Kit QIAGEN Plasmid Maxi (25)	Qiagen	12162	124114870
Kit QIAprep Spin Miniprep	Qiagen	27106	124117906

65

ES 2 356 159 T3

<i>Reactivos inmunológicos y de biología molecular</i>			
Artículo	Proveedor de Reino Unido	Nº de catálogo	Nº de Lote
Kit de purificación QIAquick gel	Qiagen	28704	11549740
Kit de purificación PCR QIAquick	Qiagen	28106	G10.1.12
Solución de detención roja (Para Azul K)	SkyBio Ltd,	301475	060104
	Qiagen	74106	10916587
Fosfatasa alcalina de camarón	USB	70092Y	107635
Subclonación Efficiency™ DH5α™ químicamente competente de <i>E. coli</i>	Invitrogen	44 0098	1164658
ADN ligasa de T4	Promega	M1801	167080
Sustrato uni-etapa TMB para HRP	SkyBio Ltd,	KB176	
Kit TOPO-TA Cloning®	Invitrogen	45-0641	1350772
X-Gal	Sigma	B-9146	20965701

<i>Soluciones procedentes del Instituto Nacional de Investigación Médica</i>		
Nombre de la solución:	Componentes	Cantidad
PBS 'A' Dulbecco (Sin Ca ni Mg)	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ Agua	8g 0,2g 1,15g 0,2g 1l
LB	Bacto Triptona Extracto de levadura NaCl Agua	10g 5g 10g 1l
Agar LB	LB Agar (Difco)	1l 15g

ES 2 356 159 T3

<i>Reactivos de cultivo</i>				
Artículo	Proveedor de Reino Unido	Número de catálogo	Número de lote	Fecha de caducidad
Medio de Eagle modificado por Dulbecco DMEM (1X) (alto contenido en glucosa) con GlutaMAX™ I, D-Glucosa 4500mg/l, piruvato de sodio	Invitrogen	41966-047	9206	07/07
DMSO (Dimetil sulfóxido)	Sigma	D2650	125K2409	12/07
Penicilina y Estreptomicina	Invitrogen	15070-063	1298401	
Suero: Clon Fetal I	Perbio Science	SH30080	AMM17779	12/07
SOC	Invitrogen	15544-034	1306051	
Azul Tripano	Sigma	T8154	19H2388	
Solución Trypsina-EDTA, ensayada en cultivo celular, 0.25%	Sigma	T4049	48K2342	04/08

Ejemplo 9

Secuencia de ADN del anticuerpo 158

9.1- Preparación de ARN

El 3 de Octubre del 2006 se recibieron por TAG sedimentos de células del hibridoma 158 de ratón, (viales con la etiqueta N° 060824, 5x10⁶ células 158), congeladas instantáneamente. Estas células se conservaron congeladas hasta el procesamiento usando el kit Qiagen Rneasy midi para aislar el ARN siguiendo el protocolo de los fabricantes.

9.2- Síntesis de la 1ª cadena

Aproximadamente 5 microgramos de ARN 158 se sometieron a transcripción inversa para producir ADNc 158 usando el kit de síntesis de 1ª cadena Amersham Biosciences siguiendo el protocolo de los fabricantes. Esto se repitió para generar 3 productos de ADNc independientes (rondas 1, 2 y 3) con objeto de obviar mutaciones de ADN debidas a la reacción de transcripción inversa RT.

9.3- Clonación del ADNc de inmunoglobulina de 158

El ADNc del hibridoma 158 se amplificó por PCR en 23 reacciones distintas. Se amplificó el ADNc de la región variable de cadena kappa (VK) de inmunoglobulina usando 11 cebadores para VK (MKV1-11) en combinación con el cebador de la región constante kappa MKC (Tabla 6). De manera similar, el ADNc de la región variable de cadena pesada (VH) de inmunoglobulina se amplificó por PCR usando 12 cebadores para VH diferentes (MHV 1-12) en combinación con una mezcla de cuatro cebadores de la región constante de IgG (MHC1/2a/2b/3: Tabla 7).

ES 2 356 159 T3

El resultado del conjunto inicial de las reacciones PCR de IgH fue el único producto de amplificación usando el cebador MHV5. Ninguno de los otros 11 pares de cebadores proporcionó ningún producto PCR. El producto de la reacción PCR cebada con los cebadores oligonucleotídicos: MHV5+ (mezcla de MHCg1/2a/2b/3) se ligó en el vector pCR2.1[®]-TOPO[®] usando el kit TOPO-TA cloning[®]. El resultado del conjunto inicial de las reacciones PCR de IgK fue de sólo dos productos de amplificación usando los cebadores MKV1 y MKV2 con MKC. Los otros 9 pares de cebadores no generaron ningún producto. Los productos de la reacción PCR cebada con los cebadores oligonucleotídicos: MKV1 o MKV2 + MKC se ligaron en el vector pCR2.1[®]-TOPO[®] usando el kit TOPO-TA cloning[®].

En placas de agar con LB/ampicilina/X-gal, se clonaron bacterias de *E. coli* TOP10 transformadas con el vector ligado, se recogieron en rejillas de agar y en una mezcla de selección por PCR. Los insertos plasmídicos clonados se seleccionaron por amplificación PCR. Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis en gel y se identificaron clones que producían el producto de amplificación de PCR de tamaño correcto (500 pb aprox.). Se procesaron cultivos de cada clon (5 ml) durante una noche usando el protocolo del kit QIAprep Spin Miniprep para producir mini preparaciones plasmídicas de ADN.

9.4- Determinación de las secuencias de ADNc

El ciclo completo de RT-PCR, la clonación y el análisis de la secuencia de ADN se repitió para obtener tres conjuntos de información de secuencia completamente independientes, para cada cadena de inmunoglobulina. Los clones de los plásmidos de cada conjunto independiente de las regiones RT-PCR se secuenciaron en las dos direcciones usando los cebadores 1212 y 1233 (Tabla 10). Los plásmidos se secuenciaron usando el kit de reacción preparado para secuenciación de ciclo BigDye[®] Terminator v3.0 (ABI), se ciclaron en un aparato de PCR GeneAmp9600 y se analizaron en un secuenciador capilar ABI 310.

9.5- Secuencia de ADN de la VK de 158

Las secuencias de los clones de VK generados usando los cebadores de PCR, MKV2 y MKC en las rondas 1 y 2 de los ADNc de 1^a cadena, fueron idénticas a las de un transcrito estéril de kappa originado del compañero de fusión del mieloma tal como MOPC-21, SP2 y Ag8. Este es un transcrito estéril. En la Tabla 11 se muestra la secuencia consenso (VK de 158) de clones de VK generados usando cebadores de PCR, MKV1 y MKC, en las rondas 1-3 de los ADNc de 1^a cadena. Esta es una reorganización funcional. La Tabla 11 muestra algunas diferencias de la secuencia mostradas en las Tablas 1, 4 y 5. Estas diferencias están en la región FW1 en la que se localizó el cebador de PCR. La secuencia líder de VK de ratón más parecida al fragmento del líder de VK de 158, no codificada por los cebadores de la invención, era la N^o K5.1 (Tabla 12). La predicción para que el péptido de señal escindiese correctamente la secuencia de señal N^o K5.1 se realizó mediante un programa de predicción. Más probablemente el sitio de escisión previsto estaba correctamente entre los restos aminoacídicos 19 y 20 (Tabla 13). En la Tabla 14 se muestra la secuencia de la proteína quimérica de 158VK y de ADN.

9.6- Secuencia de ADN de 158 VH

En la Tabla 15 se muestra la secuencia consenso (158 VH) de clones VH generados usando cebadores de PCR, MHV5 y una mezcla de MHCg1/2a/2b/3 en las rondas 1-3 de los ADNc de 1^a cadena. Como con 158 VK, existen algunas diferencias de la secuencia FW1 mostrada en las Tablas 1, 4 y 5. La secuencia líder de VH de ratón más parecida a la del fragmento del líder, no codificada por los cebadores de la invención, fue NL-1 (Tabla 16).

Ejemplo 10

Construcción de vectores de expresión quiméricos

La construcción de vectores de expresión quiméricos conlleva añadir una secuencia líder adecuada a VH y VK, precedida por un sitio de restricción *Hind*III y una secuencia de Kozak. La secuencia de Kozak (Tabla 8) garantiza la traducción eficaz de la secuencia de región variable. Esta define el codón AUG correcto a partir del cual un ribosoma puede comenzar la traducción y la base más crítica es la adenina en la posición -3, aguas arriba del inicio AUG. La secuencia líder se selecciona como la secuencia líder de ratón más similar en la base de datos de Kabat. Estas adiciones se codifican dentro de los cebadores directos (Tabla 9). Por otro lado, la construcción de los vectores de expresión quiméricos conlleva introducir un fragmento 5' de la región constante γ 1 humana, hasta un sitio de restricción *Apal* natural, contiguo al extremo 3' de la región J de 158. La CH se codifica en el vector de expresión aguas abajo de la secuencia VH insertada pero carece del intrón V-C. Para la cadena ligera, se añade el sitio donante de corte y empalme natural (Tabla 8) y un sitio *Bam*HI aguas abajo de la región V. La secuencia donante de corte y empalme facilita el corte y empalme fuera del intrón V:C kappa que es necesario para la unión en lectura del VK con la región constante. Los genes de ratón VK y VH se analizaron para identificar cualquiera de los sitios donantes de corte y empalme, sitios aceptores de corte y empalme, secuencias Kozak no deseados y para identificar la presencia de cualquiera de los sitios de restricción de subclonación extras que pudieran interferir más tarde con la subclonación y/o expresión del anticuerpo completo funcional. En este caso no se encontró ninguno.

ES 2 356 159 T3

10.1- Vectores de expresión

Se purificaron preparaciones de ADN de plásmidos de los vectores de expresión pKN100 y pG1D200 usando kits Qiagen Maxi siguiendo el protocolo de los fabricantes. La purificación de ADN de plásmidos usando los kits midi y maxi QIAGEN Plasmid, procedentes de cultivos de 500 ml de bacterias TOP10 se transfectaron con cada vector. En las Figuras 10 y 11 se muestran los mapas de los vectores.

10.2- Los cebadores de quimerización de cadena ligera

La secuencia líder de ratón N° K5.1 se incorporó en el diseño del 158 VK quimérico. Los cebadores se diseñaron para generar un producto PCR que contenía esta secuencia líder completa y la región 158 VK, con sitios de restricción terminales *HindIII* y *BamHI* para la clonación en el vector de expresión pKN100 (Tabla 9). El cebador directo 158v1 introduce un sitio de restricción *HindIII*; un sitio Kozak y la secuencia líder N° K5.1. El cebador inverso 158v1rev introduce: un sitio donante de corte y empalme y un sitio de restricción *BamHI*.

10.3- Los cebadores de quimerización de cadena pesada

La secuencia líder NL-1 se incorporó en el diseño del 158 VH quimérico. Los cebadores se diseñaron para generar un producto PCR que contenía esta secuencia líder y la región 158 VH, con sitios de restricción terminales *HindIII* y *ApaI* para la clonación en el vector de expresión pG1D200. Esto se muestra en la Tabla 9. El cebador directo, 158vh, introduce un sitio de restricción de *HindIII*, un sitio de inicio de la traducción de Kozak y la secuencia líder NL-1. El cebador inverso, 158vhrev, introduce el extremo 5' de la región C y1 y un sitio de restricción *ApaI* natural. En la Tabla 17 se muestra la predicción del sitio de escisión del péptido de señal para la secuencia líder K5.1 de VK.

10.4- Generación de la construcción quimérica 158 VH: pG1D200158VH

El fragmento de ADN de 158 VH se amplificó con los cebadores 158vh y 158vhrev (Tabla 9). El producto PCR de 450pb (aprox) se ligó a T-A en el vector pCR2.1 y se usó para transformar bacterias TOP10 químicamente competentes. Los clones se seleccionaron por tamaño de inserto apropiado y se secuenciaron usando el cebador 1212 (Tabla 10). El inserto de correcta expresión se subclonó en el vector de expresión pG1D200 y el subclon correcto se seleccionó por secuenciación de ADN usando el cebador BDSH61R (Tabla 10). Este clon se cultivó en un cultivo de 200 ml para producir ADN plasmídico usando el kit Qiagen Maxi usando el protocolo de los fabricantes. En la Tabla 18 se muestra la secuencia de la proteína quimérica 158VH y del ADN.

10.5- Generación de la construcción quimérica 158 VK: pKN100158VK

El fragmento de ADN de 158 VK se amplificó con los cebadores 158v1 y 158v1rev (Tabla 9). El producto PCR de 450bp (aprox) se ligó a T-A en el vector pCR2.1 y se usó para transformar bacterias TOP10 químicamente competentes. Los clones se seleccionaron por tamaño de inserto y se secuenciaron usando el cebador 1212 (Tabla 10). El clon correcto se subclonó en el vector de expresión pKN100. El subclon correcto se seleccionó explorando el tamaño de inserto y la secuenciación de ADN usando el cebador Hu-K2 (Tabla 10). Este clon se cultivó en un cultivo de 200 ml para producir el ADN plasmídico usando el kit Qiagen Maxi usando el protocolo del fabricante.

Ejemplo 11

Producción y propiedades de unión del anticuerpo quimérico 158

11.1- Transformación de células COS 7 y cultivo de células

Se descongeló un vial de células COS 7 y se cultivaron en DMEM complementado con suero de clon fetal I al 10% y antibióticos. Una semana después, se realizó la electroporación de las células (0,8ml a 10^7 /ml) con pG1D200158VH más pKN100158VK (10 μ g de ADN cada uno). Las células se cultivaron durante 3 días en placas de Petri en 8 ml de medio de crecimiento.

11.2.- Producción de anticuerpo quimérico

Para medir las concentraciones de anticuerpo en los sobrenadantes de COS 7, se usó un ELISA de tipo sándwich. El anticuerpo quimérico 158VH x 158 VK se expresó a 0,3 μ g/ml y posteriormente a 3,7 μ g/ml (Tabla 19) en medios acondicionados de células COS co-transfectadas transitoriamente.

