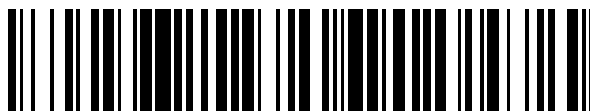


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 591**

51 Int. Cl.:
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06829502 .1**
96 Fecha de presentación: **11.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1960428**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2008**

54 Título: **ANTICUERPOS CONTRA BETA AMILOIDE CON GLICOSILACIÓN EN LA REGIÓN VARIABLE.**

30 Prioridad:
12.12.2005 EP 05027090

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.11.2011

73 Titular/es:
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
GRENZACHERSTRASSE 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:
**LOETSCHER, Hansruedi; HUBER, Walter;
SCHUHBAUER, Diana; WEYER, Karl;
BROCKHAUS, Manfred; BOHRMANN, Bernd;
KOLL, Hans; SCHAUBMAR, Andreas y
LANG, Kurt**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

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).

ES 2 368 591 T3

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra beta amiloide con glicosilación en la región variable

La presente invención se refiere a una preparación de molécula de anticuerpo purificado que se caracteriza porque al menos un sitio de unión al antígeno comprende una asparagina (Asn) glicosilada en la región variable de la cadena pesada (V_H). Más específicamente, se proporciona una molécula de anticuerpo purificado que es capaz de reconocer específicamente el péptido β -A4/A β 4 y que comprende una glicosilación en la región variable de la cadena pesada (V_H). La presente invención se refiere a una mezcla de anticuerpos que comprenden uno o dos sitios de unión al antígeno glicosilados con una asparagina (Asn) glicosilada en la región variable de la cadena pesada, es decir, mezclas de isoformas de anticuerpos que comprenden una Asn glicosilada en la región variable de la cadena pesada (V_H). También se divulgan composiciones o preparaciones de anticuerpos que comprenden específicamente isoformas de anticuerpos glicosilados. Además, se proporcionan los usos farmacéuticos y de diagnóstico para estos anticuerpos. Las isoformas de anticuerpos se pueden utilizar, por ejemplo, en la intervención farmacéutica de la amiloidogénesis o formación de placas de amiloide y/o en su diagnóstico.

Aproximadamente el 70% de todos los casos de demencia se deben la enfermedad de Alzheimer que está asociada con el daño selectivo de las regiones del cerebro y los circuitos neurales críticos para la cognición. La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por ovillos neurofibrilares, en particular, en las neuronas piramidales del hipocampo y numerosas placas de amiloide que contienen mayormente un núcleo denso de depósitos de amiloide y halos difusos.

Las placas neuríticas extracelulares contienen grandes cantidades de un péptido predominantemente fibrilado denominado " β -amiloide", "A-beta", "A β 4", " β -A4" o "A β ", ver Selkoe (1994), Ann. Rev. Cell Biol. 10, 373-403, Koo (1999), PNAS Vol. 96, págs. 9989-9990, US 4.666.829 o Glenner (1984), BBRC 12, 1131. Este β -amiloide deriva de la "proteína precursora de Alzheimer/proteína precursora de β -amiloide" (APP). Las APP son glicoproteínas de membrana integrales (ver Sisodia (1992), PNAS Vol. 89, pág. 6075) y se escinden endoproteolíticamente dentro de la secuencia A β por medio de una proteasa de membrana de plasma, α -secretasa (ver Sisodia (1992), loc. cit.). Además, una actividad adicional de la secretasa, en particular, la actividad de la β -secretasa y γ -secretasa, conduce a la liberación extracelular del β -amiloide (A β) que comprende ya sea 39 aminoácidos (A β 39), 40 aminoácidos (A β 40), 42 aminoácidos (A β 42) o 43 aminoácidos (A β 43); ver Sinha (1999), PNAS 96, 11094-1053; Price (1998), Science 282, 1078 a 1083; WO 00/72880 o Hardy (1997), TINS 20, 154.

Cabe destacar que el A β tiene muchas formas que ocurren en forma natural, donde las formas humanas se denominan como las antes mencionadas A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 y A β 43. La forma más predominante, A β 42, tiene la secuencia de aminoácidos (comenzando por el término N): DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 3). En A β 41, A β 40, A β 39, faltan los aminoácidos C-terminales, A, IA y VIA, respectivamente. En la forma A β 43, un residuo de treonina adicional está comprendido en el término C de la secuencia anteriormente descrita (SEQ ID NO: 3).

El tiempo requerido para nuclear los fibrilos de A β 40 fue significativamente mayor que para nuclear fibrilos de A β 42; ver Koo, loc. cit. y Harper (1997), Ann. Rev. Biochem. 66, 385-407. Tal como se indica en Wagner (1999), J. Clin. Invest. 104, 1239-1332, el A β 42 se encuentra, con mayor frecuencia, asociado a las placas neuríticas y se considera que es más fibrillogénico *in vitro*. También se sugirió que el A β 42 sirve como "semilla" en la polimerización dependiente de la nucleación de péptidos A β no cristalinos ordenados; Jarrett (1993), Cell 93, 1055-1058.

El procesamiento de APP modificada y/o la generación de placas extracelulares que contienen deposiciones proteínicas no sólo se conocen de la patología de Alzheimer, sino también de sujetos que sufren otros trastornos neurológicos y/o degenerativos. Estos trastornos comprenden, *inter alia*, el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de "tipo holandés", la enfermedad de Parkinson, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), la enfermedad de Creutzfeldt Jakob, la demencia relacionada con el VIH y la neuropatía motora.

Hasta el momento, sólo se han descrito esquemas de intervención médica limitados para las enfermedades relacionadas con el amiloide. Por ejemplo, se han descrito inhibidores de la colinesterasa, tales como la galantamina, la rivastigmina o el donepezil, como beneficiosos para pacientes con Alzheimer que sólo presentan una enfermedad leve a moderada. Sin embargo, también se han informado eventos adversos debido a la acción colinérgica de estos fármacos. Si bien estos tratamientos mejoradores de la acción colinérgica producen cierto beneficio sintomático, la respuesta terapéutica no es satisfactoria para la mayoría de los pacientes tratados. Se ha estimado que se produce una mejora cognitiva significativa sólo en aproximadamente un 5% de los pacientes tratados y existe escasa evidencia de que el tratamiento altere significativamente el curso de esta enfermedad progresiva.

En consecuencia, existe una gran necesidad clínica de disponer de tratamientos más eficaces y, en particular, aquellos que puedan detener o demorar la progresión de la enfermedad.

Asimismo, más recientemente se han empleado antagonistas de los receptores NMDA, como la memantina. Sin embargo, se han informado eventos adversos debido a la actividad farmacológica. Además, dicho tratamiento con

estos antagonistas de los receptores NMDA puede considerarse, simplemente, como enfoque sintomático y no como un enfoque que modifique la enfermedad.

Además se han propuesto enfoques de inmunomodulación para el tratamiento de los trastornos relacionados con el amiloide. El documento WO 99/27944 divulga conjugados que comprenden partes del péptido A β y moléculas portadoras, donde dicha molécula portadora debe mejorar la respuesta inmune. Otro método de inmunización activa se menciona en el documento WO 00/72880, donde también se emplean fragmentos de A β para inducir la respuesta inmune.

Asimismo, se han propuesto enfoques de inmunización pasiva con anticuerpos anti-A β generales en los documentos WO 99/27944 o WO 01/62801 y se han descrito anticuerpos humanizados específicos dirigidos contra partes del A β en los documentos WO 02/46237, WO 02/088306 y WO 02/088307. El documento WO 00/77178 describe anticuerpos que se unen a un estado de transición adoptado por el β -amiloide durante la hidrólisis. El documento WO 03/070760 divulga moléculas de anticuerpos que reconocen dos secuencias de aminoácidos discontinuas en el péptido A β .

El documento WO 03/016466 describe un anticuerpo anti-A β humanizado que se modifica a fin de evitar cualquier glicosilación potencial en su cadena pesada, dado que una glicosilación en la(s) región(es) variable(s) de los anticuerpos se ha descrito en Wallick (1988) J. Exp. Med. 168, 1099-1109.

El problema técnico subyacente a la presente invención es brindar medios y métodos eficaces en el manejo médico de trastornos del amiloide, en particular, medios y métodos para la reducción de las placas de amiloide perjudiciales en pacientes que necesitan una intervención médica (correspondiente).

La presente invención brinda una molécula de anticuerpo purificado que se caracteriza porque al menos un sitio de unión al antígeno comprende una asparagina (Asn) glicosilada en la región variable de la cadena pesada (V_H). El anticuerpo purificado de la invención o la composición de anticuerpos que se brinda en el presente documento está dirigida, en particular, contra el A β y/o un fragmento del A β . La molécula de anticuerpo purificado que se brinda en el presente documento y, en particular, la composición de anticuerpos o preparación de anticuerpos de la invención, es útil en la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico para el tratamiento, reducción o prevención de una enfermedad asociada con la amiloidosis y/o formación de placas de amiloide. Un ejemplo de dicha enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.

En consecuencia, la presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Por tanto, se refiere a una composición que comprende una molécula de anticuerpo que puede reconocer específicamente el péptido β -A4/A β 4, siendo dicha molécula de anticuerpo una molécula de anticuerpo monoglicosilado o una molécula de anticuerpo doblemente glicosilado o en la que dicha composición comprende una mezcla de dicha molécula de anticuerpo monoglicosilado y dicha molécula de anticuerpo doblemente glicosilado,

- en la que dicha molécula de anticuerpo monoglicosilado comprende una asparagina (Asn) glicosilada en la posición 52 de la SEQ ID NO:2 o de la SEQ ID NO:6 en la región variable de la cadena pesada (VH) y en la que dicha molécula de anticuerpo doblemente glicosilado comprende una asparagina (Asn) glicosilada en la posición 52 de la SEQ ID NO:2 o de la SEQ ID NO:6 en la región variable de la cadena pesada (VH) de ambos sitios de unión del anticuerpo,

- en la que dicha molécula de anticuerpo comprende una CDR1 en la cadena pesada variable tal como se muestra en la SEQ ID NO: 10, una CDR2 en la cadena pesada variable tal como se muestra en la SEQ ID NO: 12, una CDR3 en la cadena pesada variable tal como se muestra en la SEQ ID NO: 14, una CDR1 en la cadena ligera variable tal como se muestra en la SEQ ID NO: 16, una CDR2 en la cadena ligera variable tal como se muestra en la SEQ ID NO: 18 y una CDR3 en la cadena ligera variable tal como se muestra en la SEQ ID NO: 20,

y mediante lo cual dicha composición comprende menos del 5% de una molécula de anticuerpo que se caracteriza porque ningún sitio de unión al antígeno de dicha molécula de anticuerpo comprende una asparagina (Asn) glicosilada en la región variable de la cadena pesada (VH).

En el contexto de esta invención, se descubrió sorprendentemente que las moléculas de anticuerpos purificados, donde al menos un sitio de unión al antígeno comprende una glicosilación unida a N en la región variable de la cadena pesada, es particularmente útil, por ejemplo, en la reducción de las placas de amiloide. Además, se ha descubierto en el contexto de esta invención que los anticuerpos glicosilados o las composiciones de anticuerpos que se brindan en el presente documento son particularmente útiles y eficaces para cruzar la barrera hematoencefálica/borde hematoencefálico *in vivo* ilustrado por la unión eficaz de las placas.

Esto es muy diferente de las enseñanzas de la técnica anterior. El documento WO 03/016466 divulga anticuerpos que están específicamente modificados para carecer de un sitio de N-glicosilación en la cadena pesada y se describe que la glicosilación en la estructura de la región variable tiene un efecto negativo en la afinidad de la unión de los anticuerpos. Se describe en la técnica anterior que el anticuerpo anti-A β descrito en una forma

desglucosilada de la región CDR2 variable de la cadena pesada tiene una afinidad notablemente mayor con el péptido A β sintético y purificado *in vitro*.

En consecuencia, la presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo purificado mejorado o una preparación de anticuerpos, en particular, una preparación de moléculas de anticuerpos que se dirigen contra el péptido A β 4/A β (amiloides β) y que es altamente eficaz *in vivo*. La mejora de la preparación de molécula de anticuerpo/preparación de anticuerpos del presente documento radica en la provisión de moléculas de anticuerpos purificados que comprenden una N-glicosilación en al menos una de sus regiones variables en la cadena pesada, por ejemplo, en la región CDR2 de dicha región variable de la cadena pesada. Tal como se ha mencionado anteriormente, esto se diferencia de la técnica anterior de acuerdo con el documento WO 03/016466 que describe que dicha N-glicosilación tiene que evitarse en anticuerpos dirigidos contra, por ejemplo, el A β .

Los ejemplos de molécula de anticuerpo de la presente invención son las moléculas de inmunoglobulina, por ejemplo, las moléculas de IgG. Las IgG se caracterizan por comprender dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas (que se ilustra, por ejemplo, en la figura 14) y estas moléculas comprenden dos sitios de unión al antígeno. Dichos sitios de unión al antígeno comprenden "regiones variables", compuestas por partes de las cadenas pesadas (V_H) y partes de las cadenas ligeras (V_L). Los sitios de unión al antígeno se forman por yuxtaposición de los dominios V_H y V_L. Para información general sobre las moléculas de anticuerpo o moléculas de inmunoglobulina ver también los textos comunes, como Abbas "Cellular and Molecular Immunology", W.B. Saunders Company (2003).

Por ejemplo, en la provisión de una molécula de inmunoglobulina caracterizada en la presente invención, se describe un anticuerpo donde un sitio de unión al antígeno comprende una asparagina (Asn) glicosilada en la región variable correspondiente de la cadena pesada (V_H). Dicho anticuerpo se denomina en el presente documento "ANTICUERPO monoglicosilado", ver también la figura 14.

Se proporciona una molécula de inmunoglobulina donde ambos sitios de unión al antígeno comprenden una asparagina glicosilada (Asn) en la región variable de las cadenas pesadas (V_H) correspondientes. Dicha molécula de anticuerpo se denomina en adelante "ANTICUERPO doblemente glicosilado", ver figura 14.

Una inmunoglobulina donde ningún sitio de unión al antígeno comprende una asparagina (Asn) glicosilada en la región variable de la cadena pesada (V_H) se denomina en adelante "ANTICUERPO no glicosilado".

El ANTICUERPO monoglicosilado, el ANTICUERPO doblemente glicosilado y el ANTICUERPO no glicosilado pueden comprender secuencias de aminoácidos idénticas o secuencias de aminoácidos diferentes. El término "ANTICUERPO" comprende, por consiguiente, moléculas de anticuerpo, en particular, moléculas de anticuerpo producidas de un modo recombinante, como las inmunoglobulinas. Sin embargo, tal como se describe más adelante, la frase "molécula(s) de ANTICUERPO" también comprende isoformas conocidas y modificaciones de inmunoglobulinas, como los anticuerpos de cadena única o fragmentos Fv de cadena única (scAB/scFv) o estructuras de anticuerpos biespecíficas, y dichas isoformas y modificaciones se caracterizan por comprender al menos una región V_H glicosilada tal como se define en el presente documento. Un ejemplo específico de dicha isoforma o modificación puede ser un anticuerpo sc (cadena única) en el formato V_H-V_L o V_L-V_H, donde dicha V_H comprende la glicosilación que se describe en el presente documento. También se contemplan scFvs biespecíficos, por ejemplo, en el formato V_H-V_L-V_H-V_L, V_L-V_H-V_H-V_L, V_H-V_L-V_L-V_H, que comprenden la glicosilación que se describe en el presente documento en la región CDR-2.

En el contexto de la presente invención, se emplea el término "ANTICUERPO" en mayúsculas a fin de proporcionar una mejor claridad. Sin embargo, el término "anticuerpo" utilizado también en minúsculas se utiliza en el contexto de la presente solicitud. Los términos "ANTICUERPO"/"ANTICUERPOS"/"anticuerpo" y "anticuerpos" se utilizan indistintamente.

El "ANTICUERPO monoglicosilado" y el "ANTICUERPO doblemente glicosilado" se refieren en el presente documento a "isoformas de ANTICUERPOS glicosilados". Una molécula de anticuerpos purificados, caracterizada porque al menos un sitio de unión al antígeno comprende una asparagina (Asn) glicosilada en la región variable de la cadena pesada (V_H), es un ANTICUERPO monoglicosilado que está libre o en un menor grado asociado a una isoforma seleccionada entre un ANTICUERPO doblemente glicosilado y un ANTICUERPO no glicosilado, es decir, un "ANTICUERPO monoglicosilado purificado". Un ANTICUERPO doblemente glicosilado en el contexto de la presente invención está libre o en menor grado asociado a una isoforma seleccionada entre un ANTICUERPO monoglicosilado y un ANTICUERPO no glicosilado, es decir, un "ANTICUERPO doblemente glicosilado purificado".

La frase "que está libre o en un menor grado" indica la ausencia completa de las otras isoformas (de glicosilación) respectivas o la presencia de otra isoforma (glicosilada) en una concentración del 10% como máximo, por ejemplo, del 5% como máximo, por ejemplo, del 4% como máximo, por ejemplo, del 3% como máximo, por ejemplo, del 2% como máximo, por ejemplo, del 1% como máximo, por ejemplo, del 0,5% como máximo, por ejemplo, del 0,3% como máximo, por ejemplo, del 0,2% como máximo. Se proporciona mayor información al respecto más adelante en los ejemplos adjuntos.

En el contexto de la presente invención, la frase “anticuerpo(s) monoglicosilado(s)” o “ANTICUERPO(S) monoglicosilado(s)” se refiere a moléculas de anticuerpos que comprenden una N-glicosilación en una región (V_H) de una molécula de anticuerpo individual, por ejemplo, de una inmunoglobulina, por ejemplo, una IgG, por ejemplo, de una IgG1. Por ejemplo, dicha “forma monoglicosilada” comprende una glicosilación en una región variable de la cadena pesada, por ejemplo, en la posición de la asparagina “Asn 52” tal como se define más adelante. Esta “forma de IgG1 glicosilada o isoforma monoglicosilada” también puede comprender, tal como se ilustra en la el presente documento, la glicosilación en el sitio de glicosilación bien conservado en la parte Fc, por ejemplo, la asparagina Asn 306 en la parte Fc no variable.

La frase “anticuerpo(s) doblemente glicosilado(s)” o “ANTICUERPO(S) doblemente glicosilado(s)” en el significado de la presente invención comprende la glicosilación que se define en el presente documento en ambas regiones variables de la región de la cadena pesada (V_H). Nuevamente, esta “forma doblemente glicosilada” comprende una glicosilación en la región variable de ambas cadenas pesadas, en particular, en la posición de la asparagina Asn 52 que se describe más adelante y como se ejemplifica en los ejemplos adjuntos. Esta forma de IgG1 doblemente glicosilada o isoforma doblemente glicosilada” también puede comprender, tal como se ilustra en el presente documento, la glicosilación en el sitio de glicosilación bien conservado en la parte Fc no variable/constante, en particular, en la posición 306 de la inmunoglobulina ejemplificada. La figura 14 adjunta ilustra las moléculas de anticuerpos correspondientes.

Los anticuerpos que carecen de dicha modificación postraducciona en la región variable, por ejemplo, en ambas regiones variables de la cadena pesada (ambas regiones (V_H)) se consideran, en el contexto de la presente invención, una “forma no glicosilada” que no comprende glicosilación en la región variable de la cadena pesada. Sin embargo, esta “forma no glicosilada” puede comprender (a) glicosilación(es) en la región constante (región-C) del anticuerpo, por ejemplo, y más comúnmente en el sitio de glicosilación bien conservado de parte Fc, en particular, la asparagina (Asn) 306 en la parte Fc no variable/constante tal como se define en el presente documento, ver también la SEQ ID NO:6.

La asparagina (Asn) glicosilada en la región variable de la cadena pesada (V_H) puede encontrarse en la región determinante de complementariedad 2 (región CDR2). Dicha asparagina glicosilada (Asn) en la región variable de la cadena pesada (V_H) puede encontrarse en la posición 52 de la región variable tal como se define más adelante y se muestra en la SEQ ID No. 2 (o en la posición 52 de la SEQ ID NO:6 que también comprende la parte Fc de una cadena pesada de anticuerpos tal como se divulga en el presente documento).

Las isoformas de ANTICUERPOS también pueden comprender (a) glicosilación(es) adicional(es) en la parte constante/no variable de las moléculas de anticuerpos, por ejemplo, en la parte Fc de una IgG, por ejemplo, en la parte Fc en una IgG1. Dicha glicosilación en la parte Fc se refiere a una glicosilación bien conservada, que se caracteriza por ubicarse en la posición Asn306 de la cadena pesada, por ejemplo, de acuerdo con la siguiente secuencia:

QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINASGTRTTYADSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 6).

Esta secuencia también se describe más adelante en la presente y se indican las CDRs, regiones CH, regiones pesadas, así como también dos sitios de N-glicosilación (N52 y N306):

QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS

AINASGTRTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

GKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 6).

en recuadro: CDR1, 2, 3

subrayado: CH1

en cursiva: articulación

subrayado doble: CH2

subrayado con línea de puntos: CH3

en **negrita N**: sitios de glicosilación unidos a N

La región IgG-Fc de los anticuerpos de la presente invención puede ser un homodímero compuesto por regiones de articulación con enlaces de disulfuro entre las cadenas, dominios C_{H2} glicosilados, que tienen oligosacárido unido al N en la asparagina 306 (Asn-306) de los dominios C_{H2} y C_{H3} no covalentemente apareados. El oligosacárido de la glicosilación en Asn-306 es del tipo biantenarico complejo y puede comprender una estructura de heptasacárido central con adición variable de los azúcares de brazos externos.

El oligosacárido influencia o determina la estructura y función Fc (Jefferis (1998) Immunol Rev. 163, 50-76). Las funciones efectoras, entre ellas las interacciones IgG-Fc/ligando efector específicas particulares, se mencionan en (Jefferis (2002) Immunol Lett. 82(1-2), 57-65 y Krapp (2003) J Mol Biol. 325(5), 979-89). Esta Asn 306 en la posición Fc conservada corresponde a la "Asn-297" en el sistema-Kabat (Kabat (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^o Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda MD).

La cadena pesada ejemplificada puede ser codificada por la siguiente secuencia:

cagggtgaattggtggaagcgggcgggcctggtgcaaccgggcgggcagcctgctgtagctgcgcgccctccggattaccttagcagctatgcatgagct
gggtgcgcaagccccctggaagggctcgtgagtgagcgctattatgcttctggtactcgactattatgctgattctgtaagggctgtttaccatttcacgtgata
attcgaaaaacacccctgtatctgcaaatgaacagcctgctgctggaagatacggccgtgtattatgctgctggtgaagggtaataactcataagccttatggtatgtt
cgttattttgatgtttggggccaaggcaccctggtgacggttagctcagcctccaccaagggctccatcggtcttccccctggcacccctcctcaagagcacctctggtggg
cacagcgccctgggtgctggtgcaaggactacttccccgaaccggtagcgggtgctggtggaactcaggcgccctgaccagcgcgctgcacaccttccccgctgtc
ctacagctcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacggcgtgccccagcagctgggacccagacctacatctgcaacgtgaatcacagccccagcaaca
ccaaggtggacaagaaagttgagccagatatcgtgcgatatcgtgcaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgcccagcacctgaactcctggtggg
accgtcagcttcttcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctccggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagacctgag
gtcaagttcaactgtgtagcggcggtgaggtgcataatgccaagacaaagccgcgaggagcagtagacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcac
cgtcctgcaccagagctggtgtaattggaaggagtagaaggtcaaggttccaacaaagccctccagccccatcgagaaaacctctccaaagccaaaggg
cagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcga
catcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccgggagacaactacaagaccacgcctccgtgctggactccgacggctccttctctctacagcaagctcac
cgtggacaagagcaggtggcagcgggaacgttctctcatgtctcgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggt
aatga (SEQ ID NO: 5).

Dicha cadena pesada también puede comprender (en particular, durante su producción recombinante) secuencias adicionales, como "secuencias líderes". Un ejemplo correspondiente es codificado por la siguiente secuencia:

atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctccagatgggtctctgcc (seguida por)
cagggtgaattggtggaagcgggcgggcctggtgcaaccgggcgggcagcctgctgtagctgcgcgccctccggattaccttagcagctatgcatgagct
gggtgcgcaagccccctggaagggctcgtgagtgagcgctattatgcttctggtactcgactattatgctgattctgtaagggctgtttaccatttcacgtgata
attcgaaaaacacccctgtatctgcaaatgaacagcctgctgctggaagatacggccgtgtattatgctgctggtgaagggtaataactcataagccttatggtatgtt
cgttattttgatgtttggggccaaggcaccctggtgacggttagctcagcctccaccaagggctccatcggtcttccccctggcacccctcctcaagagcacctctggtggg
cacagcgccctgggtgctggtgcaaggactacttccccgaaccggtagcgggtgctggtggaactcaggcgccctgaccagcgcgctgcacaccttccccgctgtc
ctacagctcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacggcgtgccccagcagctgggacccagacctacatctgcaacgtgaatcacagccccagcaaca
ccaaggtggacaagaaagttgagccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgcccagcacctgaactcctggtgggggacggcagcttcttcttcccc
ccaaaacccaaggacacctcatgatctccggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtg
gacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgaggagcagtagacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgaccagagactgg
ctgaatggaaggagtagaaggtcaaggttccaacaaagccctccagccccatcgagaaaacctctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
ggtgtacacctgcccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgga
gagcaatgggcagccgggagacaactacaagaccacgcctccgtgctggactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggt
ggcagcaggggaacgttctctcatgtctcgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga (SEQ ID NO: 25)

la secuencia de aminoácidos correspondiente sería:

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLS (seguida por)
QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINASGTRTYADSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGKGNTHKPYGYVRYFDVWQGGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 26).

La secuencia anterior también comprende un "péptido señal" y dicho péptido señal es escindido proteolíticamente por la peptidasa señal huésped durante el trayecto secretor, durante la producción de las moléculas de anticuerpos de la invención en células huéspedes, como ser células CHO.

Alternativamente, dicha cadena pesada puede ser codificada por una secuencia de ácido nucleico que es optimizada para la producción recombinante, tal como se ejemplifica en la siguiente secuencia:

```

1   atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggatga
51  ttcatggaga aatagagaga ctgagtgatga gtgaacatga gtgagaaaaa
5   101 ctggatttgt gtggcatttt ctgataacgg tgccttctg ttgcagggtg
    151 tccagtgt
seguida por:
        ca ggtggagctg gtggagtctg ggggaggcct ggtccagcct
201 ggggggtccc tgagactctc ctgtgcagcg tctggattca ccttcagtag
10  251 ctatgccatg agctgggtcc gccaggctcc aggcaagggg ctgagtgagg
    301 tgtccgcat aaacgccagc ggtaccgca cctactatgc agactccgtg
    351 aagggccgat tcacatctc cagagacaat tccaagaaca cgctgtatct
    401 gcaaatgaac agcctgagag ccgaggacac ggctgtgtat tactgtgcga
    451 gaggcaaggg gaacaccac aagccctacg gctacgtacg ctactttgac
15  501 gtgtggggcc aaggaaccct ggtcaccgtc tctcagggtg agtctcaca
    551 acctctctcc tgcggccgca gctgaagtc tgaggcagaa tctgtccag
    601 ggtctatcgg actcttgtga gaattagggg ctgacagtgt atggtgacaa
    651 tttaggggtc agtgactgtc tggtttctct gaggtgagac tgaatatag
    701 gtcacctga agactaaaga ggggtccagg ggcttttctg cacaggcagg
20  751 gaacagaatg tggaacaatg actgaatgg ttgattcttg tgtgacacca
    801 agaattggca taatgtctga gttgccaag ggtgatctta gctagactct
    851 ggggttttg tcgggtacag aggaaaaacc cactattgtg attactatgc
    901 tatggactac tgggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tcaggaaga
    951 atggcctctc caggcttta ttttaacct ttgtatgga gtttctgag
25  1001 cattgcagac taatcttga tattgccct gagggagccg gctgagagaa
    1051 gttgggaaat aaatctgtct agggatctca gagccttag gacagattat
    1101 ctccacatct ttgaaaaact aagaatctgt gtgatggtgt tggaggagtc
    1151 cctggatgat gggatagggg cttggaggc tcatttgagg gagatgctaa
    1201 aacaatccta tggctggagg gatagttggg gctgtagtgt gagatttca
30  1251 gtttttagaa tgaagtatta gctgcaatac ttcaaggacc acctctgtga
    1301 caaccatttt atacagatc caggcatagg gacaaaaagt ggagtggggc
    1351 acttcttta gatttgtgag gaatgtcca cactagattg ttaaaaact
    1401 catttgttg aaggagctgt ctagtgatt gagtcaaggg agaaaggcat
    1451 ctaggctcgg tctcaaaagg gtagttgctg tctagagagg tctgtggag
35  1501 cctgcaaaag tccagcttc aaaggaacac agaagtatgt gtatggaata
    1551 ttagaagatg ttgcttttac tctaaagtg gttcctagga aaaatagtta
    1601 aatactgtga ctttaaatg tgagaggggt tcaagtact catttttta

```

1651 aatgtccaaa atttttgtca atcaatttga ggtcttgttt gtgtagaact
 1701 gacattactt aaagttaac cgaggaatgg gagtgaggct ctctcatacc
 1751 ctattcagaa ctgacttta acaataataa attaagtta aaatatttt
 1801 aaatgaattg agcaatgttg agttgagtca agatggccga tcagaaccgg
 5 1851 aacacctgca gcagctggca ggaagcaggt catgtggcaa ggctatttgg
 1901 ggaagggaaa ataaaaccac taggtaaact ttagctgtg gttgaagaa
 1951 gtggtttga aacctctgt ccagccccac caaacgaaa gtccaggctg
 2001 agcaaaacac cacctgggta atttgcattt ctaaaataag ttgaggattc
 2051 agccgaaact ggagagggtcc tctttaact tattgagttc aacctttaa
 10 2101 ttttagcttg agtagttcta gttcccaa acttaagtt atcgacttct
 2151 aaaatgtatt tagaattcga gtcggtaca gcttctggg gcaggccagg
 2201 cctgaccttg gcttggggc agggaggggg ctaaggtag gcagggtggc
 2251 ccagcagggt cacaccaat gccatgagc ccagacctg gacgtgaac
 2301 ctgcggaca gtaagaacc caggggcctc tgcgctggg cccagctctg
 15 2351 tccacaccg cggtcacatg gcaccacctc tctgcagcc tccaccaagg
 2401 gccatcgggt ctccccctg gcaccctct ccaagagcac ctctggggc
 2451 acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttcccc aaccggtgac
 2501 ggtgtcgtg aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac acctccccg
 2551 ctgtctaca gtctcagga ctctactcc tcagcagcg ggtgacctg
 20 2601 ccctccagca gcttgggcac ccagacctac atctgaacg tgaatcaca
 2651 gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tggtagagg ccagcacagg
 2701 gagggagggt gctgctgga agccaggctc agcgtctct cctggacgca
 2751 tccggctat gcagccccag tccagggcag caaggcaggc cccgtctgcc
 2801 tcttccccg gagcctctc cgccccact catgtcagg gagagggtct
 25 2851 tctggcttt tccaggctc tgggcaggca caggctagg gccctaacc
 2901 caggccctgc acacaaagg gcagggtctg ggctcagacc tgccaagagc
 2951 catatccggg aggacctgc ccctgacct agccacccc aaaggccaaa
 3001 ctctccact cctcagctc gacacctct ctctccag attccagtaa
 3051 ctccaatct tctctgca gagccaaat ctgtgacaa aactcacaca
 30 3101 tgccaccgt gccaggtaa gccagccag gcctgcctt ccagctcaag
 3151 gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat ccaggacag gccccagccg
 3201 ggtgtgaca cgtccacctc catctcttc tcagcacctg aactcctggg
 3251 gggacctgca gtcttctct tcccccaaa accaaggac acctcatga
 3301 tctccggac ccctgaggtc acatgcgtg tggtagacgt gagccacgaa
 35 3351 gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgt gacggcgtg aggtgcataa
 3401 tgccaagaca aagccgagg aggagcagta caacagcac taccgtgtg
 3451 tcagcgtct caccgtctg caccaggact ggctgaatg caaggagtac

3501 aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaacat
 3551 ctccaaagcc aaaggtggga cccgtgggt gcgaggcca catggacaga
 3601 ggccggctcg gccaccctc tgccctgaga gtgaccgtg taccaacctc
 3651 tgtccctaca gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat
 5 3701 cccgggatga gctgaccaag aaccagggtca gcctgacctg cctgtgcaaa
 3751 ggctctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc
 3801 ggagaacaac tacaagacca cgctcccggt gctggactcc gacggctcct
 3851 tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcagggt gcagcagggg
 3901 aacgtctct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac
 10 3951 gcagaagagc ctctccctgt ccccgggcaa atga (SEQ ID NO: 23).

La secuencia de proteínas “alternativa” tal como se muestra anteriormente como SEQ ID NO:23 comprende la misma secuencia codificadora que la primera alternativa, pero en una organización genómica levemente diferente, como intrones adicionales y una “secuencia líder”/“secuencia señal” levemente diferente. Dicha “secuencia líder” también puede comprender, tal como se ha indicado anteriormente, un intrón(es) (adicional). El experto en la técnica se encuentra en posición de deducir, en la secuencia que se muestra en el presente documento, la estructura exón/intrón correspondiente a través de métodos convencionales.

El anticuerpo ejemplificado que se describe en el presente documento también puede comprender una cadena ligera, y dicha cadena ligera puede comprender o tener la siguiente secuencia de aminoácidos

20 DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTIS
 LEPEDFATYYCLQIYNMPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
 GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 8)

que puede ser codificada por la siguiente secuencia de ácidos nucleicos:

25 gatatcgctgctgacccagagcccggcgaccctgagcctgtctccggcggaacgtgacgacctgagctgcagagcgagccagagcgtgagcagcagctatctggc
 gtggtaccagcagaaccagggtcaagcaccgctctattaattatggcgcgagcagccgtgcaactgggtcccgcgcggttttagcggctctggatccggcacg
 gatattaccctgaccattagcagcctggaacctgaagactttgacgacttatttgccctcagattataatgcctattacctttggccagggtacgaaagtgaattaaa
 cgtacgggtgctgcaccatctgtctcatctcccgccatctgatgagcagtgaaatctggaactgcctctgtgtgctgctgaataactctatcccagagaggcca
 aagtacagtggaaggtggataacgcctccaatcggttaactcccaggagagtgacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacc
 tgacgctgagcaaacgagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcaggggcctgagctcgcccgtcacaaagagctcaacaggggag
 30 agtgtag (SEQ ID NO: 7).

Asimismo, la “cadena ligera” del anticuerpo ejemplificado que se describe en el presente documento puede comprender una “secuencia líder” que es particularmente útil en la producción técnica. Una secuencia correspondiente puede ser (o puede comprender, por ejemplo, en un sistema vector) la siguiente secuencia:

35 atggtgtgacgacccaggtctctctgtgtgctctggtgctacggg (seguida por)
 gatatcgctgctgacccagagcccggcgaccctgagcctgtctccggcggaacgtgacgacctgagctgcagagcgagccagagcgtgagcagcagctatctggc
 gtggtaccagcagaaccagggtcaagcaccgctctattaattatggcgcgagcagccgtgcaactgggtcccgcgcggttttagcggctctggatccggcacg
 gatattaccctgaccattagcagcctggaacctgaagactttgacgacttatttgccctcagattataatgcctattacctttggccagggtacgaaagtgaattaaa
 cgtacgggtgctgcaccatctgtctcatctcccgccatctgatgagcagtgaaatctggaactgcctctgtgtgctgctgaataactctatcccagagaggcca
 aagtacagtggaaggtggataacgcctccaatcggttaactcccaggagagtgacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacc
 40 tgacgctgagcaaacgagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcaggggcctgagctcgcccgtcacaaagagctcaacaggggag
 agtgtag (SEQ ID NO: 27).

Dicha secuencia codifica la siguiente secuencia de aminoácidos

MVLQTQVFISLLLWISGAYG (seguida por)
 45 DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTIS
 LEPEDFATYYCLQIYNMPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
 GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 28).

Alternativamente, dicha cadena ligera también puede ser codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es optimizada para la producción recombinante ejemplificada por la siguiente secuencia:

1 atggacatga gggctcctgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctgtt

51 cccaggttaag gatggagaac actagcagtt tactcagccc aggggtgctca
 101 gtactgcttt actattcagg gaaattctct tacaacatga ttaattgtgt
 151 ggacatttgt tttatgttt ccaatctcag gcgccagatg t

seguida por

5 gatatcgtg
 201 ttgacgcagt ctccagccac cctgtctttg tctccagggg aaagagccac
 251 cctctcctgc cgggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcctggt
 301 accagcagaa acctggccag gcgccaggc tctcatcta tggcgcatcc
 351 agcagggcca ctggcgtgcc agccaggttc agtggcagtg ggtctgggac
 10 401 agacttcact ctccatca gcagcctgga gcctgaagat ttcgcgacct
 451 attactgtct gcagatttac aacatgccta tcacgtcgg ccaagggacc
 501 aaggtgaaa tcaaacgtga gtagaatta aactttgcgg ccgcctagac
 551 gtttaagtgg gagatttga ggggatgagg aatgaaggaa cttcaggata
 601 gaaaagggt gaagtcaagt tcagctccta aaatggatgt gggagcaaac
 15 651 ttgaagata aactgaatga cccagaggat gaaacagcgc agatcaaaga
 701 ggggcctgga gctctgagaa gagaaggaga ctcatccgtg ttgagtttc
 751 acaagtactg tcttgagttt tgcaataaaa gtgggatagc agagttgagt
 801 gagccgtagg ctgagttctc tctttgtct cctaagttt tatgactaca
 851 aaaatcagta gtatgtcctg aaataatcat taagctgtt gaaagtatga
 20 901 ctgctgccca ttagatacc atgtctgtct gaatgatcag aagaggtgtg
 951 actctattc taaaattgt cacaaatgt caaaatgaga gactctgtag
 1001 gaacgagtc ttgacagaca gctcaagggg tttttcct ttgtctcatt
 1051 tctacatgaa agtaaattg aaatgatctt tttattata agagtagaaa
 1101 tacagttggg ttgaactat atgttttaac ggccacgggt ttgtaagaca
 25 1151 ttggtcctt tgtttccca gttattactc gattgtaatt ttatatcgcc
 1201 agcaatggac tgaaacggtc cgcaacctct tcttacaac tgggtgacct
 1251 cgcggtctgt ccagccattt ggcgttcacc ctgccgctaa gggccatgtg
 1301 aacccccgcg gtagcatccc ttgctccgcg tggaccactt tctgaggca
 1351 cagtgatagg aacagagcca ctaatctgaa gagaacagag atgtgacaga
 30 1401 ctacactaat gtgagaaaaa caaggaaagg gtgactatt ggagatttca
 1451 gaaataaaat gcatttatta ttatttccc ttattttaat ttctattag
 1501 ggaattagaa agggcataaa ctgctttatc cagtgtata ttaaagctt
 1551 aatgtatata atcttttaga ggtaaaatct acagccagca aaagtcattg
 1601 taaatattct ttgactgaac tctactaaa ctctctaaa ttatatgtca
 35 1651 tattaactgg ttaaattaat ataaattgt gacatgacct taactggta
 1701 ggtaggatat tttcttcat gcaaaaatat gactaataat aatttagcac
 1751 aaaaatattt cccaatactt taattctgtg atagaaaaat gttaactca

1801 gctactataa tcccataatt tgaaaaacta ttattagct ttgtgttg
1851 acccttcct agccaaaggc aactattaa ggaccctta aaactctga
1901 aactactta gagtcattaa gttattaac cactttaat tacttaaaa
1951 tgatgtcaat tccctttta ctattaattt atttaaggg gggaaaggct
5 2001 gctcataatt ctattgttt tcttggttaa gaactctcag tttcgttt
2051 tactacctc gtcaccaag agttggcatc tcaacagagg ggactttccg
2101 agaggccatc tggcagttgc ttaagatcag aagtgaagtc tgccagttcc
2151 tccaggcag gtggcccaga ttacagttga cctgttctgg tgtggctaaa
2201 aattgtccca tgtggttaca aaccattaga ccagggtctg atgaattgct
10 2251 cagaatatt ctggacacc aaatacagac cctggctta ggcctgtcc
2301 atacagtagg tttagcttg ctacaccaa ggaagcata cagaggctaa
2351 tatcagagta ttcttgaag agacaggaga aaatgaaagc cagtttctgc
2401 tcttaccta tgtgcttg ttcagactcc caaacatcag gagtgcaga
2451 taaactggtc tgaatctct tctgaagcat ggaactgaaa agaattgagt
15 2501 ttcagggaag aaaggcaata gaaggaagcc tgagaatacg gatcaattct
2551 aaactctgag ggggtcggat gacgtggcca ttcttgct aaagcattga
2601 gtttactgca aggtcagaaa agcatgcaa gccctcagaa tggctgcaa
2651 gagctccaac aaaacaattt agaactttat taaggaatag ggggaagcta
2701 ggaagaaact caaaacatca agattttaa tacgctctt ggtctcctg
20 2751 ctataattat ctgggataag catgctgtt tctgtctgc cctaacatgc
2801 cctgtgatta tccgcaaaca acacaccaa ggcagaaact ttgttactta
2851 aacaccatcc tgttgcttc ttcctcagg aactgtggct gcaccatctg
2901 tctcatctt cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct
2951 gttgtgtgcc tgctgaataa ctctatccc agagaggcca aagtacagt
25 3001 gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag
3051 agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg
3101 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcacca
3151 tcagggcctg agctgccccg tcacaaagag cttaacagg ggagagtgtt
3201 **ag** (SEQ ID NO: 24)

30 La "secuencia" anterior para una cadena ligera ejemplificada también tiene una estructura genómica levemente diferente. Esta "secuencia alternativa" comprende intrones diferentes y/o adicionales. En consecuencia, las realizaciones que describen una "cadena ligera" se aplican en el presente documento cambiando lo que se deba cambiar.

35 En el contexto de la presente invención, la frase "molécula de anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina totales, por ejemplo, IgMs, IgDs, IgEs, IgAs o IgGs, como ser IgG1, IgG2, IgG2b, IgG3 o IgG4, así como también a partes de dichas moléculas de inmunoglobulina, como fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab)2, fragmentos F(ab)2 quiméricos o Fab' quiméricos, fragmentos Fab quiméricos o regiones V_H o CDR aisladas (dichas regiones V_H o CDR aisladas están, por ejemplo, integradas o modificadas en la(s) "estructura(s)" correspondiente(s)). La frase "molécula de anticuerpo" también comprende los diacuerpos y moléculas que
40 comprenden un dominio Fc de anticuerpo como vehículo adosado al menos a una parte/péptido de unión al antígeno, por ejemplo, pepticuerpos tal como se describe en el documento WO 00/24782. En consecuencia, y en el

contexto de la presente invención, la frase “región variable de la cadena pesada (V_H)” no se limita a una región variable en una inmunoglobulina total, sino que se refiere a las partes correspondientes de dicha región variable de la cadena pesada (V_H), como las CRDs, ya sea solas o en combinación de CDR1, 2 y/o 3 o la “estructura” correspondiente de la región variable. Por lo tanto, una molécula de anticuerpo de la presente invención también puede ser una estructura de anticuerpo que comprende, como sitio de unión al antígeno, las CDRs o al menos una CDR de una región variable dada de la cadena pesada glicosilada (V_H). Dicha parte correspondiente de dicha región variable de la cadena pesada (V_H) en la estructura de anticuerpos de la invención es glicosilada tal como se define en el presente documento, por ejemplo, comprende una asparagina glicosilada (Asn) en el sitio de unión al antígeno. Un ejemplo de dicha “parte aislada”, una región variable de la cadena pesada (V_H), es la región CDR2 ejemplificada en el presente documento que comprende la SEQ ID NO: 12 (o codificada por una secuencia de ácidos nucleicos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 11).

Además, la frase “molécula de anticuerpos” se refiere a moléculas de anticuerpos modificados y/o alterados, como los anticuerpos quiméricos, humanizados o totalmente humanizados.

Dichas moléculas de “anticuerpos totalmente humanizados” también se caracterizan y describen como anticuerpos “completamente humanos”. Todos estos anticuerpos se pueden generar a través de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, a través de la tecnología de exhibición de fagos, se pueden generar moléculas de anticuerpos recombinantes debido al uso de maduración *in vitro* que es el uso de una estructura de inmunoglobulina γ humana completa subclase-1 (IgG1) tal como se describe en Knappik (2000) J Mol Biol. 296(1), 57-86, y Rauchenberger (2003) J Biol Chem. 278(40), 38194-205.

Tal como se documenta en los ejemplos adjuntos, el término anticuerpo se refiere, por ejemplo, a una molécula de IgG y, por ejemplo, a una IgG1. El término también se refiere a anticuerpos monoclonales o policlonales modificados o alterados, así como también a anticuerpos recombinantemente o sintéticamente generados/sintetizados. El término también se refiere a anticuerpos intactos, así como también a fragmentos de anticuerpos/partes de ellos, como cadenas ligeras y pesadas separadas, Fab, Fab/c, Fv, Fab', F(ab')₂. El término “molécula de anticuerpo” también comprende derivados de anticuerpos, los anticuerpos bifuncionales y las estructuras de anticuerpos, como Fvs de cadena única (scFv) o proteínas de fusión a los anticuerpos. También se contemplan los anticuerpos catalíticos y/o proteolíticos que comprenden un dominio V_H glicosilado, por ejemplo, una V_H -CDR glicosilada tal como se define en el presente documento. La frase “molécula de anticuerpos” también se refiere a estructuras de anticuerpos/moléculas de anticuerpos recombinantemente producidas que pueden comprender, además de una especificidad (por ejemplo, contra $A\beta/A\beta$), otra especificidad o una especificidad adicional. Dichas estructuras pueden comprender, sin carácter limitativo, estructuras “bienespecíficas” o “triespecíficas”. Se proporciona mayor información sobre la frase “molécula de anticuerpos” de la invención más adelante.

Tal como se ha indicado anteriormente, también se contempla un anticuerpo de una única cadena, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo injertado a CDR, un anticuerpo-estructura bivalente, un anticuerpo-proteína de fusión, un anticuerpo entreclonado o un anticuerpo sintético que comprende la glicosilación que se ha definido en la presente en al menos un sitio de unión al antígeno, por ejemplo, en al menos una región variable de una/la cadena pesada definida en la presente y glicosilada. Cuando se producen, por ejemplo, los anticuerpos monocatenarios, la “región variable de la cadena pesada” que se define en el presente documento no se limita a una cadena pesada *per se*, sino que significa que también se refiere a las partes correspondientes derivadas de una cadena pesada de un anticuerpo completo, por ejemplo, una inmunoglobulina completa, como ser una IgG. Dichas partes pueden ser las CDRs correspondientes ya sea solas o con partes de su estructura correspondiente. Además, las variantes genéticas de los genes de inmunoglobulina también se contemplan en el contexto de la presente invención. Las variantes genéticas, por ejemplo, de la cadena G pesada de la inmunoglobulina subclase 1 (IgG1) pueden comprender los marcadores alotípicos G1m(17) o G1m(3) en el dominio CH1, o el marcador alotípico G1m(1) o G1m(no 1) en el dominio CH3. Aquí, se emplea preferentemente una IgG1 del alotipo Gm(17)(z) y Gm(1)(a). La molécula de anticuerpo de la invención también comprende anticuerpos modificados o mutantes, como la IgG mutante con unión Fc-receptor mejorada o atenuada, o activación complementaria. En una realización, el anticuerpo provisto en la presente invención es un anticuerpo totalmente humanizado o un anticuerpo “completamente humano”.