ES 2 356 159 T3

11.3- Actividad del anticuerpo quimérico

Para analizar la unión del anticuerpo quimérico 158 al antígeno, se usaron dos ELISA. Usando el medio acondicionado del anticuerpo quimérico de 3,7 $\mu\text{g/ml}$, se midió la unión al monómero $A\beta$ mediante un protocolo ELISA directo (Figura 12) y se comparó con la IgG 158 de ratón. En segundo lugar, se realizó un ELISA competitivo usando monómero o protofibrilla mezclado en la fase líquida con antibiótico, que posteriormente se unió al monómero $A\beta$ en la fase sólida (Figura 13). Esto demostró que el anticuerpo quimérico 158 se une a monómeros $A\beta$ y protofibrillas amiloides de manera similar al anticuerpo de ratón 158 original.

Comentario

Secuenciación posterior ha mostrado que los datos de secuencias del anticuerpo de ratón, como se muestra en las tablas 1 y 4, contienen errores en ambas cadenas VH y VK en el extremo 5'. Los inventores sugieren que esto se debe al uso de cebadores localizados dentro de la región V. En secuenciación posterior, se usaron cebadores localizados dentro de las secuencias líder, que no puede introducir mutaciones dentro de las regiones V. La secuenciación posterior mostró diferencias de secuencia (véanse las Tablas 15 y 11). Sin embargo, dichas diferencias no se localizan dentro de las regiones CDR.

El anticuerpo quimérico se une a monómeros $A\beta$ y protofibrillas amiloides como se muestra mediante el ELISA de unión directo y el ELISA competitivo, respectivamente. Esta prueba confirma que la combinación de cadenas 158VH y 158VK codifica el anticuerpo-LSAP 158 e indica que estas secuencias son adecuadas para el procedimiento de humanización para generar un anticuerpo 158 humanizado.

Ejemplo 12

Diseño y discusión del anticuerpo humanizado

Abreviaturas y definiciones

158	Anticuerpo 158 monoclonal de ratón anti-LSAP TM .
158 VH	VH del anticuerpo 158 de ratón.
158 VK	VK del anticuerpo 158 de ratón.
158RKAss	Versión humanizada de 158 VK conservando sitios de corte y empalme crípticos.
158RKA	Versión humanizada de 158 VK con sitios de corte y empalme crípticos eliminados.
158RHAss	Versión humanizada de 158 VH conservando sitios de corte y empalme crípticos.
158RHA	Versión humanizada de 158 VH con sitios de corte y empalme crípticos eliminados.
A	Adenina.
Pb	Pares de bases.
C	Citosina.
CDR	Región determinante de la complementariedad en las regiones variables de inmunoglobulina, definida usando el sistema de numeración de Kabat.
Gen D	Gen de diversidad.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
FW	Región flanqueante: las regiones variables de inmunoglobulina excluyendo las regiones CDR.
G	Guanina.
IgG	Inmunoglobulina G.
Gen J	Gen de acoplamiento.
Kabat	Un sistema de alineamiento y numeración de inmunoglobulina cuyo pionero fue Elvin A Kabat.

ES 2 356 159 T3

mAb	Anticuerpo monoclonal.
MRCT	Tecnología del Consejo de Investigación Médica.
5 T	Timina.
VCI	Resto flanqueante clasificado como interfaz VH-VL o de vernier o canónico.
10 Gen V	El segmento génico que se transpone junto con un gen J (y D para VH) para generar una VH o VK completa.
Región V	El segmento de cadenas de IgG que es variable en la secuencia entre diferentes anticuerpos. Se extiende hasta el resto de Kabat 109 en la cadena ligera y 113 en la cadena pesada.
15 VH	Región variable de cadena pesada de inmunoglobulina.
VK	Región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina.

<u>Equipamiento</u>	
Equipo y programa informático	Origen
Ordenador SGWC2	Silicon Graphics
Ordenador PC	Hewlett Packard
SR 7.6	Steve Searle, Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge
Lasergene 6.0	DNASTar Inc.
Modeler 9.0	Accelrys Ltd.
P de señal	www.cbs.dtu.dk
BlastP	www.ncbi.nlm.nih.gov

12.1- Bases de datos del gen V humano

Para recopilar una base de datos de secuencias de proteínas de inmunoglobulina en el alineamiento de Kabat, se usaron las secuencias de proteínas de inmunoglobulinas humanas y de ratón procedentes de la Base de Datos de Inmunogenética Internacional 2006 y de la Edición 5 de la Base de Datos de Kabat de secuencias de proteínas de interés inmunológico (última actualización 17 de noviembre de 1999). La base de datos de la invención contiene 9322 secuencias VH humanas y 2689 VK humanas. Para averiguar las bases de datos de VH y VK humanas con las secuencias de proteínas de 158 VK y 158 VH (Tabla 20), se usó el programa de análisis de secuencias, SR 7.6.

12.2- Selección de un resto flanqueante humano para 158RHA

12.2.1- Comparación de 158 VH con secuencias VH humanas

En la Tabla 21 se muestran las secuencias VH humanas con mayor identidad a 158 VH en restos (VCI) de Vernier (Foote, J. And G. Winter. 1992. Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. J Mol. Biol 224:487-499.), Canónicos (Morea, V., A.M. Lesk, and A. Tramontano. 2000. Antibody modeling: implications for engineering and desing. Methods 20:267-279.) y de la Interfaz VH-VL (Chothia, C., J. Novotny, R. Brucoleri, and M. Karplus. 1985. Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. J Mol. Biol. 186:651-663.), localizadas dentro de la región flanqueante (FW) de V. También se muestra el número de restos VCI (puntuación VCI) y restos FW (puntuación FW) idénticos a 158. Como se muestra en la Tabla 22, todas estas secuencias de VH comparten idénticos restos VCI y longitudes de CDR. En este conjunto de datos AJ556669 tiene una Pro74 inusual no observada en las otras secuencias humanas, lo que conduce a descartarla en el análisis inicial. Sin embargo, Pro74 está presente en la secuencia 158VH, por lo que AJ556669 podría considerarse co-

ES 2 356 159 T3

mo una FW alternativa para la humanización, si la construcción de VH basada en AF062243 no se une el antígeno. El alineamiento de estas secuencias (Tabla 23) pone de manifiesto sus diferencias. En este conjunto de datos, AF062243 únicamente tiene el cambio conservativo T(82a)S y la conservación de F79. Las otras características de AF062243 son los cambios conservativos D1E, K19R, A23S, T77S, S118T. El resto de los cambios de FW fueron comunes a todas las regiones flanqueantes en la Tabla 23. AF062243 se seleccionó como región flanqueante en la cual se basa 158RHA.

12.3- Generación de 158RHA

El diseño de 158RHA es simplemente el injerto de la CDR 1, 2 y 3 de 158 VH en la FW aceptora de AF062243. El gen V de la línea germinal humana más idéntico a AF062243 es M99649 de VH (VH3-07), (Tabla 24) a partir del cual se extrajo el péptido líder (Tabla 25). El algoritmo del P de señal (Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak y G. von Heijne. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10:1-6.) predijo que este se cortaría apropiadamente con peptidasa de señal (Tabla 26). La tabla 27 muestra el esquema del injerto de las CDR 1, 2 y 3 de 158 VH en la FW de AF062243, para generar una secuencia de proteína 158RHA. La tabla 28 muestra la generación de la secuencia de ADN de 158 RHAss a partir de secuencias de ADN naturales de 158 VH y AF062243. El análisis de la secuencia de ADN de 158RHAss predijo la presencia de sitios donantes de corte y empalme, cuyas puntuaciones de predicción se muestran en la tabla 29. Se introdujeron mutaciones no codificantes para inactivar estos sitios de corte y empalme predichos, como se muestra en la Tabla 30 para generar la secuencia final de ADN de 158RHA (Tabla 31).

12.4- Selección de una región flanqueante humana para 158RKA

12.4.1- Comparación de 158 VK con secuencias VK humanas

En la Tabla 32 se muestran las secuencias de VK humanas con mayor identidad a 158VK en los restos VCI junto con el número de restos VCI (puntuación VCI) y restos FW (puntuación FW) idénticos a 158 VK. Once secuencias tenían todos los restos VCI idénticos a 158 VK.

La Tabla 33 muestra que todas estas secuencias tienen longitudes de CDR idénticas a 158 VK. La Tabla 34 pone de manifiesto sus diferencias, mostrando que K45 se conserva únicamente en AB0064054, que también conserva I85. El cambio de G100P no es llamativo porque P100 es común, con una incidencia del 15% en la base de datos de VK humana de la invención. Las dos sustituciones: T7S y K74R, son conservativas y las restantes sustituciones son comunes a todas las secuencias en la Tabla 34. Por estas razones, para generar 158RNA se seleccionó AB064054.

12.5- Generación de 158 RKA

El diseño de 158RHA es simplemente el injerto de las CDR 1, 2 y 3 de 158VK en la FW aceptora de AB064054 humana. El gen V de la línea germinal más cercano a AB064054 es A19 (Tabla 35), a partir del cual se extrajo el péptido líder (Tabla 36). El algoritmo del P de señal predijo el corte apropiado (Tabla 37) de este péptido líder. La Tabla 38 muestra la generación de la secuencia de la proteína de 158RKA intercalando las CDR de 158 VK en la FW de AB064054. La Tabla 39 muestra la generación de la secuencia de ADN de 158RKAss a partir de la secuencia natural de ADN de 158 VK y AB064054. El análisis de la 158RKAss predijo la presencia de sitios donantes de corte y empalme, cuyas puntuaciones se muestran en la Tabla 40. Se introdujeron mutaciones no codificantes (41) para inactivar estos sitios y generar la construcción final de ADN de 158RKA (Tabla 42).

12.6- Actividad de unión del anticuerpo humanizado (BAN2401)

Se insertaron los genes 158RKA y 158RHA en un vector de expresión que contenía la región constante de IgG1. Esta construcción se expresó en células COS para generar el anticuerpo 158 humanizado. El anticuerpo 158 humanizado se ensayó para determinar la actividad y especificidad de unión en un ensayo competitivo ELISA. El anticuerpo humanizado mostró propiedades de unión idénticas a las de mAb158 y a las del anticuerpo quimérico 158 (véase la Figura 14).

12.7- Mutaciones adicionales en las cadenas 158RHA y 158RKA

Comparando genes V de la línea germinal de ratón AAK71612 de VH con 158 VK se identificó una sola mutación somática A60G en la CDR2. Por otro lado, el modelo molecular del anticuerpo158 contiene tres restos en FW de VH dentro de 5 Å de restos CDR que no están conservados en 158RHA. Estas sustituciones son D1E, P74A y T82S (Tabla 43). De manera similar, existen dos restos en FW de VK dentro de 5Å de restos CDR que no están conservados en 158RKA. Esta sustitución es L3V y G100P (Tabla 44). En las Tablas 43 y 44, se muestra la introducción de retromutaciones en las posiciones VH-1, VH-74, VH-82, VK-3 y VK-100 en 158RHA y 158RKA, en versiones humanizadas 158RHB, 158RHC, 158RHD, 158RKB y 158RKC.

Referencias

- Bacskai et al.**, *Nat. Med.* 7:369-372, 2001.
- 5 **Bard et al.**, *Nat. Med.* 6:916-919, 2000.
- Bayer et al.**, *Neurology* 64:94-101, 2005.
- Brendza et al.**, *J. Clin. Invest.* 115:428-33, 2005.
- 10 **Chen et al.**, *Nature* 408:975-9, 2000.
- Chothia, C. et al.**, *J. Mol. Biol.*, 186:651-663, 1985.
- 15 **Ester W.P.** *Science* 293, 1449-1459, 2001.
- Gullberg et al.**, *Proc. Natl Acad Sci*, 101:8420-4, 2004.
- Foote, J. et al.**, *J Mol. Biol.*, 224:487-499, 1992.
- 20 **Hosti et al.**, *Proc, Natl Acad. Sci*, 100:6370-6375, 2003.
- Jarret J.T. ,** *Biochemistry*, 32, 4693-4697, 1993.
- 25 **Leatherbarrow R.J. et al.**, *Mol. Immunol.* 22, 407, 1985.
- Lord et al.**, *Neurobiol. Aging*, 27:67-77, 2006.
- McLean et al.**, *Ann. Neurol* 46:860-866, 1999.
- 30 **Morea, V. et al.**, *Methods* 20:267-279, 2000.
- Mullan et al.**, *Nat Genet* 1:345-347, 1992.
- 35 **Nielsen, H. et al.**, *Protein Eng* 10:1-6, 1997.
- Nilsberth et al.**, *Nat Neurosci.* 4:887-893, 2001.
- Näslund et al.**, *JAMA*, 283:1571-1577, 2000.
- 40 **Pfeifer et al.**, *Science* 298:1379, 2002.
- Racke et al.**, *J. Neurosci* 25:629-36, 2005.
- 45 **Schenk D. et al.**, *Nature*, 400, 173-177, 1999.
- Stenh et al.**, *Ann. Neurol.* 58:147-50, 2005.
- Walsh D.M. et al.**, 272, 22364-22372, 1997.
- 50 **Walsh D.M. et al.**, *Nature*, 416, 535-9, 2002.
- Wilcock et al.**, *J. Neurosci.*, 23:3745-51, 2003.
- 55 **Wright A. et al.**, *J. of Immunology*, 3393-3402, 1998.
- Xu Y. et al.** *J. Biol. Chem.* 269, 3469-3474, 1994.

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento del mismo que es selectivo y que tiene una elevada afinidad por protofibrillas $A\beta$ humanas, en el que el anticuerpo o el fragmento en sus seis regiones CDR posee las siguientes secuencias consenso:

VH-CDR1 **SFGMH**

VH-CDR2 **YISSGSSTIYYGDTVKG**

VH-CDR3 **EGGYYYGRSYYTMDY**

VL-CDR1 **RSSQSIVHSNGNTYLE**

VL-CDR2 **KVSNRFS**

VL-CDR3 **FQGSHPPT**

2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es monoclonal.

3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el aminoácido prolina en la posición 331 en la IgG1 humana se cambia por serina o por otro aminoácido polar.

4. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo es de la clase IgG.

5. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho anticuerpo es de la subclase IgG1 o IgG4.

6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo es una quimera de las subclases IgG1 e IgG4, en el que la región constante de cadena pesada CH2 o una parte de CH2 es de IgG4 y las regiones CH1 y CH3 son de IgG1.

7. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho anticuerpo comprende la secuencia completa de aminoácidos de cadena pesada de acuerdo con la Tabla 31 y la secuencia completa de aminoácidos de cadena ligera de acuerdo con la Tabla 42.

8. Un anticuerpo que se une a protofibrillas $A\beta$ humanas, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos 158RHA en la Tabla 27 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos 158RKA en la Tabla 38.

9. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho anticuerpo comprende mutaciones en la cadena pesada (VH) de acuerdo con la Tabla 43, seleccionándose dichas mutaciones de E a D en la posición de Kabat 1, de A a P en la posición de Kabat 74 y de S a T en la posición de Kabat 82A, y/o mutaciones en la cadena ligera (VK) de acuerdo con la Tabla 44, seleccionándose dichas mutaciones de V a L en la posición de Kabat 3 y de P a G en la posición de Kabat 100, o combinaciones de estas mutaciones VH y VK.

10. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho anticuerpo comprende la secuencia de cadena pesada completa de acuerdo con la Tabla 31 y la secuencia de cadena ligera completa de acuerdo con la Tabla 42, con la excepción de que en la cadena pesada se ha introducido la mutación S23A.

11. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho anticuerpo es humano o humanizado o ha mutado para reducir la antigenicidad en seres humanos.

12. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la proporción específica entre monómeros $A\beta$ y protofibrillas es al menos de 1:200 como se determina por ELISA competitivo.

13. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 5 ó 6, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo de ratón.

14. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho anticuerpo comprende la secuencia de cadena ligera completa codificada por la secuencia de ADN 158VK de acuerdo con la Tabla 11 y la secuencia de cadena pesada completa codificada por la secuencia de ADN 158VH de acuerdo con la Tabla 15.

15. Composición que comprende el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y un tampón farmacéuticamente aceptable.

ES 2 356 159 T3

16. La composición de acuerdo con la reivindicación 15, que comprende adicionalmente un agente anti-bacteriano.

17. La composición de acuerdo con la reivindicación 15 ó 16, en el que la composición esta liofilizada.

5 18. La composición de acuerdo con la reivindicación 17, en la que la composición esta liofilizada junto con un excipiente para aumentar la estabilidad del anticuerpo durante y después de la liofilización.

19. La composición de acuerdo con la reivindicación 18, en la que el excipiente es manitol o trehalosa.

10 20. Un método de detención de protofibrillas $A\beta$ *in vitro*, que comprende las etapas de:

- añadir el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 a una muestra biológica que comprende o se piensa que comprende protofibrillas $A\beta$.

15 - medir la concentración del complejo formado entre dichas protofibrillas $A\beta$ y dicho anticuerpo.

21. El método de acuerdo con la reivindicación 20, en el que dicho método de detección es un inmunoensayo.

20 22. El método de acuerdo con la reivindicación 20, en la que dicho método de detección es un ensayo de ligamiento por proximidad.

23. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para su uso en un método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo el método:

25 - añadir el anticuerpo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 a una muestra extraída de un sujeto; y

30 - medir la concentración del complejo formado ente dicho anticuerpo y cualquiera de las protofibrillas $A\beta$ en dicha muestra.

24. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para su uso en un método de diagnóstico del síndrome de Down, demencia por cuerpos de Lewy o demencia vascular, comprendiendo el método:

35 - añadir el anticuerpo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 a una muestra extraída de un sujeto; y

40 - medir la concentración del complejo formado entre dicho anticuerpo y cualquiera de las protofibrillas $A\beta$ en dicha muestra.

25. El uso del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 o la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15-19 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

26. El uso del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 o la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15-19 para la preparación de un medicamento para el tratamiento del síndrome de Down, demencia por cuerpos de Lewy o demencia vascular.

50 27. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 o la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15-19 para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

55 28. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 o la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15-19 para su uso en el tratamiento del síndrome de Down, demencia por cuerpos de Lewy o demencia vascular.

60

65

Tabla 1.
 Secuencia de aminoácidos de regiones variables de la cadena pesada (VH) y cadena ligera (VL)κ de seis anticuerpos monoclonales diferentes específicos de protofibrillas Aβ de tipo silvestre humanas.

VH-BA1: X731	ZKLVESGGGLVQPGGSRKLSCLASGFTESAPGHEWVROAPEKGLRWAVYIASSGASTIYADDPKGERFTISKRNPKSTLFLQVTSLSRSEDVAVVYCARVGLAM-----DVRGQETSVTWSS
VH-BA2: X736	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCLASGFTFSSVAMSRVROTEPKLEWVAVIASSGGSYTIYPSVAKGRFTISKRNARNTLQVZSSLRSRSDVAVVYCARVGSPPYF-----DVRGASFTVTVSS
VH-BA3: X745	QVHLQSGPPELIVPQKSVVMKSCVHSGYFTTSVAVHVVKQKQKGGCHLHTGIYINPVDGTYHKEFKGKATISDSSSTAVNELSLSRSEDVAVVYCARVYSPLSYAM---DVRGQETSVTWSS
VH-BN7: X746	QVQLVESGPGIIVAPPSLSLTCVYSAFELTSGVHWVQPPKELKELWLVWVAGSTVWVSLKLS-RLSISKMSKSOVELKESLQVDTWVYCARGVDSKTRFA-----YKSGSTLTVWSS
VH-BA4: X748	EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCLASGFTFSEFAMHVVROAPEKGLRWAVYIASSGASTIYADDPKGERFTISKRNPKSTLFLQVTSLSRSEDVAVVYCARVGSPPYF-----DVRGQETSVTWSS
VH-BA9: X758	ZVQRVIESGGGLVQPGGSRKLSCLASGFTFSEFAMHVVROAPEKGLRWAVYIASSGASTIYADDPKGERFTISKRNPKSTLFLQVTSLSRSEDVAVVYCARVGSPPYF-----DVRGQETSVTWSS
Vκ-BA1: X731	DVAVTQFLSLPNSLQDQASISCRSSQSIYHNGEHTYLS-WLQVQKQSPKLLIYVSRRESGVPRFSSGSGTDTLKLRSVERHDLGVTYCEQSHNPFZTFGGGTYKLRK
Vκ-BA2: X736	DIYVYQAKKELLVGNQDAVTITCKASQSVSHVA-----HYQQKQKQSPKLLIYVASHRYIVGVEPRFTISSVYGTDTFTLSTVQADLAVYFCQDQSSDFEFGSGTKLRK
Vκ-BA3: X745	DEVYVQAPSSLVWNGEKVTVNSCKSSQSLNRSFTRKAVLWVYQKPGQSPKLLIYVWVSRRESGVPRFTISSGSGTDTFTLSTVQADLAVYVCKQSYHL-WTFGGGTYKLRK
Vκ-BA7: X746	ZVHLGQSPAIVMSAPQEKVTVNFCVLSVSSSYLH-----HYQQKQKQSPKLLIYVSHRYIVGVEPRFSSGSGTDTFTLSTVQADLAVYVCKQSYHL-WTFGGGTYKLRK
Vκ-BA4: X748	DIYVYQAPLSEVSLQDQASISCRSSQSIWVSNENYELH-WLQVQKQSPKLLIYVSRRESGVPRFSSGSGTDTLKLRSVERHDLGVTYCEQSHNPFZTFGGGTYKLRK
Vκ-BA9: X758	DIYVYQAPLSEVSLQDQASISCRSSQSIWVSNENYELH-WLQVQKQSPKLLIYVSRRESGVPRFSSGSGTDTLKLRSVERHDLGVTYCEQSHNPFZTFGGGTYKLRK

* La posición de las diversas regiones CDR (1-3) se subraya en VL y VH. En las Tablas 3 y 4 se muestran los límites de las regiones CDR (1-3). El anticuerpo BA9, denominado también 158 en la solicitud de patente, es un ejemplo de un anticuerpo específico de protofibrillas de elevada afinidad de acuerdo con la invención.

Tabla 2.

Secuencias de aminoácidos de las regiones CDR 1-2 de cadena VH de un anticuerpo selectivo de protofibrillas y sustituciones de aminoácidos que son compatibles con la unión de elevada afinidad a protofibrillas A β de tipo silvestre humanas

Región CDR-1 de cadena VH AASGFTFSSFGMHWVR -----YA-S---	Anticuerpo 158 Sustituciones*
Región CDR-2 de cadena VH WVAYISSGSSTIYYGDTVKGRT -----A----- --T---G-YT--P-S-----	Anticuerpo 158 Sustituciones* Sustituciones*
Región CDR-3 de cadena VH CAREG-GYYYGRSYY-TMDYWGQ CARYGxxxxxNYxxxxAMDYWGQ CARNYxxxxGSRRxxxYFDVWGA	Anticuerpo 158 Sustituciones y deleciones* Sustituciones y deleciones*

* Las sustituciones de aminoácidos (aminoácidos distintos a los del anticuerpo 158) se muestran con un código de letra del aminoácido. Las deleciones se muestran con (x).

Tabla 3.

Secuencias de aminoácidos de las regiones CDR 1-3 de cadena VL de un anticuerpo selectivo de protofibrillas y sustituciones de aminoácidos que son compatibles con la unión de elevada afinidad a protofibrillas A β de tipo silvestre humanas

Región CDR-1 de cadena VL ISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYL ITCKASQSV _{xx} SND _{xxx} VAWYQ	Anticuerpo 158 Sustituciones y deleciones*
Región CDR-2 de cadena VL LIYKVSNRFGVP ---YA---YT---	Anticuerpo 158 Sustituciones*
Región CDR-3 de cadena VL YYCFQGSHVPPTFGG -F-Q-DYSS-F---S	Anticuerpo 158 Sustituciones *

* Las sustituciones de aminoácidos (aminoácidos distintos a los del anticuerpo 158) se muestran con un código de letra del aminoácido. Las deleciones se muestran con (x).

Tabla 4.
Secuencia de aminoácidos de regiones flanqueantes de ratón de la región de cadena ligera variable (VL) de ratón y de ser humano de anticuerpos específicos de protofibrillas

<u>Regiones VL flanqueantes de ratón</u>		
D	vmtqaplsipvslgdqasiscwylqkpgqspklllygvdpdrfsgsgtdftlkisrveaedlgiyyc	anticuerpo 158
.	BA9 VL_fr123
.	v.....t.....	BA1_VL_fr123
.kf.l.a.rvt.t...q.....t...y.....ft..t.q.....av.f.	BA2_VL_fr123
<u>Regiones VL flanqueantes de ser humano</u>		
.t.....tp.ep.....q.....v.v....	VKII-3-1-(1)-O11
.s.....tp.ep.....q.....v.v....	VKII-4-1-(1)-A19
.t.....s.tp.qp.....q.....v.v....	VKII-4-1-(1)-A18
.t.....s.tp.qp.....p.q.....v.v....	VKII-4-1-(1)-A2
.	v.....s.....t.....qp.....fg.r.....rr.....v.v....	VKII-4-1-(1)-A17

* La región flanqueante es la región fuera de las regiones CDR. Para mayor claridad, regiones CDR se han deletado.

Tabla 5.

Secuencia de aminoácidos de regiones flanqueantes de ratón y de ser humano de la región pesada ligera variable (VH) de ratón y de ser humano de anticuerpos específicos de protofibrillas

<u>Regiones VH flanqueantes de ratón</u>	
Evklmesggglvqpggsrkliscaaswvrgapekglewvarftlsrdnpkntlflqmtslrse dtamyyca r	anticuerpo 158
.....	BA9_VH_fr123
.....	BA1_VH_fr123
.....	BA2_VH_fr123
.....k.....l.....t.....r.....a.....y.....s.....	

Regiones VH flanqueantes de ser humano

.....q.v.....lr.....g.....a.s.y.....n.....a.....v.....	VH3-7_fr123
.....q.v.....i.....lr.....g.....s.....y.....n.....a.....v.....	VH3-53_fr123
.....q.l.....lr.....g.....s.....y.....n.....a.....v.....k	VH3-23_fr123
.....q.v.....lr.....g.....s.....a.s.y.....n.....d.....v.....	VH3-48_fr123
.....q.v.....lr.....g.....v.....s.....a.....y.....n.....a.....v.....	VH3-74_fr123

* La región flanqueante es la región fuera de las regiones CDR. Para mayor claridad, regiones CDR se han deletado.

Tabla 6 - Cebadores de PCR para la clonación de VK de ratón

Nombre	Secuencia (5' → 3')
MKV1	ATGAAGTTGVVTGTTAGGCTGTTGGTGCTG
MKV2	ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGTG
MKV3	ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGGSGTTG
MKV4	ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGMWTCTTG
MKV5	ATGGATTTWAGGTGCAGATTWTCAGCTTC
MKV6	ATGAGGTKCKKTGKTSAGSTSCTGRGG
MKV7	ATGGGCWTCAAGATGGAGTCACAKWYYCWGG
MKV8	ATGTGGGGAYCTKTTYCMMTTTTTCAATTG
MKV9	ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG
MKV10	ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT
MKV11	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC
MKC	ACTGGATGGTGGGAAGATGG

Tabla 7. Cebadores PCR para la clonación de la VH pesada de ratón

Nombre	Secuencia (5'→3')
MHV1	ATGAAATGCAGCTGGGGCATSTTCTTC
MHV2	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT
MHV3	ATGAAGWTGTGGTTAAACTGGGTTTTT
MHV4	ATGRACCTTGGGYTCAGCTTGRITTT
MHV5	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTTCCTT
MHV6	ATGGCTGTCYTRGSGCTRCTCTCTGC
MHV7	ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT
MHV8	ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG
MHV9	ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATTCCTG
MHV10	ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCCTG
MHV11	ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG
MHV12	ATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCTG
MHCG1	CAGTGGATAGACAGATGGGGG
MHCG2a	CAGTGGATAGACCGATGGGGC
MHCG2b	CAGTGGATAGACTGATGGGGG
MHCG3	CAAGGGATAGACAGATGGGGC

Leyenda: Las bases cambiantes se definen en abreviatura (Sección 2).

Tabla 8.

Secuencias vitales para la expresión eficaz de inmunoglobulina en células de mamíferos.