En consecuencia, los anticuerpos de la invención también pueden comprender anticuerpos entreclonados, es decir, anticuerpos que comprenden diferentes regiones de anticuerpos (por ejemplo, regiones CDR) de uno o más anticuerpos parentales o de afinidad optimizada tal como se describe en el presente documento. Estos anticuerpos entreclonados pueden ser anticuerpos en varias estructuras diferentes, por ejemplo, una estructura IgG, por ejemplo, una estructura IgG1 (humana) o una estructura IgG2a o IgG2b. Por ejemplo, dicha estructura de anticuerpos es una estructura mamífera, por ejemplo, humana. Los dominios en las cadenas ligeras y pesadas tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones de la estructura, cuyas secuencias están relativamente conservadas, unidas por tres dominios hipervariables conocidos como regiones determinantes de complementariedad (CDR1-3).

Tal como se utiliza en el presente documento, una “región de estructura humana” se refiere a una región de estructura que es substancialmente idéntica (aproximadamente el 85% o más habitualmente el 90-95% o más) a la región de la estructura de una inmunoglobulina humana de origen natural. La región de la estructura de un

anticuerpo (por ejemplo, las regiones combinadas de la estructura de las cadenas ligeras y pesadas) sirve para posicionar y alinear las CDRs. Las CDRs son responsables principalmente de la unión de un antígeno a un epítipo. Cabe destacar que no sólo pueden estar presentes anticuerpos entreclonados descritos en la presente en una estructura de anticuerpos (humanos) preferida, sino que también las moléculas de anticuerpos que comprenden CDRs de los anticuerpos que se describen en el presente documento se pueden introducir en una estructura de inmunoglobulina. Los ejemplos de estructuras incluyen IgG1, IgG2a e IgG2b. Se prefieren mayormente las estructuras humanas y las estructuras IgG1 humanas, tales como la cadena pesada de un ANTICUERPO tal como se muestra, *inter alia*, en la SEQ ID NO:6.

En una realización, las isoformas de ANTICUERPOS pueden comprender en una región variable de la cadena pesada una **CDR1** que comprende los siguientes aminoácidos:

GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 10).

Dicha CDR1 puede ser codificada por la siguiente secuencia de ácidos nucleicos:

ggattaccttagcagctatgcgatgagc (SEQ ID NO: 9).

Las isoformas de ANTICUERPOS pueden comprender la siguiente **CDR2** en la región variable de la cadena pesada:

AINASGTRTYADSVKG (SEQ ID NO: 12)

(N: sitio de glicosilación unido a N en Asn-52 de una cadena pesada completa).

Dicha **CDR2** puede ser codificada por la siguiente secuencia de ácidos nucleicos:

gctattaatgcttctgtactctgattatgctgattctgtaagggt (SEQ ID NO: 11).

La N-glicosilación de acuerdo con la presente invención está incluida, por ejemplo, en dicha región CDR2 y se ubica en la Asn52 correspondiente de la región variable de la cadena pesada, dicha región variable (V_H) está codificada por una molécula de ácidos nucleicos tal como se muestra en la SEQ ID NO:1 y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO:2.

Además, las isoformas de ANTICUERPOS pueden comprender en su región variable de la cadena pesada una **CDR3** que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

GKGNTHKPYGYVRYFDV (SEQ ID NO: 14).

Dicha **CDR3** puede ser codificada por la siguiente secuencia de ácidos nucleicos:

ggtaagggttaataactcataagccttatggtatgttcgtattttgatgtt (SEQ ID NO: 13).

Las isoformas de ANTICUERPOS pueden comprender una cadena ligera (L) que puede caracterizarse por las siguientes CDRs:

CDR1: RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 16)

agagcgagccagagcgtgagcagcagctatctggcg (SEQ ID NO: 15)

CDR2: GASSRAT (SEQ ID NO: 18)

ggcgagcagccgtgcaact (SEQ ID NO: 17)

CDR3: LQIYNMPI (SEQ ID NO: 20)

cttcagattataatatgcctatt (SEQ ID NO: 19).

Las isoformas de ANTICUERPOS pueden comprender sitios de glicosilación potencial adicionales (que según se conoce en la técnica comprenden los motivos Asn-X-Ser/Thr) en la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas del anticuerpo, por ejemplo, en el sitio de glicosilación bien conservado en Asn 306 en la parte Fc no variable (correspondiente a "Asn297" en el sistema-Kabat (Kabat (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^o Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda Md.: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine), dichas cadenas pesadas son o comprenden la secuencia que se ha proporcionado anteriormente, es decir, en la SEQ ID NO:6 (codificada por la SEQ ID NO:5).

En una realización de la presente invención, las isoformas de ANTICUERPOS se caracterizan porque al menos un sitio de unión al antígeno comprende una asparagina (Asn) glicosilada en la región variable de la cadena pesada (V_H), y dicha V_H está codificada por

(a) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO:1:

CAGGTGGAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC
CTCCGGATTACCTTTAGCAGCTATGCGATGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGCGGTG
AGCGCTATTAATGCTTCTGGTACTCGTACTTATTATGCTGATTCTGTTAAGGGTCGTTTTACCATTTCACGTGATA
ATTTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGT
5 GGTAAGGGTAATACTCATAAGCCTTATGGTTATGTTGCTTATTTTATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACG
GTTAGCTCA (SEQ ID NO: 1);

(b) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2:

QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINASGTRTYADSVKGRFTISRDNK
10 NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 2; “N” en negrita
representa la Asn definida en el presente documento en la posición 52 de la región variable de la cadena pesada);

(c) una molécula de ácido nucleico que se hibrida a la molécula de ácido nucleico de (a) o (b) y que codifica para un polipéptido que es capaz de unirse al péptido β -A4/A β 4 que se muestra en la siguiente secuencia de aminoácidos

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 3)

15 o a un fragmento de ella que comprende al menos 15 aminoácidos;

(d) una molécula de ácido nucleico que se hibrida a la molécula de ácido nucleico de (a) o (b) y que codifica para un polipéptido que es capaz de unirse a al menos dos regiones en el péptido β -A4/A β 4 tal como se muestra en la siguiente secuencia de aminoácidos

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 3)

20 o a al menos dos regiones de un fragmento de la SEQ ID NO:3 que comprende al menos 15 aminoácidos

donde dichas dos regiones en el péptido β -A4/A β 4 o su fragmento comprenden los aminoácidos en la posición 3 a 6 y en la posición 18 a 26 de la SEQ ID NO:3; o

(e) una secuencia de ácidos nucleicos que se degenera a una secuencia de ácidos nucleicos tal como se define en cualquiera de (a) a (d).

25 El experto en la técnica sabe que la frase “molécula de ácido nucleico que se hibrida a la molécula de ácido nucleico de (a) o (b) y que codifica para un polipéptido que es capaz de unirse a al menos dos regiones en el péptido β -A4/A β 4” tal como se emplea en el presente documento se refiere a una cadena codificadora de una molécula de ácido nucleico bicatenaria, donde la cadena no codificadora se hibrida a la molécula de ácido nucleico anteriormente identificada de (a) y (b).

30 Tal como se ha establecido anteriormente, la molécula de anticuerpo purificado que comprende la glicosilación de Asn definida en el presente documento puede caracterizarse y describirse, *inter alia*, como una molécula de anticuerpo donde la región variable que comprende una Asn glicosilada está comprendida en una cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en:

35 (a) un polipéptido de cadena pesada codificado por una molécula de ácido nucleico tal como se muestra en la SEQ ID NOS: 5, 23 ó 25;

(b) un polipéptido de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 6 ó 26;

40 (c) un polipéptido de cadena pesada codificado por una molécula de ácido nucleico que se hibrida a la molécula de ácido nucleico de (a) y que codifica para un polipéptido que es capaz de unirse al péptido β -A4/A β 4 tal como se muestra en la siguiente secuencia de aminoácidos

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 3)

o un fragmento de ella que comprende al menos 15 aminoácidos; o

45 (d) un polipéptido de cadena pesada codificado por una molécula de ácido nucleico que se hibrida a la molécula de ácido nucleico de (a) y que codifica para un polipéptido que es capaz de unirse a al menos dos regiones en el péptido β -A4/A β 4 tal como se muestra en la siguiente secuencia de aminoácidos

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 3)

o al menos dos regiones de un fragmento de la SEQ ID NO:3 que comprende al menos 15 aminoácidos

donde dichas dos regiones en el péptido β -A4 A β 4 o su fragmento comprenden los aminoácidos en la posición 3 a 6 y en la posición 18 a 26.

El anticuerpo anteriormente identificado (por ejemplo un anticuerpo ejemplificado de la invención) también puede comprender una cadena L con la siguiente secuencia de aminoácidos:

5 DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTIS
LEPEDFATYYCLQIYNMPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 22)

o una cadena L, por ejemplo, codificada por la secuencia de ácidos nucleicos siguiente:

10 gatatcgtgctgaccagagcccgccgaccctgagcctgtctccggcgcaacgtgcgaccctgagctgcagagcgagccagagcgtgagcagcagctatctggc
gtgggtaccagcagaaccaggtgaagcaccgctctattaattatggcgagcagccgtgcaactgggtcccgccgcttttagcggctctggatccggcagc
gattttaccctgaccattagcagcctgaacctgaagactttgagctattatgccttcagattataatgcctattacctttggccagggtagaaagttaaataaa
cgtacggtggctgcaccatctgtctcatctccgccatctgatgagcagtgaaatctggaactgcctctgtgtgctgctgaataacttctatccagagaggcca
aagtacagtggaaggtgataacgcctccaatcggtgaactccaggagagtgacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcagc
15 tgacgtgagcaaacgagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccgctcacaaagagctcaacaggggag
agtgttag (SEQ ID NO: 21).

Tal como se mencionó anteriormente, la molécula de anticuerpos purificados que comprende la glicosilación de Asn definida en la presente en la cadena pesada también puede comprender una cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en:

20 (a) un polipéptido de cadena ligera codificado por una molécula de ácido nucleico tal como se muestra en la SEQ ID Nos. 7, 21, 24 ó 27;

(b) un polipéptido de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 8, 22 ó 28;

25 (c) un polipéptido de cadena ligera codificado por una molécula de ácido nucleico que se hibrida a la molécula de ácido nucleico de (a) y que codifica para un polipéptido que es capaz de unirse al péptido β -A4/A β 4 tal como se muestra en la siguiente secuencia de aminoácidos

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 3)

o un fragmento de ésta que comprende al menos 15 aminoácidos; o

30 (d) un polipéptido de cadena ligera codificado por una molécula de ácido nucleico que se hibrida a la molécula de ácido nucleico de (a) y que codifica para un polipéptido que es capaz de unirse a al menos dos regiones en el péptido β -A4/A β 4 tal como se muestra en la siguiente secuencia de aminoácidos

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 3)

o a al menos dos regiones de un fragmento de la SEQ ID NO:3 que comprende al menos 15 aminoácidos.

35 El término "hibridación" o "se hibrida" tal como se utiliza en el presente documento en el contexto de las moléculas de ácido nucleico/secuencias de ADN puede referirse a hibridaciones bajo condiciones astringentes o no astringentes. Si no se especificase, las condiciones son preferentemente no astringentes. Dichas condiciones de hibridación pueden establecerse de acuerdo con los protocolos convencionales descriptos, por ejemplo, en Sambrook, Russell Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001); Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989), o Higgins and Hames (Eds.) Nucleic acid hybridization, a practical approach IRL Press Oxford, Washington DC, (1985). El establecimiento de las condiciones se encuentra dentro de la pericia del experto y se puede determinar de acuerdo con los protocolos descriptos en la técnica. Por lo tanto, la detección sólo de secuencias de hibridación específicas requerirá habitualmente condiciones de hibridación y lavado astringentes tales como 0,1 xSSC, el 0,1% de SDS a 65°C. Las condiciones de hibridación no astringentes para la detección de secuencias homólogas o no exactamente complementarias pueden establecerse en 6xSSC, el 1% de SDS a 65°C. Como es sabido, la longitud de la sonda y la composición del ácido nucleico por determinar constituyen otros parámetros de las condiciones de hibridación. Nótese que las variaciones en las condiciones anteriores pueden lograrse a través de la inclusión y/o sustitución de reactivos bloqueantes alternados utilizados para suprimir fondo en los experimentos de hibridación. Los reactivos bloqueantes típicos incluyen el reactivo de Denhardt, BLOTTO, heparina, ADN de esperma de salmón desnaturalizado, y las formulaciones patentadas disponibles comercialmente. La inclusión de reactivos bloqueantes 40 específicos puede requerir la modificación de las condiciones de hibridación que se han descripto anteriormente, debido a problemas con la compatibilidad. Las moléculas de ácido nucleico hibridizantes también comprenden fragmentos de las moléculas anteriormente descriptas. Dichos fragmentos pueden representar secuencias de ácidos nucleicos que codifican para una molécula de anticuerpo no funcional o un fragmento no funcional de la misma o para una CDR tal como se define en el presente documento y que tienen una longitud de al menos 12 nucleótidos, 45 50

preferentemente al menos 15, con mayor preferencia al menos 18, con mayor preferencia al menos 21 nucleótidos, con mayor preferencia al menos 30 nucleótidos, incluso con mayor preferencia al menos 40 nucleótidos y con mayor preferencia aún al menos 60 nucleótidos. Además, las moléculas de ácido nucleico que se hibridan con cualquiera de las moléculas de ácido nucleico también incluyen fragmentos complementarios, derivados y variantes alélicas de estas moléculas. Adicionalmente, un complejo de hibridación se refiere a un complejo entre dos secuencias de ácido nucleico en virtud de la formación de enlaces de hidrógeno entre las bases G y C complementarias y entre las bases A y T complementarias; estos enlaces de hidrógeno también pueden estabilizarse mediante interacciones de apilamiento entre bases. Las dos secuencias de ácidos nucleicos complementarias presentan enlaces de hidrógeno en una configuración antiparalela. Puede formarse un complejo de hibridación en solución (por ejemplo, análisis Cot o Rot) o entre una secuencia de ácidos nucleicos presente en la solución y otra secuencia de ácidos nucleicos inmovilizada en un soporte sólido (por ejemplo, membranas, filtros, chips, clavos o portaobjetos de vidrio a los cuales se han fijado, por ejemplo, células). Los términos "complementario" o "complementariedad" se refieren a la unión natural de los polinucleótidos bajo condiciones de sal y temperatura permitidas a través del apareamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia "A-G-T" se une a la secuencia complementaria "T-C-A". La complementariedad entre dos moléculas monocatenarias puede ser "parcial", donde sólo algunos de los ácidos nucleicos se unen, o puede ser completa cuando existe una complementariedad completa entre las moléculas monocatenarias. El grado de complementariedad entre las cadenas de ácido nucleico tiene efectos significativos en la eficacia e intensidad de la hibridación entre cadenas de ácido nucleico. Esto es de particular importancia en reacciones de amplificación, que dependen de la unión entre las cadenas de ácidos nucleicos.

La frase "secuencias de hibridación" se refiere preferentemente a las secuencias que exhiben una identidad de secuencia de al menos el 40%, preferentemente al menos el 50%, con mayor preferencia al menos el 60%, incluso con mayor preferencia al menos el 70%, con particular preferencia al menos el 80%, más particularmente al menos el 90%, incluso más particularmente al menos el 95% y más preferentemente aún al menos el 97% de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos tal como se ha descrito anteriormente que codifican para una molécula de anticuerpo. Además, la frase "secuencias de hibridación" se refiere preferentemente a secuencias que codifican para una molécula de anticuerpo que tiene una identidad de secuencia de al menos el 40%, preferentemente al menos el 50%, con mayor preferencia al menos el 60%, incluso con mayor preferencia al menos el 70%, particularmente al menos el 80%, más particularmente al menos el 90%, incluso más particularmente al menos el 95% y más preferentemente aún al menos el 97% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la molécula de anticuerpo tal como se ha descrito anteriormente.

De acuerdo con la presente invención, el término "idéntico" o "porcentaje de identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales, o que tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (por ejemplo, el 60% ó el 65% de identidad, preferentemente el 70-95% de identidad, más preferentemente al menos el 95% de identidad), cuando se compara y alinea para una correspondencia máxima en una ventana de comparación, o en una región designada medida utilizando un algoritmo de comparación de secuencia conocido en la técnica, o por alineación manual e inspección visual. Las secuencias que tienen, por ejemplo, del 60% al 95% o más de identidad de secuencia se consideran substancialmente idénticas. Dicha definición también se aplica al complemento de una secuencia de prueba. Preferentemente, la identidad de secuencia existe en una región que tiene una longitud de al menos aproximadamente 15 a 25 aminoácidos o nucleótidos, con mayor preferencia, en una región que tiene una longitud de aproximadamente 50 a 100 aminoácidos o nucleótidos. Los expertos en la técnica sabrán cómo determinar el porcentaje de identidad entre las secuencias utilizando, por ejemplo, algoritmos tales como aquellos basados en el programa informático CLUSTALW (Thompson Nucl. Acids Res. 2 (1994), 4673-4680) o FASTDB (Brutlag Comp. App. Biosci. 6 (1990), 237-245) tal como se conoce en la técnica.

Si bien el algoritmo FASTDB típicamente no considera las eliminaciones o adicionales no coincidentes internas en las secuencias, es decir, vacíos, en sus cálculos, esto se puede corregir manualmente para evitar una sobreestimación del % de identidad. Sin embargo, CLUSTALW no tiene en cuenta los vacíos de las secuencias en sus cálculos de identidad. También están disponibles para los expertos en la técnica los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, (Altschul, Nucl. Acids Res. 25 (1997), 3389-3402; Altschul, J. Mol. Evol. 36 (1993), 290-300; Altschul, J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410). El programa BLASTN para las secuencias de ácidos nucleicos utiliza como valores preestablecidos una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como valores preestablecidos una longitud de palabra (W) de 3, y una expectativa (E) de 10. La matriz de puntuación BLOSUM62 (Henikoff Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89, (1989), 10915) utiliza alineaciones (B) de 50, expectativas (E) de 10, M=5, N=4 y una comparación de ambas cadenas.

Además, la presente invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico cuya secuencia se degenera en comparación con la secuencia de la molécula hibridizante anteriormente descrita. Cuando se utiliza de acuerdo con la presente invención, la frase "que se degenera como resultado del código genético" significa que, debido a la redundancia del código genético, diferentes secuencias de nucleótidos codifican para el mismo aminoácido.

Para determinar si un residuo de aminoácido o residuo de nucleótido en una secuencia de anticuerpos dada corresponde a cierta posición en la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos, por ejemplo, de cualquiera de las SEQ ID Nos: 1, 5, 23 y 25, el experto en la técnica puede utilizar medios y métodos conocidos en

la técnica, por ejemplo, alineaciones, ya sea manualmente o utilizando programas informáticos tales como los mencionados más adelante en relación con la definición del término "hibridación" y grado de homología.

Por ejemplo, BLAST 2,0 que significa herramienta de búsqueda de alineación local básica [Basic Local Alignment Search Tool] BLAST (Altschul (1997), loc. cit.; Altschul (1993), loc. cit.; Altschul (1990), loc. cit.) se puede utilizar para buscar alineaciones de secuencias locales. BLAST, tal como se ha tratado anteriormente, produce alineaciones tanto de las secuencias de nucleótidos como de aminoácidos para determinar la similitud de las secuencias. Debido a la naturaleza local de las alineaciones, BLAST es especialmente útil para determinar coincidencias exactas o identificar secuencias similares. La unidad fundamental del rendimiento del algoritmo BLAST es el Par de Segmentos con Puntajes Altos [High-scoring Segment Pair] (HSP). Un HSP está compuesto por dos fragmentos de secuencias de longitudes arbitrarias pero iguales, cuya alineación es localmente máxima y para los cuales el puntaje de alineación cumple o excede un umbral o puntaje discriminatorio establecido por el usuario. El método BLAST consiste en buscar los HSPs entre una secuencia de interrogación y una secuencia de bases de datos, para evaluar la significancia estadística de cualquier coincidencia hallada e informar sólo aquellas coincidencias que satisfagan el umbral de significancia seleccionado por el usuario. El parámetro E establece el umbral estadísticamente significativo para informar las coincidencias de secuencias de la base de datos. E se interpreta como unión superior de la frecuencia esperada de oportunidad de ocurrencia de un HSP (o conjunto de HSPs) dentro del contexto de toda la búsqueda en la base de datos. Cualquier secuencia de la base de datos cuya coincidencia satisfaga E se informa en el dispositivo de salida del programa.

Se utilizan técnicas informáticas análogas que utilizan BLAST (Altschul (1997), loc. cit.; Altschul (1993), loc. cit.; Altschul (1990), loc. cit.) para buscar moléculas idénticas o relacionadas en las base de datos de nucleótidos tales como en el GenBank o EMBL. Este análisis es mucho más rápido que las hibridaciones basadas en membranas múltiples. Además, la sensibilidad de una búsqueda informática se puede modificar para determinar si cualquier coincidencia particular es categorizada como exacta o similar. La base de la búsqueda es el puntaje del producto que se define como:

$$\% \text{ identidad de secuencia } \times \% \text{ puntaje BLAST máximo}$$

$$100$$

y tiene en cuenta tanto el grado de similitud entre dos secuencias como la longitud de la coincidencia de la secuencia. Por ejemplo, con un puntaje de producto de 40, la coincidencia será exacta con un error del 1-2%, y en 70, la coincidencia será exacta. Habitualmente se definen moléculas similares seleccionando aquellas que exhiban un puntaje de producto que oscile entre 15 y 40, aunque puntajes menores pueden identificar moléculas relacionadas. Otro ejemplo para un programa capaz de generar alineaciones de secuencias son los programas informáticos CLUSTALW (Thompson, Nucl. Acids Res. 2 (1994), 4673-4680) o FASTDB (Brutlag Comp. App. Biosci. 6 (1990), 237-245), conocidos en la técnica.

En una realización, la presente invención brinda isoformas de ANTICUERPOS glicosilados en las que la glicosilación en la Asn en la región V_H se selecciona del grupo que consiste en

- (a) una estructura de azúcar del tipo complejo biantenarico sin fucosilación en el núcleo;
- (b) una estructura de azúcar del tipo híbrido biantenarico;
- (c) una estructura de azúcar del tipo oligomanosa biantenaria; y
- (d) una estructura biantenaria de cualquiera de las estructuras provistas en la figura 5 adjunta o la figura 27 adjunta.

En una realización del anticuerpo/anticuerpos de la presente invención, la estructura de azúcar correspondiente no comprende fucosilación en el núcleo.

La N-glicosilación correspondiente puede estar compuesta predominantemente por estructuras de azúcar del tipo complejo biantenarico ($\geq 75\%$; principalmente el 80-90%) sin fucosilación en el núcleo y altamente sialilada con hasta el 80% de antenas. Las estructuras de azúcar secundarias pertenecen al tipo híbrido biantenarico y al tipo oligomanosa ($\leq 25\%$), respectivamente, y también se muestran en las figuras 5 y 27 adjuntas. Las estructuras de glicosilación en la región variable son resistentes a la escisión por parte de la N-glicosidasa F de la proteína (polipéptido de aminoácido).

Las estructuras de azúcar biantenarias complejas dominantes pueden caracterizarse además

- por contener uno o dos ácidos siálicos unidos a una o la otra antena o a ambas antenas. El ácido siálico es del tipo ácido N-acetil neuramínico y está unido muy probablemente en el enlace alfa 2,3 a las galactosas con enlaces beta 1,4 terminales;

- por carecer de fucosilación en el núcleo, es decir, el residuo de fucosa unido en el enlace alfa 1,6 a la N-acetil-glucosamina más interna en el extremo de reducción de la cadena de azúcar.

Las estructuras de azúcar híbridas pueden caracterizarse además

- 5 - por contener una antena de tipo complejo (una unidad de lactosaminilo (GlcNAc-Gal) unida a la estructura de azúcar del núcleo) como un brazo de la estructura biantenaria. Este brazo contiene predominantemente ácido N-acetil neuramínico unido a la galactosa con enlaces beta 1,4 terminales;
- por tener de una hasta 3 subunidades de manosa adicionales unidas a la estructura de azúcar del núcleo como otra antena;
- 10 - por carecer de fucosilación en el núcleo, es decir, por carecer del residuo de fucosa unido en el enlace alfa 1,6 a la N-acetil-glucosamina más interna en el extremo de reducción de la cadena de azúcar.

Las estructuras de azúcar de tipo oligomanosa pueden caracterizarse además

- por contener subunidades de manosa 4 (Man4 →GlcNAc2), 5 (Man5→GlcNAc2) o 6 (Man6→GlcNAc2) en la estructura de azúcar completa, es decir, que incluye las 3 subunidades de manosa ramificadas presentes en una estructura de azúcar unida a N en el núcleo típica;
- 15 - por carecer de fucosilación en el núcleo, es decir, por carecer del residuo de fucosa unido en el enlace alfa 1→6 a la N-acetil-glucosamina más interna en el extremo de reducción de la cadena de azúcar.

Se brinda una composición que comprende una molécula de anticuerpo que se caracteriza porque un sitio de unión al antígeno comprende una asparagina (Asn) glicosilada en la región variable de la cadena pesada (V_H) y una molécula de anticuerpo que se caracteriza porque dos sitios de unión al antígeno comprenden una asparagina (Asn) glicosilada en la región variable de la cadena pesada (V_H), es decir, una composición que comprende ANTICUERPO monoglicosilado y ANTICUERPO doblemente glicosilado, y en adelante se denomina COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS. La frase COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS también se refiere a composiciones que comprenden moléculas que comprenden al menos una región V_H glicosilada tal como se define en el presente documento o al menos una CDR glicosilada de dicha región V_H , mediante la cual dichas moléculas pueden ser, *inter alia*, inmunoglobulinas o isoformas y modificaciones de inmunoglobulinas, tal como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, dicha composición también puede comprender anticuerpos de una única cadena (scFvs) o moléculas biespecíficas que comprenden regiones CDR derivadas de V_H glicosiladas.

Otras definiciones de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS de la presente invención se proporcionan más adelante.

30 La COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS no comprende o simplemente comprende en un grado muy bajo moléculas de anticuerpos “no glicosilados en V_H ”, es decir, anticuerpos que no comprenden la glicosilación definida en el presente documento en la región variable, en particular, en la parte variable de la cadena pesada (V_H).

En el contexto de la presente invención y en particular en el contexto de las mezclas de anticuerpos provistas en el presente documento, la frase “no comprende o simplemente comprende en un grado muy bajo moléculas de anticuerpos no glicosilados” significa que la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS comprende menos del 10%, por ejemplo, menos del 5%, por ejemplo, menos del 4%, por ejemplo, menos del 3%, por ejemplo, menos del 2%, por ejemplo, menos del 1%, por ejemplo, menos del 0,5% o menos de la/una isoforma no glicosilada tal como se ha descrito en el presente documento.

40 En consecuencia, en una realización la presente invención se brinda una preparación de anticuerpos que comprende anticuerpos monoglicosilados y/o doblemente glicosilados (dicha glicosilación se ubica en la región variable de la cadena pesada) y que carece de moléculas de anticuerpos sin glicosilación en la región variable.

Nuevamente, la frase “que carece de moléculas de anticuerpos sin glicosilación en la región variable” se refiere a preparaciones de anticuerpos/mezclas de anticuerpos/grupos de anticuerpos que comprenden como máximo el 10%, por ejemplo, como máximo el 5%, por ejemplo, como máximo el 4%, por ejemplo, como máximo el 3%, por ejemplo, como máximo el 2%, por ejemplo, como máximo el 1%, por ejemplo, como máximo el 0,5%, por ejemplo, como máximo el 4%, por ejemplo, como máximo el 3%, por ejemplo, como máximo el 2%, por ejemplo, como máximo el 1%, por ejemplo, como máximo el 0,5%, por ejemplo, como máximo el 0,3%, por ejemplo, como máximo el 0,2% de isoformas no glicosiladas tal como se describe en el presente documento.

50 También se ha divulgado una composición que no comprende más del 0,5% de isoformas de anticuerpos que no están glicosilados en sus regiones variables, por ejemplo, que no están glicosilados en la región variable de la cadena pesada.

Tal como se ha indicado anteriormente, en una realización de la presente invención, se proporciona una mezcla de anticuerpos monoglicosilados y doblemente glicosilados, por ejemplo, inmunoglobulinas, y dicha mezcla carece de moléculas de anticuerpos sin glicosilación en la región variable. Los anticuerpos que carecen de dicha modificación

postraducciona en la región variable, por ejemplo, en ambas regiones variables de la cadena pesada (ambas regiones (V_H)) se considera, en el contexto de la presente invención, una "forma no glicosilada" que no comprende glicosilación en la región variable de la cadena pesada. Sin embargo, esta "forma no glicosilada" puede comprender (a) glicosilación(es) en la región constante (región C) del anticuerpo, por ejemplo, y más comúnmente en el sitio de glicosilación bien conservado de la parte Fc, en particular, la asparagina (Asn) 306 en la parte Fc no variable/constante tal como se define en el presente documento.

Las isoformas de ANTICUERPOS glicosiladas en sí o como combinación de isoformas monoglicosiladas y doblemente glicosiladas son preparaciones de anticuerpos terapéuticas muy útiles y ventajosas para el tratamiento de la enfermedad Alzheimer (AD) y de otros trastornos relacionados con el amiloide como el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de "tipo holandés", la enfermedad de Parkinson, ASL (esclerosis lateral amiotrófica), la enfermedad de Creutzfeldt Jakob, la demencia relacionada con VIH y la neuropatía motora. Las isoformas de ANTICUERPOS glicosiladas en sí o como combinación de isoformas monoglicosiladas y doblemente glicosiladas también son herramientas de diagnóstico únicas.

Ambas isoformas glicosiladas que se describen en el presente documento muestran una penetración *in vivo* en el cerebro mejorada y altamente eficaz. La penetración eficaz en el cerebro y la unión específica a las placas de β -amiloide se pueden demostrar en ratones PS2APP, un modelo de ratón para la amiloidosis relacionada con la AD.

Además, se pudo detectar una especificidad mejorada para las placas de β -amiloide humanas genuinas a través de tinciones inmunohistoquímicas *in vivo* con una viscosidad no específica significativamente reducida. La concentración eficaz mínima para una tinción consistente de las placas de β -amiloide humanas se determinó en 10 ng/ml, tal como se documenta en los ejemplos adjuntos.

Tal como se documenta en los ejemplos adjuntos, la separación y caracterización de los anticuerpos diferentemente glicosilados, por ejemplo, las inmunoglobulinas, revelaron que la glicosilación de la región variable de la cadena pesada tiene gran influencia en la unión del antígeno a los péptidos A β , el valor de diagnóstico, el perfil farmacológico y la actividad funcional. Las moléculas de anticuerpos purificados pueden someterse a estudios de unión analíticos por EM (Biacore) y unión por mapeado de epítomos (análisis Pepspot) a A β soluble, disociación de A β agregado y análisis microscópico de la unión a las placas de β -amiloide *in vivo* e *in vitro*.

En una realización de la presente invención, el ANTICUERPO purificado o la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS es capaz de reconocer específicamente el péptido β -A4/A β 4.

En consecuencia, y tal como se describe en el presente documento, las frases "ANTICUERPO purificado" o "COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS" se refiere en una realización específica a un ANTICUERPO o COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS capaz de reconocer específicamente dos regiones (la región N-terminal y la parte central/media) del A β /A β 4.

La frase "reconocer específicamente" significa de acuerdo con la presente invención que la molécula de anticuerpo es capaz de interactuar específicamente con y/o unirse a al menos dos aminoácidos de cada una de las dos regiones de β -A4 tal como se define en la presente. Dicha frase se refiere a la especificidad de la molécula de anticuerpo, es decir, a su capacidad para discriminar entre regiones específicas del péptido β -A4 definido en el presente documento y otra región no relacionada del péptido β -A4, u otra proteína relacionada con la APP/péptido/péptido de prueba (no relacionado). En consecuencia, la especificidad se puede determinar experimentalmente a través de métodos conocidos en la técnica y los métodos que se divulgan y describen en el presente documento. Dichos métodos comprenden, sin carácter limitativo, transferencia Western, pruebas ELISA, RIA, ECL, IRMA y exploraciones de péptidos. Dichos métodos también comprenden la determinación de los valores K_D tal como se ilustra, *inter alia*, en los ejemplos adjuntos. La exploración de péptidos (ensayo Pepspot) se emplea rutinariamente para mapear epítomos lineales en un antígeno de polipéptido. La secuencia primaria del polipéptido se sintetiza sucesivamente en celulosa activada con péptidos que se superponen entre sí. El reconocimiento de ciertos péptidos por el anticuerpo que se someterá a prueba para determinar su capacidad para detectar o reconocer un antígeno/epítomo específico se califica a través del desarrollo de color rutinario (anticuerpo secundario con una enzima o un colorante, como peroxidasa de rábano, 4-cloronaftol o hidrogenoperoxido), a través de una reacción de quimioluminiscencia o medios similares conocidos en la técnica. En el caso de las reacciones de quimioluminiscencia, *inter alia*, o el uso de un anticuerpo fluorescente secundario, la reacción se puede cuantificar. Si el anticuerpo reacciona con cierto grupo de péptidos superpuestos, podemos deducir la secuencia mínima de aminoácidos que es necesaria para la reacción; ver los ejemplos ilustrativos provistos de acuerdo con la presente invención.

El mismo ensayo puede revelar dos grupos distantes de péptidos reactivos, que indican el reconocimiento de un epítomo discontinuo, es decir, conformacional, en el polipéptido antigénico (Geysen (1986), Mol. Immunol. 23, 709-715).

Además del ensayo Pepspot, se puede llevar a cabo un ensayo ELISA estándar. Tal como se ha demostrado en los ejemplos adjuntos, los hexapéptidos pequeños se pueden acoplar a una proteína y esparcirse sobre una inmunoplaqueta y reaccionar con los anticuerpos que se someterán a prueba. La clasificación se puede llevar a cabo a

través del desarrollo de color estándar (por ejemplo, anticuerpo secundario con peroxidasa de rábano y bencidina de tetrametilo con hidrogenoperóxido). La reacción en ciertos recipientes se clasifica según la densidad óptica, por ejemplo, a 450 nm. El fondo típico (= reacción negativa) puede ser 0,1, DO, la reacción positiva típica puede ser 1 DO. Esto significa que la diferencia (relación) positivo/negativo puede ser superior a 10 veces más. Se proporciona mayor información en los ejemplos adjuntos. Más adelante se proporcionan los métodos cuantitativos adicionales para determinar la especificidad y la capacidad de "reconocer especialmente" las dos regiones del péptido β -A4 definidas en la presente.

La frase "dos regiones del péptido β -A4" se refiere a dos regiones relacionadas, por ejemplo, con los aminoácidos N-terminales 3 a 6 y un epítipo central/medio en la posición de los aminoácidos 18 a 24 de la SEQ ID NO: 3 (el péptido β -A4). Tal como se documenta en los ejemplos adjuntos, en particular la isoforma de ANTICUERPOS A doblemente glicosilada provista y ejemplificada en el presente documento (ver ejemplos adjuntos) detecta dos partes de la molécula A β , la primera parte comprende los aminoácidos 1 a 10 en el término N y la segunda parte comprende los aminoácidos 17 a 26 de la parte central/media del A β (tal como se muestra en la SEQ ID NO:3). En consecuencia, en las mezclas de anticuerpos provistas en el presente documento y que comprenden isoformas monoglicosiladas y doblemente glicosiladas de los anticuerpos provistos en la presente, las dos regiones también pueden ensancharse de cierta manera, y por lo tanto, comprender, por ejemplo, los aminoácidos 1 a 10 (o a 11 o a 12) o una parte más corta y los aminoácidos 17 a 26 (o aminoácidos 16 a 27) o una parte más corta comprendida entre los aminoácidos 17 a 26, como, por ejemplo, los aminoácidos 19 a 26 ó 20 a 26. La frase "péptido β -A4" en el contexto de la presente invención se refiere a A β 39, A β 41, A β 43 anteriormente descriptos, en particular, a A β 40 y A β 42. A β 42 también se describe en la SEQ ID NO:3 adjunta. Cabe destacar que la frase "dos regiones del péptido β -A4" también se refiere a un "epítipo" y/o a un "determinante antigénico" que comprende las dos regiones del péptido β -A4 o sus partes definidas en la presente. De acuerdo con la presente invención, dichas dos regiones del péptido β -A4 están separadas (a nivel de la secuencia de aminoácidos) en la estructura primaria del péptido β -A4 por al menos un aminoácido, por ejemplo, por al menos dos aminoácidos, por ejemplo, por al menos tres aminoácidos, por ejemplo, por al menos cuatro aminoácidos, por ejemplo, por al menos cinco aminoácidos, por ejemplo, por al menos seis aminoácidos. Tal como se muestra en la presente y se documenta en los ejemplos adjuntos, los anticuerpos/moléculas de anticuerpos de la invención detectan/interactúan con y/o se unen a dos regiones del péptido β -A4 tal como se define en la presente, y a través de ello dichas dos regiones están separadas (a nivel de la estructura primaria de la secuencia de aminoácidos) por al menos un aminoácido, y la secuencia que separa dichas dos regiones/"epítipos" puede comprender más de siete aminoácidos, más de 8 aminoácidos, más de 10 aminoácidos o incluso aproximadamente 14 aminoácidos.

La frase "dos regiones del péptido β -A4" también se puede referir a un epítipo conformacional o a un epítipo discontinuo que consiste en dichas dos regiones o sus partes; ver también Geysen (1986) loc. cit. En el contexto de la presente invención, un epítipo conformacional está definido por dos o más secuencias de aminoácidos discretas separadas en la secuencia primaria, que se unen en la superficie cuando el polipéptido se incorpora a la proteína nativa (Sela, (1969) Science 166, 1365 y Laver, (1990) Cell 61, 553-6). Se contempla que las moléculas de anticuerpos de la presente invención se unen/interactúan específicamente con un epítipo(s) conformacional compuesto por y/o que comprende las dos regiones del β -A4 que se describe en la presente o sus partes tal como se divulga más adelante. Se cree que las "moléculas de anticuerpos" de la presente invención comprenden una especificidad dual simultánea e independiente para (a) una longitud de aminoácidos que comprende los aminoácidos 1 a 11 (o (una) parte(s) de ella) de β -A4 y (b) una longitud de aminoácidos que comprende los aminoácidos 16 a 27 (o (una) parte(s) de ella) del β -A4 (SEQ ID NO: 3). Los fragmentos o las partes de estas longitudes comprenden al menos dos, en la mayoría de los casos al menos tres aminoácidos.

Las moléculas de anticuerpos, por ejemplo, las inmunoglobulinas, se pueden expresar, *inter alia*, en tres sistemas: a) en células de riñón embrionarias humanas transitoriamente transfectadas que contienen el antígeno nuclear del virus Epstein barr (HEK 293 EBNA, Invitrogen), b) en células de ovario de hámster chino (CHO) transitoriamente transfectadas, y c) en líneas de células CHO establemente transfectadas (CHO K1 y CHO K1 SV, Lonza Biologics). Las tres moléculas de anticuerpos diferentes (no glicosiladas, monoglicosiladas o doblemente glicosiladas) se pueden separar a través de etapas de purificación específicas, que comprenden la purificación de la proteína A, cromatografía de intercambio catiónico, así como también separación en columna tal como se detalla más adelante.

En una realización de la invención, la molécula de anticuerpo se produce en forma recombinante, por ejemplo, en una célula CHO o en una célula HEK 293, preferentemente células CHO. En una realización particular, los patrones de glicosilación anteriormente identificados se pueden obtener después de la expresión en células CHO. Las células CHO son bien conocidas en la técnica y comprenden, *inter alia*, las células CHO tal como se emplea en la parte experimental, como las células CHO K1 o CHO K1 SV. Las células HEK 293 comúnmente utilizadas son HEK 293 EBNA.

La expresión recombinante del anticuerpo glicosilado de la invención se lleva a cabo, tal como se muestra en los ejemplos, en un sistema de expresión eucariótico, en particular, en células CHO. Sin embargo, se pueden contemplar otras células eucarióticas. Las células eucarióticas comprenden, por ejemplo, células fúngicas o animales. Los ejemplos de células fúngicas son las células de levaduras, por ejemplo, las del género *Saccharomyces*, por ejemplo, las de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Las células animales adecuadas son,

por ejemplo, células de insectos, células de vertebrados, por ejemplo, las células de mamíferos, tales como, por ejemplo, NSO, MDCK, U2-OSHela, NIH3T3, MOLT-4, Jurkat, PC-12, PC-3, IMR, NT2N, Sk-n-sh, CaSki, C33A. También se contemplan líneas celulares humanas. Estas células huésped, por ejemplos, las células CHO, proporcionan modificaciones postraduccionales a las moléculas de anticuerpos de la invención, incluyendo la
 5 remoción de péptidos líderes o secuencias señal, el plegado o ensamblado de cadenas H (pesadas) y L (ligeras) y, lo que es más importante aún, la glicosilación de la molécula en los laterales correctos, es decir, en la región variable de la cadena pesada. Dicha secuencia líder o péptido señal se escinde proteolíticamente por la señalpeptidasa huésped durante el trayecto secretor durante su producción recombinante, por ejemplo, en células CHO. Otras
 10 líneas celulares adecuadas conocidas en la técnica pueden obtenerse de depositarios de líneas celulares, como la American Type Culture Collection (ATCC). De acuerdo con la presente invención, también se contempla que las células primarias/cultivos celulares puedan actuar como células huésped. Dichas células derivan, en particular, de los insectos (como los insectos de las especies *Drosophila* o *Blatta*) o mamíferos (como los seres humanos, chanchos, ratones o ratas). Dichas células huésped también pueden comprender células de líneas celulares y/o derivadas de ellas, como las líneas celulares de neuroblastoma.

Por consiguiente, la molécula de anticuerpos de la invención se prepara utilizando un sistema de expresión recombinante. Un ejemplo de dicho sistema, tal como se ha indicado anteriormente, es un sistema de expresión mamífero que utiliza células de ovario de hámster chino (CHO). Éstas se pueden utilizar con el sistema de glutamina sintetasa (GS) (WO 87/04462; WO 89/01036; Bebbington, 1992, Biotechnology (N Y), 10, 169-75). Este sistema comprende la transfección de una célula CHO con un gen que codifica para la enzima GS y los genes de anticuerpos deseados. Luego, las células CHO se seleccionan y crecen en un medio libre de glutamina, y también se someten a inhibición de la enzima GS utilizando metionina sulfoximina (MSX). Para poder sobrevivir, las células amplificarán la expresión de la enzima GS y concomitantemente la expresión de mAb.

Otro sistema de expresión posible es el sistema dhfr- de CHO, en el que las células CHO son deficientes para la dihidrofolato reductasa (dhfr-) y dependientes de la timidina e hipoxantina para su crecimiento. La línea celular dhfr- de CHO parental se transfecta con el anticuerpo y el gen dhfr, permitiendo así la selección de transformantes de células CHO del fenotipo dhfr+. La selección se lleva a cabo en ausencia de timidina e hipoxantina. La expresión del gen de anticuerpo puede incrementarse por amplificación utilizando metotrexato (MTX). Este fármaco es un inhibidor directo de la enzima dhfr y permite el aislamiento de colonias resistentes que amplifican su número de copias de genes dhfr y, por lo tanto, el gen del anticuerpo lo suficientemente para sobrevivir bajo estas condiciones.

Las moléculas de anticuerpos purificados, por ejemplo, las inmunoglobulinas, se pueden preparar a través de un método que comprende las etapas de

(a) expresar de forma recombinante una molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica para una molécula de anticuerpo tal como se ha definido anteriormente en una célula de mamífero, por ejemplo, una célula CHO o una célula HEK 293; y

(b) purificar dicha molécula de anticuerpo recombinantemente expresada a través de un método que comprende las etapas de

(b1) purificación en columna de la proteína A;

(b2) purificación en columna de intercambio iónico, por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico; y opcionalmente

(b3) purificación en columna de exclusión molecular.

El protocolo de purificación puede comprender otras etapas, como otras etapas de concentración, por ejemplo, etapas de diafiltración o analíticas, por ejemplo, que comprenden columnas analíticas. El método/procedimiento también puede comprender las etapas de inactivación del virus y/o etapas de remoción viral, por ejemplo, a través de filtraciones/nanofiltraciones. También se contempla y es posible que se repitan ciertas etapas particulares (por ejemplo, se pueden llevar a cabo dos etapas de cromatografía de intercambio de iones) o que se omitan ciertas etapas (por ejemplo, cromatografía de exclusión de tamaño).

La proteína A es un ligando específico del grupo que se une a la región Fc de la mayoría de los isotipos IgG1. Es sintetizada por algunas cepas de *Staphylococcus aureus* y se puede aislar de ellas y acoplar a perlas cromatográficas. Varios tipos de preparaciones en gel están disponibles comercialmente.

Un ejemplo para una columna de proteína A que puede utilizar es una columna MabSelect (marca comercial). Idealmente, la columna se equilibra con Tris 25 mM /HCl, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, el sobrenadante de cultivo se ubica sobre la columna, la columna se lava con Tris 1 M /HCl pH 7,2 y el anticuerpo se eluye a un pH 3,2, utilizando ácido acético 100 mM.

La cromatografía de intercambio catiónico explota las interacciones entre grupos con carga positiva en una fase estacionaria y la muestra que se encuentra en la fase móvil. Cuando se utiliza un intercambiador de cationes débil (por ejemplo, CM Toyopearl 650®), se emplean las siguientes etapas cromatográficas: después de la

preequilibración con ácido acético 100 mM pH 4, carga de un eluato de proteína A y lavado con ácido acético 100 mM pH 4, se eluye el anticuerpo y se fracciona aplicando las etapas que comprenden acetato de sodio 250 mM (pH 7,8-8,5) y acetato de sodio 500 mM (pH 7,8-8,5). Con la primera etapa, normalmente se eluye una mezcla de fracción de isoformas doblemente glicosiladas y fracción de isoformas monoglicosiladas y al utilizar la segunda etapa normalmente se eluye la fracción de isoformas no glicosiladas.

De un intercambiador de cationes fuerte (por ejemplo, SP Toyopearl 650) el anticuerpo se puede eluir a través de etapas de sal: Después de la equilibración de la columna con ácido acético 50 mM pH 5,0, carga del eluido de proteína A con pH 4, se lleva a cabo la primera etapa de elución utilizando ácido acético 50 mM y cloruro de sodio 210 mM. Luego se aplica una segunda etapa de elución de ácido acético 50 mM y cloruro de sodio 350 mM. A través de la primera etapa de sal, normalmente se eluye una mezcla de fracción de isoformas doblemente glicosiladas y una fracción de isoformas monoglicosiladas, a través de una segunda etapa de sal, normalmente se eluye la isoforma no glicosilada.