Nombre	Secuencia de ADN consenso (5'→3')
Sitio Kozak de inicio de la traducción	G C C G C C R C C' Aⁿ U G G
Sitio donante de corte y empalme de cadena ligera kappa	A C :: G T R A G T
Sitio donante de corte y empalme de cadena pesada	M A G :: G T R A G T
Sitio aceptor de corte y empalme de inmunoglobulina	Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y N C A G :: G

Leyenda: Las bases en negrita se consideran invariantes dentro de cada secuencia consenso. Los sitios de corte y empalme se definen mediante el símbolo "::". Las bases cambiantes se definen en abreviatura (véanse los Ejemplos 9-11)

Tabla 9. Cebadores oligonucleotídicos usados para generar 158 quimérico

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'→3')
158vh	<u>AAGCTT</u> GCCGCCACCATGGACTCCAGGCTC
158vhrev	GGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGACTGAGG
158vl	<u>AAGCTT</u> GCCGCCACCATGAAGTTCCTGTTAGG
158vlrev	<u>GGATCC</u> ACTCACGTTTGATTTCCAGCTTGG

Leyenda: Los sitios de restricción se indican subrayados. Las secuencias de Kozak se indican en negrita.

Tabla 10. Cebadores oligonucleotídicos usados para secuenciación

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'→3')
1212 (17 unidades)	GTTTTCCAGTCACGAC
1233 (24 unidades)	AGCGGATAACAATTTACACAGGA
Hu-K2 (17 unidades)	CTCATCAGATGGCGGGA
BDSH61R	CGCTGCTGAGGGAGTAGAGTC

Tabla 11. Secuencia de ADN de VK de 158, cebador MKVI y la secuencia de VK derivada usando cebadores localizados en la región V

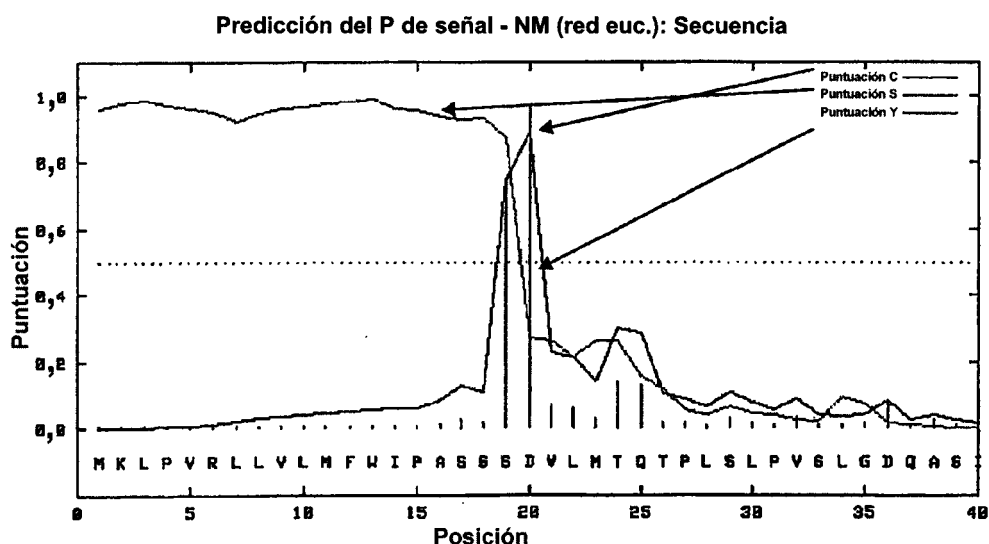
1	ATGAAGTTGCCCTGTTAGGCTGTTGGTGTGATGTTCTGGATTCCTGCTTCCAGCAGTGTATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTG	158 VK
1VV.....	MKV1
1	-----A..G.....GG.....	*** VK
91	CCTGTCAGTCTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAACACCTATTAGATGGTAC	158 VK
34	*** VK
181	CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTCCAAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTCAGTGGCAGTGA	158 VK
124	*** VK
271	TCAGGGACAGATTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTACTGCTTTCAGGTTACATGTTCCCTCCG	158 VK
214	*** VK
361	ACGTTCCGTGGAGCCACCAAGCTGGAATCAAAACGGGCTG	158 VK
304	*** VK

Leyenda: Los restos idénticos a VK de 158 se indican con un punto. *** Secuenciación usando cebadores localizados en la región V

Tabla 12. Selección de la secuencia líder de VK quimérica - selección de la secuencia líder N° K5.1 para la VK quimérica

158 VK	MKLPVRLLVLMFWIPASSS
Proteína N° K5.1	MKLPVRLLVLMFWIPASSS
ADN N° 5.1	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTCTGCTCCAGCAGT

Tabla 13. Seis resultados del P de señal para la secuencia líder N° K5.1



> Secuencia longitud = 40

# Medición	Posición	Valor	Límite	¿péptido de señal?
máx	C 20	0,970	0,30	SÍ
máx	Y 20	0,890	0,33	SÍ
máx	S 13	0,989	0,87	SÍ
media	S 1-19	0,954	0,48	SÍ
	D 1-19	0,922	0,43	SÍ

La mayor probabilidad para la escisión está entre los restos aminoacídicos 19 y 20 (SSS-DV)

Leyenda: el algoritmo⁶ del P de señal genera la puntuación de combinación Y, de la puntuación del sitio de escisión C, y la puntuación del péptido señal S.

Tabla 14. Secuencia de proteína y de ADN de la construcción quimérica 158 VK

HindIII		
AAGCTTGC	CGCCACCATGAAGTGGCTGTAGGCTGTGGTGTGATGTTCTGGATTCTCTCCAGCAGTGA	81
K L A A T M K L P V R L L V L M F I P A S S D V L	158 VK	
ATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCCTGCAGTCTGGAGATCAAGCCCTCCATCTTCAGATCTAGTCAGAGCATTGTA		162
158 VK		
M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S I V		
CATAGTAATGGAACACCTATTIAGAAIGGTACCTGCAGAAACCAGCCAGTCTCCAAGCTCCTGATCTACAAGTTTCC		243
158 VK		
H S N G N T Y L E W Y L O K P G O S P K L L I Y K V S		
AACCGATTTCTGGGTCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAG		324
158 VK		
N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E		
GCTGAGGATCTGGAAATTTACTGCTTCAAGGTTCAATGTTCTCCGACGTTCCGTTGGAGGCCACCAAGCTCGAAATC		405
158 VK		
A E D L G I Y Y C F Q G S H V P P T F G G T K L E I		
BamHI		
AAACGTGAGTGGATCC		
K R E W I		

Tabla 15. Secuencia de ADN de 158 VH, cebador MHV5 y la secuencia derivada usando cebadores localizados en la región V

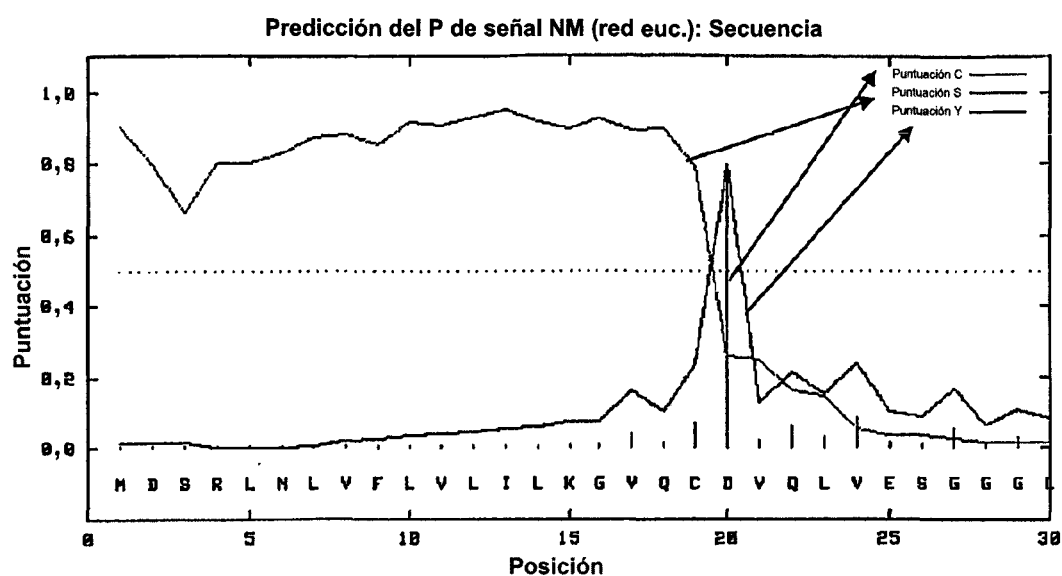
1	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCCCTTGTCCCTTATTTTAAAGSTGTCACAGTGTGAGGCTTGGGGAGGCTTA	158	VH
1	-----	***	VH
1	MHV5	
91	GTGCAGCCTGGAGGGTCCCGGAAACTCTCCTGTGCAGCCCTCTGGATTCACITTCAGTAGCTTTGGAATGCACTGGGTTTCGTCAGGCTCCA	158	VH
34	***	VH
181	GAGAAGGGCTGGAGTGGTCCGATACATTAGTAGTGGCAGTAGTACCATCTACTATGGAGACACACAGTGAAGGCCCGATTCACCATCTCC	158	VH
124	***	VH
271	AGAGACAATCCCAAGAACACCCTGTTCCCTGCAATGACCAGTCTAAGGCTGTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGAGAGGGGGA	158	VH
214	***	VH
361	TATTACTACGGTAGGAGTTACTATACTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCCAACACAGCCCCA	158	VH
304	***	VH

Leyenda: Los restos idénticos a 158 VH. Se indican con un punto. *** Secuenciación usando cebadores localizados en la región V.

Tabla 16. Selección de secuencia líder de VH quimérica - secuencia líder de VH de NL-1

líder de VH de 158	MDSRLNLFVLVLLKGVQC
Proteína NL-1	MDSRLNLFVLVLLKGVQC
ADN de NL-1	ATGGACTCCAGGCTCAATTAGTTTCCTTGTCCTATTTAAAGGTGCCAGTGT

Tabla 17. Seis resultados del P de señal para la secuencia líder de VH de NL-1



# Medición	Posición	Valor	Límite	¿péptido de señal?
máx	C 20	0,775	0,32	SÍ
máx	Y 20	0,795	0,33	SÍ
máx	S 13	0,953	0,87	SÍ
media	S 1-19	0,866	0,48	SÍ
	D 1-19	0,830	0,43	SÍ

La mayor probabilidad para la escisión está entre los restos aminoacídicos 19 y 20 (VQC-DV)

Leyenda: el algoritmo⁶ del P de señal genera la puntuación de combinación Y, de la puntuación del sitio de escisión C, y la puntuación del péptido señal S.

Tabla 18 - Secuencia de proteína y de ADN de la VH de 158 quimérico

HindIII	AAGCTTGCCGCCACCA TGGACTCCAGGCTCAA TTTAGTTTCCTTTCCTTATTTTAAAAGGTGCCAGTGTGCAG	81
	Kozak → 158 VH →	
	K L A A T M D S R L N L V F L V L I L K G V Q C D V Q	162
	CTGGTGGAGTCTEGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCGAAACTCTCCTGTCCAGCCTCTGGATTTCACITTCAGT	
	158 VH	
	L V E S G G L V Q P G G S R K L S C A A S G F T F S	243
	AGCTTTGGAATGCAC TGGTTCAGGCTCCAGAGAAGGGCTGGAGTGGTCCGCA TACATTAGTAGTGGCAGTAGTACC	
	158 VH	
	S F G M H W V R Q A P E K G L E W V A Y I S S G S S T	324
	ATCTACTGGAGACACAGTGAAGGGCCGATTCCACCATCCAGAGACAATCCCAAGAACACCCTGTTCCTGCCAAATGACC	
	158 VH	
	I Y Y G D T V K G R F T I S R D N P K N T L F L O M T	405
	AGTCTAAGGTCGAGGACCGCCATGTATTACTGTGCAAGAGAGGGGGATATTACTACGGTAGGAGTTACTACTACTATG	
	158 VH	
	S L R S E D T A M Y Y C A R E G G Y Y G R S Y Y T M	
	Apal →	
	GACTACTGGGTCAAGGAACTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC	461
	158 VH → región HC humana →	
	D Y W G Q G T S V T V S S A S T K G P	

Tabla 19 - Expresión del anticuerpo quimérico 158 en células COS

Número de Co-transfecciones	Construcciones co-transfectadas en los vectores de expresión	Concentración de anticuerpo (ng/ml)
2 agrupaciones	pG1D200158 y pKN100158	300
2 agrupaciones	pG1D200158 y pKN100158	3700

Leyenda: La concentración de anticuerpo se midió por ELISA en cultivos de 3 días de células COS transfectadas. Las células COS se co-transformaron con 10 µg de cada uno de los vectores de expresión quiméricos de cadena pesada y ligera pG1D200158 y pKN100158.

Tabla 20. Secuencia de aminoácidos de 158 VH y 158 VK

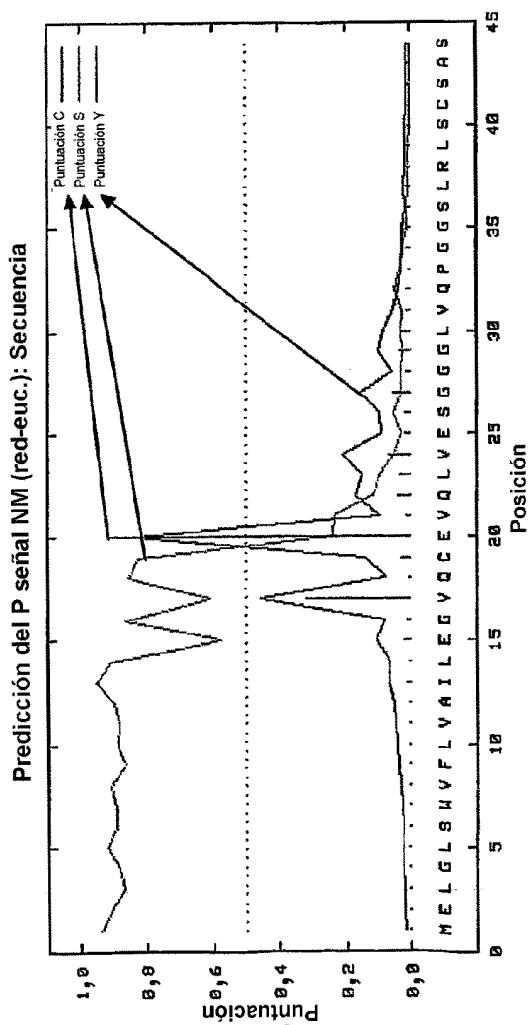
VH	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSFGMHWVROAPEKLEWVAYISSGSSTIYGDIVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDYMYCAREGGYYIGRSYYTMDYWGQGTSTVTVSS
VK	DVLTQTPLSLPLVSLGDAQSISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSINRPSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIIRVEAEIDLGIYFCFQGSHPPTFGGTKLEIK

Tabla 21. Mejores puntuaciones VCI de la región flanqueante VH humana en comparación con 158 VH.