Además, el anticuerpo también puede eluirse a partir de una columna de intercambio catiónico fuerte (por ejemplo, SP-Sepharose®) por medio de un gradiente de sal: Después de la equilibración previa, carga y lavado de la columna a pH 4,5, se aplica un gradiente de sal desde MES 50 mM pH 5,8 hasta MES 50 mM /cloruro de sodio 1 M pH 5,8. Aquí, las fracciones de isoforma doblemente glicosilada, isoforma monoglicosilada e isoforma no glicosilada normalmente se eluyen por separado. Luego, la fracción de isoforma doblemente glicosilada y la fracción de isoforma monoglicosilada se pueden combinar para producir como resultado una combinación de producto y/o una mezcla de anticuerpos deseada.

Puede realizarse una purificación adicional de la mezcla de moléculas de anticuerpos doblemente glicosilados y monoglicosilados, por ejemplo, inmunoglobulinas, mediante cromatografía de exclusión de tamaño. Un ejemplo de una columna útil es la columna Superdex 200®. Los ejemplos de tampones de trabajo incluyen histidina/cloruro de sodio, por ejemplo, histidina 10 mM / cloruro de sodio 125 mM / pH 6, y solución salina tamponada con fosfato (PBS).

La cromatografía de intercambio de aniones en el modo flujo continuo y seguida de una concentración/diafiltración es una etapa de purificación alternativa. Q Sepharose® es un ejemplo de una resina para la etapa de intercambio de aniones. Por ejemplo, el eluato de la cromatografía SP se puede diluir a la tercera parte con Tris 37,5 mM /HCl pH 7,9 y pasar por una columna de Q-Sepharose preequilibrada con Tris 25 mM /acetato de sodio 83 mM. El flujo continuo se recoge, se ajusta a un pH 5,5 y se concentra mediante ultrafiltración utilizando, por ejemplo, una membrana Hydrosart 30 kD®. Luego, el concentrado se puede diafiltrar contra, por ejemplo, 10 volúmenes de histidina 20 mM /HCl pH 5,5.

El protocolo de purificación anteriormente mencionado también comprende una etapa adicional (c) una etapa de cromatografía analítica, como el uso de una columna Mono-S HR5/5. Sin embargo, también se contemplan etapas adicionales, como la diafiltración, por ejemplo, para la concentración de las moléculas de anticuerpo.

En una realización de la presente invención, se proporciona una composición, preparación de anticuerpos o combinación de anticuerpos que comprende moléculas de anticuerpos tal como se describe en el presente documento o moléculas de anticuerpos que se preparan a través del método provisto anteriormente. En esta realización de la invención, dicha composición comprende anticuerpos monoglicosilados o doblemente glicosilados. En otra realización, dicha composición comprende anticuerpos monoglicosilados y doblemente glicosilados (en la(s) región(es) variable(s) de la(s) cadena(s) pesada(s)) y dicha composición deriva de moléculas de anticuerpos que carecen de glicosilación en la región variable. En el contexto de esta realización, la frase "combinación de anticuerpos" se refiere a una mezcla de anticuerpos monoglicosilados y doblemente glicosilados (en la(s) región(es) variable(s) de la(s) cadena(s) pesada(s)) que se han aislado en forma individual y que luego se combinan en una mezcla. Las mezclas de anticuerpos o combinaciones de anticuerpos provistas en la presente pueden comprender el 50% de anticuerpos monoglicosilados y el 50% de anticuerpos doblemente glicosilados tal como se define en el presente documento. Sin embargo, también se contemplan relaciones de 30/70 a 70/30. Pero el experto en la técnica también sabe que se contemplan otras relaciones en las mezclas de anticuerpos de la presente invención. Por ejemplo, se pueden emplear 10/90 o 90/10, 20/80 u 80/20, así como también 40/60 o 60/40 en el contexto de la presente invención. Tal como se documenta en los ejemplos, una relación útil particular en las MEZCLAS DE ANTICUERPOS de la invención comprende anticuerpos monoglicosilados y anticuerpos doblemente glicosilados tal como se define anteriormente en el presente documento en una relación que oscila entre 40/60 y 45/55.

Las composiciones provistas en el presente documento son particularmente útiles en el diagnóstico o en una composición farmacéutica.

En consecuencia, la invención brinda composiciones de diagnóstico o farmacéuticas que comprenden

(a) una molécula de anticuerpo tal como se ha definido anteriormente, que comprende un sitio de unión al antígeno con una Asn glicosilada;

(b) una molécula de anticuerpo tal como se ha definido anteriormente, que comprende dos sitios de unión al antígeno con una Asn glicosilada; o con mayor preferencia,

(c) una combinación de las moléculas de anticuerpo (a) y (b).

La combinación (c) que se proporciona en el presente documento, que comprende la(s) molécula(s) de anticuerpo que incluye un sitio de unión al antígeno con una Asn glicosilada y la(s) molécula(s) de anticuerpo que incluye dos sitios de unión al antígeno con una Asn glicosilada, carece de isoformas no glicosiladas (con respecto a la región variable de la cadena pesada). Tal como se ha indicado anteriormente, la frase "carece de isoformas no glicosiladas (con respecto a la región variable de la cadena pesada)" se refiere a combinaciones/combinaciones de anticuerpos/preparaciones de anticuerpos, donde menos del 5%, por ejemplo, menos del 4%, menos del 3%, menos del 2%, menos del 1% o incluso menos del 0,5% de las especies de anticuerpos en dicha combinación no están glicosiladas en la región variable de la cadena pesada. Tal como se ha demostrado en los ejemplos, dichas combinaciones/combinaciones de anticuerpos/preparaciones de anticuerpos pueden comprender casi ninguna (menos del 0,5%) isoforma no glicosilada. El porcentaje y/o la cantidad de una isoforma de glicosilación dada (tal como se ha definido en el presente documento, por ejemplo, glicosilación en la región variable de la cadena pesada; ver *inter alia* la figura 14 adjunta) en una COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS se puede determinar fácilmente a través de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos comprenden, sin carácter limitativo, espectrometría de masa, intercambio de iones por análisis SDS-PAGE, HPLC, ELISA y similares.

Tal como se muestra en los ejemplos adjuntos, la inmunodecoración específica y sensible de placas de β -amiloide de Alzheimer genuinas por los anticuerpos de la invención es demostrada *in vitro* con experimentos de tinción inmunohistoquímica utilizando criosecciones de tejido cerebral humano de pacientes con AD. También se demostró la tinción eficaz de las placas de β -amiloide de cortes de cerebro con anticuerpos anti-A β humanos de pacientes vacunados con A β (Hock, 2002, Nature Medicine, 8, 1270-1275). Además, la inmunodecoración también se demuestra en un modelo animal transgénico que representa la carga de placas de β -amiloide humanas (Richards, 2003, J. Neuroscience, 23, 8989-9003). En modelos animales similares se ha demostrado que esta unión de las placas conduce a su aclaramiento y posteriormente a una mejora de los síntomas relacionados con la enfermedad, donde se ha tratado la inclusión de procedimientos dependientes de Fc (Bard, 2000, Nature Medicine, 6, 916-919; Wilcock, 2003, Neurobiology Disease, 15, 11-20; Wilcock, 2004, J. Neuroscience, 24, 6144-6151). Además, se informó que una unión eficaz de anticuerpos anti-A β con placas de β -amiloide se correlaciona con una menor progresión de la enfermedad (Hock, 2002, Nature Medicine, 8, 1270-1275; Hock, 2003, Neuron, 38, 547-554). Este análisis y el análisis post mortem del tejido cerebral humano sugiere que la fagocitosis de células microgliales está mecánicamente comprometida en el aclaramiento de placas en el hombre (Nicoll, 2003, Nature Medicine, 9, 448-452). Por lo tanto, el anticuerpo de la presente invención o comprendido, en particular, en composiciones farmacéuticas es una IgG1 humana, que es principalmente responsable de procedimientos dependientes de FcR en seres humanos. La inmunodecoración de placas de β -amiloide eficaz de los anticuerpos de la invención/mezcla de la invención sugiere que el fármaco será eficaz para la inmunización pasiva para eliminar las placas de β -amiloide existentes y evitar la formación de placas de β -amiloide en seres humanos.

Además, los anticuerpos deben cruzar, preferentemente, la barrera hematoencefálica para alcanzar su lugar de destino. Para moléculas de un mayor tamaño como las IgGs humanas, este proceso se ve drásticamente disminuido, de modo tal que sólo se puede lograr aproximadamente entre el 0,1 y el 0,2% de la concentración en plasma de un anticuerpo en CSF. El mecanismo de aclaramiento de las placas aún está sujeto a una serie de debates controversiales, que pueden incluir los efectos periféricos en el péptido A β (Dodart, 2002, Nature Neuroscience, 5: 452-457). De este modo, el anticuerpo terapéutico generado o las mezclas correspondientes de la invención de anticuerpos monoglicosilados y doblemente glicosilados (en la cadena pesada de la región variable) de la invención también tienen la propiedad de despolimerizar multímeros A β *in vitro* sin la inclusión de procedimientos dependientes de Fc y de unirse a monómeros y oligómeros A β solubles en CSF, dado que la neutralización de péptidos A β o péptidos A β oligoméricos solubles (por ejemplo, intermediarios de agregación) también puede contribuir al efecto general de reducción de amiloide (Du, 2003, Brain, 126: 1-5).

Las composiciones de la invención se pueden administrar en forma sólida o líquida y pueden presentarse, *inter alia*, en forma de (un) polvo(s), (una) pastilla(s), (una) solución o (un) aerosol(es). Dicha composición puede comprender uno o más anticuerpos/moléculas de anticuerpo de la invención, con mayor preferencia una mezcla de anticuerpos monoglicosilados y doblemente glicosilados tal como se proporciona en el presente documento.

Se prefiere que dicha composición farmacéutica comprenda opcionalmente un portador y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica que se divulga en el presente documento puede ser particularmente útil para el tratamiento de trastornos neurológicos y/o neurodegenerativos. Dichos trastornos comprenden, sin carácter limitativo, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de "tipo holandés", el síndrome de Down, la demencia por VIH, la enfermedad de Parkinson y los trastornos neuronales relacionados con la edad. La composición farmacéutica de la invención es contemplada, *inter alia*, como un potente inhibidor de la formación de placas de amiloide o como potente estimulador para la despolimerización de placas de amiloide. Por lo tanto, la presente invención brinda composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de la invención que se utilizan para el tratamiento de enfermedades/trastornos amiloidogénicos. La frase "enfermedad/trastorno amiloidogénico" incluye cualquier enfermedad asociada con o causada por la formación o deposición de fibrilos de amiloide y/o proteólisis APP patológica. Un ejemplo de enfermedad amiloidogénica incluye, sin carácter limitativo, la enfermedad de Alzheimer

(AD), el síndrome de Down, la demencia asociada con la formación de cuerpos de Lewy, la enfermedad de Parkinson con demencia, el deterioro cognitivo leve, la angiopatía amiloide cerebral y la demencia vascular. Diferentes enfermedades amiloidogénicas se definen y/o caracterizan según la naturaleza del componente polipeptídico de los depósitos de amiloide. Por ejemplo, la proteína de β -amiloide es característica de los depósitos de amiloide hallados en sujetos con enfermedad de Alzheimer.

Los ejemplos de portadores, excipientes y/o diluyentes farmacéuticos adecuados son conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos portadores se pueden formular a través de métodos convencionales conocidos. Los portadores adecuados pueden comprender cualquier material que, cuando se lo combina con el agente de unión o anticuerpo anti-A β específico, mantiene la unión por alta afinidad con A β y no es reactivo con los sistemas inmunes del sujeto entre los que se incluyen excipientes, surfactantes, agentes de tonicidad y similares; ver Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16^a edition, Osol, A. Ed. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto en una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas se puede efectuar de diferentes maneras, por ejemplo, mediante la administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, tópica, intrabronquial, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, por medio de la administración intralesional. Las administraciones parenterales incluyen la administración intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intravenosa o intraarterial. Se prefiere, en particular, que dicha administración se lleve a cabo por inyección y/o suministro, por ejemplo, a un sitio en una arteria del cerebro o directamente en el tejido cerebral. Las composiciones de la invención también se pueden administrar directamente en el sitio deseado, por ejemplo, a través del suministro biolístico a un sitio objetivo externo o interno, como el cerebro.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos glicosilados que se describen en la presente se preparan mezclando el anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes, estabilizantes, surfactantes, tampones y/o agentes de tonicidad fisiológicamente aceptables opcionales. Los portadores, excipientes y/o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los recipientes en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen el ácido ascórbico, el glutatión, la cisteína, la metionina y el ácido cítrico; conservantes (tales como etanol, alcohol bencílico, fenol, m-cresol, p-clor-m-cresol, metilparabén o propilparabén, cloruro de benzalconio o combinaciones de ellos); los aminoácidos tales como la arginina, la glicina, la ornitina, la lisina, la histidina, el ácido glutámico, el ácido aspártico, la isoleucina, la leucina, la alanina, la fenilalanina, la tirosina, el triptófano, la metionina, la serina, la pralina y combinaciones de ellos; los monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como gelatina o albúmina del suero; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como trehalosa, sacarosa, lactosa, glucosa, manosa, maltosa, galactosa, fructosa, sorbosa, rafinosa, glucosamina, N-metilglucosamina (denominada "Meglumina"), galactosamina y ácido neuramínico; y/o surfactantes no iónicos tales como Tween, Brij Pluronic, Triton-X o polietilenglicol (PEG).

La composición farmacéutica puede presentarse en forma líquida, forma liofilizada o una forma líquida reconstituida a partir de una forma liofilizada, donde la preparación liofilizada debe reconstituirse con una solución estéril antes de la administración. El procedimiento estándar para reconstituir una composición liofilizada consiste en agregar nuevamente un volumen de agua pura (típicamente equivalente al volumen removido durante la liofilización). Sin embargo, también se pueden utilizar soluciones que comprenden agentes antibacterianos para la producción de composiciones farmacéuticas para la administración parenteral; ver también Chen (1992) Drug Dev Ind Pharm 18, 1311-54.

Los ejemplos de concentraciones de anticuerpos en la composición farmacéutica pueden oscilar entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 200 mg/ml o entre aproximadamente 50 mg/ml y aproximadamente 200 mg/ml, o entre aproximadamente 150 mg/ml y aproximadamente 200 mg/ml. Para una mayor claridad, se enfatiza que las concentraciones que se indican en el presente documento se refieren a la concentración en un líquido o en un líquido que es reconstituido con precisión a partir de una forma sólida.

Una formulación acuosa del anticuerpo se puede preparar en una solución de pH tamponado, por ejemplo, a un pH que oscila entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 7,0, o entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0, o alternativamente aproximadamente 5,5. Los ejemplos de tampones que son adecuados para un pH dentro de este rango incluyen tampones de fosfato, histidina, citrato, succinato, acetato y otros tampones de ácidos orgánicos. La concentración de tampón puede oscilar entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 100 mM, o entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 50 mM, según, por ejemplo, el tampón y la tonicidad deseada de la formulación.

Se puede incluir un agente de tonicidad en la formulación de anticuerpos para modular la tonicidad de la formulación. Los ejemplos de agentes de tonicidad incluyen cloruro de sodio, cloruro de potasio, glicerina y cualquier componente del grupo de aminoácidos, azúcares, así como combinaciones de ellos.

Preferentemente, la formulación acuosa es isotónica, aunque pueden ser adecuadas soluciones hipertónicas o hipotónicas. El término "isotónico" indica una solución que tiene la misma tonicidad que otra solución con la cual se compara, como ser una solución salina fisiológica y el suero sanguíneo. Los agentes de tonicidad se pueden utilizar

en una cantidad que oscila entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 350 mM, en particular, en una cantidad que oscila entre 105 mM y 305 mM.

También se puede agregar un surfactante a la formulación de anticuerpos para reducir la agregación del anticuerpo formulado y/o minimizar la formación de partículas en la formulación y/o reducir la adsorción. Los ejemplos de surfactantes incluyen ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitán (Tween), éteres alquílicos de polioxietileno (Brij), éteres de alquilfenilpolioxietileno (Triton-X), copolímero de polioxietileno-polioxipropileno (Poloxamer, Pluronic), y dodecilsulfato de sodio (SDS). Los ésteres de ácido graso-polioxietilensorbitán preferidos son el polisorbato 20 (comercializado bajo la marca Tween 20™) y el polisorbato 80 (comercializado para la marca Tween 80™). Los copolímeros de polietileno-polipropileno preferidos son aquellos comercializados bajo los nombres Pluronic® F68 o Poloxamer 188™. Los éteres alquílicos de polioxietileno preferidos son aquellos comercializados bajo la marca Brij™. Los ejemplos de concentraciones de surfactante pueden oscilar entre aproximadamente el 0,001% y aproximadamente el 1% p/v.

También se puede agregar un lioprotector a fin de proteger al principio activo lábil (por ejemplo, una proteína) frente a las condiciones desestabilizantes durante el procedimiento de liofilización. Por ejemplo, los lioprotectores conocidos incluyen los azúcares (incluyendo la glucosa y la sacarosa); los polioles (incluyendo el manitol, sorbitol y glicerol); y los aminoácidos (incluyendo la alanina, la glicina y el ácido glutámico). Los lioprotectores se utilizan, generalmente, en una cantidad que oscila entre aproximadamente 10 mM y 500 mM.

La formulación puede contener los agentes anteriormente identificados (es decir, anticuerpo glicosilado, surfactante, tampón, estabilizante y/o agente de tonicidad) y está esencialmente libre de uno o más conservantes, tales como etanol, alcohol bencílico, fenol, m-cresol, p-clor-m-cresol, metilparabén o propilparabén, cloruro de benzalconio, y combinaciones de ellos. En otra realización, se puede incluir un conservante en la formación, por ejemplo, en concentraciones que oscilan entre aproximadamente el 0,001 y aproximadamente el 2% (p/v).

La formulación de anticuerpos tal como se divulga en el presente documento puede ser una formulación líquida o liofilizada adecuada para la administración parenteral que puede comprender:

- entre aproximadamente 1 y aproximadamente 200 mg/ml de los anticuerpos glicosilados que se describen en el presente documento o COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS,
- entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 1% de al menos un surfactante;
- entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 mM de un tampón;
- opcionalmente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 500 mM de un estabilizante y/o entre aproximadamente 5 y aproximadamente 305 mM de un agente de tonicidad;
- a un pH que oscila entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 7,0.

La formulación parenteral de la invención es una formulación líquida o liofilizada que comprende:

- entre aproximadamente 1 y aproximadamente 200 mg/ml de los anticuerpos glicosilados que se describen en el presente documento o COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS,

- Tween 20 al 0,04% p/v,
- L-histidina 20 mM,
- sacarosa 250 mM,
- a un pH de 5,5.

La formulación parenteral tal como se divulga en el presente documento también puede comprender una formulación liofilizada que comprende:

- 15 mg/ml de los anticuerpos glicosilados que se describen en el presente documento o COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS,
- Tween 20 al 0,04% p/v,
- L-histidina 20 mM,
- sacarosa 250 mM,
- a un pH de 5,5;

o

- 75 mg/ml de los anticuerpos glicosilados que se describen en el presente documento o COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS,

- Tween 20 al 0,04% p/v,

- L-histidina 20 mM,

5 - sacarosa 250 mM,

- a un pH de 5,5;

o

- 75 mg/ml de los anticuerpos glicosilados que se describen en el presente documento o COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS,

10 - Tween 20 al 0,02% p/v,

- L-histidina 20 mM,

- sacarosa 250 mM,

- a un pH de 5,5;

o

15 - 75 mg/ml de los anticuerpos glicosilados que se describen en el presente documento o COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS,

- Tween 20 al 0,04% p/v,

- L-histidina 20 mM,

- trehalosa 250 mM,

20 - a un pH de 5,5;

o

- 75 mg/ml de los anticuerpos glicosilados que se describen en el presente documento o COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS,

- Tween 20 al 0,02% p/v,

25 - L-histidina 20 mM,

- trehalosa 250 mM,

- a un pH de 5,5.

La formulación parenteral tal como se describe en el presente documento también puede comprender una formulación líquida que comprende:

30 - 7,5 mg/ml de los anticuerpos glicosilados que se describen en el presente documento o COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS,

- Tween 20 al 0,022% p/v,

- L-histidina 120 mM,

- sacarosa 250 125 mM,

35 - a un pH de 5,5;

o

- 37,5 mg/ml de los anticuerpos glicosilados que se describen en el presente documento o COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS,

- Tween 20 al 0,02% p/v,

40 - L-histidina 10 mM,

- sacarosa 125 mM,
- a un pH de 5,5;
- o
- 5 - 37,5 mg/ml de los anticuerpos glicosilados que se describen en el presente documento o COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS,
- Tween 20 al 0,01% p/v,
- L-histidina 10 mM,
- sacarosa 125 mM,
- a un pH de 5,5;
- 10 o
- 37,5 mg/ml de los anticuerpos glicosilados que se describen en el presente documento o COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS,
- Tween 20 al 0,02% p/v,
- L-histidina 10 mM,
- 15 - trehalosa 125 mM,
- a un pH de 5,5;
- o
- 37,5 mg/ml de los anticuerpos glicosilados que se describen en el presente documento o COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS,
- 20 - Tween 20 al 0,01% p/v,
- L-histidina 10 mM,
- Trehalosa 125 mM,
- a un pH de 5,5;
- o
- 25 - 75 mg/ml de los anticuerpos glicosilados que se describen en el presente documento o COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS,
- Tween 20 al 0,02% p/v,
- L-histidina 20 mM,
- Trehalosa 250 mM,
- 30 - a un pH de 5,5;
- o
- 75 mg/ml de los anticuerpos glicosilados que se describen en el presente documento o COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS,
- Tween 20 al 0,02% p/v,
- 35 - L-histidina 20 mM,
- Manitol 250 mM,
- a un pH de 5,5;
- o

- 75 mg/ml de los anticuerpos glicosilados que se describen en el presente documento o COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS,
- Tween 20 al 0,02% p/v,
- L-histidina 20 mM,
- 5 - cloruro de sodio 140 mM,
- a un pH de 5,5;
- o
- 150 mg/ml de los anticuerpos glicosilados que se describen en el presente documento o COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS,
- 10 - Tween 20 al 0,02% p/v,
- L-histidina 20 mM,
- Trehalosa 250 mM,
- a un pH de 5,5;
- o
- 15 - 150 mg/ml de los anticuerpos glicosilados que se describen en el presente documento o COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS,
- Tween 20 al 0,02% p/v,
- L-histidina 20 mM,
- Manitol 250 mM,
- 20 - a un pH de 5,5;
- o
- 150 mg/ml de los anticuerpos glicosilados que se describen en el presente documento o COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS,
- Tween 20 al 0,02% p/v,
- 25 - L-histidina 20 mM,
- cloruro de sodio 140 mM,
- a un pH de 5,5.
- o
- 10 mg/ml de anticuerpo Abeta,
- 30 - Tween 20 al 0,01% p/v,
- L-histidina 20 mM,
- cloruro de sodio 140 mM,
- a un pH de 5,5.
- 35 La composición farmacéutica tal como se describe en el presente documento puede ser la formulación líquida que comprende:- 10 mg/ml de anticuerpo Abeta,
- Tween 20 al 0,01% p/v,
- L-histidina 20 mM,
- cloruro de sodio 140 mM,
- a un pH de 5,5.

La composición farmacéutica tal como se describe en el presente documento puede ser la formulación liofilizada que comprende:

- 75 mg/ml de anticuerpo Abeta,

- Tween 20 al 0,04% p/v,

5 - L-histidina 20 mM,

- sacarosa 250 mM,

a un pH de 5,5.

La frase "anticuerpos glicosilados que se describen en el presente documento" en el contexto de las formulaciones ejemplificadas puede comprender en la presente invención los anticuerpos monoglicosilados definidos en el presente documento, los anticuerpos doblemente glicosilados definidos en la presente, así como también mezclas de ellos.

El régimen de dosificación será determinado por el médico interviniente y los factores clínicos. Tal como es sabido en la técnica de la medicina, las dosificaciones para un paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se administrará, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general, y otros fármacos administrados concurrentemente. La materia farmacéuticamente activa proteínica puede estar presente en cantidades que oscilan entre 1 ng y 20 mg/kg de peso corporal por dosis, por ejemplo, entre 0,1 mg y 10 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, entre 0,5 y 5 mg/kg de peso corporal; sin embargo, se contemplan dosis por debajo o por encima de este rango ejemplar, en especial considerando los factores antes mencionados. Si el régimen es una infusión continua, también debe oscilar entre 1 µg y 10 mg/kg de peso corporal por minuto.

Las composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento se pueden formular para que sean de corta acción, de rápida liberación, de larga acción o de liberación retardada. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas también pueden ser adecuadas para una liberación lenta o una liberación controlada.

Las preparaciones de liberación retardada se pueden preparar utilizando los métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación retardada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, donde las matrices se presentan en forma de artículos con forma, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación retardada incluyen poliésteres, copolímeros del ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, hidrogeles, poliláctidos, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Se puede evitar la posible pérdida de actividad biológica y los posibles cambios en la inmunogenicidad de los anticuerpos comprendidos en las preparaciones de liberación retardada utilizando aditivos apropiados, controlando el contenido de humedad y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

Se puede monitorear el progreso a través de la evaluación periódica. Las composiciones, es decir, los anticuerpos monoglicosilados y/o doblemente glicosilados de la invención o una mezcla de ellos, se pueden administrar local o sistémicamente. Cabe destacar que los anticuerpos periféricamente administrados pueden ingresar en el sistema nervioso central; ver, *inter alia*, Bard (2000), Nature Med. 6, 916-919. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Los ejemplos de solventes no acuosos son el propilenglicol, el polietilenglicol, los aceites vegetales tales como el aceite de oliva, y los ésteres orgánicos inyectables tales como el oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, que incluyen medios salinos y tamponados. Los vehículos parenterales incluyen una solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactada, o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de fluidos y nutrientes, reabastecedores de electrolito (como aquellos a base de dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos como ser, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes, y similares. Además, la composición farmacéutica de la invención puede comprender otros agentes de acuerdo con el uso deseado de la composición farmacéutica. Dichos agentes pueden ser fármacos que actúan en el sistema nervioso central, como los factores neuroprotectores, inhibidores de la colinesterasa, agonistas del receptor muscarínico M1, hormonas, antioxidantes, inhibidores de la inflamación, etc. Se prefiere particularmente que dicha composición farmacéutica comprenda otros agentes como, por ejemplo, los neurotransmisores y/o las moléculas de sustitución para neurotransmisores, la vitamina E o el ácido alfa-lipoico.

El experto en la técnica, en particular, pero sin carácter limitativo, los bioquímicos, biólogos, químicos, farmacéuticos y grupos de dichos profesionales ya se encuentran en posición de trabajar y generar las composiciones farmacéuticas anteriormente mencionadas. También el personal médico experto en la técnica, como los médicos intervinientes, saben cómo administrar las composiciones farmacéuticas a un paciente que necesita un tratamiento con las composiciones farmacéuticas que se definen en la presente. Dicha administración puede comprender la administración sistémica, por ejemplo, a través de infusiones y/o inyecciones. Sin embargo, también se contempla la administración directa de los compuestos y/o mezclas de compuestos de la invención al cerebro. Por ejemplo, el

compuesto o mezcla de compuestos o formulación de compuestos se puede administrar mediante inyección interventricular o intratecal directa al cerebro, preferentemente a través de una infusión lenta para minimizar el impacto en el parénquima cerebral. También se puede emplear un implante de liberación lenta en el cerebro. También se contempla el empleo de enfoques de terapia génica, por ejemplo, a través del uso de células recombinantes implantadas que producen los anticuerpos que se definen en la presente invención. Estas “células recombinantes” deben ser capaces de brindar las glicosilaciones definidas en la presente en las regiones/partes variables de los anticuerpos que se describen en el presente documento, en particular, los anticuerpos anti- β de la invención. Sin embargo, tal como se ha establecido anteriormente, una ventaja de los anticuerpos/mezclas de anticuerpos de la presente invención es su capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica y unirse a las placas de amiloide. Las composiciones farmacéuticas de la invención descritas infra se pueden utilizar para el tratamiento de todos los tipos de enfermedades desconocidas hasta el momento o relacionadas o dependientes de la agregación de APP patológica o procesamiento de APP patológico. Pueden ser particularmente útiles para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y de otras enfermedades donde los depósitos extracelulares de β -amiloide parecen desempeñar una función. Se pueden emplear convenientemente en seres humanos, aunque el tratamiento en animales también está comprendido en los métodos, usos y composiciones que se describen en el presente documento.

En una realización preferida de la invención, la composición de la presente invención tal como se divulga en el presente documento es una composición de diagnóstico que también comprende, opcionalmente, medios de detección adecuados. La composición de diagnóstico comprende al menos uno de los compuestos de la invención antes mencionados, es decir, los anticuerpos glicosilados que se describen en el presente documento.

Dicha composición de diagnóstico puede comprender los compuestos de la invención, en particular, las moléculas de anticuerpos glicosilados de la presente invención, forma soluble/fase líquida, pero también se contempla que dichos compuestos están unidos/adosados y/o ligados a un soporte sólido.

Los soportes sólidos se pueden utilizar en combinación con la composición de diagnóstico tal como se define en el presente documento o los compuestos de la presente invención se pueden ligar directamente a dichos soportes sólidos. Dichos soportes son conocidos en la técnica y comprenden, *inter alia*, materiales de columna comercialmente disponibles, perlas de poliestireno, perlas de látex, perlas magnéticas, partículas de metales coloidales, chips y superficies de vidrio y/o silicio, tiras de nitrocelulosa, membranas, láminas, duracitos, recipientes y paredes de bandejas de reacción, tubos plásticos, etc. El/los compuesto(s) de la invención, en particular, los anticuerpos de la presente invención, se puede unir a muchos portadores diferentes. Los ejemplos de portadores bien conocidos incluyen el vidrio, el poliestireno, el cloruro de polivinilo, el polipropileno, el polietileno, el policarbonato, el dextrano, el nailon, las amilosas, las celulosas naturales o modificadas, las poliácridamidas, las agarosas y la magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble o insoluble a los fines de la invención. Los marcadores y métodos adecuados para el marcaje se han identificado anteriormente y también se mencionan más adelante en el presente documento. Los métodos adecuados para fijar/inmovilizar dicho(s) compuesto(s) de la invención son bien conocidos e incluyen, sin carácter limitativo, interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares.

Se prefiere particularmente que la composición de diagnóstico de la invención se emplee para la detección y/o cuantificación de APP y/o productos de procesamiento de APP, como el β -amiloide o para la detección y/o cuantificación de lados de escisión de APP patológicos y/o (genéticamente) modificados.

Tal como se ha ilustrado en los ejemplos adjuntos, las moléculas de anticuerpos glicosilados de la invención son particularmente útiles como reactivos de diagnóstico en la detección de placas de amiloide humanas genuinas en secciones del cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer mediante inmunofluorescencia indirecta.

Se prefiere que dichos compuestos de la presente invención, que se emplean en una composición de diagnóstico, sean detectablemente marcados. Existen varias técnicas disponibles para el marcaje de biomoléculas, que son bien conocidas por los expertos en la técnica y que se consideran dentro del alcance de la presente invención. Existen muchos marcadores diferentes y métodos para marcar que son conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de los tipos de marcadores que se pueden utilizar en la presente invención incluyen enzimas, radioisótopos, metales coloidales, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes.

Los marcadores comúnmente utilizados comprenden, *inter alia*, fluorocromos (como la fluoresceína, rodamina, rojo de Texas, etc.) enzimas (como la peroxidasa de rábano, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina), isótopos radiactivos (como ^{32}P o ^{125}I), biotina, digoxigenina, metales coloidales, compuestos quimioluminiscentes o bioluminiscentes (como los dioxetanos, luminol o acridinio). Los procedimientos de marcaje, como el acoplamiento covalente de enzimas o grupos biotinilo, yodinationes, fosforilaciones, biotinilaciones, etc., son conocidos por los expertos en la técnica.

Los métodos de detección comprenden, sin carácter limitativo, autoradiografía, microscopía fluorescente, reacciones enzimáticas directas e indirectas, etc. Los ensayos de detección comúnmente utilizados comprenden métodos radioisotópicos o no radioisotópicos. Éstos comprenden, *inter alia*, transferencia Western, ensayos de superposición,

RIA (radioinmunoensayo) e IRMA (ensayo radioinmunométrico), EIA (inmunoensayo enzimático), ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), FIA (inmunoensayo fluorescente) y CLIA (inmunoensayo quimioluminiscente).

Además, la presente invención brinda el uso de moléculas de anticuerpos glicosilados de la invención, o una molécula de anticuerpo producida con el método de la invención, o una mezcla de anticuerpos monoglicosilados y doblemente glicosilados provistos en el presente documento para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico para la prevención, tratamiento y/o diagnóstico de una enfermedad asociada con la amiloidogénesis y/o formación de placas de amiloide. También se prefiere que los compuestos que se describen en la presente, en particular, las moléculas de anticuerpos de la invención, sean empleados en la prevención y/o tratamiento de neuropatologías asociadas con el procesamiento de APP modificado o anormal y/o amiloidogénesis. Las moléculas de anticuerpos, por ejemplo, en el formato de inmunoglobulinas (modificadas), como anticuerpos en una estructura IgG, en particular, en una estructura IgG1, o en el formato de anticuerpos quiméricos (en particular, anticuerpos totalmente humanizados o anticuerpos completos), anticuerpos biespecíficos, Fvs de cadena única (scFvs) o scFvs biespecíficos y similares se emplean en la preparación de las composiciones farmacéuticas del presente documento. Sin embargo, las moléculas de anticuerpos y las mezclas provistas en el presente documento también son útiles en las configuraciones de diagnóstico tal como se documenta en los ejemplos adjuntos, dado que las moléculas de anticuerpos de la invención interactúan específicamente con/detectan A β 4 y/o depósitos/placas de amiloide.

Por lo tanto, un uso inventivo de los compuestos de la presente invención es el uso para la preparación de una composición farmacéutica para un trastorno neurológico que necesita ser reducido, por ejemplo, mediante desintegración de las placas de β -amiloides, mediante aclaramiento (de placas) de amiloide o mediante inmunización pasiva contra la formación de placas de β -amiloides. Tal como se ilustra en los ejemplos adjuntos, las moléculas de anticuerpos de la invención son particularmente útiles en la prevención de la agregación de A β y en la despolimerización de los ya formados agregados de amiloide. En consecuencia, los anticuerpos glicosilados de la invención, o una mezcla de anticuerpos monoglicosilados o doblemente glicosilados tal como se describe en el presente documento, se deben emplear en la reducción de depósitos/placas de amiloide patológicos, en el aclaramiento de placas de amiloide/precursores de placas, así como también en la protección neuronal. Se contempla particularmente que las moléculas de anticuerpos de la invención se pueden emplear en la prevención *in vivo* de las placas de amiloide, así como también en el aclaramiento *in vivo* de placas/depositos de amiloide preexistentes. Además, las moléculas de anticuerpos o las mezclas de la invención se pueden emplear en enfoques de inmunización pasiva contra el péptido A β y agregados de A β , es decir, las placas de β -amiloides. El aclaramiento de A β 4/depositos de A β 4 puede lograrse, *inter alia*, a través del uso médico de anticuerpos de la presente invención que comprende una parte Fc. Dicha parte Fc de un anticuerpo puede ser particularmente útil en las respuestas inmunes mediadas por el receptor Fc, por ejemplo, la atracción de macrófagos (células fagocíticas y/o microglia) y/o células auxiliares. Para la mediación de las inmunorespuestas relacionadas con la parte Fc, la molécula de anticuerpo de la invención se encuentra preferentemente en una estructura IgG1 (humana). Tal como se ha tratado en el presente documento, el sujeto preferido a tratar con las moléculas de anticuerpo de la invención, o mezclas de anticuerpos, es un sujeto humano. También se contemplan otras estructuras, como las estructuras IgG2a o IgG2b, para las moléculas de anticuerpo de la invención. Las estructuras de inmunoglobulinas en el formato IgG2a e IgG2b se contemplan particularmente en escenarios con ratones, por ejemplo, en usos científicos de las moléculas de anticuerpo de la invención, por ejemplo, en pruebas en ratones transgénicos que expresan APP de tipo silvestre (humano) o mutada, fragmentos de APP y/o A β 4.

Las enfermedades anteriormente mencionadas asociadas con amiloidogénesis y/o formación de placas de amiloide comprenden, sin carácter limitativo, demencia, enfermedad de Alzheimer, neuropatía motora, enfermedad de Parkinson, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), escurpie, demencia relacionada con VIH, así como también la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés, el síndrome de Down y los trastornos neuronales relacionados con la edad. Las moléculas de anticuerpos de la invención y las composiciones provistas en el presente documento también pueden ser útiles en la reducción o prevención de procesos inflamatorios relacionados con la amiloidogénesis y/o la formación de placas de amiloide.

En consecuencia, la presente invención también brinda un método para tratar, prevenir y/o demorar los trastornos neurológicos y/o neurodegenerativos que comprenden la etapa de administrar a un sujeto que sufre dicho trastorno neurológico y/o neurodegenerativo, y/o a un sujeto susceptible de dicho trastorno neurológico y/o neurodegenerativo, una cantidad eficaz de una molécula de anticuerpo o una mezcla de anticuerpos monoglicosilados y/o doblemente glicosilados de la invención tal como se provee en el presente documento y/o una composición tal como se ha definido anteriormente. El tratamiento que se proporciona en el presente documento puede comprender la administración del compuesto/composiciones de la presente invención solo o en forma de tratamiento coterapéutico, es decir, en combinación con otros fármacos o medicamentos. En una realización preferida particular de la invención, se brinda un método para tratar, prevenir y/o demorar trastornos neurológicos y/o neurodegenerativos que comprende la etapa de administrar a un paciente que necesita una intervención médica correspondiente la mezcla de anticuerpos que comprende anticuerpos monoglicosilados o doblemente glicosilados dirigidos frente a A β y tal como se proporciona en el presente documento.

El término "tratamiento" tal como se utiliza en el presente documento contempla la administración de anticuerpos monoglicosilados y/o doblemente glicosilados (o mezclas de ellos) tal como se describe en la presente a un paciente

que lo necesite. Dicho paciente puede ser un paciente humano, en una realización un ser humano que sufre o que es susceptible a un trastorno relacionado con el procesamiento de APP patológico. En consecuencia, el término "tratamiento" tal como se utiliza en el presente documento comprende la administración profiláctica, así como también curativa, de los compuestos o mezclas de compuestos del presente documento.

5 Un trastorno a tratar con los compuestos y la composición provista en el presente documento es la enfermedad de Alzheimer. Los pacientes que tienen un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer probable basado en los criterios del Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Comunicativos y Emiplejia/Asociación para la Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Relacionados [National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association] (criterios de NINCDS/ADRDA) Mckhann *et al.*, 1984.

10 También se contempla en el contexto de la presente invención el uso médico de los compuestos y/o composiciones provistas en el presente documento en un escenario de "coterapia", por ejemplo, en el caso de trastornos relacionados con la APP, como la enfermedad de Alzheimer. En este caso, se contempla la coterapia con medicamentos aprobados, como la memantina, el donepezil, la rivastigmina o la galantamina.

15 Aún en otra realización, la presente invención brinda un kit que comprende al menos una molécula de anticuerpo glicosilado tal como se define en el presente documento o la mezcla de los métodos monoglicosilados y/o doblemente glicosilados de la invención tal como se provee en el presente documento. Ventajosamente, el kit de la presente invención también comprende opcionalmente (un) tampón(s), soluciones de almacenamiento y/o reactivos o materiales restantes requeridos para la realización de ensayos y con fines médicos, científicos o de diagnóstico. Además, partes del kit de la invención se pueden envasar individualmente en viales o botellas o en combinación en
20 envases o unidades de múltiples envases.

El kit de la presente invención se puede utilizar ventajosamente, *inter alia*, para llevar a cabo el método de la invención y se puede emplear en una variedad de aplicaciones mencionadas en la presente, por ejemplo, como kits de diagnóstico, como herramientas de búsqueda o herramientas médicas. Adicionalmente, el kit de la invención puede contener medios para la detección adecuada para fines científicos, médicos y/o de diagnóstico. La fabricación
25 de los kits sigue, preferentemente, procedimientos estándares que son conocidos por los expertos en la técnica.

Las figuras presentan:

Figura 1: Mapa de plásmidos que muestra los sitios de inserción para las secuencias de cadenas pesadas y ligeras.

Figura 2: Ejemplo de un cromatograma analítico.

Figura 3: Cromatograma de una columna CMT tal como se describe en el texto. Las isoformas doblemente glicosiladas y monoglicosiladas se eluyen en el pico doble 1, la isoforma no glicosilada se eluye en el pico 2.
30

Figura 4: Análisis ESI-EM completo de IgG de isoformas de ANTICUERPO A. La masa molecular del pico principal se indica en Da. A: ANTICUERPO A no glicosilado; B: ANTICUERPO A monoglicosilado; C: ANTICUERPO A doblemente glicosilado.

Figura 5: Esquema de patrones de N-glicosilación de ANTICUERPOS deducidos. Las estructuras que ocurren sólo parcialmente se indican entre paréntesis. A: Tipo Complejo; B: Tipo Híbrido; C: Tipo Oligomanosa; GlcNAc = N-acetilglucosamina, Man = manosa; Gal = galactosa; Fuc = fucosa; NeuAc = ácido N-acetil-neuramínico.
35

Figura 6: Presentación esquemática de estructuras de carbohidrato en Asn306 del ANTICUERPO A deducidas del análisis EM y HPAEC-PAD. Las estructuras que ocurren sólo parcialmente se indican entre paréntesis. GlcNAc = N-acetil-glucosamina, Man = manosa; Gal = galactosa; Fuc = fucosa; NeuAc = ácido N-acetil-neuramínico.

Figura 7: Unión de isoformas de ANTICUERPO A a Aβ40 fibrilado inmovilizado (chip sensor Biacore). Concentración de anticuerpos 60 nM. También se muestra la curva de unión de una mezcla de todas las isoformas, es decir, antes de la purificación, tal como se indica.
40

Figura 8: Mapeo de epítomos de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS A mediante análisis pepspot. A) Señales Pepspot de puntos de decapeptidos superpuestos individuales indicados; B) análisis densitométrico de la intensidad de señal de puntos de decapeptidos superpuestos únicos.
45

Figura 9: Ensayo de despolimerización. La COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS A y las isoformas de ANTICUERPOS A inducen la liberación de Aβ biotinilado de Aβ agregado.

Figura 10: COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS A que comprende isoformas de ANTICUERPOS A que capturan Aβ soluble de fluido cerebroespinal humano (CSF). Promedio de 4 muestras de CSF de pacientes con enfermedad de Alzheimer analizados en grupos de 2. Dos inmunoprecipitaciones seguidas de transferencias Western por combinación con cuantificación del Aβ capturado mediante densitometría de transferencias Western. Se tomó el valor de Aβ más alto en una serie de transferencias Western dadas como el 100%.
50

Figura 11: Tinción por inmunofluorescencia indirecta de placas de amiloide humanas con isoformas de ANTICUERPOS A *in vitro*. Detección altamente sensible y específica de placas de β -amiloide humanas *ex vivo* genuinas después de la tinción con 10 ng/ml de concentración de ANTICUERPO A. El ANTICUERPO A ligado se reveló mediante Cy3 (H+L) antihumano de cabra para (A) COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS A; (B) ANTICUERPO A doblemente glicosilado; (C) ANTICUERPO A monoglicosilado; y (D) ANTICUERPO A no glicosilado. Barra de escala = 80 μ m.

Figura 12: Inmunodecoración *in vivo* de placas de ratón transgénico PS2APP con isoformas de ANTICUERPOS A glicosilados revelados por microscopia confocal. La inmunodecoración revela la unión *in vivo* de isoformas de ANTICUERPOS A 3 días después de una única dosis de 1 mg de isoformas de ANTICUERPOS A. Las imágenes representativas de la distribución de las isoformas de ANTICUERPOS A se muestran para la isoforma de ANTICUERPOS A doblemente glicosilada (A), monoglicosilada (B) y no glicosilada (C). Barra de escala = 80 μ m.

Figura 13: Análisis de unión de anticuerpos anti-A β con la APP de la superficie de la célula. La unión de anticuerpos con células HEK293 transfectadas a APP humana y células control no transfectadas se analizó mediante citometría de flujo.

Figura 14: Esquema de moléculas de anticuerpos no glicosilados, monoglicosilados y doblemente glicosilados de ANTICUERPO A (inmunoglobulinas).

Figura 15: Superficie total de las placas (A), número total de placas (B) y número y distribución de tamaño de las placas (C) en la región del tálamo después de un tratamiento de 5 meses con la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS A (que comprende ANTICUERPO A monoglicosilado y doblemente glicosilado), isoformas de ANTICUERPOS A doblemente glicosilados y mono glicosilados (20 mg/kg semanalmente, i.v.) o vehículo.

Figura 16: Superficie total de las placas (A), número total de placas (B) y número y distribución de tamaño de las placas (C) en la región de la corteza y cuerpo calloso después de un tratamiento de 5 meses con la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS A (que comprende ANTICUERPO A monoglicosilado y doblemente glicosilado), isoformas de ANTICUERPOS A doblemente glicosilados y mono glicosilados (20 mg/kg semanalmente, i.v.) o vehículo.

Figura 17: Superficie total de las placas (A), número total de placas (B) y número y distribución de tamaño de las placas (C) en la región del hipocampo después de un tratamiento de 5 meses con la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS A (que comprende ANTICUERPO A monoglicosilado y doblemente glicosilado), isoformas de ANTICUERPOS A doblemente glicosilados y mono glicosilados (20 mg/kg semanalmente, i.v.) o vehículo.

Figura 18: Superficie total de las placas (A), número total de placas (B) y número y distribución de tamaño de las placas (C) en la región del subiculum después de un tratamiento de 5 meses con la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS A (que comprende ANTICUERPO A monoglicosilado y doblemente glicosilado), isoformas de ANTICUERPOS A doblemente glicosilados y mono glicosilados (20 mg/kg semanalmente, i.v.) o vehículo.

Figura 19: Medición de la intensidad de fluorescencia de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS A inmunoteñida unida a placas de β -amiloide después de la dosificación bisemanal de 0,1 mg/kg con 1, 2 y 4 aplicaciones i.v. a ratones PS2APP. El análisis se llevó a cabo 2 semanas después de la última inyección.

Figura 20: Medición de la intensidad de fluorescencia de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS A inmunoteñida unida a placas de β -amiloide después de la dosificación mensual de 0,15 mg/kg con 2 y 3 aplicaciones i.v. a ratones PS2APP. El análisis se llevó a cabo 2 semanas después de la última inyección.

Figura 21: Medición de la intensidad de fluorescencia de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS A inmunoteñida unida a placas de β -amiloide después de 4 inyecciones bisemanales de 0,05, 0,1 y 0,30 mg/kg a ratones PS2APP, lo cual sugiere la unión de las placas de amiloide relacionada con la dosis. El análisis se llevó a cabo 2 semanas después de la última inyección.

Figura 22: Medición de la intensidad de fluorescencia de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS A inmunoteñida unida a placas de β -amiloide después de 3 inyecciones mensuales de 0,075, 0,15 y 0,45 mg/kg a ratones PS2APP, lo cual sugiere la unión de las placas de amiloide relacionada con la dosis. El análisis se llevó a cabo 2 semanas después de la última inyección.