Numeración de Kabat ⁶			2	24	26	27	28	29	30	37	39	45	47	48	49	67	69	71	73	78	91	93	94	103			
Resto canónico ⁸			-	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	1	-		
Resto de Vernier ⁷			*	-	-	*	*	*	*	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	
Resto de interfaz ⁹			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Resto de interfaz ⁹			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Resto de interfaz ⁹			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Nombre de la secuencia	Punt. FW	Punt. VCI	Restos VCI																								
158 VH	87	22	V	A	G	F	T	F	S	V	Q	L	W	V	A	F	I	R	N	L	Y	A	R	W			
38687	79	22		
AB021520	77	22		
AJ556669	77	22		
38672	77	22		
38673	77	22		
DQ322738	77	22		
AB067108	76	22		
AB021531	76	22		
AB021532	76	22		
AB063892	76	22		
AB067237	76	22		
AB021507	76	22		
AF471177	76	22		
AF471184	76	22		
AF062243	76	22		
AF174030	76	22		
AF466141	76	22		
AF466142	76	22		
AJ245279	76	22		
AJ579216	76	22		

Leyenda: En esta tabla los restos canónicos se enumeran de acuerdo con la CDR a la que están asociados. La puntuación FW y la puntuación VCI son el número de restos en la definición de FW o VCI respectivamente, que son idénticos a su equivalente en 158. Los restos idénticos a los de 158 VH se indican con un punto.

Tabla 26. Predicción del corte del péptido señal M99649

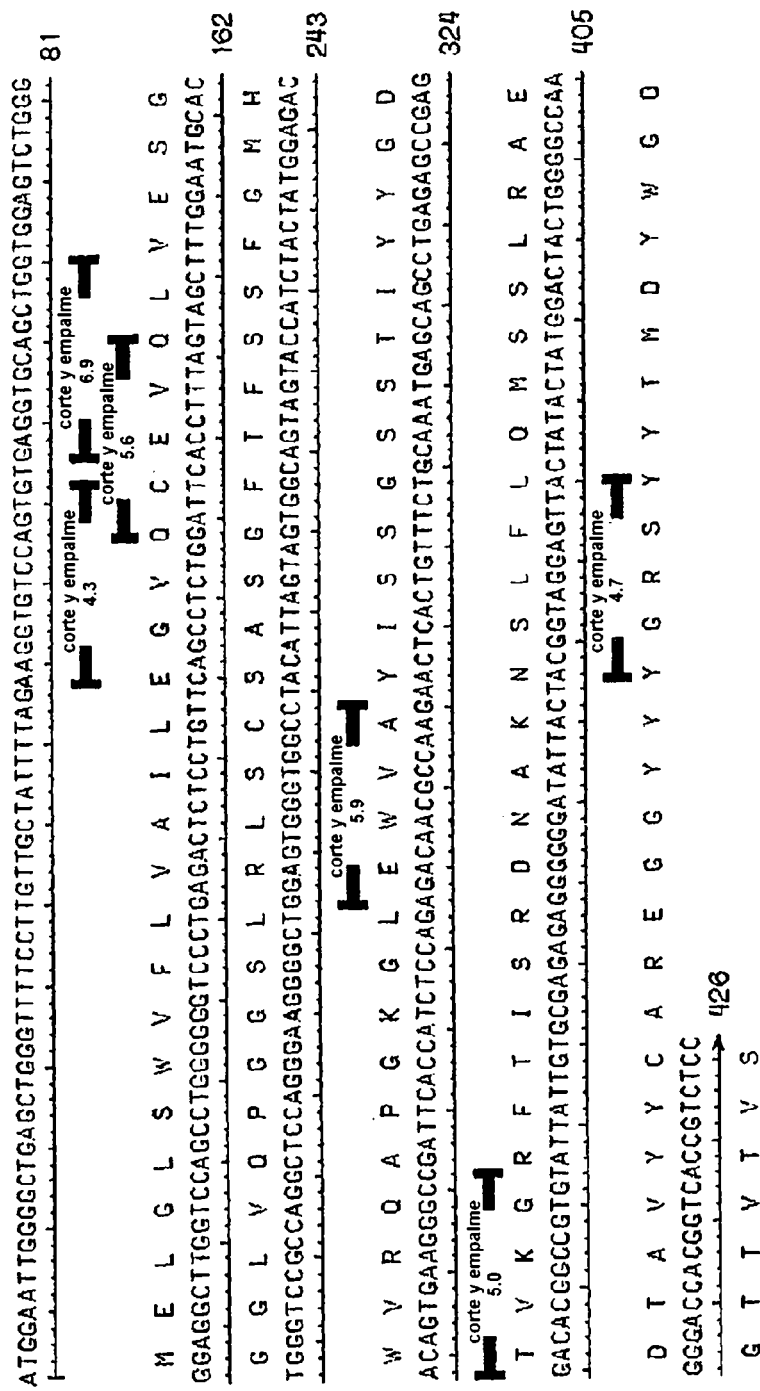


# Medición	Posición	Valor	Límite?	¿péptido de señal?
máx	C 20	0,909	0,32	SÍ
máx	Y 20	0,836	0,33	SÍ
máx	S 13	0,953	0,87	SÍ
media	S 1-19	0,859	0,48	SÍ
	D 1-19	0,848	0,43	SÍ

La mayor probabilidad para la escisión está entre los restos aminoacídicos 19 y 20 (VQC-DV)

Leyenda: el algoritmo⁶ del P de señal genera la puntuación de combinación Y, de la puntuación del sitio de escisión C, y la puntuación del péptido señal S.

Tabla 29. Secuencia de ADN y de proteína de 158RHAss



Leyenda: sitios donantes de corte y empalme predichos por análisis geneQuest de Lasergene 6.0 junto con su puntuación, usando la matriz human-ds_2 con un umbral de 4.2

Tabla 30. Mutaciones en 158RHA eliminando sitios de corte y empalme en 158RHAss

1	ATGGAATGGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGCTATTTAGAGGGAGT	158RHA
1A..T..	
158RHAss		
51	CCAGTGCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTG	158RHA
51T..G.....	
158RHAss		
101	GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTGAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAGC	158RHA
101	
158RHAss		
151	TTTGAATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGGT	158RHA
151G.....	
158RHAss		
201	GGCCTACATTAGTAGTGGCAGTAGTACCATCTACTATGGAGACACCGTGA	158RHA
201A....	
158RHAss		
251	AGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTTTCTG	158RHA
251	
158RHAss		
301	CAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGATTATTGTGCGAG	158RHA
301	
158RHAss		
351	AGAGGGGGGATATTACTACGGAAGGAGTTACTATACTATGGACTACTGGG	158RHA
351T.....	
158RHAss		
401	GCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC	158RHA
401	
158RHAss		

Leyenda: Secuencia de ADN de 158RHA en comparación con 158RHAss (Tabla 5.7.2) que contiene sitios de corte y empalme predichos. Las posiciones idénticas a 158RHA se identifican con un punto.

Tabla 31. Secuencia de ADN y de potencia de 158RHA

ATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTCCTTGTCTATTTAGAGGGAGTCCAGTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGG 81
 líder VH3-07 → 158RHA FW1
 M E L G L S W V F L V A I L E G V Q C E V Q L V E S G
 GGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCCTGTTGAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGCTTTGGAATGCAC 162
 158RHA FW1 → CDR1
 G G L V Q P G G S L R L S C S A S G F T F S S F G M H
 TGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGGCTGGAATGGGTGCCCTACATTAGTAGTGGCAGTAGTACCCTACTACTATGGAGAC 243
 158RHA FW2 → CDR2
 W V R Q A P G K G L E W V A Y I S S G S T I Y Y G D
 ACCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCAGTCTGTTTCGCAAIAGGCAGCCTGAGAGCCGAG 324
 CDR2 → 158RHA FW3
 T V K G R F T I S R D N A K N S L F L Q M S S L R A E
 GACACGGCCGTATTATTGTGGGAGAGAGGGGGGATATTACTACGGAAGGAGTTACTATGACTATGAGGAGGCTGAGGAGG 405
 158RHA FW3 → CDR3 → 158RHA F
 D T A V Y Y C A R E G G Y Y G R S Y Y T M D Y W G Q
 GGCACCGGTCACCGTCTCC 426
 158RHA FW4 →
 G T T V T V S

Tabla 32. Mejores puntuaciones VCI de VK humana con comparación con 158K

Numeración de Kabat ⁶			3	4	35	36	39	44	46	47	48	49	64	66	68	69	71	87	98
Resto canónico ⁸			1				2	2			1								
Resto de Vernier ⁷			****				*****					*							
Resto de interfaz ⁹			IIII			II													
Secuencia	Punt. Fw	Punt. VCI	Restos VCI																
158 VK	80	17	VMWYQPLLIYGGGTFYF																
AB064054	71	17	V.....																
AB063934	70	17	V.....																
AB064105	70	17	V.....																
AY941999	70	17	V.....																
AX805665	69	17	V.....																
AB064104	69	17	V.....																
AY942057	69	17	V.....																
AB064055	68	17	V.....																
AX742874	68	17	V.....																
AY685343	67	17	V.....																
AY685353	67	17	V.....																
DQ187506	70	16	I.....																
DQ187679	70	16	I.....																
AY043107	69	16	I.....																
AJ388639	69	16V.....																
AJ388646	69	16	I.....																
AJ388642	69	16	I.....																
M74470	69	16	I.....																
X72466	69	16	I.....																
U95244	69	16	I.....																
AAA51016	69	16	I.....																
X89054	69	16	I.....																
DQ187505	69	16	I.....																
DQ187683	69	16	I.....																
DQ187691	69	16	I.....																
AX805669	68	16	I.....																
AF455562	68	16	I.....																

Leyenda: En esta tabla los restos canónicos se enumeran de acuerdo con la CDR a la que están asociados. La puntuación FW y la puntuación VCI son el número de restos en la definición de FW o VCI respectivamente, que son idénticos a su equivalente en 158. Los restos idénticos a los de 158 VH se indican con un punto..

Tabla 33. Secuencias de mejor puntuación VCI de VK humana, en comparación con 158VK

Numeración de Kabat ⁶	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Canónica ⁸	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
De Vernier ⁷	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Interfaz ⁹										
VCI	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CDR de Kabat										
158 VK	DVMTQTPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIHS-NGNYLDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGHVPP-----PFRGGTKLEIK									
AB064054	DVMTQSPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIHT-NGVNELDWYLQKPGQSPKLLIYLASHRASGVEDRFRSGSGSCTDFTLRI SRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----PFRGGTKLEIK									
AB063934	DVMTQSPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIHS-NGNYLDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRASGVPDRFSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----LTFPGGTKVEIK									
AB064105 scFv	DVMTQSPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIHS-NGNYLDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRASGVPDRFSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----YTFGQGTKEIK									
AY941999 scFv	DVMTQSPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIHS-NGNYLDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRNLGYVDPDRFSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGHVPP-----WTFGQGTKEIK									
AX805665 patent	DVMTQSPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIHS-NGNYLDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRABGVEDRFRSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----HIFGQGTKEIK									
AB064104	DVMTQSPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIHS-NGNYLDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRABGVEDRFRSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----HIFGQGTKEIK									
AY942057 scFv	DVMTQSPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIHS-NGNYLDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRABGVEDRFRSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----PFRGGTKVEIK									
AB064055	DVMTQSPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIHS-NGNYLDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRABGVEDRFRSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----PFRGGTKVEIK									
AX742874	DVMTQTPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIHS-DGWTYFESYLYLQKPGQSPKLLIYKSNRABGVEDRFRSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----WTFGQGTKEIK									
AY665343	DVMTQSPLSLAVTPEGPASISCRSSQSVVFT-NGKNYLDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRABGVEDRFRSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----WTFGQGTKEIK									
AY685353	DVMTQSPLSLAVTPEGPASISCRSSQSVVFT-NGKNYLDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRABGVEDRFRSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----WTFGQGTKEIK									
DQ187506	DVMTQTPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLLES-HCNYLDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRABGVEDRFRSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----YFSGQGTKEIK									
DQ187519	DVMTQTPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIHS-NGNYLDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRABGVEDRFRSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----HIFGQGTKEIK									
AY043107	DVMTQSPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIHS-NGNYLDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRABGVEDRFRSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----LTFGGGTKVEIK									
AJ388639	DVMTQSPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIHS-NGNYFYAMYLQKPGQSPKLLIYKSNRABGVEDRFRSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----YTFGQGTKEIS									
AJ388646	DVMTQSPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIHS-NGNYLDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRABGVEDRFRSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----LTFGGGTKVEIK									
AJ388642	DVMTQSPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIHS-NGNYLDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRABGVEDRFRSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----PFRGGGTKVEIK									
M74470	DVMTQSPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIHS-NGNYLDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRABGVEDRFRSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----YTFGQGTKEIK									
X72466	DVMTQSPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIHN-NGNYLDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRABGVEDRFRSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----LTFGGGTKVEIK									
U95244	DVMTQSPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIYS-NGNYLDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRABGVEDRFRSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----LTFGGGTKVEIK									
AA451016	DVMTQSPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIHS-NGENYLDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRABGVEDRFRSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----YTFGQGTKEIK									
X89054	DVMTQSPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIHS-NGNYFDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRABGVEDRFRSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----LTFGGGTKVEIK									
DQ187505	DVMTQSPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIHS-NGNYLDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRABGVEDRFRSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----YFSGQGTKEIK									
DQ187663	DVMTQTPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIHG-NGNYLDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRABGVEDRFRSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----RFRGGGTKVEIK									
DQ187691	DVMTQTPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIHG-NGNYLDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRABGVEDRFRSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGLQTP-----RFRGGGTKVEIK									
AX805669	DVMTQSPLSLAVTPEGPASISCRSSQSLIHS-NGNYLDWYLQKPGQSPKLLIYKSNRABGVEDRFRSGSGSCTDFTLKISRVEAEDGIVYYCQGHVPP-----WTFGQGTKEIK									

Tabla 34. Alineamiento de 158 VK con la mejor puntuación VCI de VK humana

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Numeración de Kabat															
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567	DVIMTQPLSLPVISIGLQASISCRFSSGTSWIASNGRMVYVLTWYLRKQKFGQSPLLIYVWSSNEKSGVEDRFSSGSGTDFTLKISRVAEADLGIYVCFRQESHVPTVEGGGTFKLEIK	158K	AB064054	AB064394	AB064105	AY941999	AX805665	AB064104	AY942057	AB064055	AX742874	AY685343	AY685353	DQ187506	DQ187679	AY043107	AY388639	AJ388646	AJ388642	AAA51016	X89054	DQ187505	DQ187683	DQ187691	AX805669

Leyenda: Las CDR 1, 2 y 3 se indican con sombra gris.