Figura 23: Secciones de cerebro con AD humanas teñidas contra A β con anticuerpo murino monoclonal anti-A β (BAP-2) después de 40 horas de incubación con la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS A en las concentraciones indicadas junto con macrófagos humanos primarios diferenciados vivos (0,8 millones de células/ml). Los resultados indican una reducción en la carga de amiloide que indica el efecto de fagocitosis celular dependiente del antígeno de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS A en las placas de β -amiloide. Barra de escala = 300 μ m.

Figura 24: Respuesta a la dosis de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS A en las placas de β -amiloide a partir de secciones de cerebro con AD humanas incubadas con 0,8 millones de células/ml. (A) muestra el área total de las placas y (B) la intensidad de la tinción.

Figura 25: Microscopia fluorescente de células P388D1 incubadas con 0, 0,1, 1 y 10 µg/ml de COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS A (A a D, respectivamente).

Figura 26: Medición cuantitativa de la respuesta a la dosis de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS A utilizando fluoperlas conjugadas de Aβ y células P388D1 (que se muestran en unidades fluorescentes relativas, RFU). Dos experimentos independientes indican un rango considerable de eficacia para la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS A.

Figura 27: Tabla que muestra diferentes estructuras de glicano del ANTICUERPO A en la región constante de la cadena pesada (Asn 306; primeras dos columnas) y en la región variable de la cadena pesada (Asn 52; tercera y cuarta columna).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos no limitativos ilustran la invención.

Ejemplo 1: Generación de ANTICUERPO A a través de técnicas de clonaje

De acuerdo con la presente invención, se generó una molécula de IgG1 mediante técnicas comunes de clonación. El ANTICUERPO A se encuentra en su secuencia codificadora y en su secuencia de aminoácidos expresada caracterizada por su región variable de la cadena pesada (V_H). El ejemplo correspondiente de una cadena pesada codificada por una secuencia de ADN es el siguiente:

```
cagggtggaattggtggaagcggcgccgctggtgcaaccggcgccgagcctgctgagctgcgccgctccggttaccttagcagctatgcatgagct
gggtgcgccaagccccctggaagggtctcgagtggtgagcgctattaatgcttctgtactcgacttattatgctgattctgtaagggtcgtttaccatttcacgtgata
attcgaaaaacaccctgtatctgcaaatgaacagcctgctgcggaagatacggccgtgtattattgcgcgctggttaagggtataactcataagccttatggttatgtt
cgttattttgatgtttggggccaaggcaccctggtgacggttagctcagcctccaccaagggtccatcggttctccccctggcaccctcctccaagagcacctctggggg
cacagcgccctgggtgctgctggtcaaggactactccccgaaccggtgacggtgctgtggaactcaggcgccctgaccagcgcggtgcacacctcccggtgtc
ctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacggtgcccctcagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaaca
ccaaggtggacaagaaagttgagcccagatacgtgcatatcgtgcaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggg
accgtcagcttctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctccggaccctgaggtcacatgctggtggtggagctgagccacgaagaccctgag
gtcaagttcaactgtgtagctggagcggtgaggtgcataatgccaagacaaagccgcgaggagcagtagaacagcacgtaccgggtggtcagcgctcctcac
cgtcctgcaccagactggctgaatggcaaggagtagaaggtgcaaggttccaaacaaagccctccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggg
cagccccgagaaccacaggtgacaccctgcccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgcaaaaggcttctatcccagcga
catcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgctcccggtgctggactccgacggctccttctctacagcaagctcac
cgtggacaagagcaggtggcagcgggaacgtcttctcatgctcgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggt
aatga (SEQ ID NO: 5).
```

y codifica para la siguiente cadena H de inmunoglobulina:

```
QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINASGTRTYADSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHKPYGYVRYFDVWVGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 6).
```

La misma cadena pesada también puede ser codificada por una secuencia que comprende una “secuencia líder” adicional tal como se muestra en la siguiente secuencia:

```
atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctccagatgggtcctgtcc
cagggtggaattggtggaagcggcgccgctggtgcaaccggcgccgagcctgctgagctgcgccgctccggttaccttagcagctatgcatgagct
gggtgcgccaagccccctggaagggtctcgagtggtgagcgctattaatgcttctgtactcgacttattatgctgattctgtaagggtcgtttaccatttcacgtgata
attcgaaaaacaccctgtatctgcaaatgaacagcctgctgcggaagatacggccgtgtattattgcgcgctggttaagggtataactcataagccttatggttatgtt
cgttattttgatgtttggggccaaggcaccctggtgacggttagctcagcctccaccaagggtccatcggttctccccctggcaccctcctccaagagcacctctggggg
cacagcgccctgggtgctgctggtcaaggactactccccgaaccggtgacggtgctgtggaactcaggcgccctgaccagcgcggtgcacacctcccggtgtc
ctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacggtgcccctcagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaaca
ccaaggtggacaagaaagttgagccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctgggggaccgtcagcttctcttcccc
caaaaaccgaagcaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtgagcgtgagccagcaagaccctgaggtcaagttcaactgttacgtg
gacggcggtgaggtgcataatgccaagacaaagccgcgaggagcagtagaacagcacgtaccgggtggtcagcgctcctcaccgtcctgcaccaggtg
ctgaatggcaaggagtagaaggtgcaaggttccaaacaaagccctccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
ggtgtacacctgccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgga
gagcaatgggagcgggagagaactacaagaccacgctcccggtgctggactccgacggctccttctcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggt
ggcagcaggggaacgtcttctcatgctcctgtagcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctcctcctgtctccgggtaatga (SEQ ID
NO: 25).
```

La secuencia de aminoácidos correspondiente sería:

MKHLWFFLLVAAPRWVLS

QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINASGTRTYADSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGKGNTHKPYGYVRYFDVWQGGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 26).

De un modo similar, la cadena ligera del ANTICUERPO A es codificada por la siguiente secuencia de nucleótidos:

10 gatatcgtgctgaccagagcccggcgaccctgagcctgtctccggcggaacgtgacgacctgagctgcagagcgagccagagcgtgagcagcagctatctggc
gtggtagcagcagaaccagggtcaagcaccgctctattaattatggcgagcagccgtgcaactgggtcccgcgcggttagcggtctggtaccggcacg
gattttaccctgaccattagcagcctggaacctgaagactttgagacttatttgccttcagattataatgcctattacctttggccagggtacgaaagttaaattaa
cgtacggtggtgcaccatctgtctcatctcccgcctcatgtgagcaggtgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctgaataacttctatccagagaggcca
aagtacagtgaaggtggataacgcccctcaatcgggtaactccaggagagtgacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacc
15 tgacgtgagcaaacgagactacgagaaacacaaagtctacgctgcgaagtacccatcagggtcgtgagctcgccgtcacaaagagctcaacaggggag
agtgttag (SEQ ID NO: 7).

y codifica para la siguiente secuencia de aminoácidos (cadena L):

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTIS
LEPEDFATYYCLQIYNMPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
20 GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 8).

Nuevamente también aquí, se puede emplear una "secuencia líder" y las secuencias correspondientes serían:

atgggtgtgcagaccaggctcttctctgtgtgctctggtgctacggg
gatatcgtgctgaccagagcccggcgaccctgagcctgtctccggcggaacgtgacgacctgagctgcagagcgagccagagcgtgagcagcagctatctggc
gtggtagcagcagaaccagggtcaagcaccgctctattaattatggcgagcagccgtgcaactgggtcccgcgcggttagcggtctggtaccggcacg
25 gattttaccctgaccattagcagcctggaacctgaagactttgagacttatttgccttcagattataatgcctattacctttggccagggtacgaaagttaaattaa
cgtacggtggtgcaccatctgtctcatctcccgcctcatgtgagcaggtgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctgaataacttctatccagagaggcca
aagtacagtgaaggtggataacgcccctcaatcgggtaactccaggagagtgacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacc
tgacgtgagcaaacgagactacgagaaacacaaagtctacgctgcgaagtacccatcagggtcgtgagctcgccgtcacaaagagctcaacaggggag
agtgttag (SEQ ID NO: 27).

30 Esta secuencia codifica para la siguiente secuencia de aminoácidos:

MVLQTQVFISLLLWISGAYG
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTIS
LEPEDFATYYCLQIYNMPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 28).

35 Estas secuencias anteriores se conocen de MAB31 tal como se divulga en el documento WO 03/070760.

Sin embargo, las cadenas pesadas y ligeras del ANTICUERPO A ejemplificado también se pueden codificar mediante las secuencias que se indican a continuación:

a) la cadena pesada

atggagtttgggctgagctgggttttctcgttcttttaagaggtgattcatggagaaatagagagactgagtgagtgaaatgagtgagaaaaactggatttgt
40 ggcattttctgataacggtgtccttctgttgcaggtgtccaggtgtcaggtggagctgggtggagctggggaggcctgggtccagcctgggggtccctgagactctcgt
tgcagcgtctggtacacctcagtagctatgcatgagctgggtccgagcaggtccaggcaaggggctcagtggtgtccgcatataaacgagcggtagccgc
acctactatgagactccgtgaaggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacagcgt
gtgtattactgtgcgagaggcaaggggaacaccacaagccctacggtacgtactattgacgtgtggggccaaggaaccctggtcaccgtctcctcaggtg
agtctctacaacctctcctcgtcgccgagctgaagtctgagggcagaatctgtccaggtctatcgactctgtgagaattaggggtgacagttgatgtgacaa
45 tttaggggtcagtgactgtctgttctgtgagtgagactggaataggtcaccctgaagactaaagaggggtccaggggcttttctgcacaggcagggaaacagaat
gtggaacaatgactgaatgggtgattctgtgtgacaccaagaattggcataatgtctgagttgccaaaggtgatcttagctagactctgggttttctcgggtacaga
ggaaaaaccactattgtgattactatgctatggactactgggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctcaggaagaatggcctctcaggtcttatttttaacctttgtt
atggagtttctgagcattgcagactaatctggatatttgcctgagggagccggtgagagaagttgggaaataatctgtctaggatctcagagccttaggacag
attatctccacatcttgaaaaactaagaatctgtgtgatgtgtgtgtgagtcctggatgatgggactttggaggctcattttagggagatgctaaaacaat
50 cctatggctggaggatagttgggtgtgagttgagatttgcagtttgaatgaagtatttagctgcaatactcaaggaccacctctgtgacaaccattttatacagat
ccaggcatagggacaaaaagtgagtgaggcactttcttagatttggaggaattgtccacactagattgtttaaactcatttgggaaggagctgtctagtgtg
agtcaaggagaaaggcatcagcctcgtctcaaaagggtgagtgctgtagagaggtctgtggagcctgcaaaagtcagctttcaaggaaacacagaagt
atgtgtatggaatattagaagatgtgttcttacttaagttggttcttaggaaaaaatagttaaatactgtgactttaaatgtgagaggttttcaagtaactatttttaaat
gtccaaaattttgtcaatcaattttaggtctgttgtgtgtagaactgacattactaaagttaaaccgaggaatgggagtgaggctctctacacccattcagaactgactt
55 taacaataataaataaagttaaaatatttttaaatgaattgagcaatgtgtgagttgagtaagatggccgatcagaaccggaacacctgcagcagctggcaggaagc
aggatcatgtgcaaggctatttggggaagggaataaaaccactaggtaaactgtgagctgtgttgaagaagtggtttgaacactctgtccagccccacaaa

cggaagtcagagctgagcaaaacaccacctgggtaatttgcatttctaaataagttagagattcagccgaactggagaggtccttttaactattagttcaacc
tttaattttagcttgagtagttctagttccccaaactaagtttatgcattctaaatgtattagaattcgagctcggtagacagctttctggggcaggccaggcctgaccttg
gctttggggcaggagggggctaaggtaggcaggtggcgccagcaggtgcacaccaatgccatgagccagacactggacgtgaacctcgcgagacgt
aagaaccaggggcctctgcgctgggcccagctctgtccacaccgcggtcacatggcaccacctctcttgagcctccaccaaggggcccatcggtcttccccctg
5 gacccctctccaagagcacctctgggggcacagcggcctgggctgctgtgaaggactactccccgaaccggtgacggtgtctgtggaactcaggcgccctg
accagcggctgcacacctcccggtgctctacagtctcaggaactctactccctcagcagcgtggtgacctgcccctcagcagctggggacccagacctacat
ctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagaagttggtgagagggccagcacaggaggagggtgtctgtggaagccaggctcagc
gtctctgcttgagcgcacatccggctatgcagcccagtcagggcaggaaggcagggcccgctgctccttccaccggagcctctgcccgccactcatgctcag
ggagagggtctctgtgttttccaggctctggcaggcagcaggtcagggtgcccctaacccaggccctgcacacaaggggcaggtgtggtgctgagcagctcca
10 agagccatatccgggagggactgcccctcagctaaggccaccccaaggccaaactctcactccctcagctgcgagacactctctctccagattcagtaac
cccaatctctctgcagagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccaggtaagccagcccaggcctgcacctccagctcaaggcgggaca
ggtgccttagagtagcctgcacaggacaggccccagccgggtgtgacacgtccacctccatcttctcctcagcacctgaactcctggggggaccgtcagctt
cctctccccccaaaacccaaggacacctcatgatctccggacccttgaggtcacatgctgtggtggtagcgtgagccacgaagacctgaggtaagttaac
tggtacgtggacggcgtggagggtcataatgccaagacaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtgtgtagcgtctcaccgtctgcacca
15 ggactgctgaatggcaaggagtacaagtgcagggtctcaacaagccctcccagcccccatgcagaaaaccatctcctaagcctaagggtggaccctggtgg
gtgaggggccaatggacagaggccggctcgccacacctctgcctgagagtgaccgtgtaccaacctctgtccctacagggcagccccgagaaccacag
gtgtacacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccagggtcagcctgacctgctgtgtaaaaggcttctatcccagcgacatgcgctggagtgaggag
agcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctccgctgtgagctccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtg
gcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaccactacgcgagaagagcctctcctgtccccgggcaaatga (SEQ ID NO:
20 23)

b) la cadena ligera

25 atggacatgagggtcctgcgcagctcctgggctcctgctgctgttccagtgtaagatggagaacactagcagtttactcagccagggtgctcagtagctgtt
actattcagggaaattctctacaacatgattaattgtgtggacattgttttatgttccaatctcaggcgccagatgtgatctgtgtgacgcagctccagccaccctgtc
ttgtctccaggggaagagccacctctcctgcggggccagtcagagtgtagcagcagctacttagcctggtagcagaaacctggccaggcgccaggctc
ctcatctatggcgcatccagcagggccactggcgtgcccagcaggttcagtggcagtggtgtggagacactcactctaccatcagcagcctggagcctgaag
atttcgcgacctattactgtctgcagatttacaacatgcctatcacggtcggccaagggaagggtggaatcaaacgtgagtagaattaaactttgcggcgcgctag
acgtttaagtgggagatttgagggggatgaggaatgaaggaactcaggatagaaaagggtgaagtcagttcagctcctaaatggatgtgggagcaaaacttg
aagataaactgaatgaccgagagtgaaacacgcgcagatcaaaaggggcctggagctgtgaaagagaaggagactccggtgtgagtttccacaagta
ctgtcttgagtttgcacaataaaagtggatagacagagtgtagtgagccgtgaggtgactgtctcttctgtctctcagttttatgactacaaaactcagtagtatgcttgaa
30 ataatcattaagctgtttgaaagtatgactgctgcatgtagataccatgtctgtgaatgatcagaagaggtgtgactcttattctaaaattgtcacaaaatgtcaaaat
gagagactgttaggaacgagtcctgacagacagctcaagggttttttcttctgtctattctacatgaaagtaaaattgaaatgatctttttattataagagtagaaat
acagttgggttgaaactatagttttaattggccacggttttgtaagacattggctcctgttttccaggtattactcagttgtaatttatatcgccagcaatggactgaaacggt
ccgcaacctctctttacaactgggtgacctcgcgctgtgcccagccattggcgttcacctgcgctgaaggccatgtgaacccccgcggtagcatccctgtctcgc
gtggaccactttcctgaggcacagtgataggaacagagccactaatctgaagagaacagagatgtgacagactacactaatgtgagaaaaaacaggaaagggt
35 gacttatgtgagatttcagaaaataaactcatttattattatcttctttaaatttcttattgggaattagaagggaataaactcgtttatccaggtttatttaaaggct
aatgtataatcttttagaggtgaaactcagacccagcaaaagtcatgtgtaataattcttgactgaactcactaaactcctctaattatgtctatataactgtgttaa
attaataaaattgtgacatgacctaaactggttaggtaggatattttctcatgcaaaaatgatgactaataataatttagcaaaaaatatttccaataactttaattctgtg
atagaaaaatgttaactcagctactataatccataattttgaaaactatttattagctttgtgttgacccttccttagccaaaggcaactatttaaggacctttaaact
ctgaaactactttagagtcattaagtatttaaaccatttaattactttaaatagtatgcaattccctttaactataatttttaaggggggaaggctgtcataattctatt
40 gttttcttggtaaagaactctcagtttctgttttactacctgtcacccaagagttggcatctcaacagaggggacttccgagaggccatctggcagttgctaagatca
gaagtgaagctgccagttctccaggcagggtggccagattacagttgacctgttctgtgtgtggctaaaaattgtcccattgtggttacaaccattagaccagggtct
gatgaattgctcagaataatttctggacacccaaatacagacccctggcctaaggccctgccatacagtaggttagctgttgctacaccaagggaagccatacagggtg
taatatcagagatttcttgaagacagcaggaaagaaactcaggttctgtcttactgtctgtgtgttcagactcccaaacatcaggatgtgcagataaactg
gtctgaatctctgtgaaagcatggaactgaaaagaatgtagtttcagggaagaaaggcaatgagaaggcctgagaatacggatcaacttctaaactctgagggtg
45 gtcggatgacgtggccattcttgcttaagcattgagtttactgcaaggctcagaaaagcatgcaaagccctcagaatggctgcaagagctccaacaaaacaatt
agaactttataaggaatagggggaagctaggaagaaactcaaacatcaagattttaaatacgtcttgtgtctctgtctataattatctgggataagcatgctgtttct
gtctgtccctaactatgcccgtgtattatcgcaacaacacaccaagggcagaaacttgttacttaaacacacatctgtttgtcttctccatcagggaactgtggtgcacc
atctgtctcatctcccgcattctgatgagcagttgaaatctggaactgcctgtgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaagggtg
gataacgcccctcaatcgggtaactcccaggagagtgacacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaaagca
50 gactacgagaacacaaaagtctacgctgcgaagtcccatcagggcctgagctgcgccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgttag (SEQ ID
NO: 24).

Ejemplo 1.1: Construcción del vector

Las secuencias para ANTICUERPO A se originaron de la 2ª ronda de maduración después de la selección primaria de la biblioteca MorphoSys HuCAL, una biblioteca de exhibición de fagos sintética. El ADN para el ANTICUERPO A fue provisto originariamente en vectores pMorph de MorphoSys, Alemania, y corresponde a los vectores que expresan Fab en la figura 2 del documento WO 03/070760, apéndice pág. 6/43. En la construcción del vector a los fines de la presente invención, los vectores pEE6.1 y pEE 14.4 (ambos disponibles comercialmente de Lonza Biologics) se codifican para obtener una construcción con ambas cadenas en un vector, ver figura 1 anexa; ver documento WO 87/04462 o WO 89/01036. Se aplicó la siguiente estrategia de clonaje:

60 La cadena kappa Ig se aisló del vector MS-Roche n.º 7.9.H7_Ig_cadena kappa (tal como se describe en el documento WO 03/070760) mediante PCR con el cebador ACGTAAGCTTGCCGCCACCATGGTGTTCAG (sentido, HindIII; SEQ ID NO: 29) y el cebador ACGTGAATTCCTAACACTCTCCCCTGTT (antisentido, EcoRI; SEQ

ID NO: 30), insertados en pCR 2.1 Topo TA y el inserto se secuenció por completo. El inserto de cadena kappa Ig se eliminó de pCR Topo 2.1 mediante digestión con HindIII/EcoRI y se ligó al vector pEE14.4 como inserción HindIII/EcoRI.

La cadena pesada gamma 1 Ig se clonó del vector pMorph MS-Roche n.º 7.9.H7_IgG1 mediante PCR con el cebador ACGTAAGCTTGCCGCCACCATGAAACACCTG (sentido, HindIII; SEQ ID NO: 31) y el cebador ACGTGAATTCTCATTTACCCGGAGACAG (antisentido, EcoRI; SEQ ID NO: 32), insertados en pCR 2.1 Topo TA y el inserto se secuenció por completo. La inserción de cadena pesada gamma 1 Ig se eliminó de pCR Topo 2.1 mediante digestión con HindIII/EcoRI y se ligó al vector pEE 6.4 como inserción HindIII/EcoRI. El casete de expresión de cadena pesada se eliminó de pEE 6.4 IgG1 mediante la digestión con NotI/Sall y el fragmento aislado se insertó en pEE14.4 kappa digerida por Sall/NotI que tuvo como resultado la construcción de doble gen final pEE 14.4 mAb-31.

Ejemplo 1.2: Transfección de células CHO y expresión de ANTICUERPO A

Las transfecciones se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos estándares. La línea de células huésped CHO K1 se obtuvo del banco de células de trabajo (WCB) de Lonza Biologics n.º 028-W2 (Lonza, 2002, 1-179) y la línea de células huésped CHO K1 SV se obtuvo del banco de células maestras (MCB) de Lonza Biologics n.º 269-M (Lonza, 2003, 1-87).

Las células CHO K1 adherentes derivadas de WCB n.º 028-W2 se transfectaron con el vector pEE 14.4 MAb31 que contenía tanto genes de cadena ligera kappa como cadena pesada mediante transfección liposómica (Fugene, Roche Diagnostics). Se seleccionaron aislados de transfección en DMEM, suplemento GS (ambos JRH Biosciences), el 10% de FCS dializado (PAA Laboratories, CoSn.º R0-CEP 2001-083-Rev 00) y 50 µm de sulfoximina de metionina (MSX de Sigma). Dos semanas después, las colonias se recogieron y transfirieron a placas de 96 pocillos y se sometieron a prueba con ELISA para la producción de anticuerpos. Cuatro colonias con la expresión de ANTICUERPO A más alta se clonaron mediante dilución limitada serial para obtener cultivos derivados de una única célula, de los cuales se derivaron 82 clones después de una semana y se expandieron.

Uno de estos clones se seleccionó como el de mayor índice de producción específica de 48 pg/célula/día en estado adherente. Luego se subclonó por dilución limitada para obtener los buenos productores que expresan el ANTICUERPO A con una alta estabilidad (Pu, (1998) Mol Biotechnol, 10, 17-25). Adicionalmente, una variante de suspensión de células CHO K1, las células CHO K1 SV de MCB n.º 269-M, se transfectaron con el vector pEE 14.4 MAb31 mediante electroporación. Los transfectantes se seleccionaron como antes y los clones resultantes se sometieron a una clonación de una única célula limitando la dilución, lo cual tuvo como resultado varios clones de altos productores de ANTICUERPO A.

Ejemplo 1.3. Adaptación de clones que expresan el ANTICUERPO A a un cultivo en suspensión

Se determinaron las propiedades óptimas de crecimiento de los clones CHO K1 en un medio DHI con diferentes hidrolizados de proteína: las células se adaptaron finalmente al medio DHI sin glutamina (Invitrogen), que es una mezcla de DMEM, Ham's F12 e IMDM en las proporciones respectivas de 1:1:2 (v:v:v) (Schlaeger and Schumpp, 1992, J Immunol Methods, 146, 111-20) con las siguientes modificaciones: hidrolizado de soja y arroz: el 0,2% de soja HyPep 1510 y el 0,2% de arroz HyPep 5603 (Kerry Bioscience), el 0,03% de Pluronic F68 (Invitrogen), 25µM de MSX (Sigma) y el 5% de FCS dializado (PAA Laboratories). La concentración de FCS disminuyó gradualmente hasta que las células crecieron exponencialmente en un medio DHI libre de suero. Los bancos de semillas primarias en el medio DHI libre de suero se congelaron para varios clones de células recombinantes.

Los clones de CHO K1 SV se adaptaron de DMEM que contenía el 10% de FCS dializado a un cultivo de suspensión en el medio CD-CHO químicamente definido con 25 µM de MSX (Gibco-Invitrogen) en un procedimiento de dos etapas (Lonza). Los bancos de células se crearon en CD-CHO. Opcionalmente, se pudo utilizar cualquier otro medio libre de suero y libre de proteína para células CHO para el cultivo en suspensión y como base para la expresión del anticuerpo.

Ejemplo 2: Producción del ANTICUERPO A

Producción del ANTICUERPO A (por fermentación semicontinua)

Se prepararon clones de CHO para la fermentación a partir de cultivos concentrados en matraces de agitación o cultivos de centrifugadora de la siguiente manera:

Se descongeló un criovial de los clones respectivos en el medio de cultivo respectivo que contenía 25 µM de MSX en un matraz de agitación de 100 ml o centrifugadora con un volumen nominal de 50-75 ml.

Luego, las células se expandieron en fracciones consecutivas de 1:5 para llegar a un cultivo concentrado de 400-500 ml de volumen en los matraces de agitación o centrifugadoras. Las células utilizadas para la inoculación de fermentadores se obtuvieron de estos cultivos concentrados hasta 90 días después del descongelamiento. El tren de siembra está compuesto por una etapa 2x 1000 ml en matraces de agitación de 2 l o centrifugadoras, seguido de la

inoculación de un fermentador de 10 l como otro recipiente. Alternativamente, el fermentador de 10 l actuó como recipiente semicontinuo o como inóculo para el fermentador semicontinuo de 100 l. En el medio de cultivo estaba presente MSX para la selección hasta la inoculación del fermentador de 10 l, donde se excluyó.

Proceso de fermentación:

- 5 Día 0: Inicio con $3-4 \times 10^5$ /ml de células (fracción 1:4-1:5 del cultivo de semillas)

Día 2-3: inicio de la alimentación, la densidad de las células debe ser superior a $1,5 \times 10^6$ /ml.

Alimentación: Alimentación continua o en forma de bolo al 2% por día.

La composición de isoformas de ANTICUERPO A se monitoreó a lo largo de la fermentación mediante cromatografía de intercambio de iones (ver más adelante).

- 10 Día 14-18: Cuando la viabilidad de las células comenzó a descender (50%) y se lograron los títulos esperados, se cosechó el sobrenadante de células mediante centrifugación y/o filtración y se esterilizó en un filtro. Se almacenó asépticamente y luego se procesó tal como se describe en la próxima sección.

La fermentación se llevó a cabo de acuerdo con los protocolos estándares; ver, por ejemplo, Werner, (1993), Arzneimittelforschung, 43, 1242-9 o Rendall, (2003). Proceedings of the 18th ESACT meeting, 11-14 de mayo de 2003, 1, 701-704).

15

Ejemplo 3: Purificación del ANTICUERPO A

El proceso de purificación se basó en tres etapas cromatográficas y una etapa de diafiltración: cromatografía por afinidad con la Proteína A, cromatografía por intercambio catiónico, cromatografía por intercambio de aniones y diafiltración con una membrana de 100 kD. Los tipos de geles y los tamaños de columna fueron 1 l MabSelect (GE Healthcare, Art. 17-5199, diámetro de la columna 9 cm, longitud del lecho 18 +/- 2 cm), 0,4 l CM-Toyopearl 650M (Toso Bioscience, Art. 007972, capacidad pequeña de iones = 85 microequivalentes/ml, diámetro 5,0 cm, longitud del lecho 20 +/- 2 cm), 1,3 l Q-Sepharose FF (GE Healthcare, Art.17-0510-04), diámetro 9 cm, longitud del lecho 20 +/- 2 cm. Las columnas trabajaron a temperatura ambiente. Se almacenaron las fracciones a 2-8°C. La detección fue a 280 nm. Se utilizó un módulo de ultrafiltración Biomax 100 con un área de 0,1 m² (Millipore Corp. Art. P2B100A01) para la concentración y diafiltración.

20

25

Cromatografía de la Proteína A

Se prepararon las siguientes soluciones utilizando agua purificada:

Solución A (tampón de equilibración): Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, regulado a pH 7,1 +/-0,1 mediante HCl

Solución B (tampón de lavado 1): ácido acético 100 mM regulado a pH 4,5 +/-0,1 mediante NaOH

- 30 Solución C (tampón de elución): ácido acético 100 mM regulado a pH 3,2 +/-0,1 mediante NaOH

Solución D (tampón de lavado 2): ácido acético 100 mM, NaCl 75 mM, pH 3 +/- 0,1

Solución E: (tampón de regeneración): clorhidrato de guanidinio 2 M, Tris 100 mM, regulado a pH 7,5 +/-0,1 mediante HCl

35

Solución F (tampón de almacenamiento): 200 mM de alcohol bencílico, 100 mM de ácido acético, regulado a pH 5,0 +/-0,1 mediante hidróxido sódico.

La columna se equilibró primero con 3 volúmenes de lecho de solución A.

Luego, se cargó con el sobrenadante de cultivo celular clarificado (45 l, 386 mg/l de anticuerpo)

se lavó con 5 volúmenes de lecho de solución A,

se lavó con 3 volúmenes de lecho de solución B,

- 40 se eluyó con 3,5 volúmenes de lecho de solución C y se recogió el eluato,

se lavó con 3 volúmenes de columna de solución D, y

se regeneró con 2 volúmenes de columna de solución E,

se equilibró con 3 volúmenes de lecho de tampón A,

y se lavó con volúmenes de lecho de tampón F para su almacenamiento.

Se utilizó un caudal lineal de 100 cm/h para todas las etapas cromatográficas.

La carga de la columna fue de 17,4 g de anticuerpo/l de gel Mabselect y el rendimiento de la mezcla de isoformas total fue del 96%.

Inactivación viral

- 5 Se preparó la siguiente solución utilizando agua purificada:

Solución G (solución reguladora): 2M de acetato de sodio

El pH del eluato de proteína A se reguló a un pH que oscilaba entre 3,5 y 3,7 por adición de ácido acético concentrado o acetato de sodio 2 M (solución G). Se agitó durante 15 minutos y luego se reguló a pH 4 +/- 0,1 agregando acetato de sodio 2 M (solución G).

10 Cromatografía de intercambio catiónico

Se prepararon las siguientes soluciones utilizando agua purificada:

Solución H (tampón de equilibrio): ácido acético 100 mM regulado a pH 4,0 +/- 0,1 mediante NaOH,

Solución I (tampón de elución 1): acetato de sodio 250 mM sin regular el pH, pH 7,8-8,5,

Solución J (tampón de elución 2): acetato de sodio 500 mM sin regular el pH, pH 7,8-8,5,

- 15 Solución K (solución de regeneración): hidróxido de sodio 0,5 M,

Solución L (tampón de almacenamiento): hidróxido de sodio 0,01 M.

La columna se regeneró primero con 2 volúmenes de lecho de la solución K y luego se equilibró con 5 volúmenes de lecho de la solución H.

Luego, se cargó con una cantidad del eluato de proteína A y se lavó con 1 volumen de lecho de solución H.

- 20 Encerrado, se eluyó con 6 volúmenes de lecho de solución I. En esta etapa, se eluyó una mezcla de isoformas doblemente glicosiladas y monoglicosiladas. En la etapa siguiente, se utilizaron 3 volúmenes de lecho de la solución J para eluir las isoformas no glicosiladas.

- 25 Después del uso, se regeneró la columna con 2 volúmenes de lecho de solución K, se almacenó durante 24 horas en este tampón y luego se lavó nuevamente con 2 volúmenes de lecho de solución K. Para almacenarla, se lavó con 3 volúmenes de lecho de solución L.

Un ejemplo de cromatograma se muestra en la fig. 3.

Las fracciones de la cromatografía se analizaron mediante IEX analítico tal como se describe más adelante.

Se utilizó un caudal lineal de 100 cm/h para todas las etapas cromatográficas.

- 30 La carga de la columna fue de 14,3 g de anticuerpo/l de CM-Toyopearl 650 M, y el rendimiento fue del 79% para la mezcla de isoformas doblemente glicosiladas y monoglicosiladas y del 6,2% para las isoformas no glicosiladas.

Cromatografía de flujo continuo utilizando Q-Sepharose FF

Se prepararon las siguientes soluciones en agua purificada:

Solución M (tampón de dilución): 37,5 mM Tris, regulado a pH 7,9 +/- 0,1 de ácido acético,

Solución N (solución reguladora): Tris 2 M,

- 35 Solución O (tampón de equilibrio): acetato de sodio 83 mM, Tris 25 mM, pH 7,5 +/- 0,1,

Solución P (tampón de regeneración 1): NaOH 0,5 M / NaCl 1 M,

Solución Q (tampón de regeneración 2): ácido acético 0,2 M / NaCl 1 M,

Solución R (tampón de almacenamiento): NaOH. 0,01 M

- 40 El eluato de la columna CMT (ácida) se diluyó primero a 1:3 con la solución M y luego se reguló a un pH 7,5 con la solución N.

La columna se equilibró primero con 2 volúmenes de lecho de la solución O y luego el eluato diluido de la columna CMT se procesó sobre la columna y se recogió el flujo continuo. El producto se removió mediante lavado de la columna con la solución O hasta que la absorción a 280 nm fuera inferior a 0,1 (flujo continuo recogido).

- 5 La columna se regeneró con 1,5 volúmenes de lecho de solución P, se almacenó durante 1 hora y luego se regeneró con otros 1,5 volúmenes de lecho de solución P. Luego, se regeneró la columna con 2 volúmenes de lecho de solución Q y se lavó con 3 volúmenes de lecho de solución R y se almacenó.

Se utilizó un caudal lineal de 100 cm/h para todas las etapas cromatográficas.

La carga de la columna fue de 3,5 g de anticuerpo/l Sepharose FF, y el rendimiento fue del 91% para la mezcla de isoformas doblemente glicosiladas y monoglicosiladas.

10 Diafiltración

Se preparó la siguiente solución utilizando agua purificada:

Solución S (tampón de diafiltración): Histidina 20 mM, regulado a pH 5,5 mediante HCl.

- 15 Un soporte de filtro Pellicon 2 (Millipore Corp.) estaba equipado con 1 módulo de ultrafiltración tipo Biomax 100 (Millipore Corp., área = 0,1 m², Art.P2B100A01). Se utilizó una bomba WATSON-MARLOW 501 U equipada con una tubería de silicona para el bombeo. El sistema se enjuagó con tampón O y luego se concentraron 3,8 litros (1,1 g de anticuerpo/l) del flujo continuo de la cromatografía QS (regulado hasta pH 5,5 mediante ácido acético concentrado) a 250-300 ml al cabo de 1 h a 4-11°C. A continuación, se realizó (4-11°) una diafiltración (V = const.) frente a 3 litros de tampón S (aproximadamente 10 volúmenes). Finalmente, el producto se filtró en forma estéril utilizando un filtro Millipac 20 (Millipore Corp.). El rendimiento de la etapa de ultrafiltración/diafiltración fue del 91%. La concentración del producto fue de 15 mg/ml. El producto se pudo congelar a -70°C.

Método IEX analítico para el análisis de las fracciones

Columna: Mono-S HR 5/5 (GE Healthcare, Art. 17-0547-01)

Tampón 1: ácido morfolinoetanosulfónico 50 mM, regulado a pH 5,8 mediante hidróxido de sodio

Tampón 2: ácido morfolinoetanosulfónico 50 mM, NaCl 1 M regulado a pH 5,8 mediante hidróxido de sodio

- 25 Caudal: 1 ml/min.

Detección: 280 nm

Carga de la muestra: 36-72 µ

Gradiente: Tiempo % de tampón 2

0 min.	0
1	0
25	63
27	63
28	0
35	0

- 30 La fig. 2 presenta un ejemplo de cromatograma.

Rendimientos

Etapas	Isoforma	Rendimiento de la etapa
MabSelect (proteína A)	Mezcla de todas las isoformas	96%
CM-Toyopearl 650 M	Mezcla de ANTICUERPO A monoglicosilado y ANTICUERPO A doblemente glicosilado. Contenido de ANTICUERPO A no glicosilado <0,5%.	79%

	ANTICUERPO A no glicosilado	6,2%
Q-Sepharose FF	Mezcla de ANTICUERPO A monoglicosilado y ANTICUERPO A doblemente glicosilado. Contenido de ANTICUERPO A no glicosilado <0,5%.	91%
Concentración y diafiltración	Mezcla de ANTICUERPO A monoglicosilado y ANTICUERPO A doblemente glicosilado. Contenido de ANTICUERPO A no glicosilado <0,5%.	91%

Ejemplo 4: Caracterización de isoformas de ANTICUERPO A mediante SDS-PAGE

El análisis SDS-PAGE se llevó a cabo utilizando protocolos estándares con el 4-12% gel Bis-Tris gradiente NuPage (Invitrogen) y marcador MARK12 (Invitrogen) como control. Se cargaron 1-3 ug de sobrenadantes de Proteína A purificada provenientes de fermentaciones (Prod 01, 02, 03) o cultivos de centrifugadora (los demás carriles) por cada recipiente. El análisis bajo condiciones de reducción tuvo como resultado una única banda para el pico 1 (ANTICUERPO A doblemente glicosilado), una banda doble para el pico 2 (ANTICUERPO A monoglicosilado) y una única banda para el pico 3 (ANTICUERPO A no glicosilado) en el rango del peso molecular de cadenas pesadas. Los pesos moleculares de las dos bandas del pico 2 correspondieron a los pesos moleculares del pico 1 y pico 2, respectivamente.

Se obtuvieron resultados similares empleando varios sistemas de expresión como: transfección transitoria en células HEK 293 EBNA, transfección transitoria en células CHO y expresión estable en células CHO.

Ejemplo 5: Caracterización de isoformas de ANTICUERPO A mediante análisis de espectrometría de masa (EM)

Se determinó un perfil de masa de anticuerpos completo de todas las isoformas de ANTICUERPO A mediante espectroscopia de masa con ionización por electropulverización (ESI-EM).

Para ello, se prepararon muestras de ANTICUERPO A bajo condiciones no reductoras. Las muestras se desalaron en el 2% de ácido fórmico y el 40% de acetonitrilo mediante filtración en gel G25 y se utilizaron para el análisis ESI-EM en un instrumento Q-Tof2 o espectrómetro de masa LCT de Waters.

Se obtiene una separación por masa molecular con una diferencia de 1623 entre el ANTICUERPO A no glicosilado y el ANTICUERPO A monoglicosilado. La masa esperada para el ANTICUERPO A no glicosilado de la secuencia de aminoácidos es de 145,987 Da, que concuerda óptimamente con la masa experimentalmente determinada de 145,979 Da. De un modo similar, las isoformas de ANTICUERPO A mono glicosiladas y doblemente glicosiladas difieren por 1624 Da, tal como se indica en la figura 4. Las diferencias observadas en las masas moleculares son compatibles con los patrones de N-glicosilación que se describen detalladamente más adelante en el presente documento.

Ejemplo 6: Estructura de glicosilación de Asn-52 del ANTICUERPO A

Asn52 es parte de la secuencia aaa-aaa-Asn-Ala-Ser-aaa-aaa de la parte variable de la cadena pesada, que corresponde a la secuencia consenso de N-glicosilación Asn-aaa-Ser/Thr. Se confirmó la glicosilación unida a N de Asn52 mediante mapeo de péptidos tripticos de las isoformas de ANTICUERPO A y evaluación espectrométrica de masa del péptido HC/T4 que contenía Asn52. En los mapas de péptidos tripticos del ANTICUERPO A no glicosilado, aparece exclusivamente un péptido que correspondía, según la masa, al péptido HC/T4 no glicosilado, lo cual indica que la Asn52 no era glicosilada, mientras que en el ANTICUERPO A monoglicosilado o doblemente glicosilado se detectaron péptidos correspondientes, según la masa, a las estructuras de azúcares unidas a N que contenían HC/T4.

Para confirmar adicionalmente la glicosilación de la secuencia consenso en el péptido triptico HC/T4 de la cadena pesada, el péptido HC/T4 glicosilado se aisló de los mapas de péptidos de las isoformas de ANTICUERPO A glicosilado y se analizó mediante espectrometría de masa MALDI antes y después de la incubación con N-glicosidasa. Antes del tratamiento con N-glicosidasa F, se obtuvieron masas que correspondían al péptido HC/T4 que contenía estructuras de azúcares unidas a N. Sin embargo, la masa del péptido HC/T4 tratado con N-glicosidasa F correspondía a la masa esperada para HC/T4 no glicosilado + 1 Da, como era de esperar en caso de remover una cadena de azúcar de la asparagina mediante N-glicosidasa F (conversión Asn a Asp).

La presencia de ácidos N-acetil-neuramínicos en las estructuras de azúcares unidas a Asn52 indica, además, la presencia de estructuras de azúcares de tipo híbrido y complejo unidas a N. Para ello, las isoformas de ANTICUERPO A se trataron con N-glicosidasa F, que remueve el N-azúcar en Asn306, pero no en Asn52, y con o

sin neuraminidasa, y se analizó después de la separación de HC y LC por desnaturalización, reducción y desalado. Las masas obtenidas para HC de ambos métodos difirieron en aproximadamente 291 Da ó 582 Da correspondientes a uno o 2 ácidos siálicos. De ello, también se concluye que los azúcares unidos a N del tipo complejo y/o híbrido se unieron a Asn52.

Esta glicosilación de Asn-52, una N-glicosilación, está compuesta predominantemente por estructuras de azúcares de tipo complejo biantenarío ($\geq 75\%$; principalmente el 80-90%) sin fucosilación en el núcleo y altamente sialiladas con hasta 80% de la antena de tipo complejo que contenía ácidos N-acetil-neuramínicos. Las estructuras de azúcar secundarias pertenecen al tipo híbrido biantenarío y al tipo oligomanosa ($\leq 25\%$), respectivamente (figura 5 o figura 27). La resistencia a la escisión por parte de la N-glicosidasa F del ANTICUERPO A intacto fue común a todas las estructuras de glicosilación de Asn52.

Ejemplo 7: Estructura de glicosilación de Asn306 del ANTICUERPO A

Tal como se ha indicado anteriormente, el ANTICUERPO A contenía unido a la asparagina 306 (Asn306) en la parte Fc de la cadena pesada (HC) una glicosilación de tipo anticuerpo compuesta por una cadena de oligosacáridos biantenaria compleja. Es sabido que los anticuerpos contienen diferentes isoformas de dicha cadena de oligosacáridos biantenaria compleja, que varían en el grado de galactosilación terminal, sialiación y en el grado de fucosilación del núcleo. Además, es sabido que el grado de no fucosilación del núcleo en la cadena de azúcar ubicada en Fc es importante para la eficacia *in vivo* de anticuerpos, ya que se ha aceptado que el grado de fucosilación del núcleo modula funciones efectoras de los anticuerpos.

Para el ANTICUERPO A se hallaron variaciones principales típicas de los anticuerpos (Routier (1997), Glycoconjugate 14(2), 201-207; Raju (2003), BioProcess International, 44-52) en las cadenas de azúcar ubicadas en Fc unidas a la Asn306 con respecto a la galactosilación terminal y fucosilación del núcleo.

La heterogeneidad en el grado de galactosilación terminal (estructuras G0 : G1 : G2) se determinó en aproximadamente el 35-40% de estructuras G0, aproximadamente el 45% de estructuras G1 y aproximadamente el 15-20% de estructuras G2 (para la demostración esquemática de las estructuras ver la figura 6 o la figura 27).

El contenido de estructuras de azúcar Fc que carecen de fucosilación, es decir, que carecen de la unidad de fucosa unida a la N-acetil-glucosamina más interna de la estructura de azúcar central, probablemente es importante para un anticuerpo, ya que la presencia o ausencia de esta unidad de fucosa puede modular la unión del anticuerpo a los receptores Fc de las células efectoras, influenciando así la actividad de estas células.

Para el ANTICUERPO A, se determinó el contenido relativo de isoformas de cadena de azúcar que carecen de fucosilación del núcleo en Asn 306 mediante dos métodos diferentes, tal como se describe a continuación:

A) Espectrometría de masa de HC glicosilada completa:

Se desnaturalizaron muestras de ANTICUERPO A y se redujeron a una cadena ligera (LC) y HC glicosilada en presencia de clorhidrato de guanidina 6 M y TCEP 250 mM. Las muestras reducidas se desalaron en el 2% de ácido fórmico y el 40% de acetonitrilo y se utilizaron para el análisis ESI-EM en un instrumento Q-Tof2 o espectrómetro de masa LCT de Waters. De los espectros m/z obtenidos, se calcularon las isoformas de oligosacáridos individuales mediante la altura del pico de HCs glicosiladas que contenían las isoformas de oligosacáridos individuales de estados m/z individuales seleccionados. Para el cálculo del contenido de estructuras de azúcar que carecen de fucosilación, la altura del pico de fucosa del núcleo que carece de estructura G0 (G0-Fuc) se relacionó con la suma de G0 + (G0-Fuc).

Las estructuras de carbohidratos respectivas se asignaron de acuerdo con las diferencias de las masas obtenidas para HC glicosilada y para HC, cuyas estructuras de oligosacáridos se removieron mediante incubación con N-glicosidasa F antes del análisis EM en los experimentos control.

B) Análisis cromatográfico de oligosacáridos liberados mediante HPEAC-PAD:

Las muestras de ANTICUERPO A se incubaron con N-glicosidasa F en tampón de fosfato de sodio a un pH 7,2 para liberar las cadenas de oligosacáridos de Asn306 (las estructuras de azúcar en Asn52 no se removieron del anticuerpo no desnaturalizado intacto bajo las condiciones utilizadas). Las cadenas de azúcar liberadas se separaron de la proteína de ANTICUERPO A mediante filtración por centrifugado y se analizaron en una columna Carbo Pac PA200 de Dionex en un sistema BioLC, utilizando un gradiente de acetato de sodio a un pH alcalino fuerte (pH 13). La columna utilizada era capaz de resolver las cadenas de oligosacáridos no fucosiladas de las fucosiladas. La asignación de los picos individuales obtenidos a las estructuras de carbohidratos respectivas se efectuó por comparación de los tiempos de retención con aquellos de los estándares de oligosacáridos adecuados analizados en la columna Carbo Pac PA200 y por determinación de la masa molar de los picos separados y recogidos por espectrometría de masa MALDI, respectivamente. Para el cálculo del contenido relativo de estructuras de azúcar que carecen de fucosilación en el núcleo, se formó la suma del % de área de todas las estructuras que carecen de fucosa en el núcleo.

El análisis de varios lotes (combinaciones de isoformas de ANTICUERPO A doblemente glicosiladas y monoglicosiladas) y de isoformas de ANTICUERPO A purificado, respectivamente, reveló que el contenido de cadenas de oligosacáridos unidas a Asn306 no fucosiladas oscilaba entre ~ el 14% y el 27% (medido mediante EM) y entre el 6% y el 26% (medido mediante HPAEC-PAD), respectivamente.