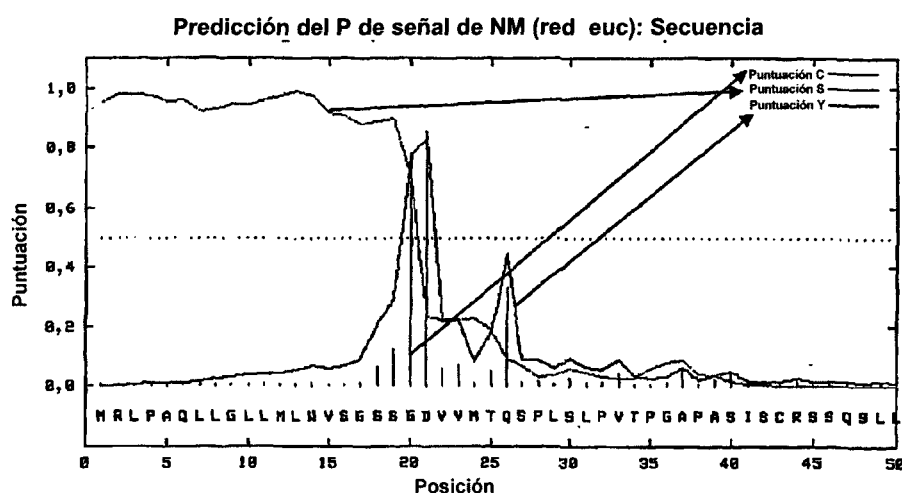
Tabla 35. Selección del péptido de señal de VK - Alineamiento de 158 VK con la línea germinal humana A19 y AB064054 humana

DVLMQTPLSLPVSIGDQASISCRSSQSIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS	158 VK
..V...S.....TP.AP.....LL.T..VNF.D.....LA.H	AB064054
.IV...S.....TP.EP.....LL...YN..D.....Q....LG..	A19
RFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPTFGGGTKLEIK	158 VK
.A.....R.....V.....M..LQT.F...P.....N	AB064054
.A.....V.V...M.ALQT.	A19

Tabla 36. Péptido señal de VK de la línea germinal A19 (VK2-28; X63397) humana

	secuencia líder VK A19
ADN	ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGG
proteína	MRLPAQLLGLLMLWVSGSSG

Tabla 37. Predicción del corte del péptido de señal A19



> Secuencia longitud = 50

# Medición	Posición	Valor	Límite?	¿péptido de señal?
máx	C 21	0,853	0,32	SÍ
máx	Y 21	0,831	0,33	SÍ
máx	S 13	0,990	0,87	SÍ
media	S 1-20	0,932	0,48	SÍ
	D 1-20	0,881	0,43	SÍ

La mayor probabilidad para la escisión está entre los restos aminoacídicos 20 y 21; SSG-DV

Leyenda: el algoritmo¹⁰ del P de señal genera la puntuación de combinación Y, de la puntuación del sitio de escisión C, y la puntuación del péptido señal S

Tabla 38. Generación de la secuencia de la proteína 158RKA

Numeración de Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456											
CDR											
158VH	DVVTQSPISL	EVTSIGDQASIS	HSLSHLSVRS	NGNTWYD	WYLPQKPGQSEPKLLIY	NSWDR	SGSGGSDFT	TIKISR	VEADGI	YGTQGS	HVP
158RKA	DVVTQSPISL	EVTSIGDQASIS	HSLSHLSVRS	NGNTWYD	WYLPQKPGQSEPKLLIY	NSWDR	SGSGGSDFT	TIKISR	VEADGI	YGTQGS	HVP
FW	DVVTQSPISL	EVTSIGDQASIS	HSLSHLSVRS	NGNTWYD	WYLPQKPGQSEPKLLIY	NSWDR	SGSGGSDFT	TIKISR	VEADGI	YGTQGS	HVP
AB064054	DVVTQSPISL	EVTSIGDQASIS	HSLSHLSVRS	NGNTWYD	WYLPQKPGQSEPKLLIY	NSWDR	SGSGGSDFT	TIKISR	VEADGI	YGTQGS	HVP

Leyenda: Las CDR (en gris) de 158VK se intercalan en la FW de AB064054 humana

Tabla 39 - Generación de la secuencia de ADN de 158RKAss - Intercalado de 158VK en la FW de AB064054

Región	ADN	Proteína
Líder A19	ATGAGGCTCCTGCTCAGCTCCTGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCTCGGATCCAGTGGG	MRLPAGLLGLMLWVSGSSG
AB064054 FW1	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTCCCGTCACTCCCTGGAGCCGCCCTCCATCCTCTGC	DVVTQSPISL
158RKA	EVTSIGDQASISHSLSHLSVRSNGNTWYD	WYLPQKPGQSEPKLLIY
AB064054 FW2	TGGTATCTGCAGAGCCAGGGCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTAT	NSWDRSGSGGSDFTTIKISRVEADGIYGTQGS
158RKA	HSLSHLSVRSNGNTWYD	WYLPQKPGQSEPKLLIY
AB064054 FW3	GGAGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGTCCAGGCACAGATTTTACACTGAGAATTCAGCAGAGTGGAGGC	NSWDRSGSGGSDFTTIKISRVEADGIYGTQGS
158RKA	TGAGGATGTGGAAATTTACTCTGC	WYLPQKPGQSEPKLLIY
AB064054 FW4	TTCGGCCCTGGACCAATTCGAAATCAAA	FGPGTKLEIK

Leyenda: líder A19 y FW de AB064054 con las CDR de 158 VK intercaladas (en gris) para generar 158RKAss

Tabla 40. Secuencia de ADN de 158RKass

ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAAATGCTCIGGGTCCTGGATCCAGTGGGATGTTGTGATGACTCAGTCT	31
M R L P A Q L L G L L M L W V S G S S G D V V M T Q S	
CCACTCCTCCCGTCAACCCTGGAGCGCGCCCTCCATCCTCCAGATCTAGTCAGAGCAATTGTACATAGTAAATGGA	162
P L S L P V T P G A P A S I S C R S S Q S I V H S N G	
AACACCTATTTAGAATGGTATCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTATAAAGTTTCCAACCGATTTTCT	243
N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S	
GGAGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGCCACAGATTTTACACTGAGAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTT	324
G V P D R F S G S G S G T D F T L R I S R V E A E D V	
GGAAATTACTGCTTCAAGGTTACATGTTCCCTCCGACGTTCCGCCCCTGGACCCAAATTGGAAATCAA	396
G I Y Y C F Q G S H V P P T F G P G T K L E I K	

Leyenda: sitios donantes de corte y empalme predichos por análisis geneQuest de Lasergene 6.0 junto con su puntuación, usando la matriz human_ds_2 con un umbral de 4.2

Tabla 41. Mutaciones en 158RKA eliminando sitios de corte y empalme en 158RKA

1	ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCTCTGGAGCAGTGGG	158RKA
1TC.....	158RKA ^{ss}
61	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGCGCGGCCTCC	158RKA
61	158RKA ^{ss}
121	ATCTCCTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAGTGG	158RKA
121A...	158RKA ^{ss}
181	TATCTTCAAAGCCAGGGCAGTCTCAAAGCTCCTGATCTATAAAGTTTCCAACCGATTT	158RKA
181G..G.....	158RKA ^{ss}
241	TCTGGAGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGAGTGGATCAGGCACAGATTTTCACTGAGAATC	158RKA
241C.....G.....	158RKA ^{ss}
301	AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCT	158RKA
301	158RKA ^{ss}
361	CCGACGTTGCGCCCTGGGACCAAATTGGAAATCAAA	158RKA
361	158RKA ^{ss}

Leyenda: secuencia de ADN de 158RKA comparada con 158RKA^{ss} (Tabla 5.13.2) que contiene sitios de corte y empalme predichos. Los restos idénticos a 158RKA se identifican con un punto.

Tabla 42. Secuencia de ADN y de la proteína de 158RKA

ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAAATGCTCTGGGTCTCTGGAAGCAGTGGGGAIGTIIGTAIGACICAGICTI	81
158RKA FW1 →	
M R L P A Q L L G L L M L W V S G S S G D V V M T O S	
CCACTCTCCCTGCCCTCAGCGCCCTCCATCTCCTCCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGA	162
158RKA FW1 →	
P L S L P V T P G A P A S I S C R S S Q S I V H S N G	
AACACCTATTAGAGTGGTATCTTCAAAGCCAGGCAGCTCCAAAGCTCTGATCTATAAAGTTCCAAACCGATTTTCT	243
158RKA FW2 →	
N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S	
GGAGTCCCTGACAGGTTCAGTGGAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTT	324
158RKA FW3 →	
G V P D R F S G S G T D F T L R I S R V E A E D V	
GGAAATTTACTGCTTCAAGGTTACATGTTCTCCGACGTTCCGGCCCTGGGACCAAATGGAAATCAA	396
158RKA FW3 →	
G I Y Y C F Q G S H V P P T F G P G T K L E I K	
158RKA FW4 →	

Figura 1

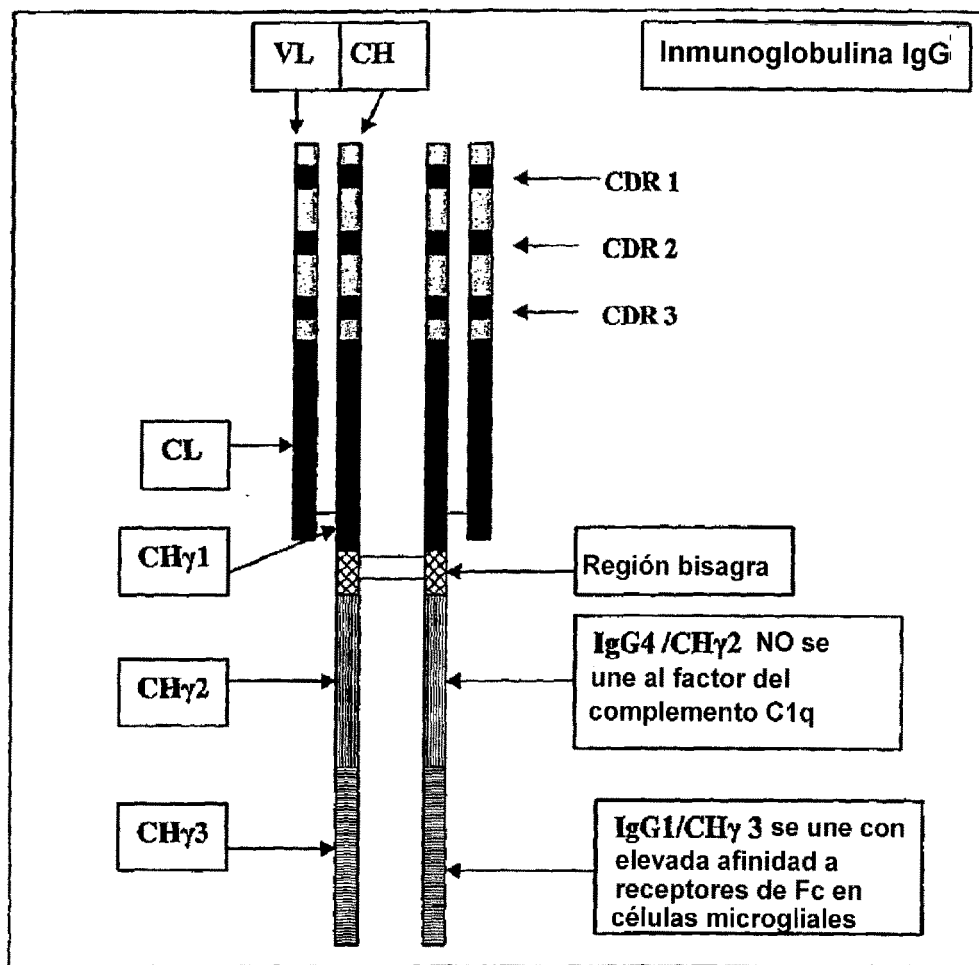


Figura 2: Caracterización de un anticuerpo monoclonal selectivo de protofibrillas de elevada afinidad

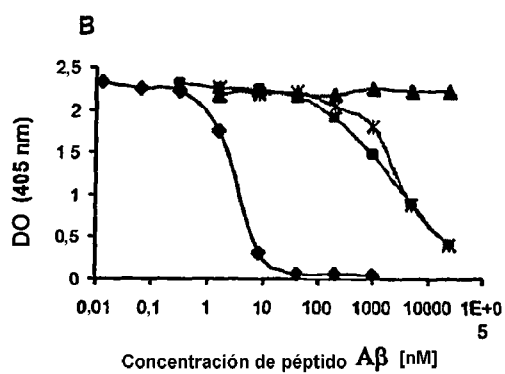
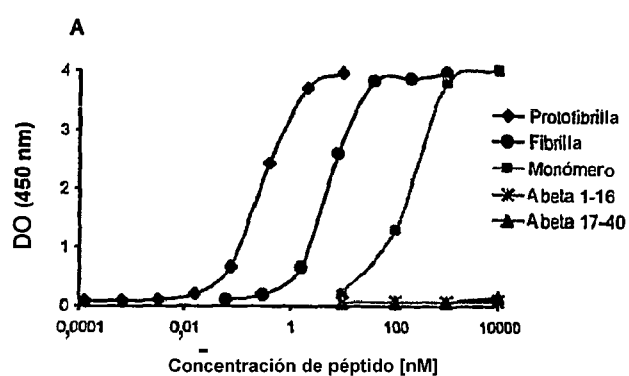


Figura 3. Eficacia terapéutica de un anticuerpo selectivo de protofibrillas de elevada afinidad en un modelo de ratón transgénico (APPsue)