5 Ejemplo 8: Determinación de valores K_D para la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A e isoformas (por ejemplo, anticuerpo no glicosilado, monoglicosilado o doblemente glicosilado de la invención) que se unen a las fibras A β 1-40 y A β 1-42 *in vitro* por resonancia de plasmones superficiales (SPR)

La unión del ANTICUERPO A a A β fibrilado se midió en línea mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) y las afinidades de las interacciones moleculares se determinaron de la siguiente manera: se utilizaron los instrumentos Biacore2000 y Biacore3000 para estas mediciones. Las fibras A β 1-40 y A β 1-42 se generaron *in vitro* mediante inoculación de péptidos sintéticos a una concentración de 200 μ g/ml en tampón de acetato de sodio 10 mM (pH 4,0) durante tres días a 37°C. El análisis microscópico de electrones confirmó una estructura fibrilada para ambos péptidos, y A β 1-40 mostró fibras predominantemente cortas (< 1 micrón) y A β 1-42 fibras predominantemente largas (> 1 micrón). Se asumió que estas fibras representaban péptidos A β agregados en el cerebro con AD humano mucho mejor que mezclas definidas para la enfermedad de agregados amorfos y precipitados no estructurados. Las fibras se diluyeron a 1:10 y se acoplaron directamente a CM5 tal como se describe en el Manual de Instrucciones del fabricante (BIAApplication Handbook, versión AB, Biacore AB, Uppsala, 1998).

El procedimiento de acoplamiento incluyó una etapa de activación, durante la cual los grupos de ácidos carboxílicos en la superficie se transfirieron a grupos éster de succinimida químicamente reactivos por contacto de la superficie con una mezcla acuosa de N-hidroxisuccinimida y clorhidrato de 1-etil-1-(3-diaminopropil)-carbodiimida, y una etapa de inmovilización, durante la cual la superficie activada entró en contacto con las fibras disueltas en tampón de acetato 10 mM (pH 4,5) a 200-350 unidades de resonancia (1 unidad de resonancia (UR) corresponde aproximadamente a una carga de superficie de 1 picogramo/mm²). La superficie cargada de fibras entró en contacto luego con las soluciones de anticuerpo en el rango de concentración de 200 nM $\geq C \geq 0,15$ nM. Las curvas típicas de respuestas dependientes del tiempo (= sensogramas) monitoreadas durante la fase de asociación (durante el contacto con tampón) y la fase de disociación (posterior al contacto con tampón) se muestran en la figura 7.

Los valores K_D para la unión a las fibras de A β 1-40 y A β 1-42 de las isoformas del ANTICUERPO A se proporcionan en la tabla que aparece más adelante. En resumen, los valores K_D se calcularon mediante el análisis de tipo Scatchard utilizando respuestas de unión por equilibrio dependientes de la concentración. Estas constantes de unión por equilibrio se obtuvieron de dos maneras.

Debido al muy lento proceso de asociación a una baja concentración de anticuerpos, los intervalos de contacto para alcanzar el equilibrio fueron muy prolongados (figura 7). Sin embargo, dichos intervalos de contacto se pudieron realizar en instrumentos Biacore y las respuestas experimentales al equilibrio se sometieron a un análisis Scatchard.

Los datos de unión por equilibrio también se obtuvieron extrapolando curvas de asociación al infinito más cortas dependientes del tiempo. Luego, estos niveles de unión por equilibrio teóricamente obtenidos se utilizaron nuevamente para la determinación de los valores K_D .

Independientemente de la manera de determinar las respuestas sensoras de equilibrio, se obtuvieron gráficos curvilíneos de Scatchard. Del gráfico curvilíneo de Scatchard, se obtuvo una interacción por afinidad superior (bivalente) e inferior (monovalente) para las isoformas de ANTICUERPO A del segundo ciclo de maduración de la afinidad. Estas dos afinidades representan los valores K_D superiores e inferiores del rango indicado en la siguiente tabla:

		Valores K_D de alta afinidad 1-40 (nM)	Valores K_D de baja afinidad 1-40 (nM)
COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS A (mezcla de ANTICUERPO A monoglicosilado y doblemente glicosilado)	Extrapolación	0,49	27,25
	Desv. est.	0,10	8,40
	Equilibrio	0,41	21,00
ANTICUERPO A doblemente glicosilado	Extrapolación	1,43	18,51
	Desv. est.	0,02	22,33
	Equilibrio	1,54	29,00
ANTICUERPO A monoglicosilado	Extrapolación	0,25	7,55
	Desv. est.	0,02	2,06
	Equilibrio	0,12	11,10
ANTICUERPO A no glicosilado	Extrapolación	0,19	1,99
	Desv. est.	0,03	0,15
	Equilibrio	0,42	2,82

La tabla anterior presenta los valores K_D del complejo de baja afinidad (monovalente) y del complejo de alta afinidad (bivalente) formado por interacción de las isoformas de ANTICUERPO A y fibrilos de A β 1-40 determinados por resonancia de plasmones superficiales. Se proporcionan valores K_D determinados utilizando respuestas de equilibrio extrapoladas (marcadas como “extrapolación”) y valores K_D determinados utilizando respuestas de equilibrio experimentalmente determinadas (marcadas como “experimental”). Se determinaron valores extrapolados al menos seis veces y se proporciona una desviación estándar. Los valores K_D basados en las respuestas sensoras de equilibrio experimentales y extrapoladas son iguales dentro de los límites dados por estas desviaciones estándares.

Ejemplo 9: Mapeo de epítomos de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A e isoformas (por ejemplo, anticuerpo no glicosilado, monoglicosilado o doblemente glicosilado de la invención) mediante análisis Pepspot con decapeptidos

Un epítipo (determinante antigénico) puede ser lineal o conformacional. La especificidad dual del epítipo que se describe en el presente documento se definió por reactividad del anticuerpo con dos péptidos lineales no secuenciales.

Los enfoques de mapeo de epítomos que se utilizan para definir el reconocimiento específico de epítomos se basan en la tecnología ELISA con conjugados de hexapéptidos esparcidos sobre microplacas o en la tecnología Pepspot. Esta última tecnología permite la detección y cuantificación del anticuerpo mediante protocolos que son comúnmente conocidos para la Transferencia Western de proteínas a membranas PVDF.

Las tecnologías de mapeo de epítomos aplicadas están diseñadas para detectar específicamente epítomos lineales, mientras que no se pueden aplicar para mapear epítomos más espacialmente complejos como epítomos discontinuos o conformacionales. Las técnicas disponibles para el mapeo de epítomos conformacionales o discontinuos, como la exploración de dominios y disposiciones de péptidos combinatorias, requieren péptidos extensos de hasta 36 aminoácidos (dominios) o péptidos combinados, cada uno de ellos compuesto por 12 aminoácidos.

Por lo tanto, las técnicas aplicadas se consideran específicas para epítomos lineales, sin incluir que los epítomos conformacionales, ya sea epítomos discontinuos o discontinuamente distribuidos, están involucrados.

En conclusión, los datos presentados muestran que las dos regiones dentro del péptido A β que se define en el presente documento parecen epítomos lineales independientes reconocidos en forma simultánea en base a la especificidad dual y única del epítomo de los anticuerpos investigados en péptidos A β hexaméricos o decaméricos individuales.

La siguiente secuencia de aminoácidos que comprende A β (1-42) se dividió en 43 decapeptidos superpuestos con un corrimiento del marco de 1 aminoácido. Los números se refieren a los aminoácidos esenciales de la secuencia de A β 1-40 que tienen que estar presentes en el decapeptido para la unión óptima del anticuerpo.

- 10 ISEVKM¹DAEF RHDSGYEVHH QKLVFFAEDV GSNKGAIIGL MVGGVVI⁴²ATV IV (SEQ ID NO: 4). En consecuencia, DAEF RHDSGYEVHH QKLVFFAEDV GSNKGAIIGL MVGGVVIA (SEQ ID NO: 3) representa los aminoácidos 1 a 42 del péptido A β 4/ β -A4.

- 15 Los 43 decapeptidos fueron sintetizados con acetilación N-terminal y unión covalente C-terminal a la lámina de celulosa ("Pepspot") por un proveedor comercial (Jerini BioTools, Berlín). La lámina de celulosa se incubó durante 2 horas en una plataforma oscilante con anticuerpo monoclonal (1 μ g/ml) en tampón bloqueante (Tris.HCl 50 mM, NaCl 140 mM, NaEDTA 5 mM, NP40 al 0,05% (Fluka), gelatina al 0,25% (Sigma), fracción de albúmina de suero bovino V al 1% (Sigma), pH 7,4). La lámina se lavó 3 veces durante 3 minutos sobre una plataforma oscilante con TBS (Tris.HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). Luego, se presionó sobre papel filtro, se humedeció con tampón de cátodo (base Tris 25 mM, ácido 6-aminohexano 40 mM, SDS al 0,01%, metanol al 20%) y se transfirió a una pila de transferencia semiseca con el lado del péptido enfrente a la membrana PVDF (Biorad) de igual tamaño.

La pila de transferencia semiseca estaba compuesta por papeles filtro recién humedecidos (Whatman NO.3) levemente más grandes que la lámina de péptidos:

3 papeles humedecidos con tampón de cátodo

la lámina de péptido

- 25 una lámina de membrana PVDF humedecida con metanol

3 papeles humedecidos con tampón de ánodo 1 (base Tris 30 mM, metanol al 20%)

3 papeles humedecidos con tampón de ánodo 2 (base Tris 0,3 mM, metanol al 20%).

- 30 La transferencia se efectuó a una densidad de corriente entre cátodo y ánodo de 0,8 mA/cm² durante una hora, lo cual fue suficiente para eluir el anticuerpo por completo desde la lámina de celulosa y transferirlo a la membrana de PVDF. La membrana de PVDF se sumergió en tampón bloqueante durante 10 minutos. Se agregó IgG(H+L) antihumana de cabra con fluorocromo IRdye800 (Rockland código n.º 609-132-123) a una dilución 1:10'000 en tampón bloqueante Odyssey (Li-Cor) y luego se diluyó a 1:1 con PBS, Tween20 al 0,05%. La membrana se incubó en una plataforma oscilante durante 1 hora. Se lavó 3x10 minutos con TBST (TBS con Tween20 al 0,005%). La membrana se secó y se exploró para detectar fluorescencia a 800 nm utilizando un escáner de fluorescencia de longitud de onda larga (Odyssey) tal como se muestra en la figura 8.

- 35 Se logró la asignación exacta de puntos reactivos al anticuerpo marcando la membrana de PVDF a través de un pinchazo con aguja. Los epítomos del anticuerpo en cuestión se definieron como la secuencia de aminoácidos mínima en péptidos reactivos. Se integró la intensidad de la fluorescencia en cada punto y se registró como la unidad de fluorescencia relativa (RFU). Para su comparación, se analizaron dos anticuerpos monoclonales de ratón (BAP-1 que es equivalente al anticuerpo 6E10 (Kim (1998)) con especificidad para el dominio N-terminal, y BAP-44 que es equivalente para el anticuerpo 4G8 (Kim (1998)) con especificidad para el dominio medio) del mismo modo, excepto que se utilizó Ig antiratón en lugar de Ig antihumana para la detección.

- 45 Cabe destacar que la maduración de la afinidad y la conversión de los fragmentos Fab monovalentes en anticuerpos IgG1 de longitud total tienen como resultado habitualmente cierto ensanchamiento de la secuencia de reconocimiento de epítomos tal como indican los análisis Pepspot y ELISA. Esto puede relacionarse con el reclutamiento de más puntos de contacto en el área de interacción anticuerpo-antígeno como consecuencia de la maduración de la afinidad o con una unión más fuerte con el epítomo mínimo, de modo tal que también se pueden detectar interacciones débiles con aminoácidos adyacentes. Este último puede ser el caso cuando se les colocó a péptidos derivados de A β una sonda con anticuerpos IgG de longitud total. Tal como ilustra la tabla que aparece a continuación, las secuencias de reconocimiento de los epítomos N-terminales y centrales se extendieron en hasta tres aminoácidos cuando se compararon Fabs madre y los anticuerpos IgG totalmente maduros correspondientes. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los decapeptidos se modificaron por unión covalente en el aminoácido C-terminal y, por lo tanto, este aminoácido puede no ser fácilmente accesible para el anticuerpo de longitud total debido a un impedimento estérico. Si este fuera el caso, el aminoácido C-terminal no contribuye significativamente a la secuencia de reconocimiento de epítomos, y en el análisis Pepspot que se utiliza en la presente invención debe

considerarse una potencial reducción de la secuencia mínima de reconocimiento por un aminoácido en el extremo C-terminal.

Anticuerpo	Posición del aminoácido	Posición del aminoácido
ANTICUERPO A doblemente glicosilado	3-4 (1-10)	18-24 (17-26)
ANTICUERPO A monoglicosilado	4-5 (3-11)	20-26
ANTICUERPO A no glicosilado	3-4	20-24
COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A (mezcla de isoformas de ANTICUERPO A monoglicosilado y doblemente glicosilado (1:1))	3-5 (3-11)	19-26
BAP-44 (monoclonal de ratón)		19-21
BAP-1 (monoclonal de ratón)	4-6	

- 5 La tabla anterior se refiere al análisis Pepspot de anticuerpos IgG de longitud total a decapeptidos en una lámina de celulosa. Los números se refieren a la posición del aminoácido en la secuencia A β 1-40 que deben estar presentes en el decapeptido para la unión del anticuerpo. Otra extensión hacia el epítopo se indica entre paréntesis para facilitar los aminoácidos flanqueadores que se requieren para lograr una unión máxima.

10 **Ejemplo 10: Ensayo de despolimerización que emplea isoformas de ANTICUERPO A (por ejemplo, anticuerpo no glicosilado, monoglicosilado y doblemente glicosilado de la invención) que induce la liberación de A β biotinilado de A β agregado**

La configuración experimental para evaluar el potencial de las isoformas de ANTICUERPO A para inducir la disociación de A β agregados fue la siguiente:

- 15 Primero se incorporó A β 1-40 biotinilado a fibras A β 1-40/A β 1-42 preformadas antes del tratamiento con las isoformas de ANTICUERPO A. Se midió la liberación de A β biotinilado utilizando un ensayo que emplea conjugado de estreptavidina-POD tal como se describe más adelante.

- 20 Cuando se incubaba en tampón acuoso durante varios días, el A β sintético se agrega espontáneamente y forma estructuras fibriladas que son similares a las observadas en depósitos de amiloide en los cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer. El siguiente ensayo *in vitro* es adecuado para medir la incorporación o liberación de A β biotinilado en agregados A β preformados para analizar el potencial neutralizador de A β de los anticuerpos anti-A β y otras proteínas de unión de A β tales como la albúmina (Bohrmann (1999) J. Biol. Chem. 274, 15990-15995). Las isoformas de ANTICUERPO A indujeron la despolimerización de A β agregado medida a través de la liberación de A β 1-40 biotinilado incorporado.

25 **Procedimiento experimental:**

- Se recubrieron placas de microtitulación NUNC Maxisorb (MTP) con una mezcla 1:1 de A β 1-40 y A β 1-42 (2 μ M cada uno, 10 μ l por pocillo) a 37°C durante tres días. Bajo estas condiciones se adsorbió A β fibrilado altamente agregado y se inmovilizó sobre la superficie de cada recipiente. Luego, se removió la solución de recubrimiento y las placas se secaron a temperatura ambiente durante 2-4 horas. Las placas secadas se pudieron almacenar a -20°C. Para la
- 30 incorporación de A β biotinilado, las placas recubiertas se incubaron con 200 μ l/pocillo de 20 nM de A β 1-40 biotinilado en TBS que contenía NaN₃ al 0,05% a 37°C durante la noche. Después de lavar la placa con 3 x 300 μ l/pocillo de T-PBS, se agregaron anticuerpos diluidos en serie en TBS que contenía NaN₃ al 0,05% y se incubaron a 37°C durante 3 horas. La placa se lavó y se analizó para determinar la presencia de A β 1-40 biotinilado. Después del lavado 3 x con 300 μ l de T-PBS se agregó un conjugado de estreptavidina-POD (Roche Molecular
- 35 Biochemicals), diluido a 1:1000 en T-PBS que contenía BSA al 1% (100 μ l/pocillo) y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Los recipientes se lavaron 3x con T-PBS y se agregaron 100 μ l/pocillo de una solución de tetrametil-bencidina (TMB) recién preparada. [Preparación de la solución TMB: 10 ml de ácido cítrico 30 mM pH 4,1 (regulado con KOH) + 0,5 ml de TMB (12 mg de TMB en 1 ml de acetona + 9 ml de metanol) + 0,01 ml de H₂O₂ al 35%.] La reacción se interrumpió agregando 100 μ l/pocillo de H₂SO₄ 1 N y se leyó la absorbancia a 450 nm en una
- 40 lectora de placa de microtitulación.

Tal como se documenta en la figura 9, las isoformas de ANTICUERPO A indujeron la disociación de A β agregado medida a través de la liberación de A β 1-40 biotinilado incorporado. Las isoformas de ANTICUERPO A y el anticuerpo monoclonal de ratón BAP-1 eran similarmente activos (figura 9), mientras que los anticuerpos BAP-2, BAP-17 y 4G8 eran claramente menos eficaces para liberar A β biotinilado de la masa de A β inmovilizado (no se muestran los datos). BAP-1 se pudo diferenciar claramente de las isoformas de ANTICUERPO A glicosilado por su reactividad con la APP de longitud total de la superficie de la célula. Los anticuerpos como BAP-1 con dichas propiedades no son útiles para las aplicaciones terapéuticas ya que se pueden inducir reacciones autoinmunitarias potenciales. Es interesante destacar que BAP-2, a pesar de su especificidad para el residuo de aminoácido 4-6 que se expuso en el A β agregado tiene una actividad claramente menor en este ensayo, lo cual indica que no todos los anticuerpos específicos del término N son a priori igualmente eficaces para liberar A β de agregados preformados. La eficacia relativamente baja de BAP-17 (específico del término C) y 4G8 (específico de los residuos de aminoácidos 16-24) en este ensayo se debe a la naturaleza críptica de estos dos epítomos en A β agregados. La BSA en las concentraciones utilizadas en la presente no tuvo efectos en el A β agregado.

La isoforma monoglicosilada tuvo una mayor capacidad en comparación con la isoforma doblemente glicosilada para despolimerizar el péptido A β agregado *in vitro* que también puede ser relevante *in vivo*.

Ejemplo 11: COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A que comprende isoformas (anticuerpo monoglicosilado y doblemente glicosilado de la invención) que capturan A β soluble de fluido cerebroespinal (CSF) humano

La capacidad para capturar A β soluble de muestras de CSF humano se determinó mediante inmunoprecipitación (IP) y análisis por transferencia Western (WB) semicuantitativa. *Procedimiento experimental:*

Se efectuó la inmunoprecipitación de muestras de CFS humano de acuerdo con el siguiente esquema:

70 ul de CSF humano

20 uL de tampón de incubación (Tris 50 mM, NaCl 140 mM, EDTA 5 mM, NP-40 al 0,05%, BSA al 1%, gelatina al 0,25%, leche en polvo al 0,25%, pH 7,2

10 ul de isoformas de ANTICUERPO A de soluciones concentradas (1000-10 ug/ml)

100 ul.

La solución se mantuvo durante una hora a 4°C. Se agregaron 40 ul de perlas de G Sepharose (Amersham Biosciences n.º 17-0618-01; lavadas con PBS, suspensión acuosa al 50%) y se incubaron durante 2 horas a 4°C en un rotador. Después de la centrifugación a 500 g durante 3 minutos a 4°C, se removió el sobrenadante y se agregaron 200 ul de PBS a las perlas, se transfirieron a tubos Millipore de 0,45 um (Millipore n.º UFC30HVN) y se centrifugaron a 500 g durante 3 minutos a 4°C. Se agregaron 200 ul de PBS adicionales a las perlas, se sometieron a un vórtice y se centrifugaron a 2000 g durante 3 minutos a 4°C. Se agregaron 45 ul de tampón de muestra 1xNuPage con DTT y se mantuvo durante 10 minutos a 70°C seguido de centrifugación a 2000 g durante 3 minutos a 4°C.

Para SDS-PAGE, se aplicaron 18 ul de eluato de proteína G al gel NuPage gel Bis-Tris al 10% junto con A β 1-42 (Bachem) como estándar interno directamente en el tampón de muestra como estándar e hizo pasar por un sistema tampón MES.

El gel se transfirió a una membrana Hybond C extra (sistema semiseco Novex), membrana seca 3' a temperatura ambiente. La membrana se transfirió a PBS precalentado y se calentó en microondas durante 3 minutos a 600 W. Se produjo el bloqueo durante 1 hora con una solución SuperBlock (Pierce) y un bloqueo adicional durante 1 hora con leche en polvo al 5% (Bio Rad) en T-PBS (Tween20 al 0,1% en PBS).

La incubación se produjo durante la noche con anticuerpo anti A β W02 Antibody (1:1500-1:2000 de The Genetics, Inc., Zürich, Suiza) a 4°C en un rotador, seguido de lavado 3x con T-PBS durante 5 minutos e incubación durante 2 horas a TA con IgG-HRP antirato (Dako) 1:5000 en T-PBS. A otro lavado 3x con T-PBS durante 5 minutos le siguió incubación con LumiLight Plus durante 5 minutos a TA. Se digitalizaron transferencias Western y se analizaron por densitometría con un Alpha Innotech Digital Camera System.

Tal como se documenta en la figura 10, la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A (que comprende isoformas de ANTICUERPO A monoglicosilado y doblemente glicosilado) eficazmente ligadas a A β soluble en CSF humano tal como se demuestra mediante inmunoprecipitación y experimentos de transferencia Western. Notablemente, en este ensayo, el ANTICUERPO A monoglicosilado resultó más eficaz para capturar A β soluble que el ANTICUERPO A doblemente glicosilado (figura 10).

Ejemplo 12: Inmunotinción *in vitro* de placas de amiloide humanas mediante la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A e isoformas (por ejemplo, anticuerpo no glicosilado, monoglicosilado o doblemente glicosilado de la invención)

Las isoformas de ANTICUERPO A glicosilado se sometieron a prueba para determinar la capacidad para manchar placas de β -amiloide humanas genuinas obtenidas de secciones del cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer severa mediante el análisis de inmunohistoquímica utilizando inmunofluorescencia indirecta. Se demostró la tinción específica y sensible de las placas de β -amiloide humanas genuinas.

Se marcaron con inmunofluorescencia indirecta secciones de criostato de tejido no fijado de la corteza temporal obtenida post mórtem de un paciente al cual se había diagnosticado la enfermedad de Alzheimer. Se utilizó una incubación de dos etapas sucesivas para detectar isoformas de ANTICUERPO A ligadas, reveladas mediante IgG (H+L) antihumana de cabra (GAH) purificada por afinidad conjugada con Cy3 (n.º 109-165-003, lot 49353, Jackson Immuno Research). Los controles incluyeron anticuerpos IgG1 humanos no relacionados (Sigma) y el anticuerpo secundario solo, y todos ellos dieron resultados negativos.

Todos los tipos de placas de β -amiloide fueron sensible y específicamente detectadas y reveladas consistentemente a una concentración de ANTICUERPO A de 10 ng/ml (figura 11).

La tinción específica y sensible de las placas de β -amiloide humanas genuinas se demuestra para las isoformas de ANTICUERPO A glicosilado a una concentración de hasta 1 μ g/ml.

A una concentración de 10 μ g/ml se observó una tinción de fondo, más prominente con la isoforma de ANTICUERPO A no glicosilada. La isoforma no glicosilada tuvo una viscosidad no específica considerable observada en la superficie de los portaobjetos de vidrio y casi todos los componentes de tejido que se expusieron después del seccionamiento *in vitro*. Esto pareció deberse a la unión no específica que comprende interacciones iónicas y/o hidrófobas.

Ejemplo 13: Decoración *in vivo* de placas de β -amiloide mediante ANTICUERPO A en un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer

Se sometieron a prueba isoformas de ANTICUERPO A glicosilado en un estudio de una única dosis en ratones transgénicos dobles PS2APP (Richards (2003), J. Neuroscience, 23, 8989-9003) para determinar su capacidad para inmunodecorar placas de β -amiloide *in vivo*. Las isoformas de ANTICUERPO A glicosilado se administraron a una dosis de 1 mg/ratón y después de 3 días se perfundió a los animales con una solución salina tamponada con fosfato y los cerebros se congelaron en hielo seco y se prepararon para el crioseccionamiento.

Ambas isoformas glicosiladas demostraron una penetración mejorada y altamente eficaz en el cerebro *in vivo* (en comparación con la forma no glicosilada). La penetración eficaz en el cerebro y la unión específica a las placas de β -amiloide se demostró en ratones PS2APP, un modelo de ratón para la amiloidosis relacionada con AD.

Se determinó la presencia de anticuerpos unidos a las placas de β -amiloide utilizando secciones de criostato no fijadas ya sea mediante inmunofluorescencia indirecta individualmente marcada con IgG antihumana de cabra (H+L) conjugada con Cy3 (n.º 109-165-003, Jackson Immuno Research) que se muestra en la figura 12 o seguido de contratinción con inmunconjugado BAP-2-Alexa488 para visualizar la posición y la distribución de todas los tipos de placas de β -amiloide presentes en el tejido.

Se utilizó un método de tinción con inmunofluorescencia para detectar el ANTICUERPO A ligado. Después de la adherencia a portaobjetos de vidrio previamente enfriados, las secciones se hidrataron en PBS y se trataron con acetona al 100% previamente enfriada a -20°C durante 2 minutos. El lavado con PBS se realizó dos veces durante dos minutos. El bloqueo de los sitios de unión no específicos se realizó ya sea con PBS que contenía BSA al 1% o por incubación secuencial en Ultra V Block (LabVision) durante 5 minutos seguido de un lavado con PBS e incubación en una solución bloqueante en polvo (BioGenex) con suero de oveja normal al 10% durante 20 minutos. Después del lavado con PBS con suero de oveja normal al 10%, se incubaron los portaobjetos con IgG antihumana de cabra (GAH) purificada por afinidad (H+L) conjugada con Cy3 (n.º 109-165-003, lot 49353, Jackson Immuno Research) a una concentración de 15 μ g/ml durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizó una contratinción para determinar las placas de amiloide mediante incubación con BAP-2, un anticuerpo monoclonal de ratón contra Ab conjugado con Alexa 488 a una concentración de 0,5 μ g/ml durante 1 hora a temperatura ambiente. La autofluorescencia de la lipofusina se templó por incubación en CuSO_4 4 mM en acetato de amonio 50 mM. Después de enjuagar los portaobjetos en agua bidestilada y lavarlos con 2 x 500 μ l/portaobjeto de PBS, los portaobjetos se incrustaron con un medio de montaje para fluorescencia (S3023 Dako).

La representación de imágenes se realizó mediante microscopia láser confocal y procesamiento de imágenes para el análisis cuantitativo de colocalizaciones mediante el software IMARIS y COLOCALIZATION (Bitplane, Suiza).

Después de una única dosis de 1 mg por ratón, se halló que las isoformas de ANTICUERPO A glicosilado penetraron la barrera hematoencefálica e inmunodecoraron/ligaron eficazmente todas las placas de β -amiloide

después de tres días *in vivo*. Las imágenes representativas se indican en la figura 12. Esto se diferencia claramente de la forma no glicosilada que no es detectable en las placas de amiloide.

Ejemplo 14: Investigación de la unión de isoformas de ANTICUERPO A con la proteína precursora del amiloide (APP) expresada en la superficie de células HEK293:

- 5 El método de citometría de flujo se conoce bien en la técnica. Las unidades de fluorescencia relativas (por ejemplo, FL1-H) medidas mediante citometría de flujo indicaron la unión del anticuerpo respectivo con la superficie de la célula. Una variación de la fluorescencia en células HEP293 transfectadas a APP en comparación con las células HEK293 no transfectadas indicó la reacción indeseada con APP de la superficie de la célula. Como ejemplo, los anticuerpos BAP-1 y BAP-2 contra el dominio N-terminal exhibieron una variación significativa de la señal FL-1 en HEK293/APP (figura 13, línea gruesa, panel derecho) en comparación con las células HEK293 no transfectadas (figura 13, líneas de puntos, panel derecho). De un modo similar, el anticuerpo BAP-44 (específico para el epítipo A-beta medio) exhibió una variación de tamaño similar. Por el contrario, todas las isoformas de ANTICUERPO A (figura 13 panel izquierdo) (específicas para los epítipos A-beta N-terminales y medios) no demostraron una variación significativa en la fluorescencia. Las células HEK293 no transfectadas tenían una mayor fluorescencia basal que las células transfectadas a APP, debido a diferentes propiedades de tamaño de célula y superficie. Se utilizó un instrumento FACScan en combinación con el paquete Cellquest Pro Software (ambos de Becton Dickinson).

Las isoformas de ANTICUERPO A estaban libres de reactividad hacia la APP de superficie de la célula (figura 13).

Ejemplo 15: Análisis morfométrico de la deposición de placas de A β en un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer

- 20 La capacidad de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A o las isoformas de ANTICUERPO A para disminuir la amiloidosis *in vivo* se estudió en varias regiones del cerebro (tálamo, neocorteza, hipocampo y subiculum), utilizando el análisis cuantitativo por imágenes asistido por computadora de los cerebros de ratones PS2APP que recibieron un tratamiento de cinco meses con la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A o las isoformas de ANTICUERPO A.

- 25 Por lo tanto, los ratones macho transgénicos PS2APP se inyectaron i.v. con COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A o isoformas de ANTICUERPO A y vehículo. Se dividieron setenta y cinco ratones PS2APP de 5-6 meses de edad en cinco grupos (A-E), compuestos por 15 ratones cada uno. Comenzando el día 0, cada ratón recibió 0,1 ml de vehículo (0 mg/kg) o bien preparaciones de ANTICUERPO A (20 mg/kg) mediante inyección i.v. por bolo a través de la vena de la cola. Los grupos A, B, C, D y E de los ratones PS2APP recibieron vehículo (solución salina tamponada con histidina), COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A que comprende ANTICUERPO A monoglicosilado y ANTICUERPO A doblemente glicosilado y que carece de ANTICUERPO A no glicosilado tal como se ha definido anteriormente, ANTICUERPO A doblemente glicosilado, ANTICUERPO A monoglicosilado y ANTICUERPO A no glicosilado, respectivamente.

- 35 Se indujo la inmunotolerancia contra anticuerpos anti-A β humanos administrados, inyectando anticuerpo anti-CD-4 (clon de hibridoma GK 1,5 comercialmente disponible de ATCC). El monitoreo de anticuerpos antidrogas indicó que los animales tratados con anticuerpo sólo desarrollaron una respuesta inmune moderada después de más de 16 semanas de tratamiento y que los anticuerpos detectables tienen baja afinidad o se producen sólo en bajas cantidades (no se muestran los datos).

- 40 Después de 5 meses de tratamiento se sacrificaron los ratones. Los cerebros no fijados se seccionaron sagitalmente, incluyendo las áreas del tálamo, de formación hipocámpica y cortical. De cada hemisferio del cerebro, se prepararon 50 secciones de la siguiente manera: Comenzando en el nivel ~1,92 lateral, se obtuvieron 5 series consecutivas de 5x 10 μ m y 5x 20 μ m secciones. No hubo ningún vacío entre secciones consecutivas, lo cual produjo como resultado un uso total del tejido de 750 μ m. Por lo tanto, la serie de secciones termina aproximadamente en el nivel 1,20 lateral (Paxinos y Franklin, 2003). Para el análisis morfométrico cuantitativo se utilizó cada 10 secciones.

- 45 Las secciones se tiñeron con isoforma de ANTICUERPO A doblemente glicosilado a una concentración de 5 μ g/ml para determinar los depósitos de amiloide. Las tinciones contra A β utilizando anticuerpo monoclonal de ratón (BAP-2) conjugado con fluoróforo Alexa-488 a 5 μ g/ml mostraron resultados comparables, aunque con tinción intracelular y de fondo significativa de neuronas que interfirieron con la rutina del procesamiento de imágenes que se describe más adelante. Para la detección se aplicó una IgG antihumana de cabra (GAH) purificada por afinidad (H+L) conjugada con Cy3 (n.º 109-165-003, lot 49353, Jackson Immuno Research) a una concentración de 15 μ g/ml durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado con 2 x 500 μ l de PBS/portaobjeto, los portaobjetos se incrustaron con medio de montaje de fluorescencia (S3023, Dako).

- 55 Las imágenes se adquirieron utilizando un escáner de micromatrices GenePix Personal 4100A (Axon Instruments, actualmente Molecular Devices, CA, USA). Se midió la carga y el número de placas de β -amiloide utilizando dos parámetros, es decir, porcentaje de área cubierta por las placas de β -amiloide y número de placas de β -amiloide, utilizando un método morfométrico sin margen de error por medio del análisis de imágenes asistido por computadora. La cuantificación de la carga y el número de placas se realizó con el software MCID M7 Elite (Imaging

Research Inc., St. Catherines/Notario, Canadá). Las imágenes exploradas se mejoraron con un filtro extractor de detalles seguido de un filtro Accent objetivo. Luego, la imagen resultante se binarizó, ajustando el umbral de acuerdo con la intensidad de tinción. Se identificaron artefactos, vasos sanguíneos y efectos de borde en la imagen de referencia original y luego se removieron de la imagen binarizada. Se marcaron las regiones de interés en la imagen de referencia. Para la cuantificación final, luego se midió el área de estas regiones y el área ocupada por las placas, así como también el número de placas, en la imagen binarizada. Se ignoraron los píxeles individuales. Se realizaron cálculos con el software de planilla de cálculo común (Microsoft Excel, Redmond/WA, USA). El tamaño de las placas se separó en 11 grupos que oscilaban entre <100 y $>1000 \mu\text{m}^2$. Se realizó una evaluación estadística utilizando una prueba heteroscedástica de dos colas.

Para la comparación y evaluación estadística, se determinó la línea de base de la amiloidosis (patología de placas de β -amiloide) al inicio del estudio con una cohorte (15 animales) de ratones PS2APP de 6 meses de edad no tratados. Los resultados se describen en las figuras 15 a 18 con niveles de significancia (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

La reducción de las placas de amiloide fue más pronunciada en la región del tálamo (figura 15). Se determinó la reducción media de la superficie de placas de β -amiloide para los grupos tratados con anticuerpo: el 64% para la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A, el 70% para el ANTICUERPO A doblemente glicosilado, el 81% para el ANTICUERPO A monoglicosilado y el 44% para el ANTICUERPO A no glicosilado. La reducción media en el número total de placas de β -amiloide fue del 70% para la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A, del 78% para el ANTICUERPO A doblemente glicosilado, del 82% para el ANTICUERPO A monoglicosilado y del 36% para el ANTICUERPO A no glicosilado. Obsérvese que la significancia para el ANTICUERPO A no glicosilado fue baja y las variaciones observadas fueron considerables.

La reducción de las placas de amiloide en la región neocortical junto con el cuerpo calloso se describe en la figura 16. Se determinó la reducción media de la superficie total de la placa de β -amiloide para los grupos tratados con anticuerpo: el 19% para la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A, el 27% para el ANTICUERPO A doblemente glicosilado, el 30% para el ANTICUERPO A monoglicosilado y el 10% para el ANTICUERPO A no glicosilado. Se halló que la reducción media del número total de placas de β -amiloide fue del 40% para la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A, del 46% para el ANTICUERPO A doblemente glicosilado, del 42% para el ANTICUERPO A monoglicosilado y del 11% para el ANTICUERPO A no glicosilado.

La reducción de placas de amiloide en la toda la región hipocámpica se describe en la figura 17. Se determinó la reducción media de la superficie total de placas de β -amiloide para los grupos tratados con anticuerpo: el 12% para la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A, el 24% para el ANTICUERPO A doblemente glicosilado, el 24% para el ANTICUERPO A monoglicosilado y el 6% para el ANTICUERPO A no glicosilado. La reducción media en el número total de placas de β -amiloide fue del 36% para COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A, del 46% para el ANTICUERPO A doblemente glicosilado, del 37% para el ANTICUERPO A monoglicosilado y del 3% para el ANTICUERPO A no glicosilado.

La reducción de las placas de amiloide en el subiculum, una región de alta susceptibilidad para la amiloidosis, se muestra en la figura 18. Se determinó la reducción media de la superficie total de las placas de β -amiloide para los grupos tratados con anticuerpo: el 2% para la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A, el 12% para el ANTICUERPO A doblemente glicosilado, el 5% para el ANTICUERPO A monoglicosilado y el 1% para el ANTICUERPO A no glicosilado. Se halló que la reducción media del número total de placas de β -amiloide fue del 22% para la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A, del 36% para el ANTICUERPO A doblemente glicosilado, del 13% para el ANTICUERPO A monoglicosilado y del 1% para el ANTICUERPO A no glicosilado. La COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A y las isoformas de N-glicosilación principal (ANTICUERPO A doblemente glicosilado y ANTICUERPO A monoglicosilado) demostraron una eficacia comparable para disminuir la carga de placas de β -amiloide y el número de placas. La reducción de la carga de placas fue más pronunciada y estadísticamente significativa en regiones con amiloidosis baja a moderada.

En general, se halló que la reducción del número de placas de β -amiloide fue estadísticamente significativa después del tratamiento con la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A y ambos comprendían isoformas glicosiladas Asn52 de ANTICUERPO A en todas las regiones medidas del cerebro. A diferencia de ello, sólo se halló un efecto menor en el número de placas de β -amiloide en el tálamo y no se halló ningún efecto significativo en el número de placas de β -amiloide en otras regiones del cerebro investigadas después del tratamiento con isoforma no glicosilada del anticuerpo A, que se excluye de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A después de la purificación que se detalla en la invención.

También se ha investigado la potencia del aclaramiento de las placas en relación con el tamaño de las placas. Por lo general, se halló que la efectividad de los anticuerpos anti-A β humanos sometidos a prueba fue más pronunciada para el aclaramiento de placas de β -amiloide pequeñas. Esto se observó en todas las regiones del cerebro (figuras 15 C, 16 C, 17 C, 17 C y 18 C). Por el contrario, sólo había una tendencia mínima o no significativa observada para la isoforma no glicosilada del ANTICUERPO A.

El análisis comparativo del ANTICUERPO A y las isoformas de glicosilación de Asn52 principales demostraron una capacidad comparable a una carga de placas menor, mientras que la isoforma no glicosilada no tiene un efecto significativo en la disminución de placas.

Ejemplo 16: Farmacocinética de la unión *in vivo* de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A a placas de β -amiloide

Se compararon dos frecuencias de dosificación a fin de investigar la cinética de unión de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A, que comprende ANTICUERPO A monoglicosilado y ANTICUERPO A doblemente glicosilado, y que carece de ANTICUERPO A no glicosilado tal como se ha definido anteriormente.

Por lo tanto, se inyectó i.v. a los ratones macho transgénicos PS2APP con COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A a través de la vena de la cola ya sea 4 veces en intervalos bisemanales a 0,05, 0,1 y 0,3 mg/kg o 3 veces con un intervalo mensual con 0,075, 0,15 y 0,45 mg/kg. Por comparación, se administraron 0,1 mg/kg una vez y dos veces con intervalos bisemanales y 0,15 mg/kg con intervalo mensual. Después de la administración, todos los ratones se sacrificaron dos semanas después de la última dosificación. Se preparó tejido de cerebro de PS2APP no fijado para el seccionamiento sagital entre ~ 1,92 y 1,2 mm laterales de acuerdo con Paxinos y Franklin, incluidas las áreas del tálamo, de formación hipocámpica y cortical. Los cerebros se seccionaron a 40 μ m utilizando criostato.

Se utilizó un método de inmunotinción *ex vivo* por inmunofluorescencia para detectar anticuerpos de COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A ligados. Por lo tanto, se seccionaron los cerebros y se incubaron con el anticuerpo de detección, una IgG antihumana (GAH) de cabra purificada por afinidad (H+L) conjugada con Cy3 (n.º 109-165-003, lote 49353, Jackson Immuno Research) a una concentración de 15 μ g/ml durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizó una contratinción para placas de β -amiloide por incubación con BAP-2, un anticuerpo monoclonal de ratón contra A β conjugado con el fluoróforo Alexa488 a una concentración de 0,5 μ g/ml durante 1 hora a temperatura ambiente.

Se registraron imágenes en la corteza occipital cerca del cerebelo utilizando un microscopio de exploración láser confocal Leica TCS SP2 AOBS, tal como se ha descrito anteriormente. Se realizó el procesamiento de imágenes asistida por computadora utilizando el software IMARIS (Bitplane, Suiza). Las imágenes de las placas se seleccionaron primero utilizando la función "crop" del software para dosis menores, excepto las dos dosis más altas de 0,3 y 0,45 mg/kg que requerían una configuración de adquisición diferente para el registro de señal lineal. Se utilizó la función SURPASS para seleccionar los vóxeles positivos después el umbral (T) como lectura para GAH-Cy3 ligados en el sitio de placas de β -amiloide. Las configuraciones umbrales fueron 19 y 12 para grupos de dosis más bajas y más altas, respectivamente. Como control para la especificidad de las placas de β -amiloide, después del marcaje doble se compararon las imágenes de las tinciones GAH-Cy3 con imágenes de placas teñidas con BAP2 monoclonal de ratón conjugado con Alexa488 y registrado en un canal diferente.

Se realizó estadísticas descriptivas para la descripción cuantitativa de todas las imágenes con el módulo de software MeasurementPro IMARIS. Se determinaron los valores de intensidad de fluorescencia de vóxeles medios (MVI) de placas de β -amiloide seleccionadas en los grupos de baja dosis o la señal total de imágenes en los grupos de dosis alta. La MVI (B) de línea de base se debe al ruido instrumental, a la señal de difusión en el tejido y a la autofluorescencia de la lipofusina. De la corrección de fondo, se determinó B midiendo la intensidad promedio de la señal en áreas separadas de las placas de β -amiloide y posteriormente se sustrajeron de la MVI de todas las imágenes medidas (MVI – B = S). Los valores de intensidad de la señal (S) que se asemejaban a las intensidades promedio o placas se obtuvieron de 3 a 4 imágenes de cada sección del cerebro por ratón y grupo de dosis. Para la comparación, las intensidades de la señal se normalizaron a una muestra de referencia obtenida de un estudio anterior. Como referencia, se utilizaron secciones de cerebro de ratón PS2APP después de una administración de una única dosis de 0,25 mg/kg. El punto final de la medición fue una semana después de la dosificación.

Todos los valores de la intensidad medida se normalizaron a la intensidad promedio en las placas de β -amiloide obtenidas después de una administración de una única dosis de 0,25 mg/kg de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A, que se midió una semana después de la dosificación (ver tabla siguiente). Los valores normalizados para la intensidad de fluorescencia relativa de las placas de β -amiloide inmunopositivas se obtuvieron mediante CLSM después de la inmunotinción y medición de las intensidades de señal promediadas de 3 animales por grupo de dosis. Las placas sin ANTICUERPO A derivado de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A se observaron sólo en los grupos de menor dosis, más probablemente debido a la ocupación limitada o parcial del ANTICUERPO A derivado de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A en la superficie de la placa, que se pudo haber perdido durante el proceso de seccionamiento. Por lo tanto, sólo las placas inmunopositivas se incluyen para el análisis comparativo.

La intensidad de fluorescencia relativa media por grupo de dosis después de la administración i.v. (BOLO) múltiple de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A en ratones transgénicos PS2APP se indica en la tabla siguiente:

Dosis intervalo/inyecciones	Intensidad Promedio de la Fluorescencia Media Normalizada de Placas de β -amiloide de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A inmunopositivas		Porcentaje de Placas de β - amiloide inmunonegativas de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A
	%	DE	%
0,25 mg - única ¹	100	6	0
0,05 mg -bisemanal/4x	53	2	58
0,075 mg -mensual/3x	57	6	39
0,15 mg - mensual/2x	106	6	19
0,1 mg - bisemanal/1x	59	8	45
0,1 mg - bisemanal/2x	83	26	21
0,1 mg - bisemanal/4x	88	12	2
0,15 mg - mensual/3x	93	19	1
0,3 mg - bisemanal/4x	148	24	0
0,45 mg - mensual/3x	184	20	0

¹Los valores experimentales representan los valores de intensidad normalizados al valor obtenido de una única dosis de 0,25 mg/kg después de 1 semana.

La figura 19 muestra la unión de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A en relación con el número de dosis bisemanales sucesivas de 0,1 mg/kg. Después de dos aplicaciones, se incrementó la intensidad media, aunque la extensión de la inmunotinción varía considerablemente y, por lo tanto, no tuvo significancia. Después de 4 inyecciones, las placas de β -amiloide se inmunotifieron de un modo más homogéneo, pero la intensidad media sólo aumentó levemente. En general, los datos para la aplicación bisemanal indican claramente una tendencia de mayor unión de las placas que se correlaciona con el número de aplicaciones.

La figura 20 muestra la unión de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A en relación con el número de dosis mensuales sucesivas de 0,15 mg/kg. Interesantemente, se obtienen niveles comparables después de 2 y 3 aplicaciones. Esto no fue necesariamente esperado y puede indicar la iniciación de efectos prematuros que contribuyen a las diferencias dependientes del tiempo en el mecanismo de aclaramiento, como la activación demorada de células microgliales.

La eficacia de unión de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A en relación con la dosis administrada se indica en las figuras 21 y 22. Las dosis bisemanales de 0,05, 0,1 y 0,3 mg/kg (figura 21) y las dosis mensuales de 0,075, 0,15 y 0,45 mg/kg (figura 22) demostraron claramente una relación con la dosis. También es evidente que la respuesta no es lineal y que factores adicionales tales como una activación temporalmente demorada de las células microgliales pueden contribuir a la no linealidad observada.

Por lo tanto, se puede concluir que la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A que se une a las placas de A β de ratón se relaciona con la dosis con indicaciones de que las múltiples dosis son acumulativas.

Ejemplo 17: Análisis de fagocitosis celular dependiente del antígeno

Para determinar el efecto fagocítico mediado por la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A, placas de A β genuinas de cortes de cerebro con AD se preincubaron con diferentes concentraciones de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A que comprende ANTICUERPO A monoglicosilado y ANTICUERPO A doblemente glicosilado y que está libre de ANTICUERPO A no glicosilado, tal como se ha definido anteriormente, y se expusieron a monocitos primarios humanos vivos.

Se prepararon secciones de tejido cerebral AD humano no fijados de la región de la corteza occipital a partir de un caso de AD severo (estadio IV de Braak). Antes de agregar las células vivas, se rehidrataron las secciones con PBS durante 5 minutos. Los anticuerpos de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A se aplicaron mediante incubación en concentraciones definidas en PBS durante 1 hora. Después del lavar con PBS, se agregaron las células vivas. Se utilizaron monocitos primarios humanos preestimulados a 0,8 y 1,5 x 10⁶/ml en medio RPMI 1640 (Gibco n.º 61870-044) con una solución antibiótica al 1% de una solución concentrada que contenía 10'000 U/ml de penicilina y 10,000 mg/ml de estreptomina (Gibco n.º 15140-122) y se incubaron a 37°C con dióxido de carbono al 5% durante 2 a 4 días. Los métodos para la preparación de monocitos primarios humanos preestimulados son conocidos en la

técnica, por ejemplo, a través del uso de factores estimulantes, como el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF).

Después de la incubación, se removió suavemente el medio de cultivo y las secciones se mantuvieron por fijación química con formaldehído al 2% en PBS durante 10 minutos. La tinción de la carga de placas de A β residual se efectuó por incubación con BAP-2, un anticuerpo monoclonal de ratón contra A β conjugado con fluoróforo Alexa488 (Sondas Moleculares: A-20181, kit de marcaje de anticuerpos monoclonales), en una concentración de 10 mg/ml durante 1 hora a temperatura ambiente.

Se determinó la cuantificación de la remoción de placas midiendo la inmunofluorescencia de las placas de A β teñidas residuales. Se registraron las imágenes en un microscopio de exploración láser confocal Leica TCS SP2 AOBs. Se registró una capa óptica a una longitud de onda de excitación de 488 nm con una configuración de orificio de 4 Airy utilizando un objetivo de corrección HCX PL FL 20x/0,40, excepto en un experimento donde se utilizó, en cambio, un objetivo HCPL Fluorar 10x/0,30 en una configuración de orificio de 3. Las configuraciones de los instrumentos se mantuvieron constantes para todas las imágenes para permitir una comparación cuantitativa relacional. Específicamente, se ajustó la potencia del láser, la adquisición y la separación (offset) para permitir el monitoreo de la intensidad de la señal dentro del rango dinámico. Para cada concentración de COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A se registraron las regiones de materia gris en posiciones comparables desde secciones consecutivas a fin de minimizar las fluctuaciones que posiblemente provienen de diferencias anatómicas en la carga de las placas. La unión competitiva potencial de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A y el anticuerpo de detección BAP-2 se midió en ausencia de células en todas las concentraciones de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A. Se utilizó un anticuerpo de IgG1 humano no relacionado (Serotec, PHP010) como control adicional. Se realizó el análisis de las imágenes utilizando el software IMARIS (Bitplane, Suiza). Se creó la isosuperficie de píxeles positivos de BAP-2 que representaba objetos de BAP-2 unidos a las placas, por medio del umbral de intensidad. El área superficial y los valores de intensidad de fluorescencia total se calcularon utilizando la "función de isosuperficie" del módulo de software SurpassPro. Los datos se expresaron como el área de tinción promedio y los valores de tinción totales obtenidos de 5 regiones de materia gris de una sección del cerebro. La línea de base de la señal está compuesta por el ruido instrumental y se halló que la señal de difusión en el tejido era insignificante y, por lo tanto, no se substrajo de la señal de intensidad total.

Se visualizó el efecto cualitativo de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A mediante una disminución de la tinción de las placas de A β , lo cual indica una mayor fagocitosis de las placas de A β de secciones de cerebro AD humanas tal como muestra la figura 23. La inmunohistoquímica reveló una reducción claramente visible de las placas de A β que se pueden teñir, después de una preincubación con 100 ng/ml de COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A después de 40 horas. El efecto es muy pronunciado y en concentraciones de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A de 1 y 5 mg/ml. Las placas de A β son substancialmente eliminadas cada vez más por la fagocitosis celular y sólo quedan unas pocas placas de A β en una concentración de 5 mg/ml. En la figura 24, se muestra una medición cuantitativa basada en las señales de inmunoreactividad expresadas como área e intensidad del mismo experimento.

Alternativamente, el efecto fagocítico mediado por la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A se determinó utilizando perlas de poliestireno fluorescentes conjugadas con A β . Por lo tanto, las perlas fluorescentes (3 μ m, Fluoresbrite carboxy YG, Polysciences Inc.) se acoplaron al A β . En resumen, las perlas se lavaron 2x mediante suspensión y centrifugación en tampón de acoplamiento (50 mM tampón MES, pH 5,2, 1% de DMSO). El sedimento (aproximadamente 10 μ l) se suspendió en 200 μ l de tampón de acoplamiento y se activó por adición de 20 μ l de una solución al 20% de EDC (etil-diaminopropil-carbodiimida, Pierce) en tampón de acoplamiento. La adición inmediata de 20 μ g de A β (1-40) o A β (1-42) (en 0,1% de hidróxido de amonio, Bachem) inició la reacción de acoplamiento. Después de una incubación de una noche las perlas se lavaron con 3x 0,5 ml de 10 mM de Tris.HCl pH 8,0 y 3x 0,5 ml de tampón de almacenamiento (Tris.HCl 10 mM pH 8,0, BSA al 0,05%, NaN₃ 0,05%). La suspensión al 1% se almacenó a 4°C hasta su uso. Como control negativo, se acoplaron perlas de Fluoresbrite carboxy NYO (fluorescencia roja) con el A β de aminoácido todo-D (1-40) (en hidróxido de amonio al 0,1%, Bachem).

Los monocitos/macrófagos de ratón (línea celular P388D1) crecieron en grupos de cultivos de tejido transparente C24 o microplacas negras C96 a aproximadamente un 50% de confluencia. El medio de cultivo fue IMEM con FBS al 5%, glutamina y antibióticos. Para bloquear los receptores de depuración no específicos, se agregaron 10 ml de fucoidan (Fluka, 10 mg/ml en agua) a un volumen de cultivo de 200 ml y se incubó durante 2 horas. Se agregó la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A en diluciones seriadas y se preincubó durante 30 minutos. Se agregó la suspensión de perlas de A β fluorescentes (20 μ l) y se incubó durante 3 horas para permitir la fagocitosis. Las células adherentes se lavaron vigorosamente 1x con EDTA helado y 2x con PBS para remover los aglutinados adherentes de la superficie de la célula. Las perlas residuales se monitorearon por inspección visual en un Zeiss Axiovert 405 o para la cuantificación utilizando un fluorímetro de microplaca (Fluoroscanner, Labsystems) con configuraciones del filtro de 444 nm (Exc) y 485 nm (Em).

El efecto cualitativo de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A en la fagocitosis de agregados de A β sintéticos acoplados a fluoroperlas fluorescentes mediante P388D1 se muestra en la figura 25. La determinación cuantitativa de la respuesta a la dosis de la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A se indica en la figura 26. Dos experimentos

independientes revelaron un rango que oscilaba entre 30 y 200 ng/ml para EC50 y entre 10 y 60 ng/ml para MEC. La variabilidad observada es causada probablemente por diferencias de la estequiometría de incubación, es decir, la relación de las perlas con las células. La disminución observada en la fagocitosis de perlas por encima de una concentración > 200 ng/ml se debe a la interacción de anticuerpos monovalente con un antígeno limitado.

- 5 Por lo tanto, podemos concluir que la COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO A induce eficazmente la fagocitosis de placas A β de secciones de tejido de cerebro con AD de un modo dependiente de la dosis.

Lista de secuencias

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Glicosilación de anticuerpos en la región variable

<130> K1314 PCT S3

<150> EP 05 02 7090.9

<151> 12-12-2005

<160> 32

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 378

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Región VH del ANTICUERPO A

<400> 1

```

cagggtggaat tgggtggaaag cggcgggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg      60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttagc agctatgcga tgagctgggt gcgccaagcc      120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgtc attaatgctt ctggtactcg tacttattat      180
gctgattctg ttaagggctg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtaag      300
ggtaatactc ataagcctta tggttatgtt cgttattttg atgtttgggg ccaaggcacc      360
ctggtgacgg ttagctca                                     378

```

<210> 2

<211> 126

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Región VH del ANTICUERPO A

<400> 2

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20           25           30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45

```

Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr
100 105 110

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 3
<211> 42
5 <212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> A-beta

<400> 3

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

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

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

<210> 4
15 <211> 52
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
20 <223> secuencia peptídica que comprende A-beta

<400> 4

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

Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser
20 25 30

Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40 45

Thr Val Ile Val
50

- 5 <210> 5
<211> 1391
<212> ADN
<213> secuencia artificial
- 10 <220>
<223> cadena pesada con región Fc del ANTICUERPO A
- <400> 5

ES 2 368 591 T3

caggtggaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttagc agctatgcga tgagctgggt gcgccaagcc 120
cctgggaagg gtctcgagt ggtgagcgt attaatgctt ctggtactcg tacttattat 180
gctgattctg ttaagggteg ttttaccatt tcaçgtgata attcgaaaa caccctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtaag 300
ggtaatactc ataagcctta tggttatgtt cgttattttg atgtttgggg ccaaggcacc 360
ctggtgacgg ttagctcagc ctccaccaag ggtccatcgg tcttccccct ggcaccctcc 420
tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc 480
gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc 540
gctgtectac agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc 600
agcttgggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg 660
gacaagaaag ttgagcccag atatcgtgcg atatcgtgca atcttgtgac aaaactcaca 720
catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc 780
caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg 840
acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc 900
ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgg gtggtcagcg 960
tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca 1020
acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag 1080
aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc 1140
tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg 1200
ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcctgtgct ggactccgac ggctccttct 1260
tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat 1320
gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc 1380
cgggtaaatg a 1391

5 <210> 6
<211> 456
<212> PRT
<213> secuencia artificial

10 <220>
<223> cadena pesada con región Fc del ANTICUERPO A

<400> 6

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr
100 105 110

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

ES 2 368 591 T3

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 7
<211> 648
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera del ANTICUERPO A
<400> 7

gatatcgtgc tgacccagag cccggcgacc ctgagcctgt ctccgggcca acgtgcgacc 60
ctgagctgca gagcgagcca gagcgtgagc agcagctatc tggcgtggta ccagcagaaa 120
ccagggtcaag caccgcgtct attaatattat ggcgcgagca gccgtgcaac tgggggtccc 180
gcgcgttttta ggcgctcttg atccggcacg gattttaccc tgaccattag cagcctggaa 240
cctgaagact ttgcgactta ttattgcctt cagatttata atatgcctat tacctttggc 300
cagggtacga aagttgaaat taaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttccc 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag 648

<210> 8
<211> 215
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera del ANTICUERPO A
<400> 8

ES 2 368 591 T3

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

 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
 65 70 75 80

 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro
 85 90 95

 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190

 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205

 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

5 <210> 9
 <211> 30
 <212> ADN

<213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cadena pesada de CDR1
 5 <400> 9
 ggatttacct ttagcagcta tgcgatgagc 30
 10 <210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 15 <220>
 <223> cadena pesada de CDR1
 <400> 10
 20 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5 10
 <210> 11
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cadena pesada de CDR2
 <400> 11
 30 gctattaatg cttctgggtac tcgtacttat tatgctgatt ctggttaaggg t 51
 35 <210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 40 <220>
 <223> cadena pesada de CDR2
 <400> 12
 45 Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 50 <210> 13
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 55

<210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> cadena ligera de CDR2
 <400> 18
 10
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 19
 <211> 24
 15 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cadena ligera de CDR3
 20 <400> 19
 cttcagattt ataatatgcc tatt 24
 25 <210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 30 <220>
 <223> cadena ligera de CDR3
 <400> 20
 Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro Ile
 35 1 5
 <210> 21
 <211> 648
 40 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cadena ligera del ANTICUERPO A
 45 <400> 21

ES 2 368 591 T3

```

gatatcgtgc tgacccagag cccggcgacc ctgagcctgt ctccgggcca acgtgcgacc      60
ctgagctgca gagcgagcca gagcgtgagc agcagctatc tggcgtggta ccagcagaaa      120
ccagggtcaag caccgcgtct attaatattat ggcgcgagca gccgtgcaac tgggggtcccg      180
gcgcgtttta gcggctctgg atccggcacg gattttaccc tgaccattag cagcctggaa      240
cctgaagact ttgcgactta ttattgcctt cagatttata atatgcctat tacctttggc      300
cagggtacga aagttgaaat taaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg      360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc      420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc      480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg      540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag      600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag      648

```

- 5 <210> 22
- <211> 215
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> cadena ligera del ANTICUERPO A
- <400> 22

ES 2 368 591 T3

Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	1	5	10	15
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	20	25	30	
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	35	40	45	
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	50	55	60	
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	65	70	75	80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Ile	Tyr	Asn	Met	Pro	85	90	95	
Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	100	105	110	
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	115	120	125	
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	130	135	140	
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	145	150	155	160
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	165	170	175	

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 23

<211> 3984

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia alternativa que codifica para la cadena pesada con la región Fc del ANTICUERPO A

<400> 23

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtga ttcattggaga	60
aatagagaga ctgagtgtga gtgaacatga gtgagaaaaa ctggatttgt gtggcatttt	120
ctgataacgg tgtccttctg tttgcagggtg tccagtgtca ggtggagctg gtggagtctg	180
ggggaggcct ggtccagcct ggggggtccc tgagactctc ctgtgcagcg tctggattca	240
ccttcagtag ctatgccatg agctgggtcc gccaggctcc aggcaagggg ctcgagtggg	300
tgtccgccat aaacgccagc ggtacccgca cctactatgc agactccgtg aagggccgat	360
tcaccatctc cagagacaat tccaagaaca cgctgtatct gcaaatgaac agcctgagag	420
ccgaggacac ggctgtgtat tactgtgcca gaggcaaggg gaacacccac aagccctacg	480
gctacgtacg ctactttgac gtgtggggcc aaggaaccct ggtcacctgc tcttcagggtg	540
agtcctcaca acctctctcc tgcggccgca gcttgaagtc tgaggcagaa tcttgtccag	600
ggtctatcgg actcttgtga gaattagggg ctgacagttg atggtgacaa tttcagggtc	660
agtgactgtc tggtttctct gaggtgagac tggaatatag gtcaccttga agactaaaga	720
gggggtccagg ggcttttctg cacaggcagg gaacagaatg tggaacaatg acttgaatgg	780
ttgattcttg tgtgacacca agaattggca taatgtctga gttgcccaag ggtgatctta	840
gctagactct ggggtttttg tcgggtacag aggaaaaacc cactattgtg attactatgc	900
tatggactac tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tcaggtaaga atggcctctc	960
caggctctta tttttaacct ttgttatgga gttttctgag cattgcagac taatcttgga	1020
tatttgccct gagggagccg gctgagagaa gttgggaaat aaatctgtct agggatctca	1080

ES 2 368 591 T3

gagcctttag gacagattat ctccacatct ttgaaaaact aagaatctgt gtgatgggtgt 1140
 tgggtggagtc cctggatgat gggatagggg ctttggaggc tcatttgagg gagatgctaa 1200
 aacaatccta tggctggagg gatagttggg gctgtagttg gagattttca gtttttagaa 1260
 tgaagtatta gctgcaatac ttcaaggacc acctctgtga caaccatttt atacagtatc 1320
 caggcatagg gacaaaaagt ggagtggggc actttcttta gatttgtgag gaatgttcca 1380
 cactagattg tttaaaactt catttggttg aaggagctgt cttagtgatt gagtcaaggg 1440
 agaaaggcat ctagcctcgg tctcaaaagg gtatgtgctg tctagagagg tctgggtggag 1500
 cctgcaaaag tccagctttc aaaggaacac agaagtatgt gtatggaata ttagaagatg 1560
 ttgcttttac tcttaagttg gttcctagga aaaatagtta aatactgtga ctttaaaatg 1620
 tgagagggtt ttcaagtact ctttttttta aatgtccaaa atttttgtca atcaatttga 1680
 ggtcttgttt gtgtagaact gacattactt aaagttaaac cgaggaaatgg gagtgaggct 1740
 ctctcatacc ctattcagaa ctgactttta acaataataa attagttta aaatattttt 1800
 aaatgaattg agcaatgttg agttgagtca agatggccga tcagaaccgg aacacctgca 1860
 gcagctggca ggaagcaggt catgtggcaa ggctatttgg ggaagggaaa ataaaaccac 1920
 taggtaaact tgtagctgtg gtttgaagaa gtgggtttga aacactctgt ccagccccac 1980
 caaaccgaaa gtccaggctg agcaaaacac cacctgggta atttgcattt ctaaaaataag 2040
 ttgaggattc agccgaaact ggagagggtc tcttttaact tattgagttc aaccttttaa 2100
 ttttagcttg agtagttcta gtttcccaa acttaagttt atcgacttct aaaatgtatt 2160
 tagaattcga gctcgttaca gctttctggg gcaggccagg cctgaccttg gctttggggc 2220
 agggaggggg ctaagggtgag gcagggtggc ccagcaggtg cacaccaat gcccatgagc 2280
 ccagacactg gacgtgaac ctgcgggaca gttaagaacc caggggcctc tgcgcctggg 2340
 ccagctctg tcccacaccg cggtcacatg gcaccacctc tcttgagcc tccaccaagg 2400
 gcccatcggc cttccccctg gcacctcct ccaagagcac ctctgggggc acagcggccc 2460
 tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg 2520
 ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtctcagga ctctactccc 2580
 tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac ccagacctac atctgcaacg 2640
 tgaatcacia gccagcaac accaagggtg acaagaaagt tggtagaggg ccagcacagg 2700
 gagggagggt gtctgctgga agccaggctc agcgtcctg cctggacgca tcccggctat 2760
 gcagccccag tccagggcag caaggcaggc cccgtctgcc tcttcaccg gagcctctgc 2820
 ccgccccact catgctcagg gagaggggtt tctggctttt tcccaggctc tgggcaggca 2880

caggctaggt gcccctaacc caggccctgc acacaaaggg gcaggtgctg ggctcagacc 2940
tgccaagagc catatccggg aggaccctgc ccctgaccta agcccacccc aaaggccaaa 3000
ctctccactc cctcagctcg gacaccttct ctctcccag attccagtaa ctcccaatct 3060
tctctctgca gagcccaaatt cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccaggtaa 3120
gccagcccag gcctcgccct ccagctcaag gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat 3180
ccagggacag gcccagccg ggtgctgaca cgtccacctc catctcttcc tcagcacctg 3240
aactcctggg gggaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga 3300
tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg 3360
tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg 3420
aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact 3480
ggctgaatgg caaggagtac aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg 3540
agaaaacat ctccaaagcc aaaggtggga cccgtggggg gcgagggcca catggacaga 3600
ggccggctcg gcccaccctc tgccctgaga gtgaccgctg taccaacctc tgtccctaca 3660
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 3720
aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 3780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 3840
gacggctcct tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 3900
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 3960
ctctccctgt ccccgggcaa atga 3984

<210> 24

<211> 3202

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia alternativa que codifica para la cadena ligera del ANTICUERPO A

10

<400> 24

ES 2 368 591 T3

atggacatga gggctcctcgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctgttt cccaggtaag	60
gatggagaac actagcagtt tactcagccc aggggtgctca gtactgcttt actattcagg	120
gaaattctct tacaacatga ttaattgtgt ggacatttgt ttttatgttt ccaatctcag	180
gcgccagatg tgatatcgtg ttgacgcagt ctccagccac cctgtctttg tctccagggg	240
aaagagccac cctctcctgc cgggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcctggt	300
accagcagaa acctggccag gcgccccaggc tcctcatcta tggcgcatcc agcagggcca	360

ctggcgtgcc agccagggttc agtggcagtg ggtctgggac agacttcact ctcaccatca 420
 gcagcctgga gcctgaagat ttcgcgacct attactgtct gcagatttac aacatgccta 480
 tcacgttcgg ccaagggacc aaggtggaaa tcaaacgtga gtagaattta aactttgcgg 540
 ccgcctagac gtttaagtgg gagatttgga ggggatgagg aatgaaggaa cttcaggata 600
 gaaaagggct gaagtcaagt tcagctccta aaatggatgt gggagcaaac tttgaagata 660
 aactgaatga ccagaggat gaaacagcgc agatcaaaga ggggcctgga gctctgagaa 720
 gagaaggaga ctcatccgtg ttgagtttcc acaagtactg tcttgagttt tgcaataaaa 780
 gtgggatagc agagttgagt gagccgtagg ctgagttctc tcttttgtct cctaagtttt 840

 tatgactaca aaaatcagta gtatgtcctg aaataatcat taagctgttt gaaagtatga 900
 ctgcttgcca tgtagatacc atgtcttget gaatgatcag aagaggtgtg actcttattc 960
 taaaatttgt cacaaaatgt caaaatgaga gactctgtag gaacgagtc cttgacagaca 1020
 gctcaagggg tttttttcct ttgtctcatt tctacatgaa agtaaatttg aaatgatctt 1080
 ttttattata agagtagaaa tacagttggg tttgaactat atgttttaat ggccacgggt 1140
 ttgtaagaca tttggtcctt tgttttccca gttattactc gattgtaatt ttatatcgcc 1200
 agcaatggac tgaaacggtc cgcaacctct tctttacaac tgggtgacct cgcggctgtg 1260
 ccagccattt ggcgttcacc ctgccgctaa gggccatgtg aacccccgcg gtagcatccc 1320
 ttgctccgcg tggaccactt tcttgaggca cagtgatagg aacagagcca ctaatctgaa 1380
 gagaacagag atgtgacaga ctacactaat gtgagaaaaa caaggaaagg gtgacttatt 1440
 ggagatttca gaaataaaat gcatttatta ttatatccc ttattttaat tttctattag 1500
 ggaattagaa agggcataaa ctgctttatc cagtgttata ttaaaagctt aatgtatata 1560
 atctttttaga ggtaaaatct acagccagca aaagtcatgg taaatattct ttgactgaac 1620
 tctcactaaa ctctctctaaa ttatatgtca tattaactgg ttaaattaat ataaatttgt 1680
 gacatgacct taactgggta ggtaggatat ttttcttcat gcaaaaatat gactaataat 1740
 aatttagcac aaaaatattt cccaatactt taattctgtg atagaaaaat gtttaactca 1800
 gctactataa tcccataatt ttgaaaacta tttattagct tttgtgtttg acccttcctt 1860
 agccaaaggc aactatttta ggacccttta aaactcttga aactacttta gagtcattaa 1920
 gttatttaac cacttttaat tactttaaaa tgatgtcaat tcccttttaa ctattaattt 1980
 attttaaggg gggaaaggct gtcataaatt ctattgtttt tcttggtaaa gaactctcag 2040
 ttttcgtttt tactacctct gtcaccaag agttggcatc tcaacagagg ggactttccg 2100

agaggccatc tggcagttgc ttaagatcag aagtgaagtc tgccagttcc tcccaggcag 2160
gtggcccaga ttacagttga cctgtttctgg tgtggctaaa aattgtccca tgtgggttaca 2220
aaccattaga ccaggggtctg atgaattgct cagaatattt ctggacaccc aaatacagac 2280
cctggcttaa ggccctgtcc atacagtagg tttagcttgg ctacaccaaa ggaagccata 2340
cagaggctaa tatcagagta ttcttgggaag agacaggaga aaatgaaagc cagtttctgc 2400
tcttacctta tgtgcttgtg ttcagactcc caaacatcag gagtgtcaga taaactggtc 2460
tgaatctctg tctgaagcat ggaactgaaa agaattgagt ttcaggaag aaaggcaata 2520
gaaggaagcc tgagaatacg gatcaattct aaactctgag ggggtcggat gacgtggcca 2580
ttctttgcct aaagcattga gtttactgca aggtcagaaa agcatgcaaa gccctcagaa 2640
tggtctgcaaa gagctccaac aaaacaattt agaactttat taaggaatag ggggaagcta 2700
ggaagaaact caaaacatca agattttaaa tacgttctt ggtctccttg ctataattat 2760
ctgggataag catgctgttt tctgtctgtc cctaactgac cctgtgatta tccgcaaaca 2820
acacacccaa gggcagaact ttgttactta aacaccatcc tgtttgcttc tttcctcagg 2880
aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg 2940
aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg 3000
gaaggtggat aacgcctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag 3060
caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgtg agcaaagcag actacgagaa 3120
acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag 3180
cttcaacagg ggagagtgtt ag 3202

<210> 25
<211> 1428
5 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
10 <223> cadena pesada con región Fc del ANTICUERPO A y con la secuencia líder

<400> 25

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
 gtggaattgg tggaaagcgg cggcggcctg gtgcaaccgg gcggcagcct gcgtctgagc 120
 tgcgcggcct ccggatttac cttagcagc tatgcgatga gctgggtgcg ccaagcccct 180
 gggaagggtc tcgagtgggt gagcgtatt aatgcttctg gtactcgtac ttattatgct 240
 gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg 300
 caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tggtaagggt 360
 aatactcata agccttatgg ttatgttctg tattttgatg tttggggcca aggcaccctg 420
 gtgacgggta gctcagcctc caccaagggt ccatcgggtc tccccctggc accctcctcc 480
 aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 540
 ccggtgacgg tgtcgtggaa ctccaggcgc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 600
 gtccctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 660
 ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caagggtggac 720
 aagaaagttg agcccaaate ttgtgacaaa actcacacat gccaccgtg cccagcacct 780
 gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc tccccccaa aaccaagga caccctcatg 840
 atctccccga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 900
 gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 960
 gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 1020
 tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc 1080
 gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 1140
 ccatccccgg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctgggt caaaggcttc 1200
 tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1260
 accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg 1320
 gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1380
 cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatga 1428

5 <210> 26
 <211> 475
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> cadena pesada con región Fc del ANTICUERPO A y con la secuencia líder

ES 2 368 591 T3

<400> 26

Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp
1				5					10					15	

Val	Leu	Ser	Gln	Val	Glu	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln
			20					25					30		

Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe
		35					40					45			

ES 2 368 591 T3

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr
 115 120 125
 Val Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 130 135 140
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 145 150 155 160
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 165 170 175
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 180 185 190
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 195 200 205
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 210 215 220
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 225 230 235 240
 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 245 250 255
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 260 265 270
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 275 280 285

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
290 295 300

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
305 310 315 320

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
325 330 335

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
340 345 350

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
355 360 365

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
370 375 380

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
385 390 395 400

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
405 410 415

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
420 425 430

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
435 440 445

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
450 455 460

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

<210> 27
<211> 708
<212> ADN

ES 2 368 591 T3

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera del ANTICUERPO A con la secuencia líder

5

<400> 27

```

atggtgttgc agaccaggt cttcatttct ctgttgctct ggatctctgg tgcctacggg      60
gatatcgtgc tgaccagag cccggcgacc ctgagcctgt ctccgggcga acgtgcgacc      120