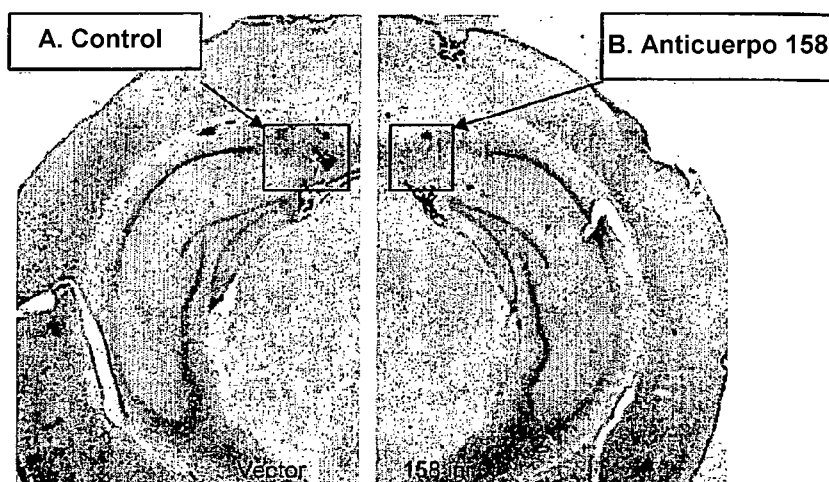
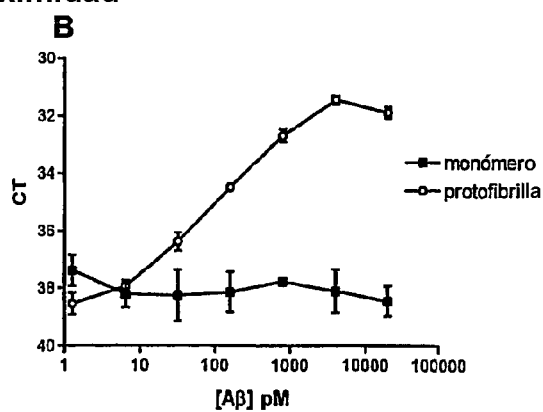


Figura 4

Las protofibrillas A β humanas se miden a niveles pM por técnica de ligamiento por proximidad



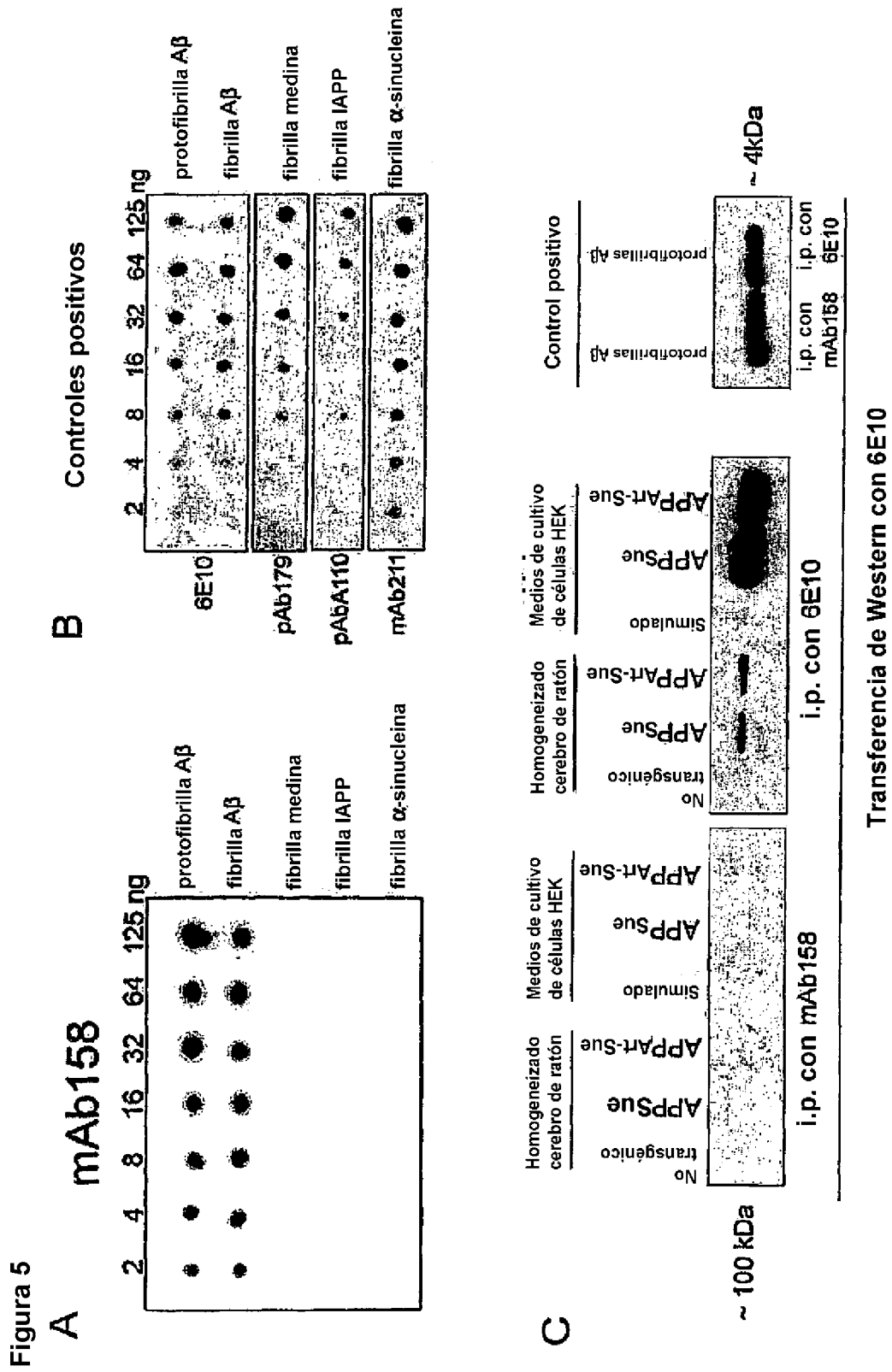


Figura 6

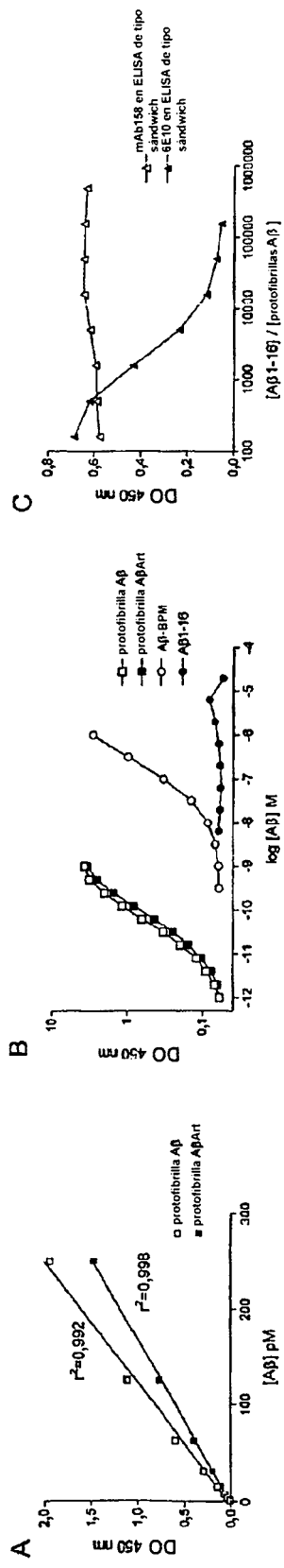


Figura 7

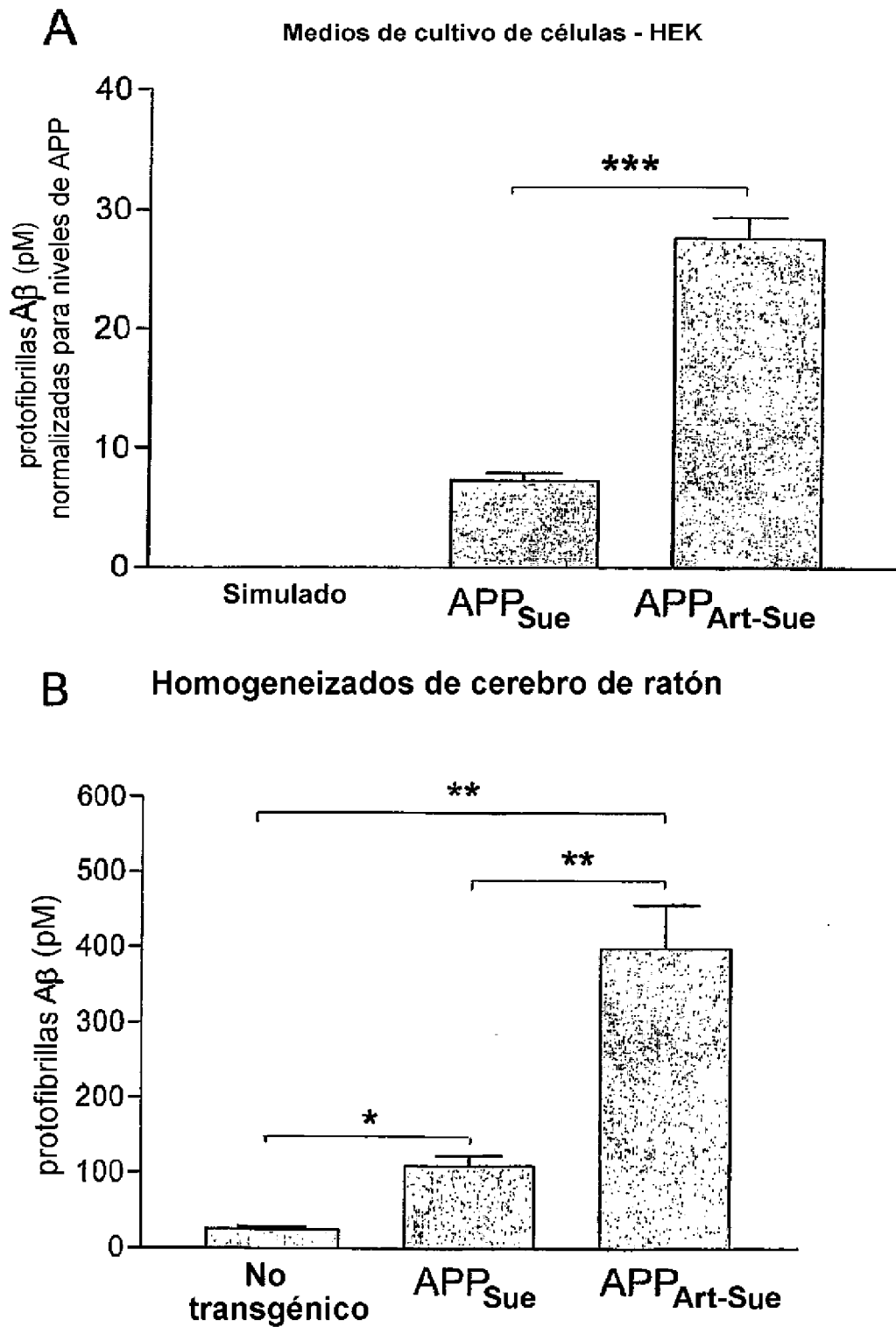


Fig. 8 Niveles de protofibrillas A β en extractos de TBS con cerebro de ratón transgénico APP_{Sueart} 4 meses después del tratamiento con mAb 158 o con placebo

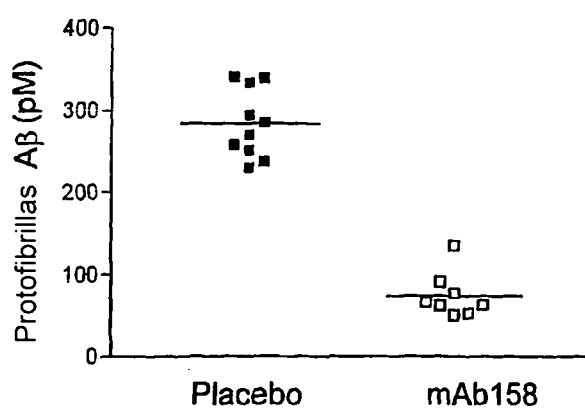


Fig. 9 Niveles de A β total en extractos de ácido fórmico con cerebro de ratón transgénico APP_{Sueart} 4 meses después