ctgagctgca gagcgagcca gagcgtgagc agcagctatc tggcgtggta ccagcagaaa      180
ccaggtcaag caccgcgtct attaatattat ggcgcgagca gccgtgcaac tgggggtccc      240
gcgcgtttta ggggctctgg atccggcacg gatatttacc tgaccattag cagcctggaa      300
cctgaagact ttgcgactta ttattgcctt cagatttata atatgcctat tacctttggc      360
cagggtacga aagttgaaat taaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttccc      420
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgctgct gaataacttc      480
tatccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc      540
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg      600
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag      660
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag      708

```

10

<210> 28

<211> 235

<212> PRT

<213> secuencia artificial

15

<220>

<223> cadena ligera del ANTICUERPO A con la secuencia líder

<400> 28

20

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ile
100 105 110

Tyr Asn Met Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 29
<211> 31
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador homosentido MS-Roche n.º 7. 9. H7_lg_kappa
<400> 29

acgtaagctt gccgccacca tgggtgttgca g

31

<210> 30
<211> 28
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador antisentido MS-Roche n.º 7. 9. H7_lg_kappa
<400> 30

	acgtgaattc ctaacactct cccctggt	28
5	<210> 31 <211> 31 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador homosentido MS-Roche n.º 7. 9. H7_IgG1 <400> 31	
15	acgtaagctt gccgccacca tgaaacacct g	31
20	<210> 32 <211> 28 <212> ADN <213> secuencia artificial	
25	<220> <223> cebador antisentido MS-Roche n.º 7.9.H7_IgG1 <400> 32	
	acgtgaattc tcatttaccc ggagacag	28

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una molécula de anticuerpo que puede reconocer específicamente el péptido β -A4/A β 4, siendo dicha molécula de anticuerpo una molécula de anticuerpo monoglicosilado o una molécula de anticuerpo doblemente glicosilado o en la que dicha composición comprende una mezcla de dicha molécula de anticuerpo monoglicosilado y dicha molécula de anticuerpo doblemente glicosilado,
 - en la que dicha molécula de anticuerpo monoglicosilado comprende una asparagina (Asn) glicosilada en la posición 52 de la SEQ ID NO:2 o de la SEQ ID NO:6 en la región variable de la cadena pesada (VH) y en la que dicha molécula de anticuerpo doblemente glicosilado comprende una asparagina (Asn) glicosilada en la posición 52 de la SEQ ID NO:2 o de la SEQ ID NO:6 en la región variable de la cadena pesada (VH) de ambos sitios de unión del anticuerpo,
 - en la que dicha molécula de anticuerpo comprende una CDR1 en la cadena pesada variable tal como se muestra en la SEQ ID NO: 10, una CDR2 en la cadena pesada variable tal como se muestra en la SEQ ID NO: 12, una CDR3 en la cadena pesada variable tal como se muestra en la SEQ ID NO: 14, una CDR1 en la cadena ligera variable tal como se muestra en la SEQ ID NO: 16, una CDR2 en la cadena ligera variable tal como se muestra en la SEQ ID NO: 18 y una CDR3 en la cadena ligera variable tal como se muestra en la SEQ ID NO: 20,
 y en donde dicha composición comprende menos del 5% de una molécula de anticuerpo que se caracteriza porque ningún sitio de unión al antígeno de dicha molécula de anticuerpo comprende una asparagina (Asn) glicosilada en la región variable de la cadena pesada (VH).
2. Composición según la reivindicación 1, en donde dicha asparagina (Asn) en la región variable de la cadena pesada (V_H) está en la región CDR-2.
3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, en donde dicho péptido β -A4/A β 4 tiene la siguiente secuencia:
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 3)
o una parte de al menos 15 aminoácidos de dicha secuencia.
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha molécula de anticuerpo comprende una cadena pesada (V_H) codificada por:
 - (a) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO:1
CAGGTGGAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGC
GCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGATGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTC
TCGAGTGGGTGAGCGCTATTAATGCTTCTGGTACTCGTACTTATTATGCTGATTCTGTTAAGGGTCGTTT
TACCATTTCACGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATAC
GGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGTAAGGGTAATACTCATAAGCCTTATGTTTATGTTTCGTTATTTTGAT
GTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA;
 - (b) una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2
QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINASGTRTYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 2);
 - (c) una molécula de ácido nucleico que se hibrida a la molécula de ácido nucleico de (a) o (b) y que codifica para un polipéptido que es capaz de unirse al péptido β -A4/A β 4 tal como se muestra en la siguiente secuencia de aminoácidos
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 3)
o es capaz de unirse a un fragmento del mismo que comprende al menos 15 aminoácidos;
 - (d) una molécula de ácido nucleico que se hibrida a la molécula de ácido nucleico de (a) o (b) y que codifica para un polipéptido que es capaz de unirse a al menos dos regiones en el péptido β -A4/A β 4 tal como se muestra en la siguiente secuencia de aminoácidos
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 3)
o a al menos dos regiones de un fragmento de la SEQ ID NO: 3 que comprende al menos 15 aminoácidos, en donde dichas dos regiones en el péptido β -A4/A β 4 o el fragmento de éste comprenden los aminoácidos en la posición 3 a 6 y en la posición 18 a 26; o

- (e) una secuencia de ácidos nucleicos que se degenera a una secuencia de ácidos nucleicos tal como se define en cualquiera de (a) a (d).
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha molécula de anticuerpo comprende una cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en:
- 5 (a) un polipéptido de cadena pesada codificado por una molécula de ácido nucleico tal como se muestra en las SEQ ID NO: 5, 23 ó 25;
- (b) un polipéptido de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 6 ó 26;
- 10 (c) un polipéptido de cadena pesada codificado por una molécula de ácido nucleico que se hibrida a la molécula de ácido nucleico definida en (a) y que codifica para un polipéptido que es capaz de unirse al péptido β -A4/A β 4 tal como se muestra en la siguiente secuencia de aminoácidos
- DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 3)
- o a un fragmento del mismo que comprende al menos 15 aminoácidos; o
- 15 (d) un polipéptido de cadena pesada codificado por una molécula de ácido nucleico que se hibrida a la molécula de ácido nucleico definida en (a) y que codifica para un polipéptido que es capaz de unirse a al menos dos regiones en el péptido β -A4/A β 4 tal como se muestra en la siguiente secuencia de aminoácidos
- DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 3)
- o a al menos dos regiones de un fragmento de la SEQ ID NO: 3 que comprende al menos 15 aminoácidos,
- 20 en donde dichas dos regiones en el péptido β -A4 / A β 4 o su dicho fragmento comprenden los aminoácidos en la posición 3 a 6 y en la posición 18 a 26.
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha glicosilación en la Asn en la región V_H se selecciona del grupo que consiste en
- (a) una estructura de azúcar del tipo complejo biantenarico;
- (b) una estructura de azúcar del tipo híbrido biantenarico;
- 25 (c) una estructura de azúcar del tipo oligomanosa biantenaria; y
- (d) una estructura de azúcar biantenaria de cualquiera de las estructuras provistas en la figura 5 o la figura 27.
7. Composición según la reivindicación 6, en donde dicha estructura de azúcar no comprende una fucosilación del núcleo.
- 30 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha molécula de anticuerpo se produce de forma recombinante.
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicha molécula de anticuerpo se produce en una célula CHO.
10. Composición según la reivindicación 9, en donde dicha célula CHO es CHO K1 o CHO K1 SV.
- 35 11. Método para la preparación de una molécula de anticuerpo comprendida en la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que comprende las etapas de
- (a) expresar de forma recombinante una molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica para una molécula de anticuerpo tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en una célula cultivada de mamífero;
- 40 (b) purificar dicha molécula de anticuerpo recombinantemente expresada a través de un método que comprende las etapas de
- (b1) purificación en columna de la proteína A;
- (b2) purificación en columna de intercambio iónico; y
- (b3) purificación en columna de exclusión molecular.

12. Método según la reivindicación 11, en el que dicha purificación en columna de intercambio iónico comprende una cromatografía de intercambio catiónico.
13. Método según la reivindicación 11 ó 12, que comprende además como etapa adicional (c) una cromatografía analítica y/o una etapa de concentración adicional.
- 5 14. Composición que comprende una molécula de anticuerpo preparada mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13.