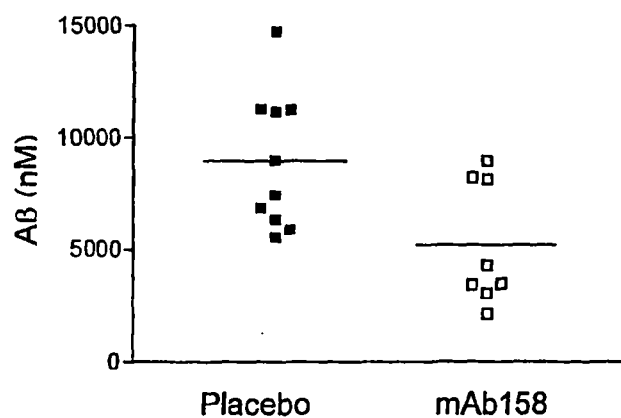


Fig. 10 Vector pKN100

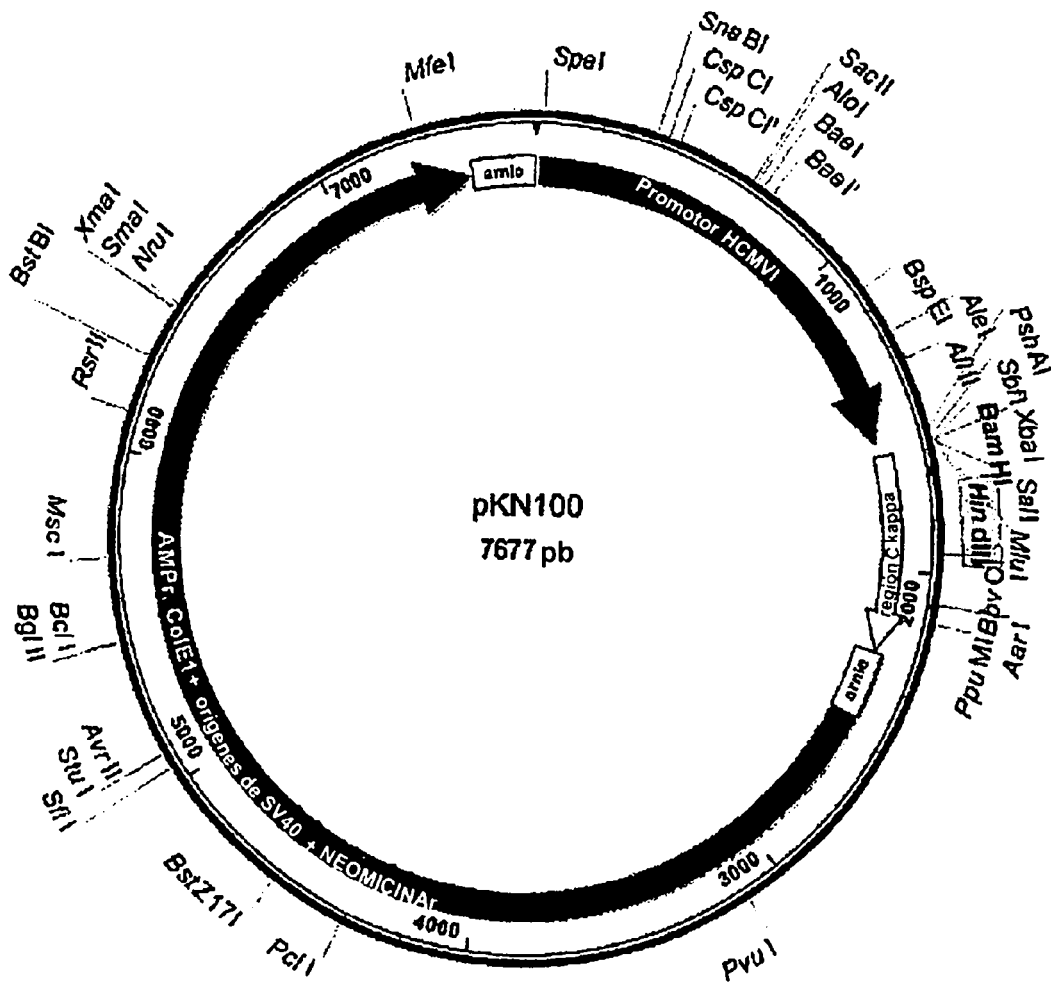


Figura 11. Vector pG1D200

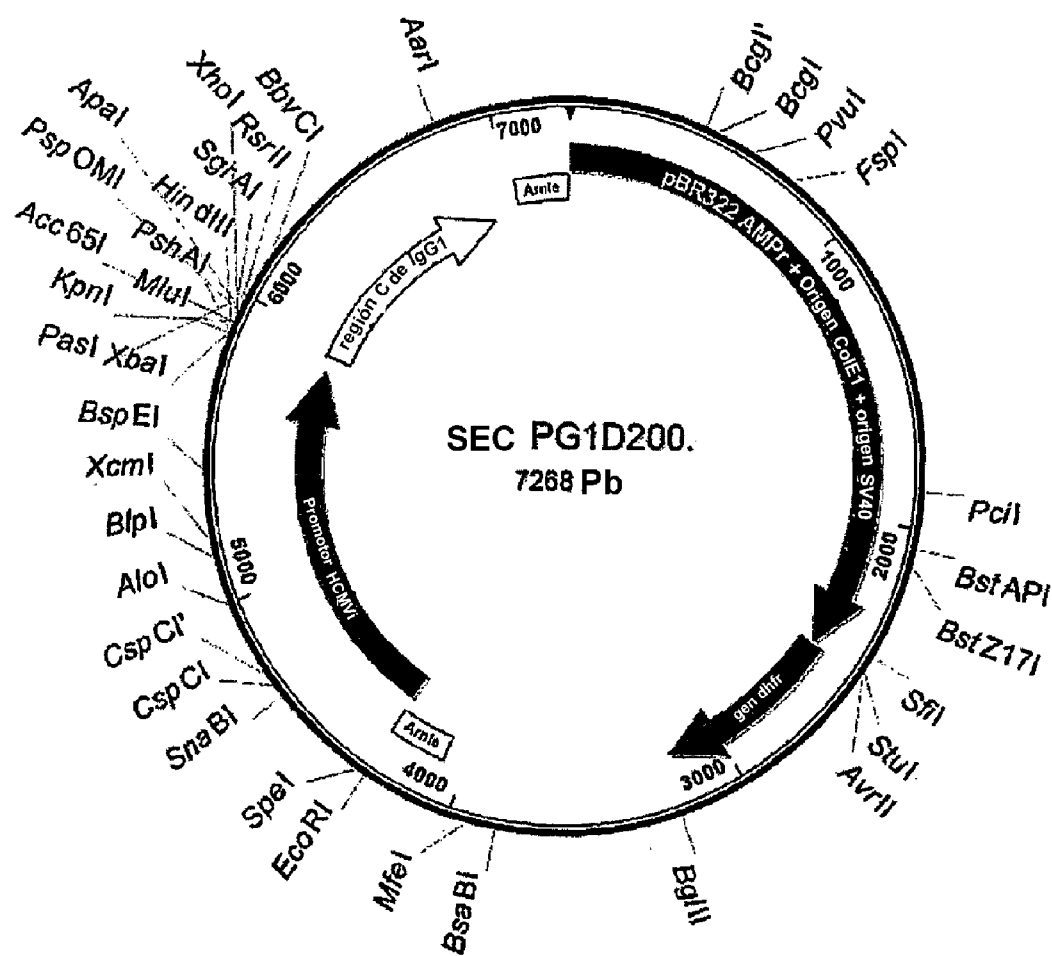
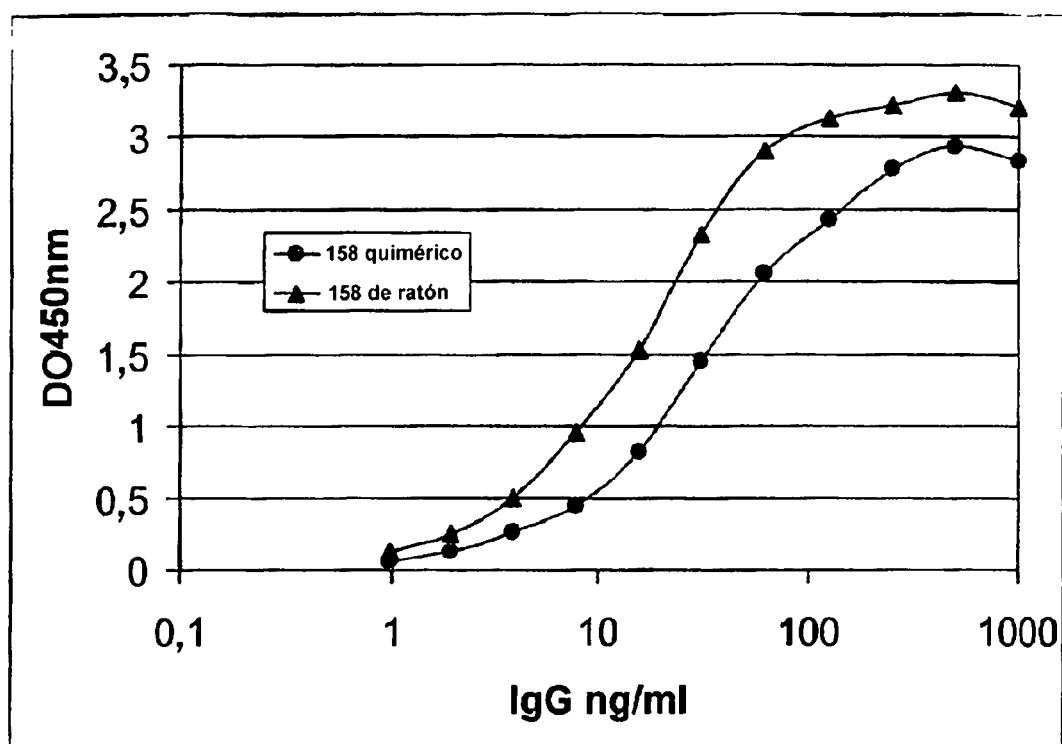
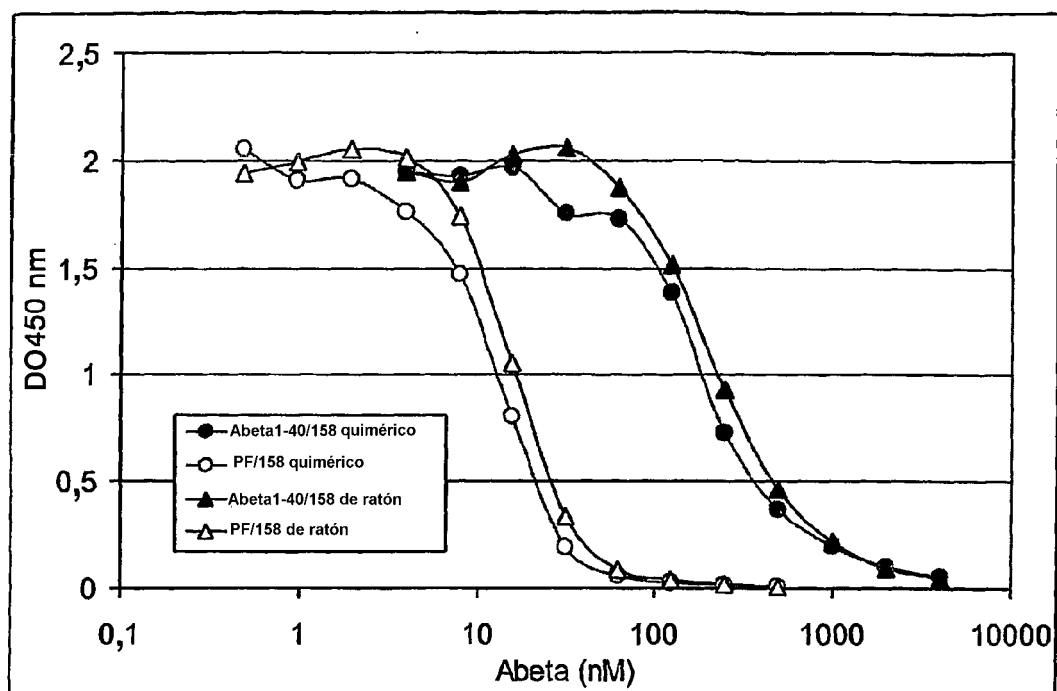


Fig. 12 Unión al monómero A β por anticuerpos 158 quimérico y de ratón

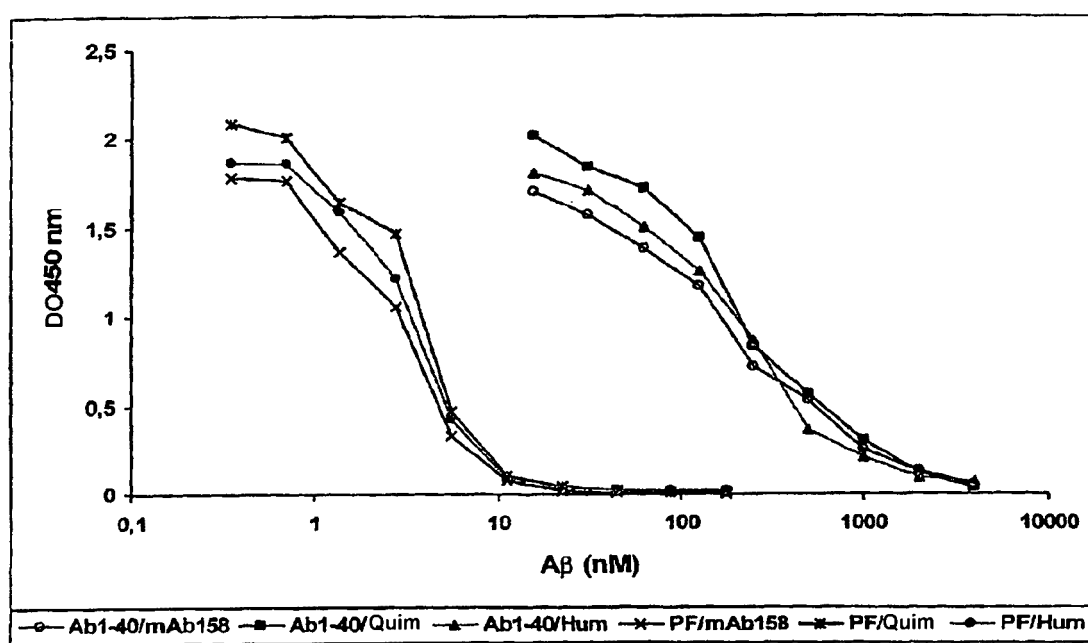
Leyenda: ELISA directo cubierto con A β 1-40 (217 ng/pocillo) y usando diluciones en serie de mAb. La cantidad de SFT a la mayor concentración (1 μ g/ml) es de 2,7%. Detección con conjugados de cadena ligera anti k de ratón o anti k humana.

Fig. 13 Competencia de A β monomérico o protofibrilar para la unión al anticuerpo quimérico 158 ó 158 de ratón



Leyenda: Se incubaron A β 1-40 monoméricos (●▲) o protofibrillas (PF) (○△) en solución con 158 quimérico (○●) o 158 de ratón (△▲). La concentración final de SFT fue de 0,3%. Después de 1 h de incubación, la mezcla se añadió a una placa cubierta con monómeros A β . La unión del anticuerpo a la placa se detectó por conjugados de cadena ligera anti- κ de ratón o anti- κ humana.

Fig. 14 Competencia de A β monomérico o protofibrilar para la unión al anticuerpo quimérico 158, 158 de ratón y 158 humanizado (BAN2401).



Leyenda: Se incubaron A β 1-40 monoméricos o protofibrillas (PF) en solución con anticuerpo 158 quimérico (quim), anticuerpo 158 de ratón (mAb158) o anticuerpo 158 humanizado BAN2401 (Hum). La concentración final de SFT fue del 0,3%. Después de 1 h de incubación la mezcla se añadió a una placa cubierta con monómeros A β . La unión del anticuerpo a la placa se detectó por conjugados de cadena ligera anti- κ de ratón o anti- κ humana.