15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 ó 14, que es una composición de diagnóstico o farmacéutica.
- 10 16. Uso de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, 14 ó 15 para la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad asociada con amiloidogénesis y/o formación de placas de amiloide, seleccionada del grupo que consiste en demencia, enfermedad de Alzheimer, neuropatía motora, síndrome de Down, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés, demencia asociada con la formación de cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ELA y trastornos neuronales relacionados con la edad.
- 15 17. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, 14 ó 15 preparada para su uso como medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad asociada con amiloidogénesis y/o formación de placas de amiloide, seleccionada del grupo que consiste en demencia, enfermedad de Alzheimer, neuropatía motora, síndrome de Down, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés, demencia asociada con la formación de cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ELA y trastornos neuronales relacionados con la edad.
- 20 18. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, 14 ó 15 para la preparación de un kit de diagnóstico para la detección de una enfermedad asociada con amiloidogénesis y/o formación de placas de amiloide, seleccionada del grupo que consiste en demencia, enfermedad de Alzheimer, neuropatía motora, síndrome de Down, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés, demencia asociada con la formación de cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ELA y trastornos neuronales relacionados con la edad.
- 25 19. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, 14 ó 15 preparada para su uso como kit de diagnóstico para la detección de una enfermedad asociada con amiloidogénesis y/o formación de placas de amiloide, seleccionada del grupo que consiste en demencia, enfermedad de Alzheimer, neuropatía motora, síndrome de Down, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés, demencia asociada con la formación de cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ELA y trastornos neuronales relacionados con la edad.
- 30 20. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, 14 ó 15 para la preparación de un medicamento para la desintegración de placas de β -amiloides en una enfermedad asociada con amiloidogénesis y/o formación de placas de amiloide, seleccionada del grupo que consiste en demencia, enfermedad de Alzheimer, neuropatía motora, síndrome de Down, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés, demencia asociada con la formación de cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ELA y trastornos neuronales relacionados con la edad.
- 35 21. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, 14 ó 15 preparada para su uso como medicamento para la desintegración de placas de β -amiloides en una enfermedad asociada con amiloidogénesis y/o formación de placas de amiloide, seleccionada del grupo que consiste en demencia, enfermedad de Alzheimer, neuropatía motora, síndrome de Down, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés, demencia asociada con la formación de cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ELA y trastornos neuronales relacionados con la edad.
- 40 22. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, 14 ó 15 para la preparación de una composición farmacéutica para la inmunización pasiva contra la formación de placas de β -amiloides.
- 45 23. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, 14 ó 15 preparada para su uso como una composición farmacéutica para la inmunización pasiva contra la formación de placas de β -amiloides.
- 50 24. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, 14 ó 15 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento preventivo contra una enfermedad asociada con amiloidogénesis y/o formación de placas de amiloide, seleccionada del grupo que consiste en demencia, enfermedad de Alzheimer, neuropatía motora, síndrome de Down, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob,
- 55

hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés, demencia asociada con la formación de cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ELA y trastornos neuronales relacionados con la edad.

- 5 25. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, 14 ó 15 preparada para su uso como composición farmacéutica para el tratamiento preventivo contra una enfermedad asociada con amiloidogénesis y/o formación de placas de amiloide, seleccionada del grupo que consiste en demencia, enfermedad de Alzheimer, neuropatía motora, síndrome de Down, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés, demencia asociada con la formación de cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ELA y trastornos neuronales relacionados con la edad.
- 10 26. Uso según la reivindicación 24 o composición según la reivindicación 25, en el que se reducen las placas preexistentes o los intermediarios de agregación de β -amiloide.
- 15 27. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, 14 ó 15 para la preparación de un kit de diagnóstico para el diagnóstico de una enfermedad asociada con amiloidogénesis y/o formación de placas de amiloide en un paciente o para el diagnóstico de la susceptibilidad de un paciente para el desarrollo de una enfermedad asociada con amiloidogénesis y/o formación de placas de amiloide, seleccionándose dicha enfermedad del grupo que consiste en demencia, enfermedad de Alzheimer, neuropatía motora, síndrome de Down, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés, demencia asociada con la formación de cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ELA y trastornos neuronales relacionados con la edad.
- 20 28. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, 14 ó 15, preparada para su uso como kit de diagnóstico para el diagnóstico de una enfermedad asociada con amiloidogénesis y/o formación de placas de amiloide en un paciente o para el diagnóstico de la susceptibilidad de un paciente para el desarrollo de una enfermedad asociada con amiloidogénesis y/o formación de placas de amiloide, seleccionándose dicha enfermedad del grupo que consiste en demencia, enfermedad de Alzheimer, neuropatía motora, síndrome de Down, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés, demencia asociada con la formación de cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ELA y trastornos neuronales relacionados con la edad.
- 25 29. Kit que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, 14, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 26 ó 28 o una molécula de anticuerpo que se prepara mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13.
- 30

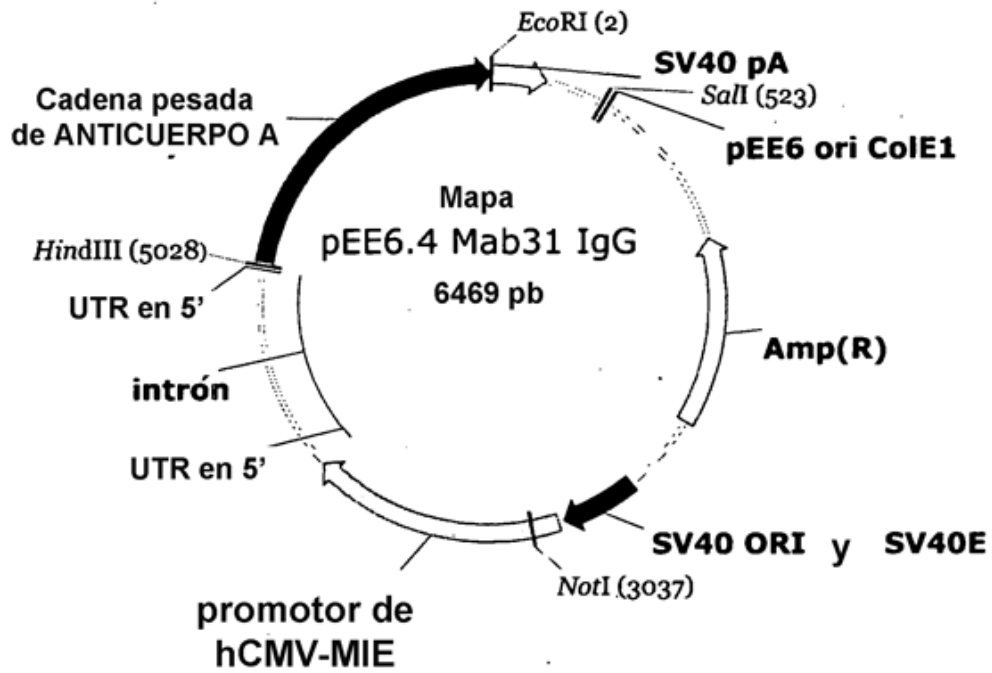


Figura 1A

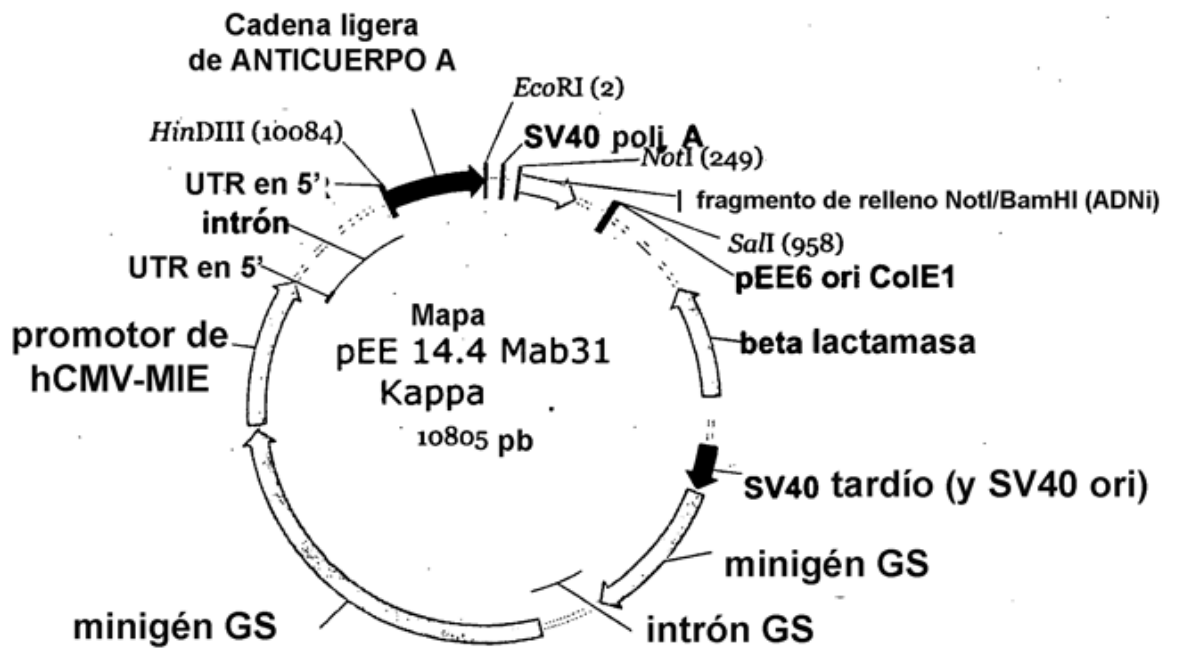


Figura 1B

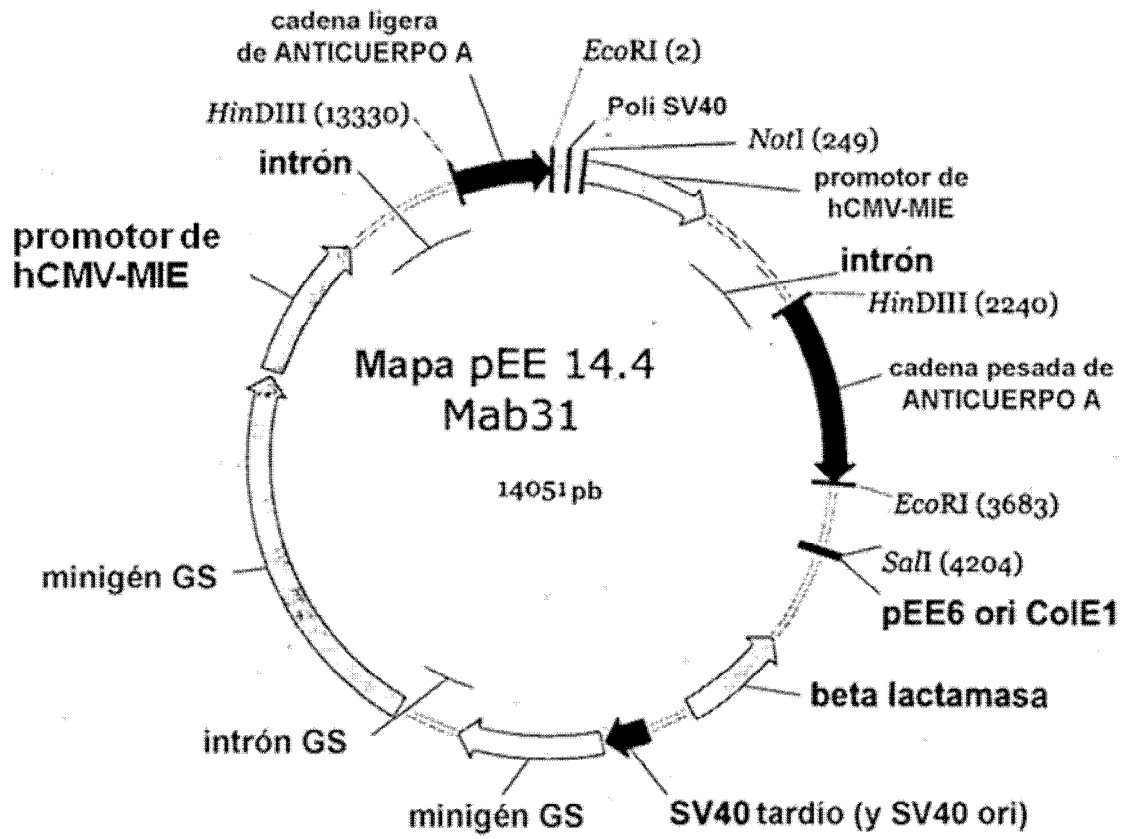


Figura 1C

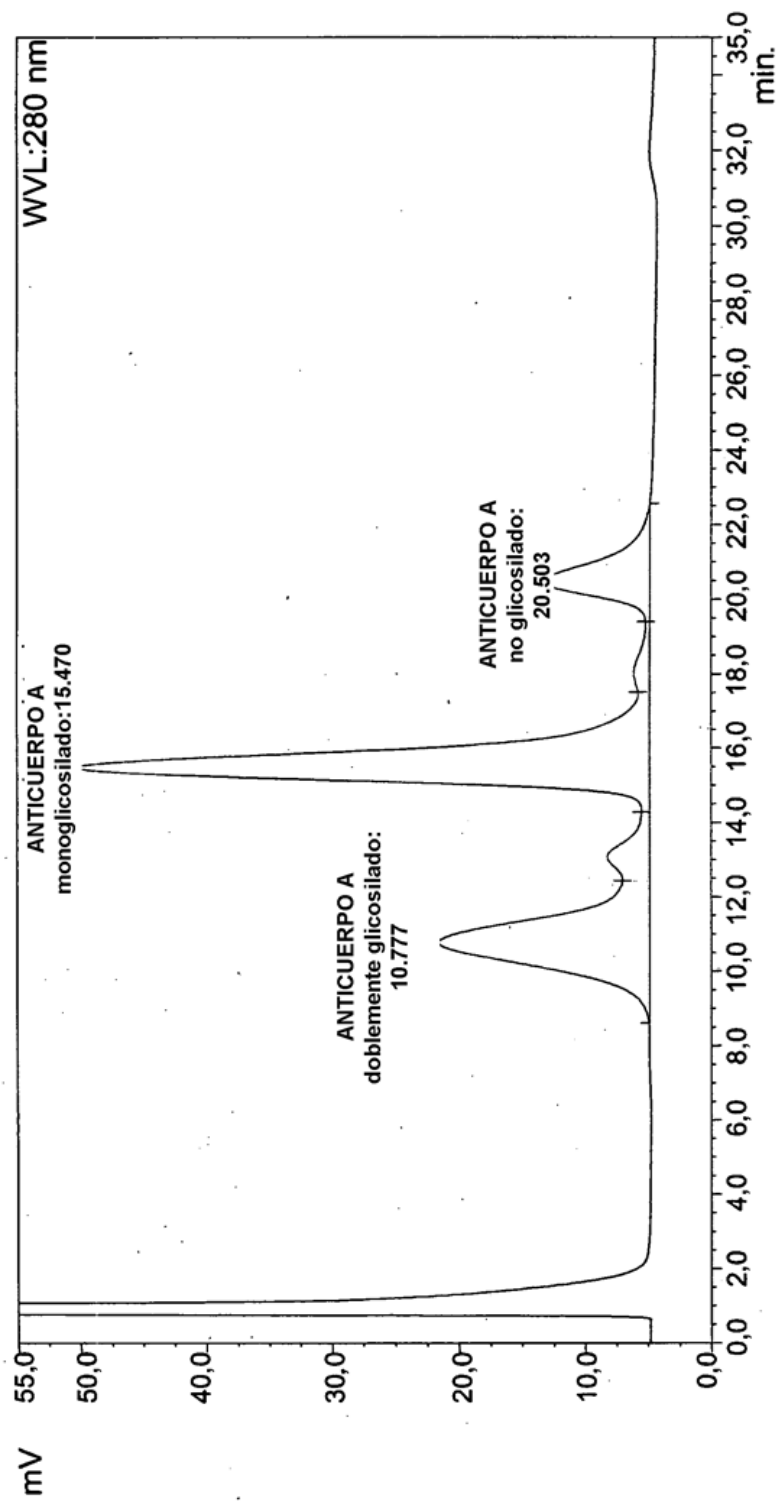


Figura 2

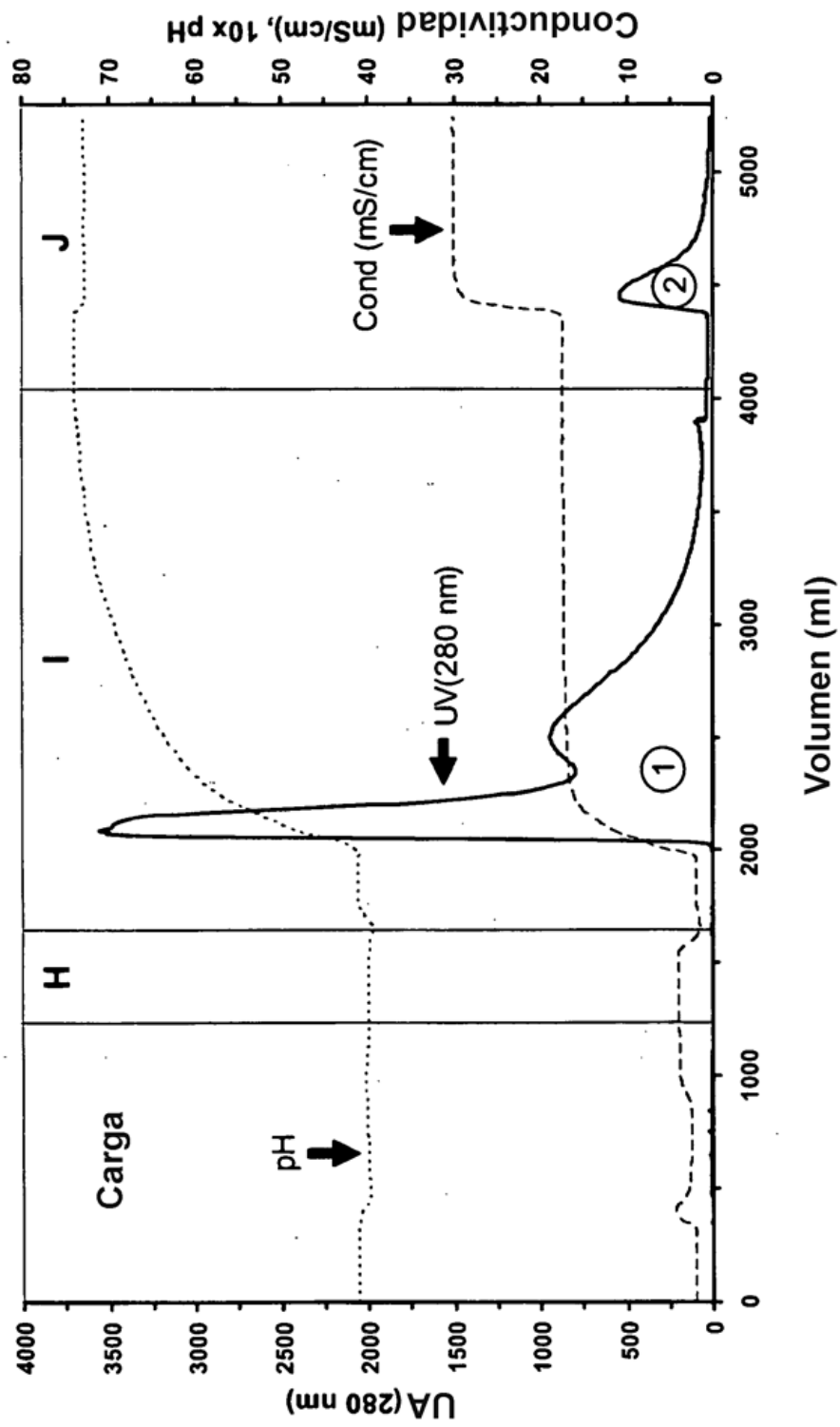


Figura 3

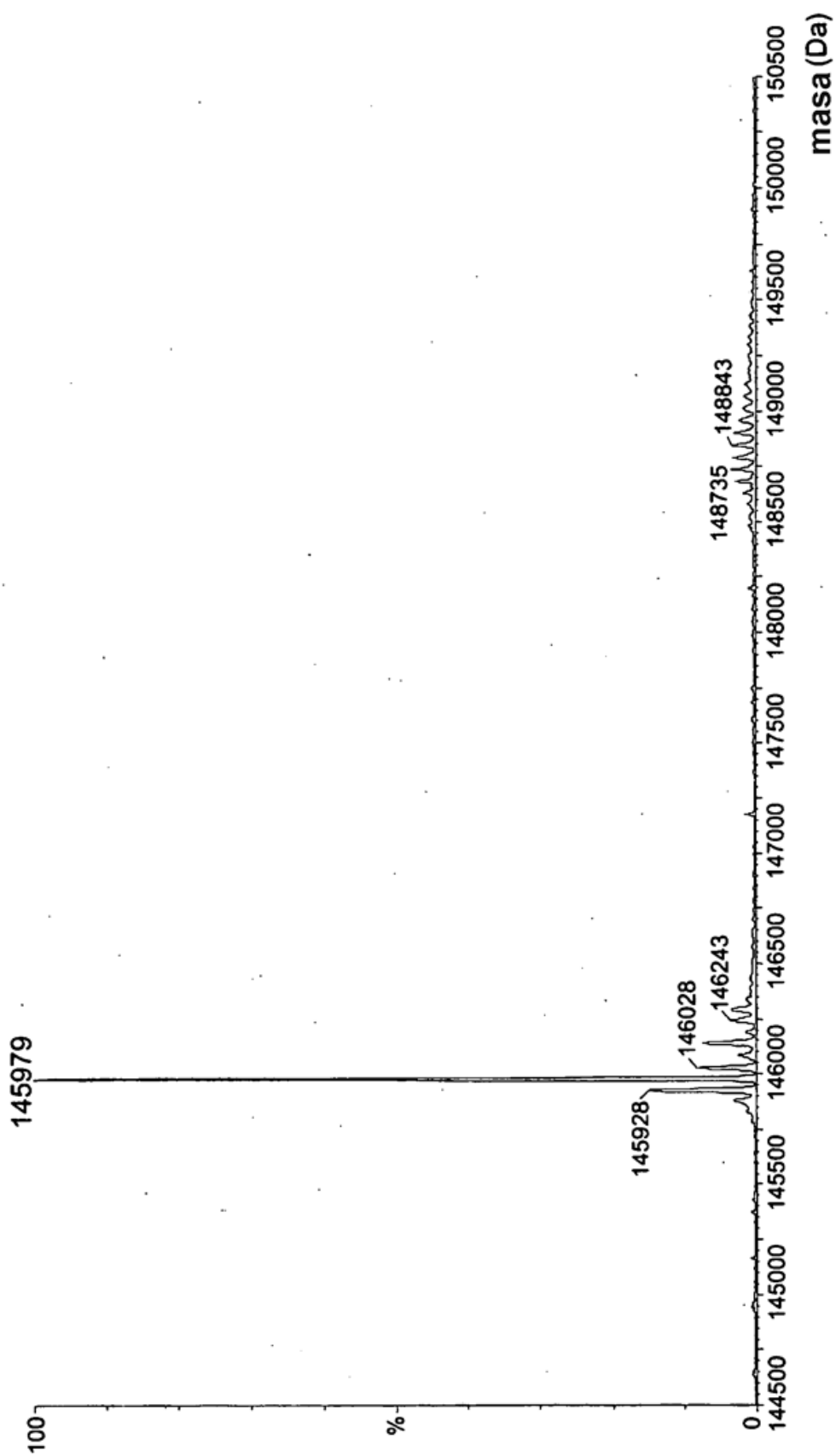


Figura 4A: Anticuerpo A no glicosilado

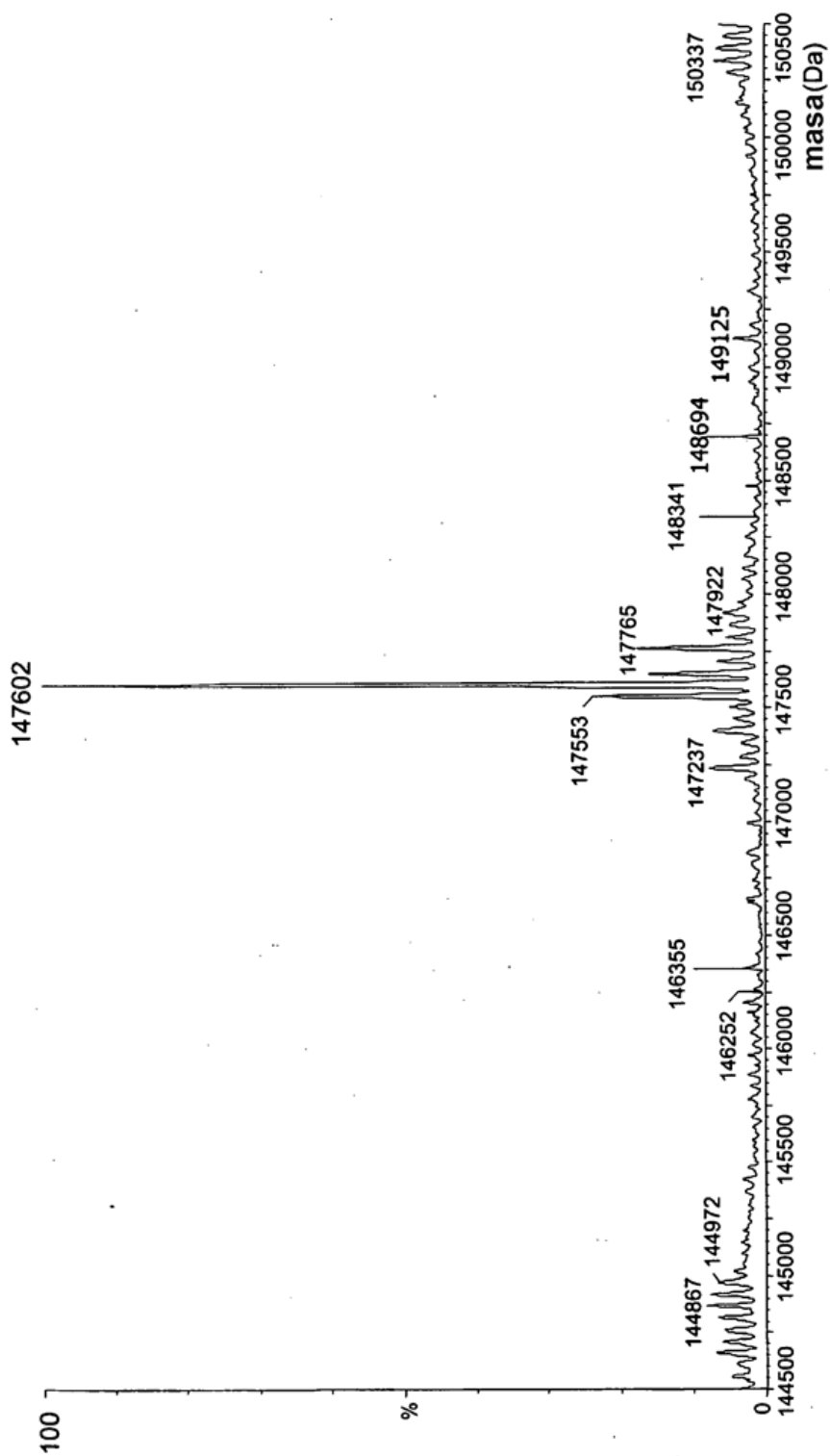


Figura 4B - ANTICUERPO A monoglicosilado

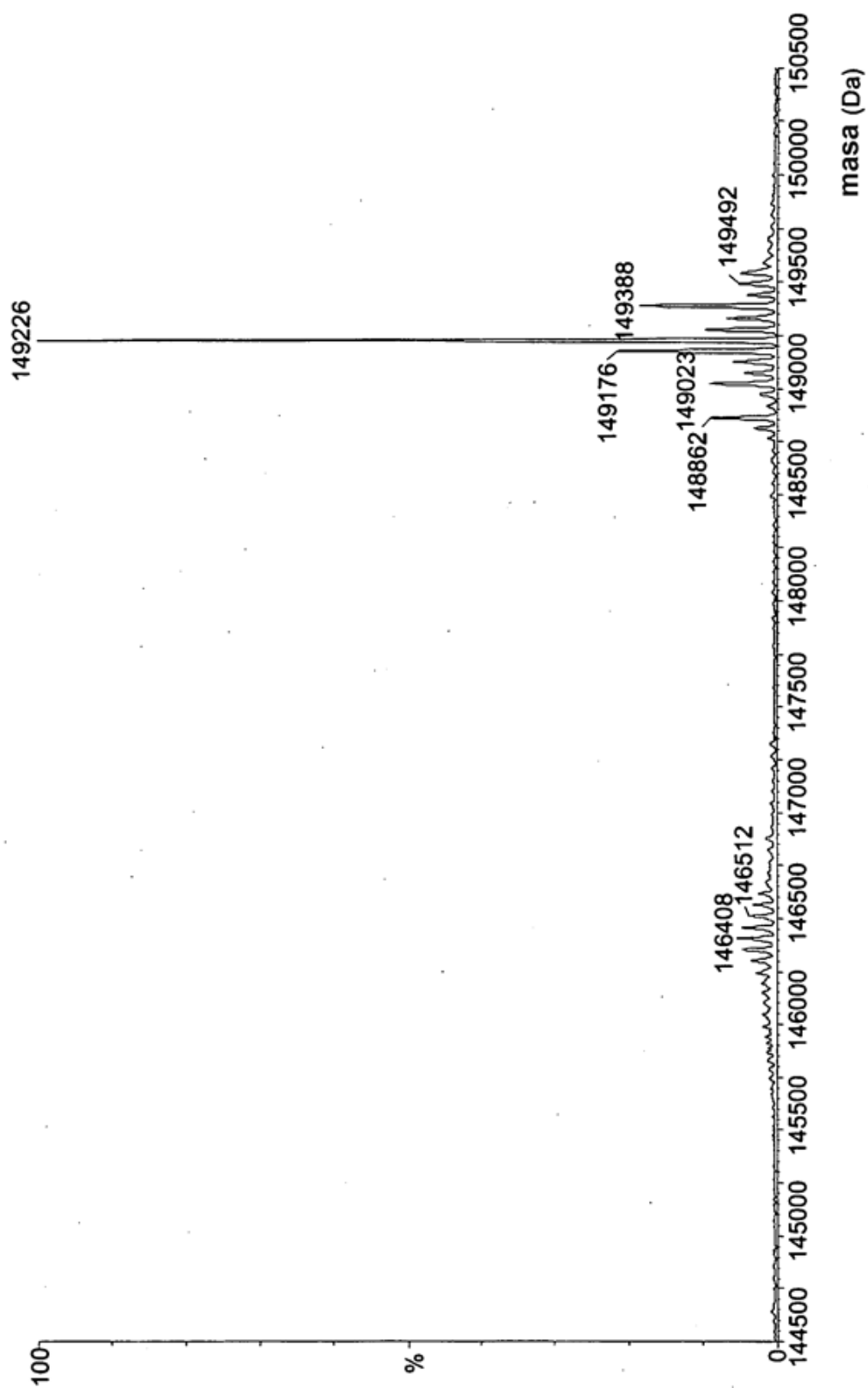


Figura 4C - ANTICUERPO A doblemente glicosilado

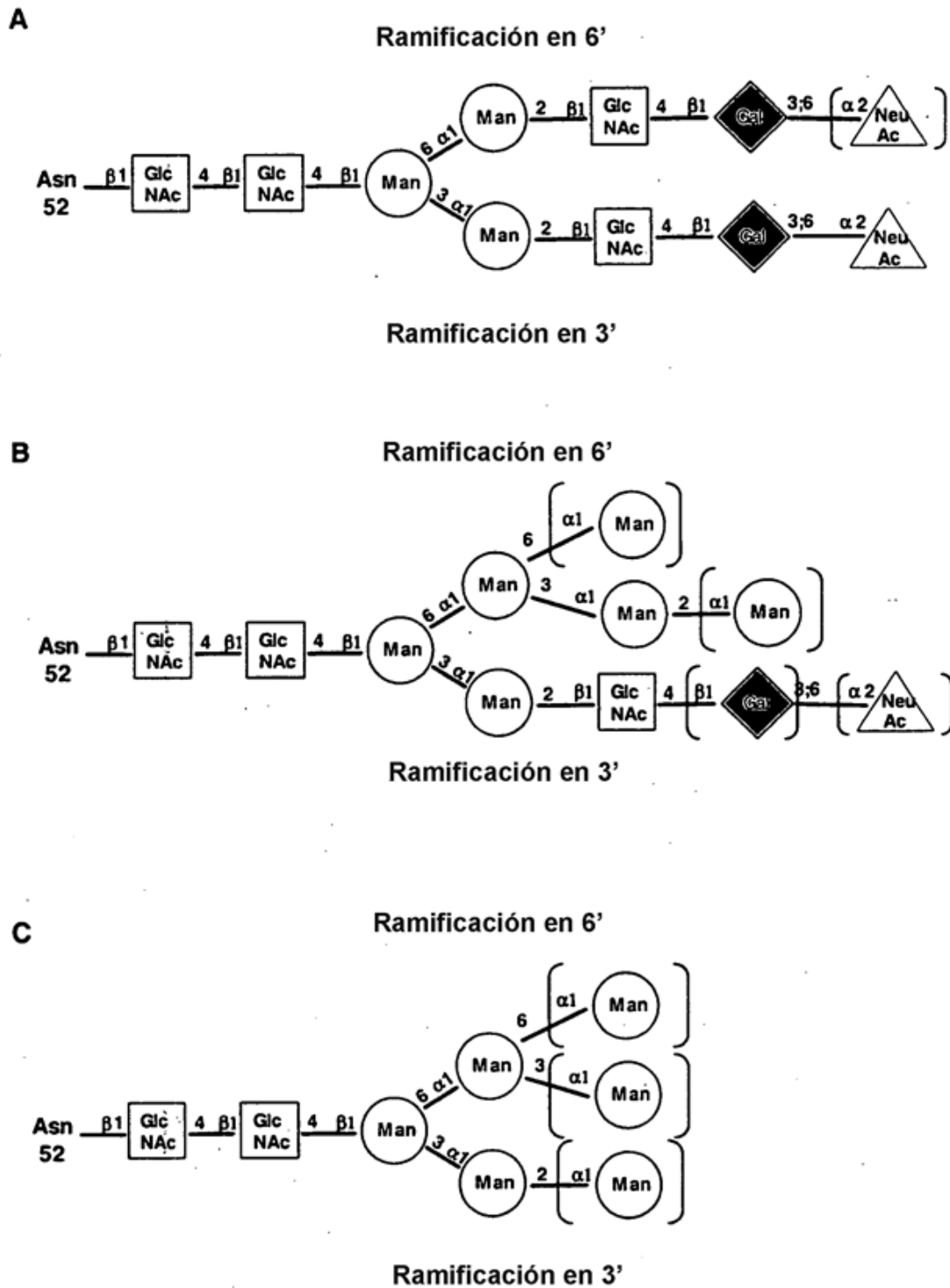


Figura 5

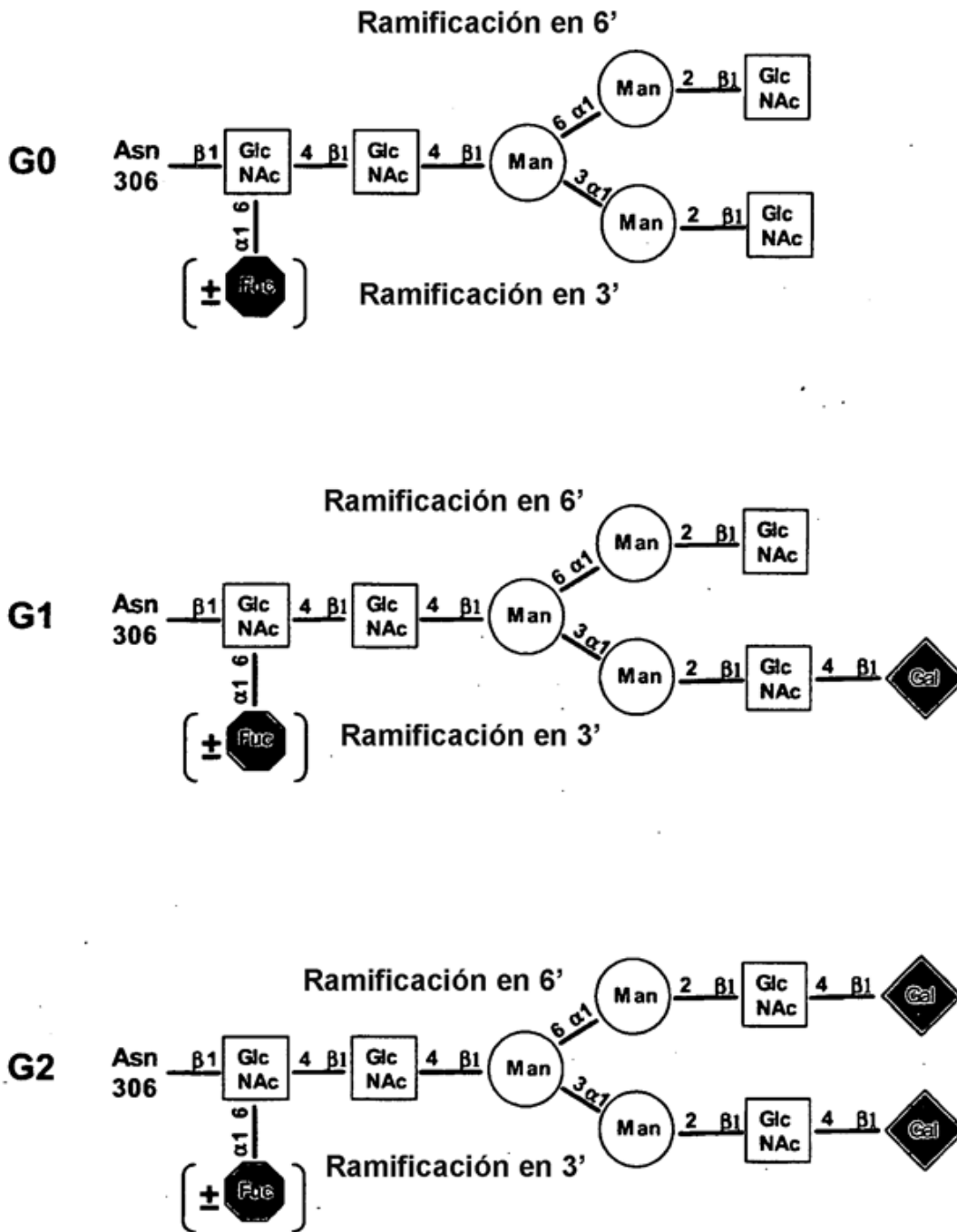


Figura 6

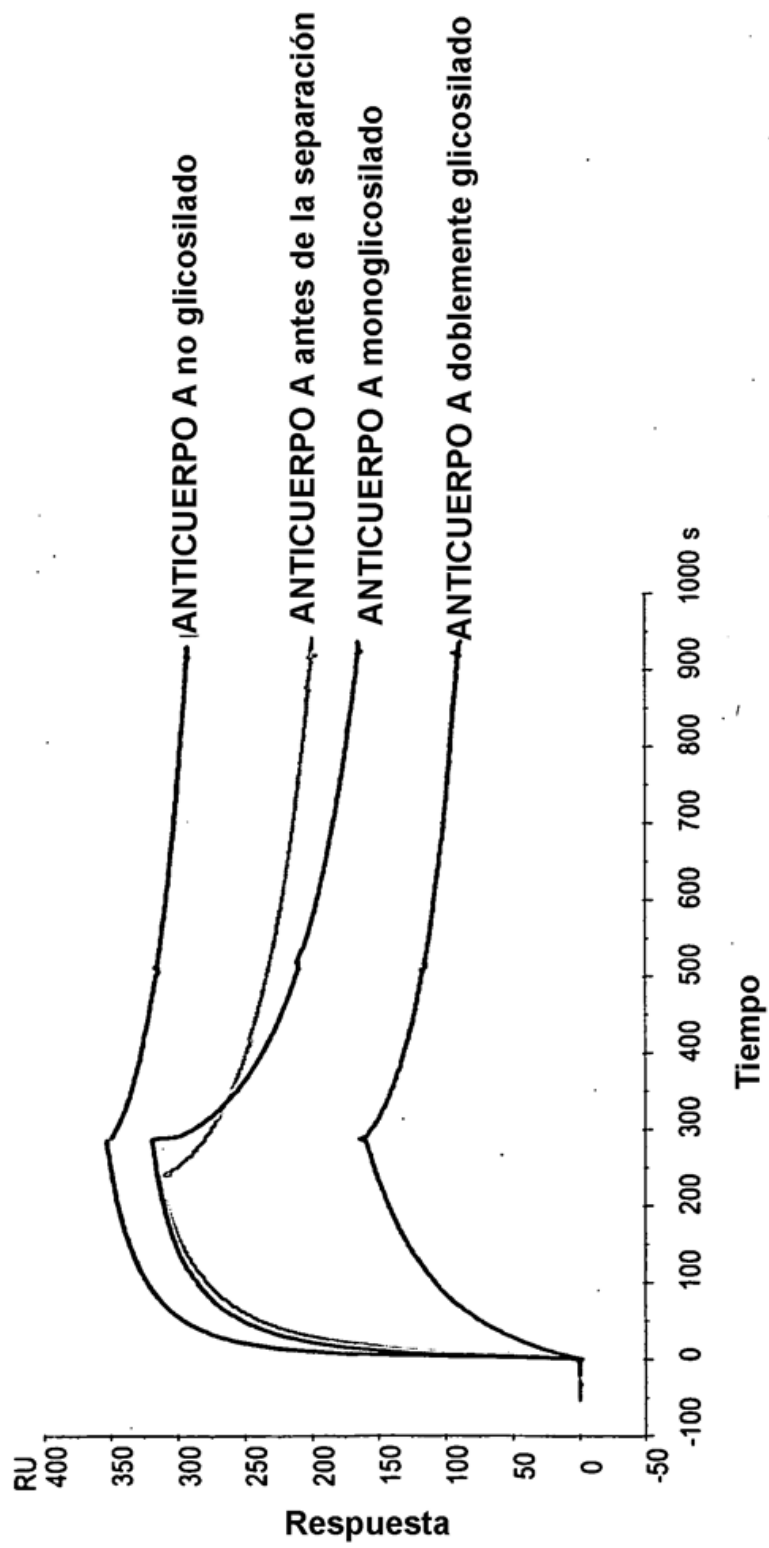


Figura 7

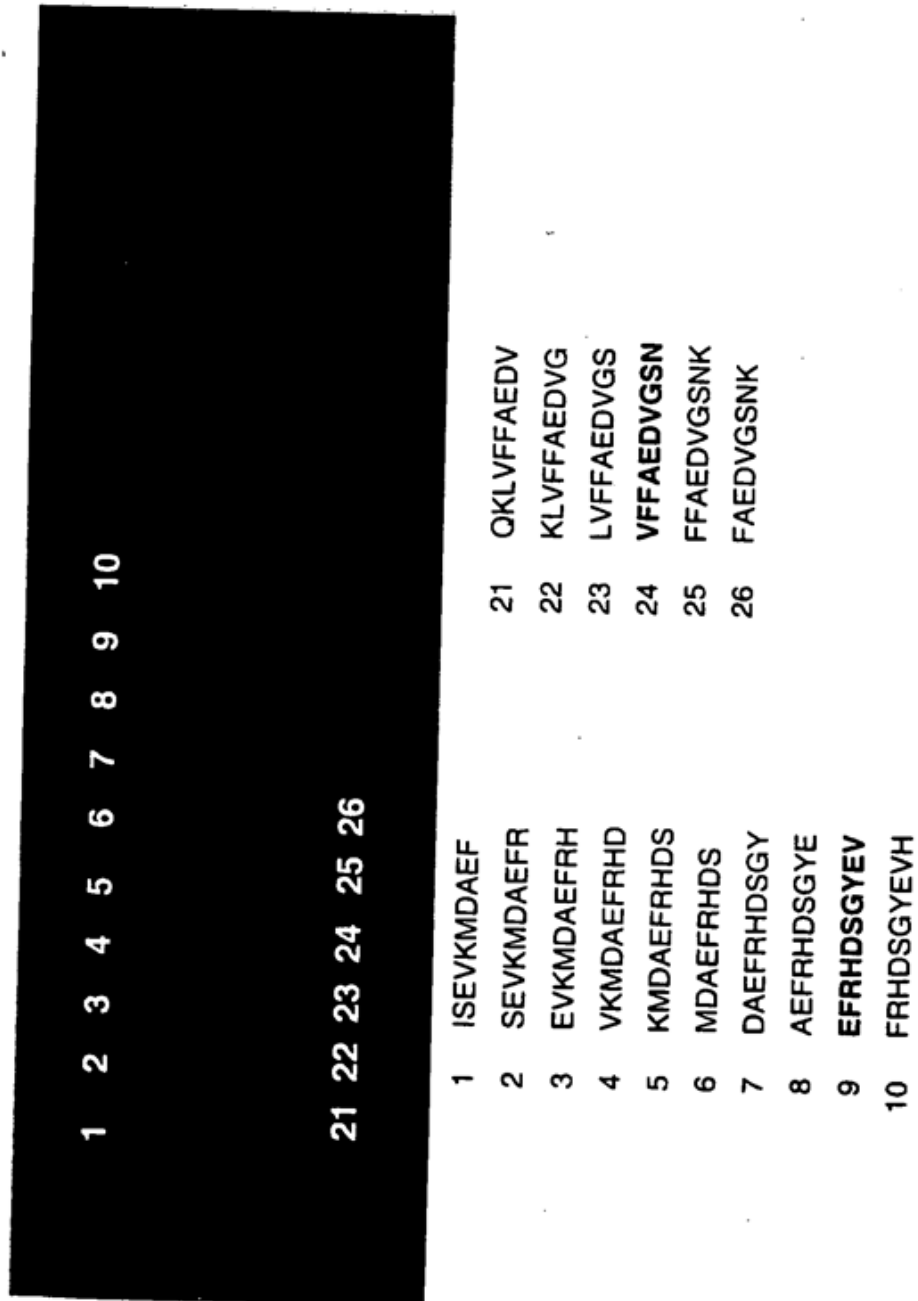


Figura 8A

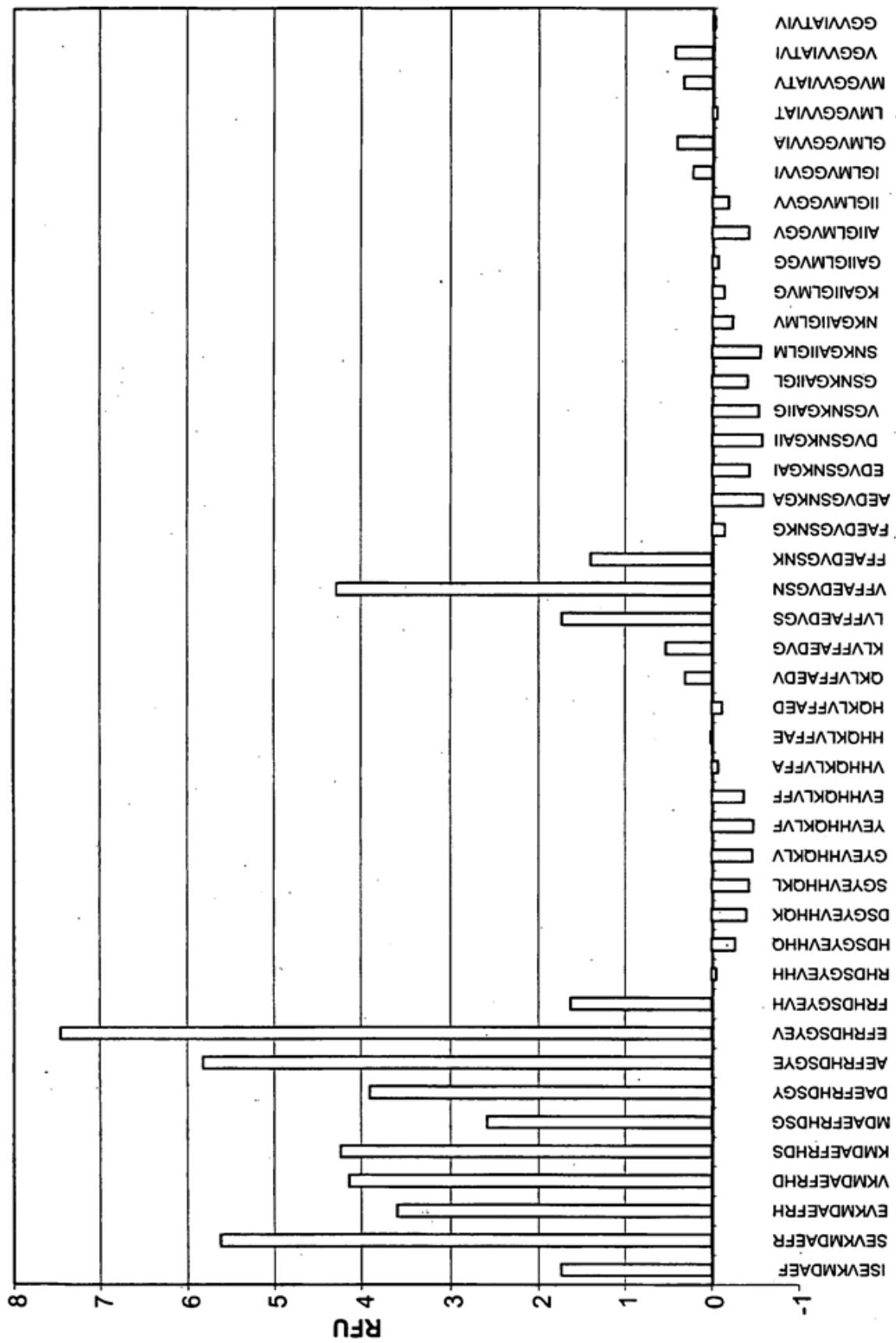


Figura 8B

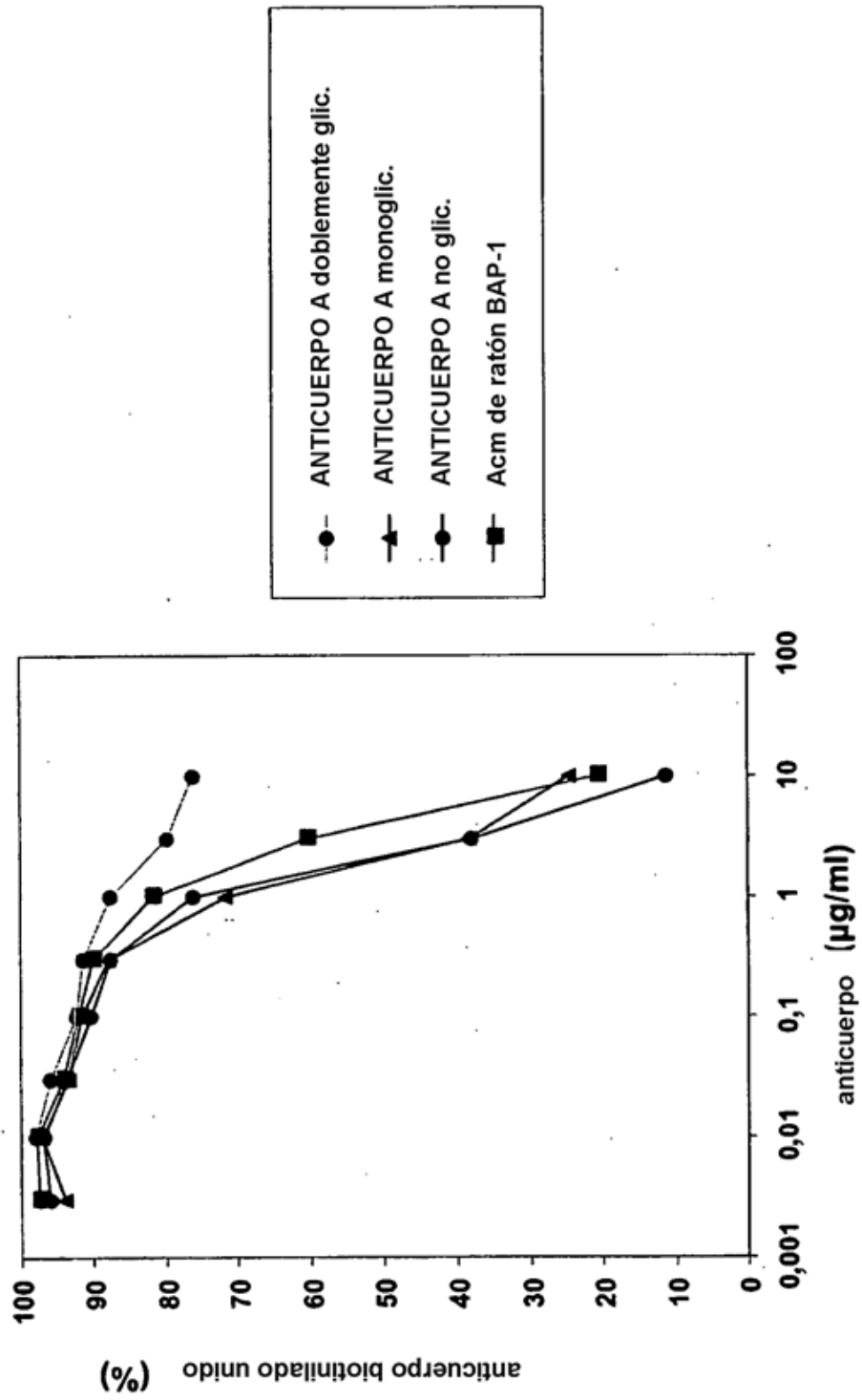


Figura 9

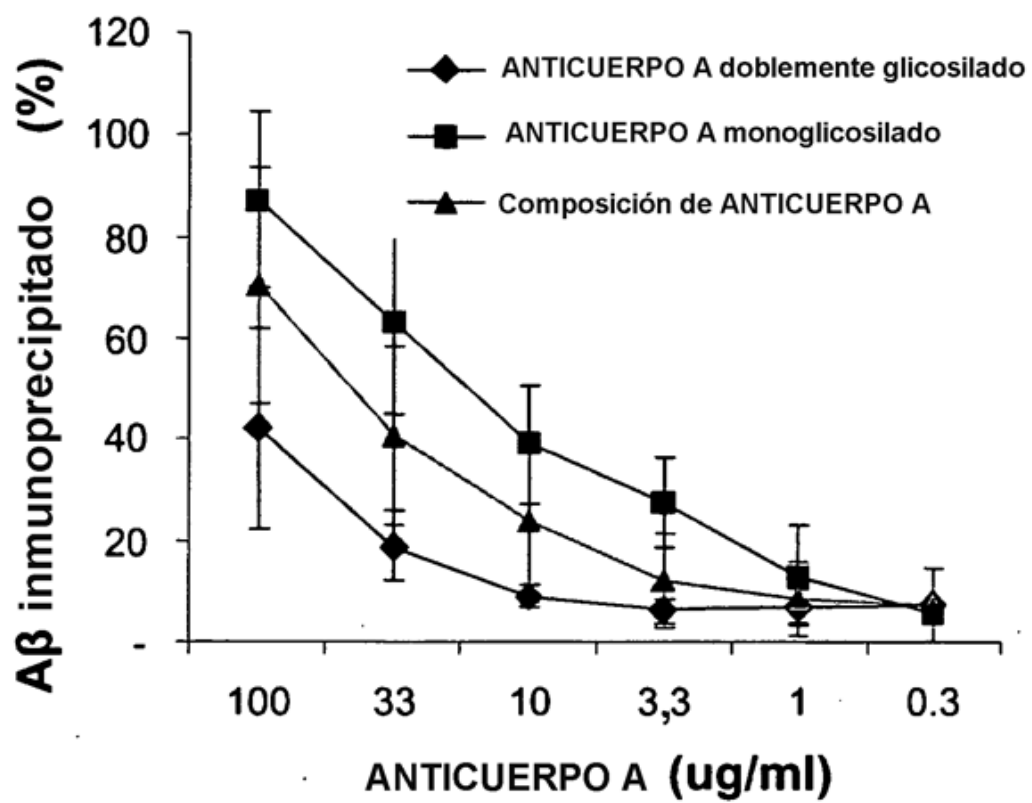


Figura 10

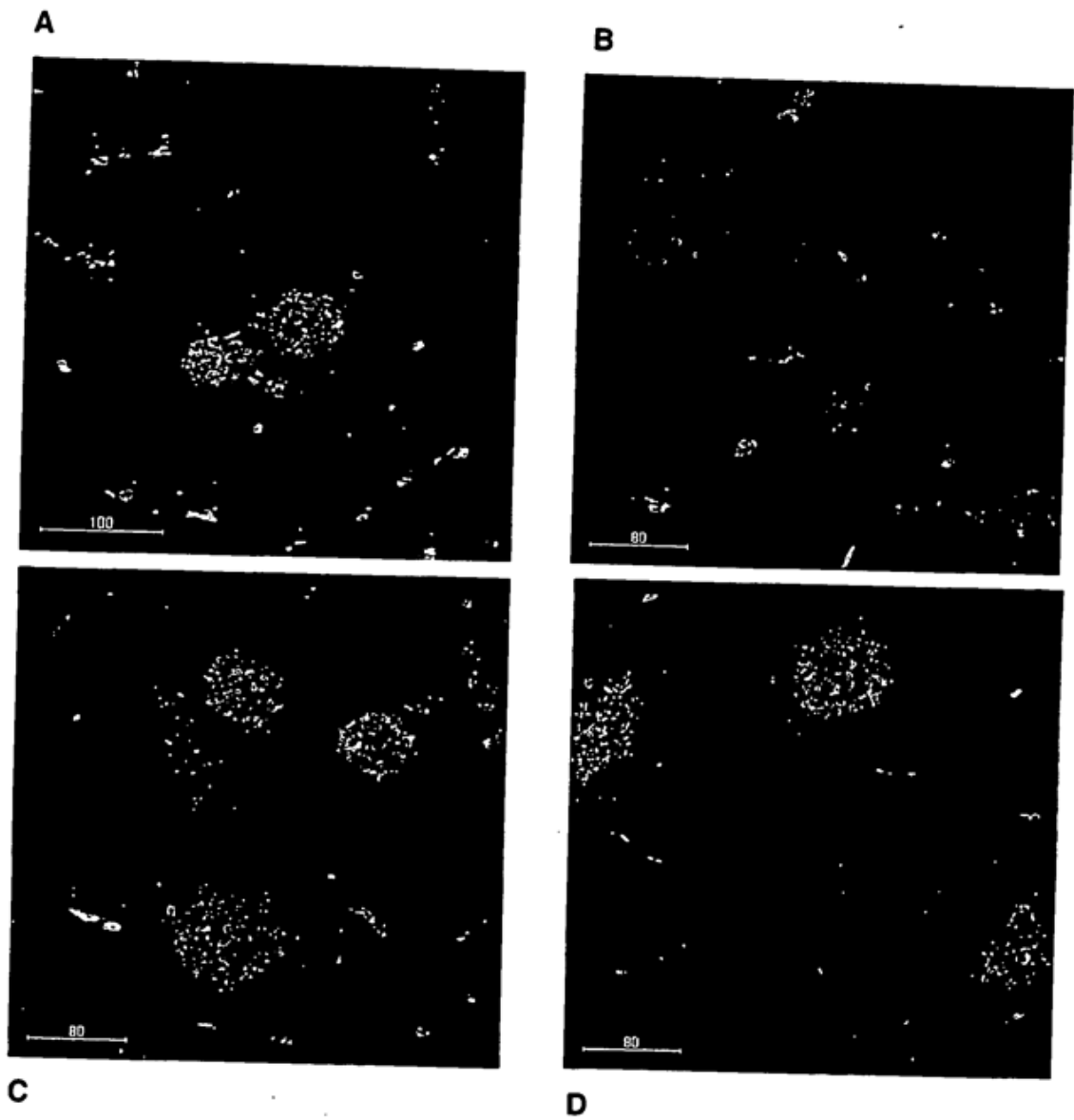


Figura 11

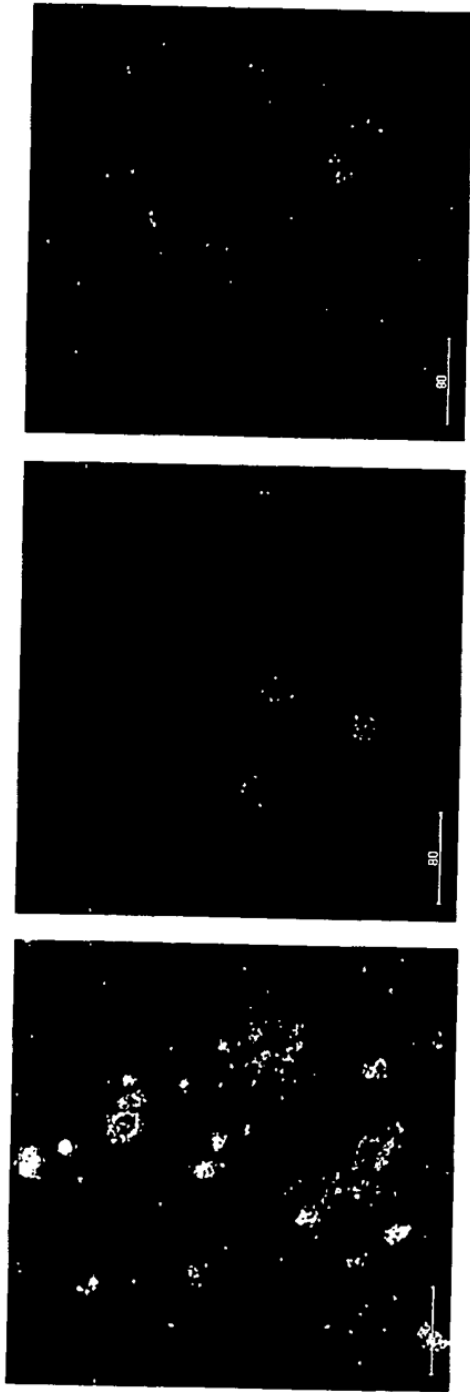


Figura 12

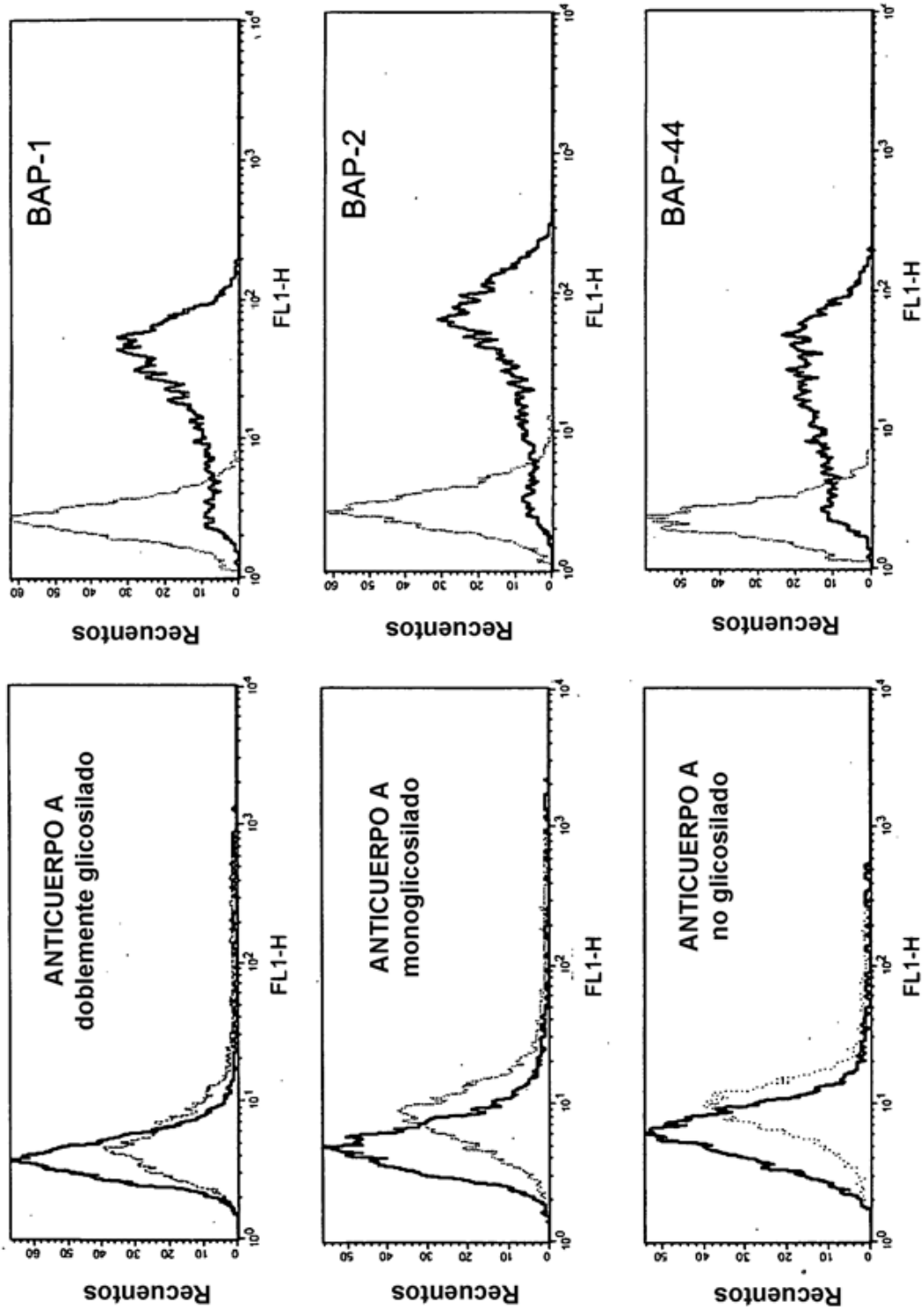


Figura 13

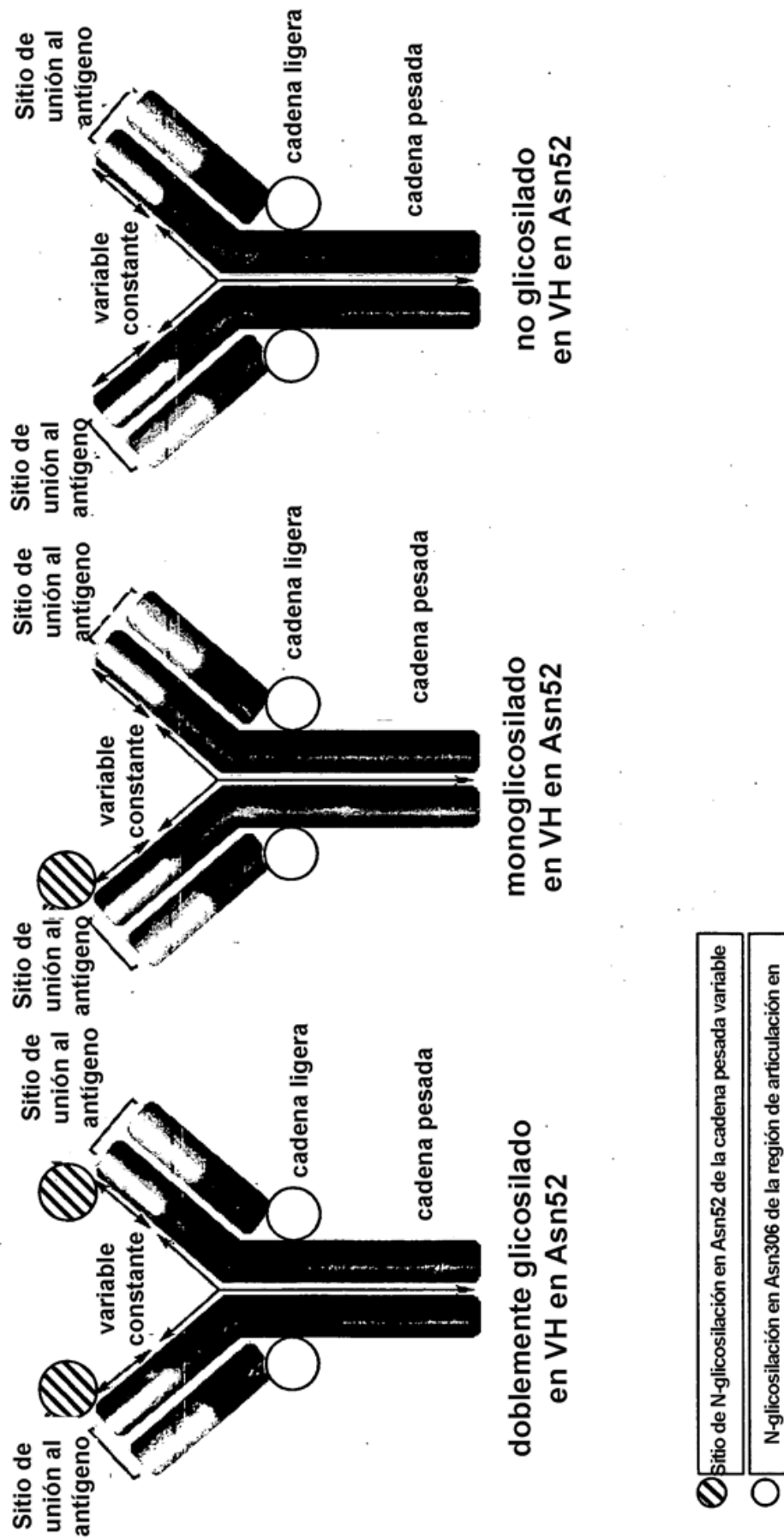


Figura 14

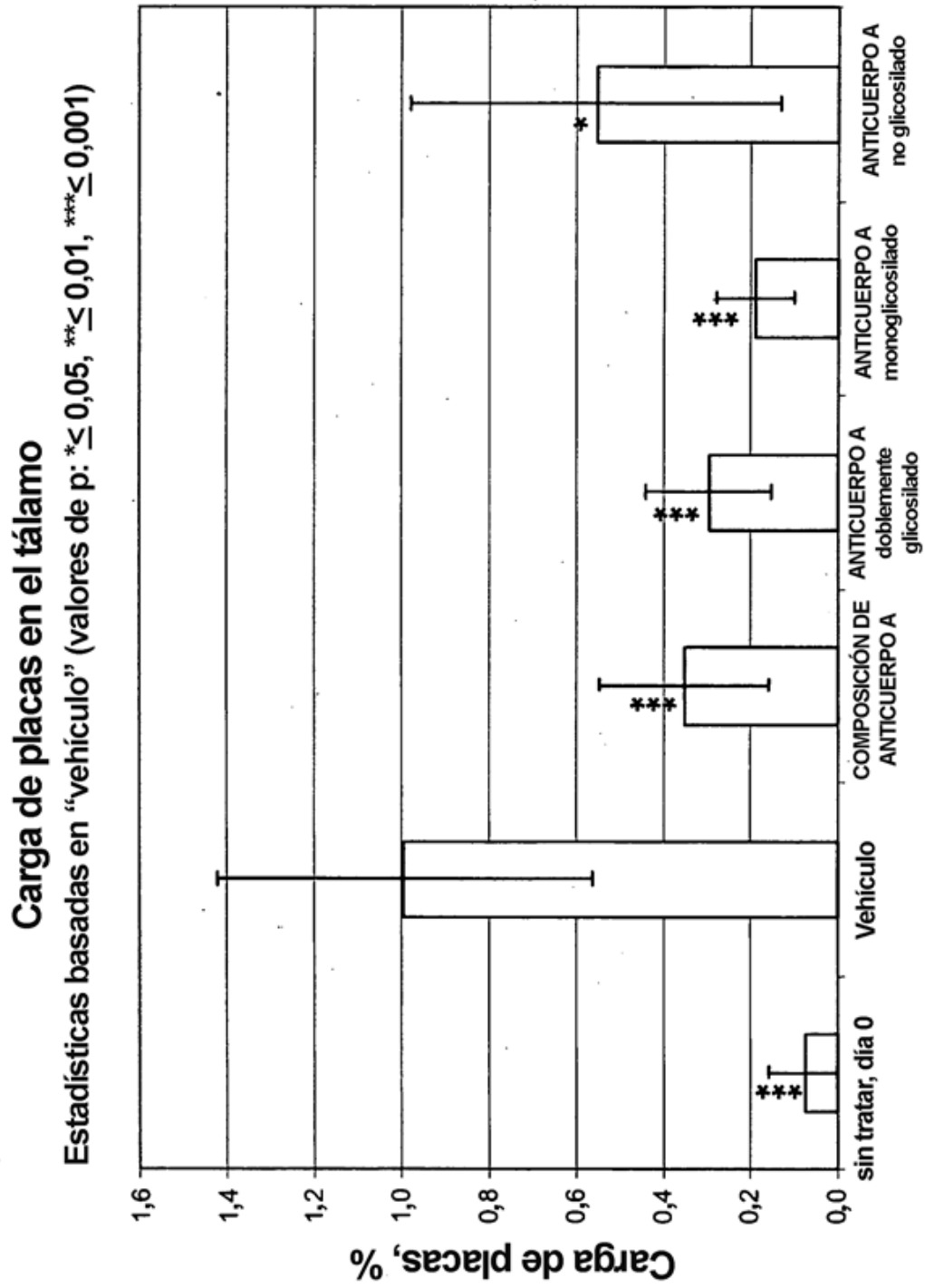


Figura 15A

Número de placas en el tálamo

Estadísticas basadas en "Vehículo" (valores de p: * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$, *** $\leq 0,001$)

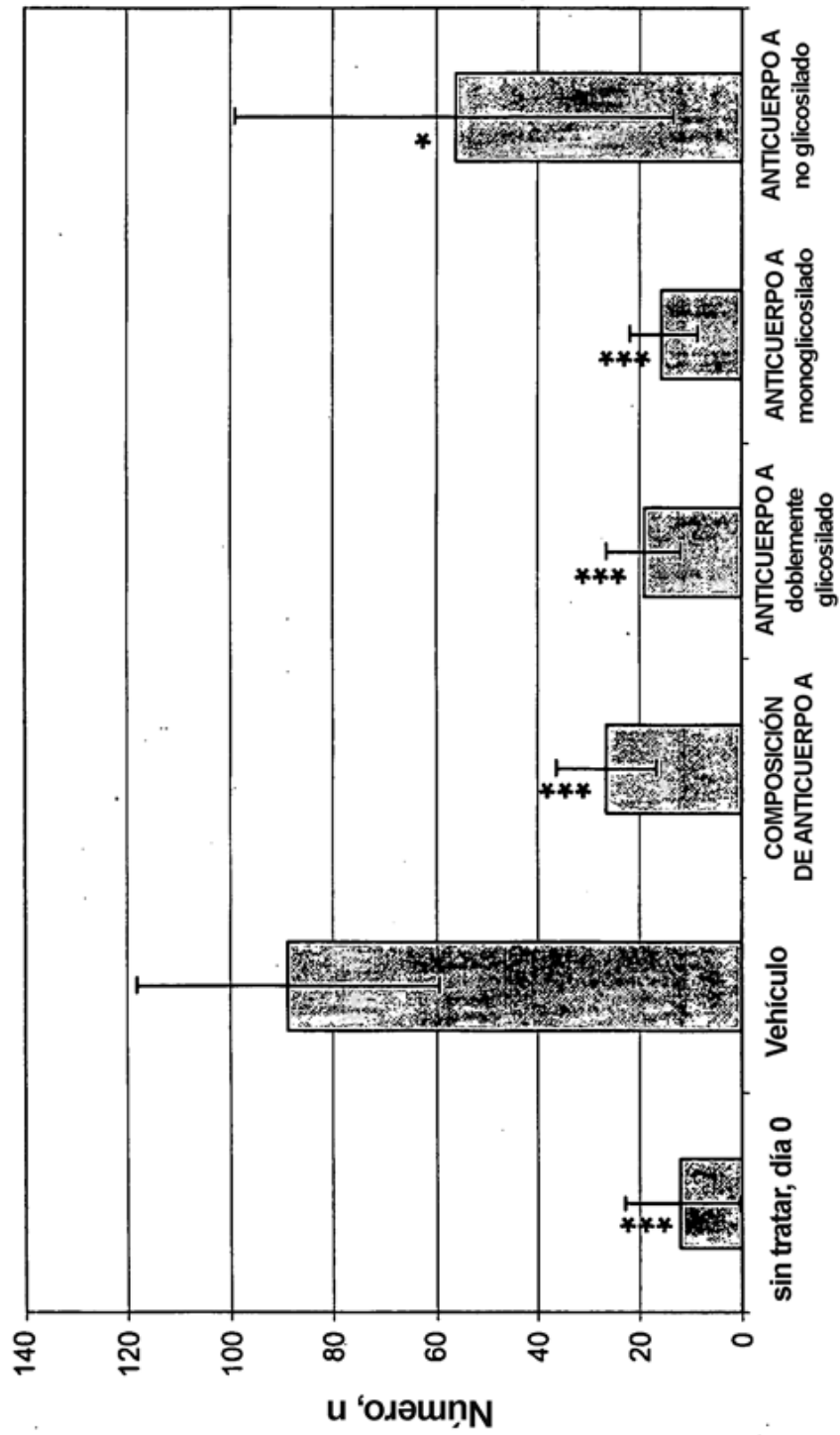


Figura 15B

Número y distribución de tamaño de las placas en el tálamo

Estadísticas basadas en "Vehículo" (valores de p: * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$, *** $\leq 0,001$)

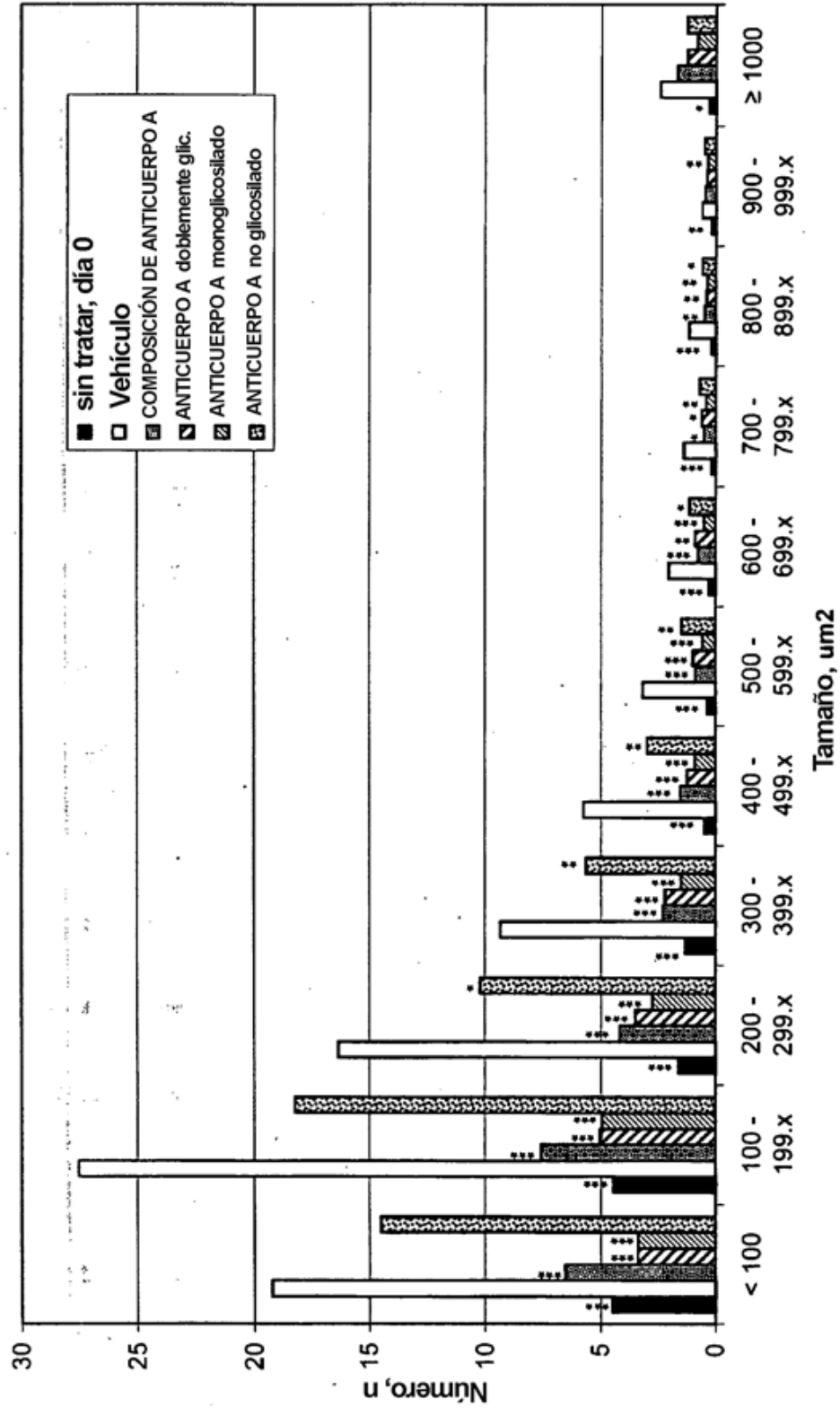


Figura 15C

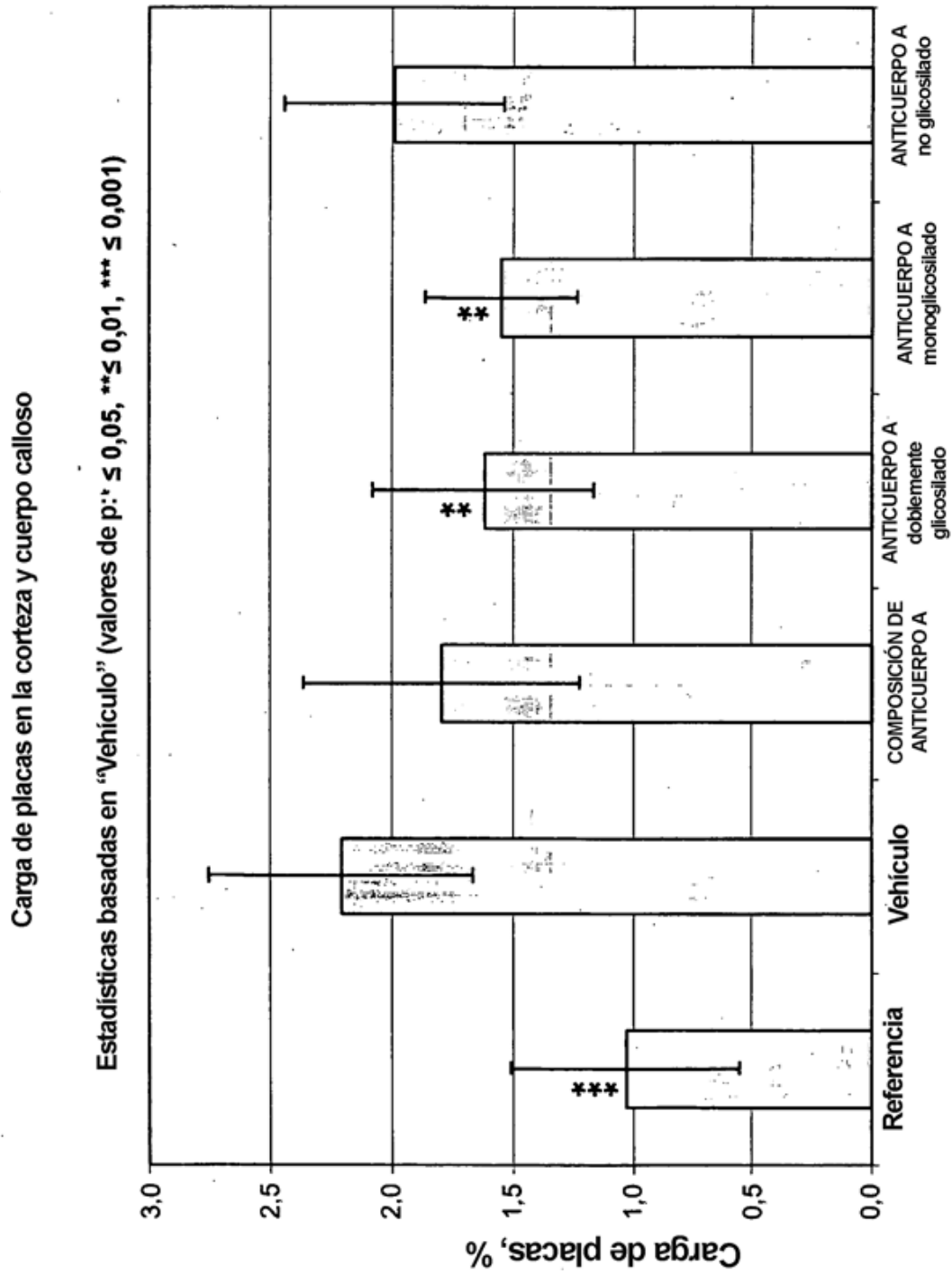


Figura 16A

Número de placas en la corteza y cuerpo calloso

Estadísticas basadas en "Vehículo" (valores de p: * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$, *** $\leq 0,001$)

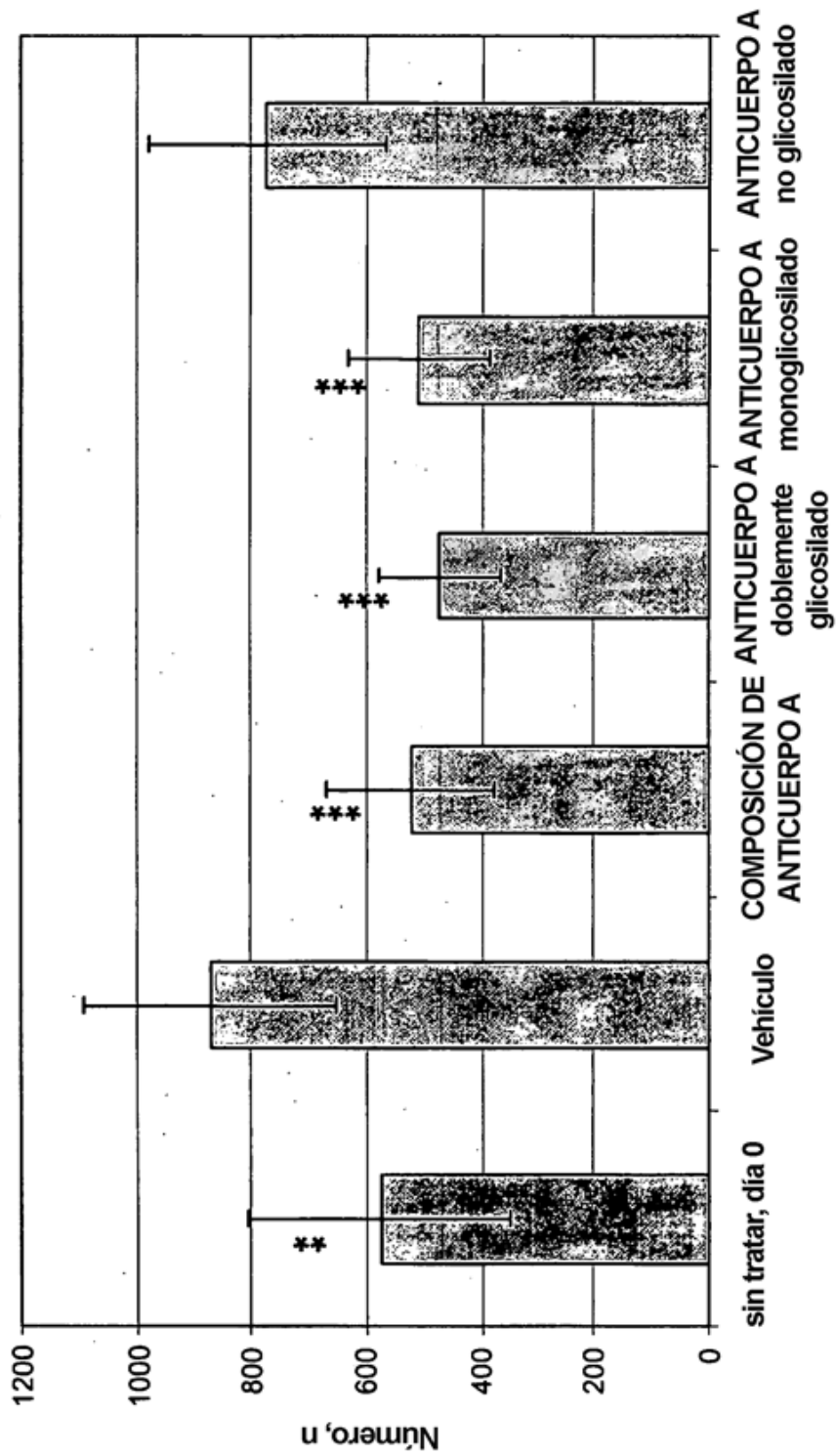


Figura 16B

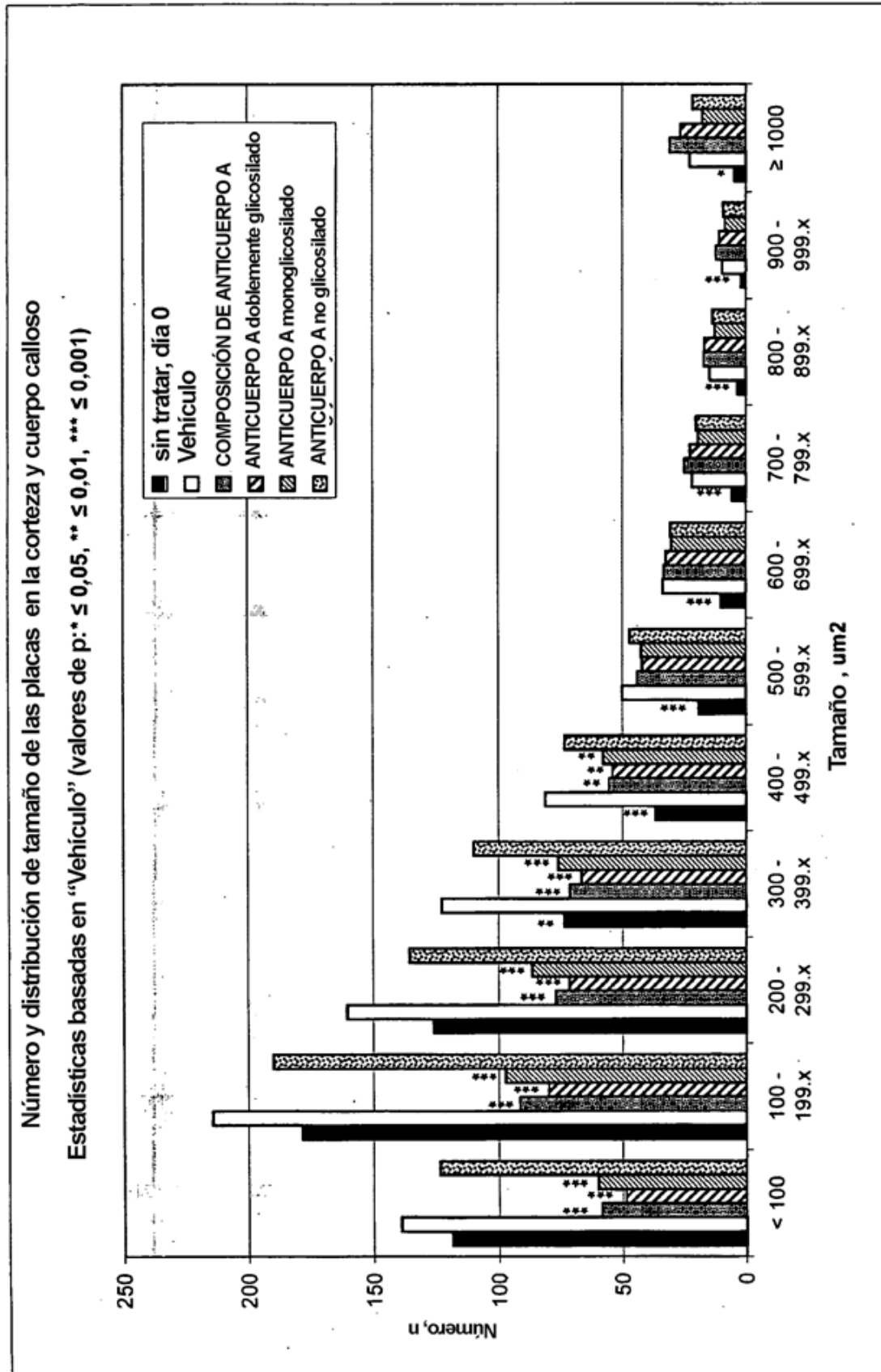


Figura 16C

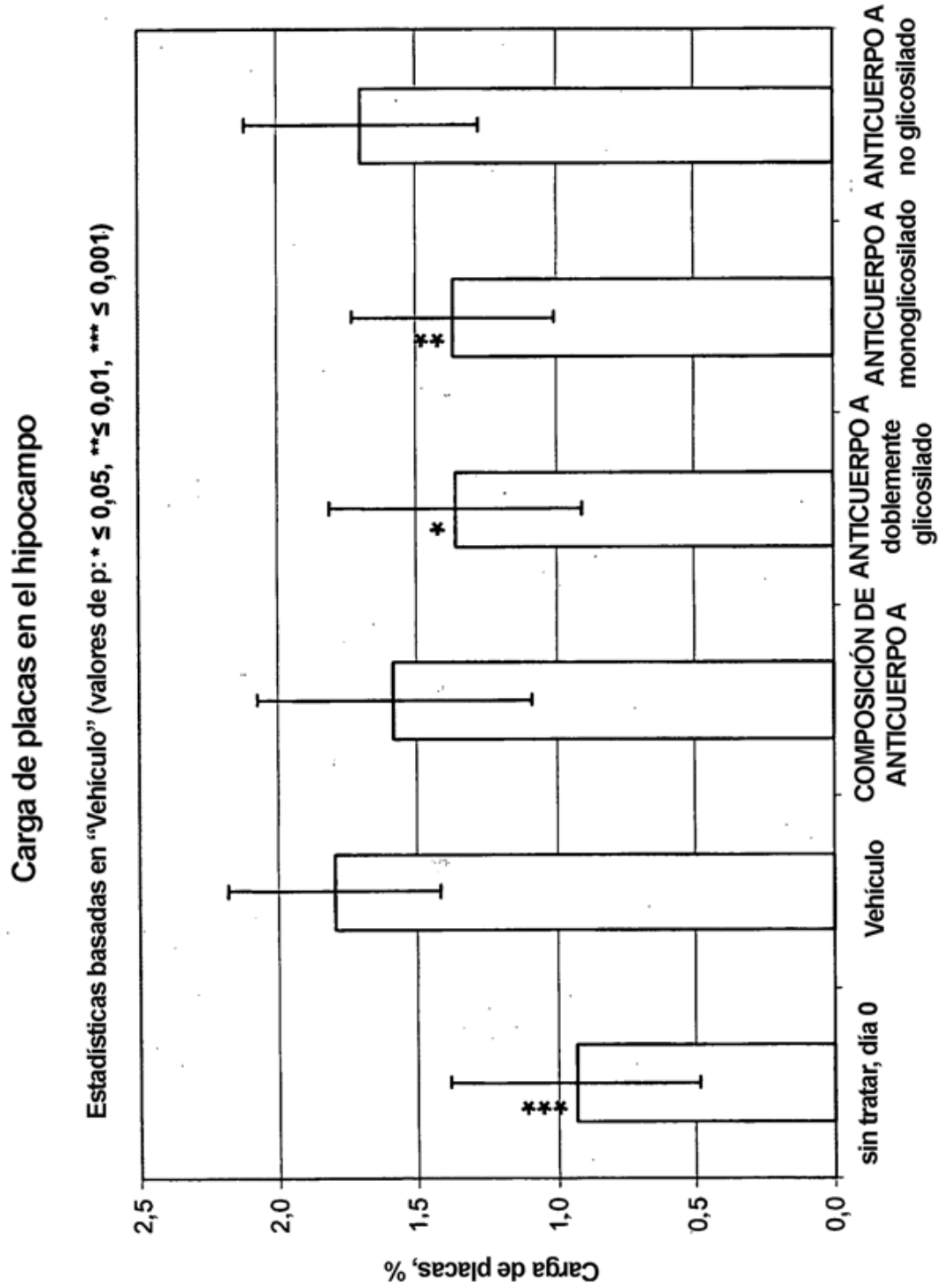


Figura 17A

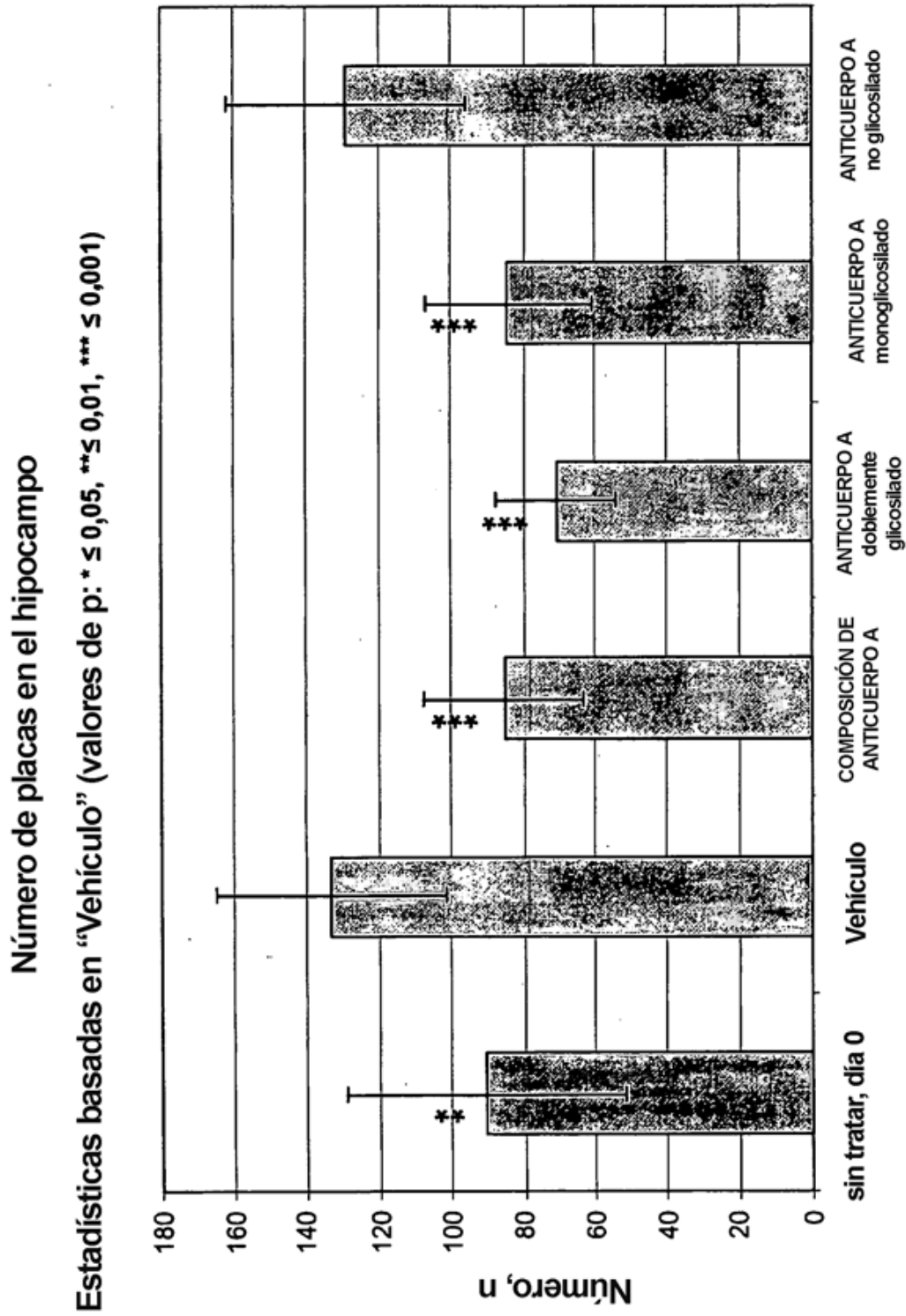


Figura 17B

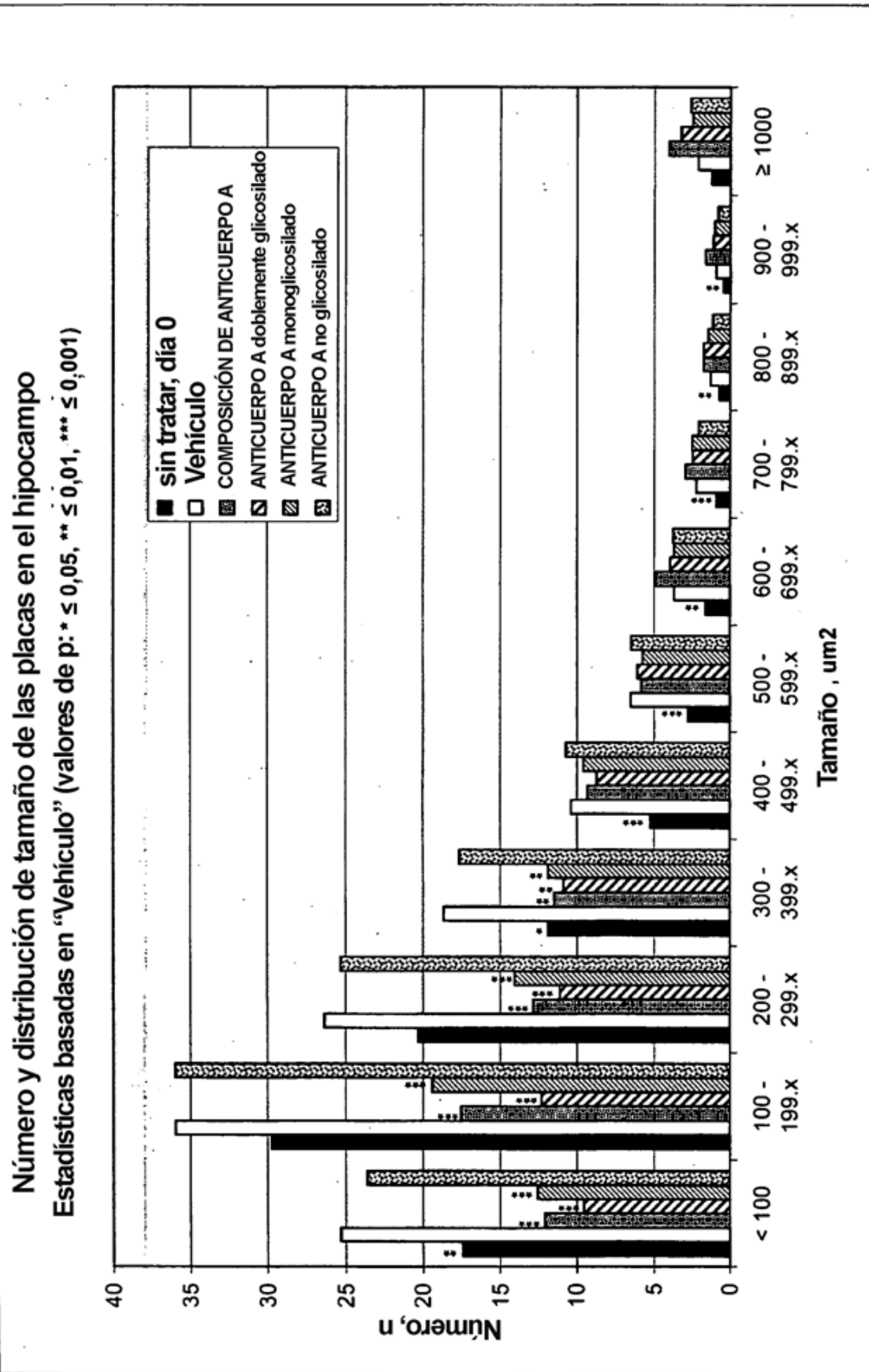


Figura 17C

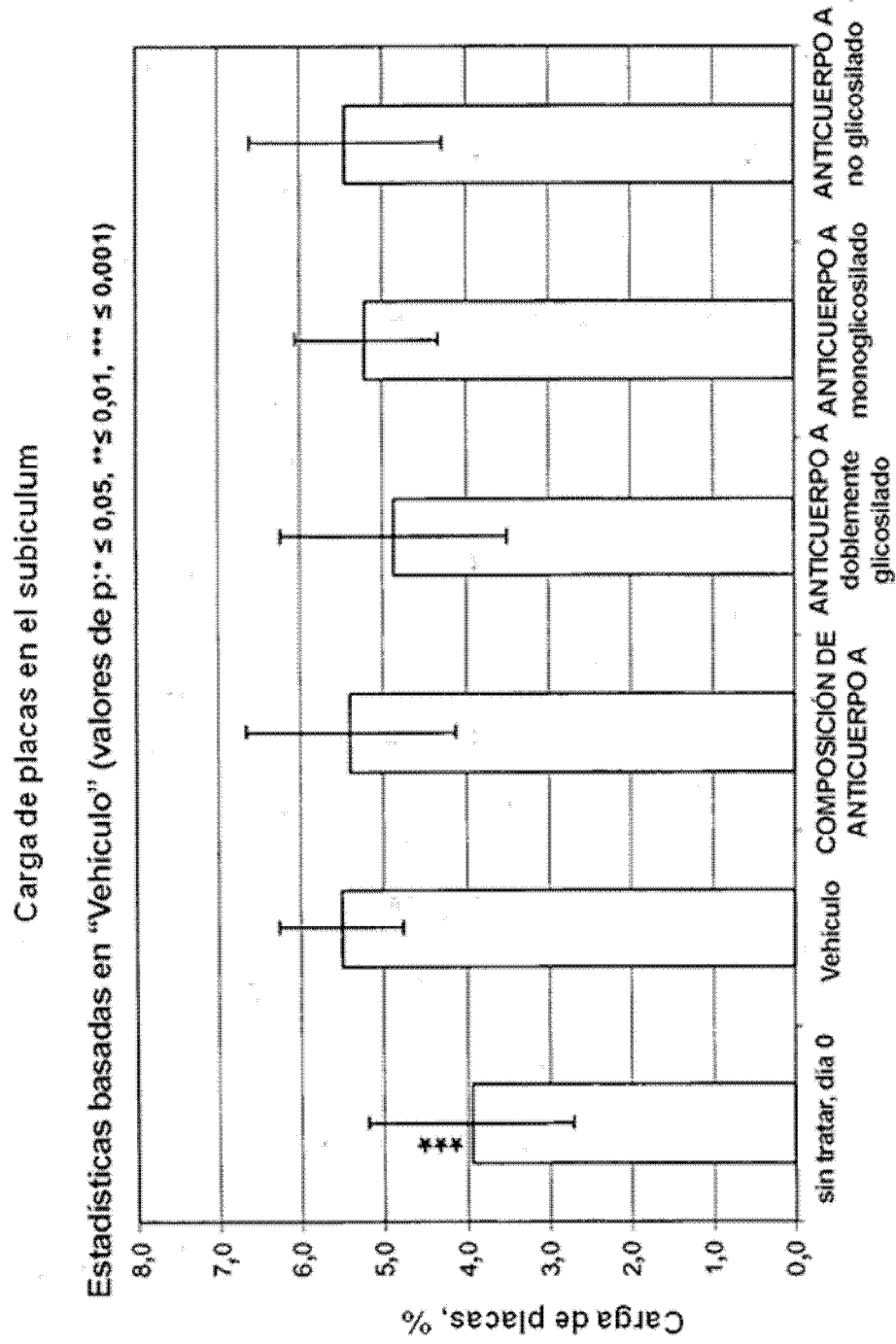


Figura 18A

Número de placas en el subiculum

Estadísticas basadas en "Vehículo" (valores de p: * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$, *** $\leq 0,001$)

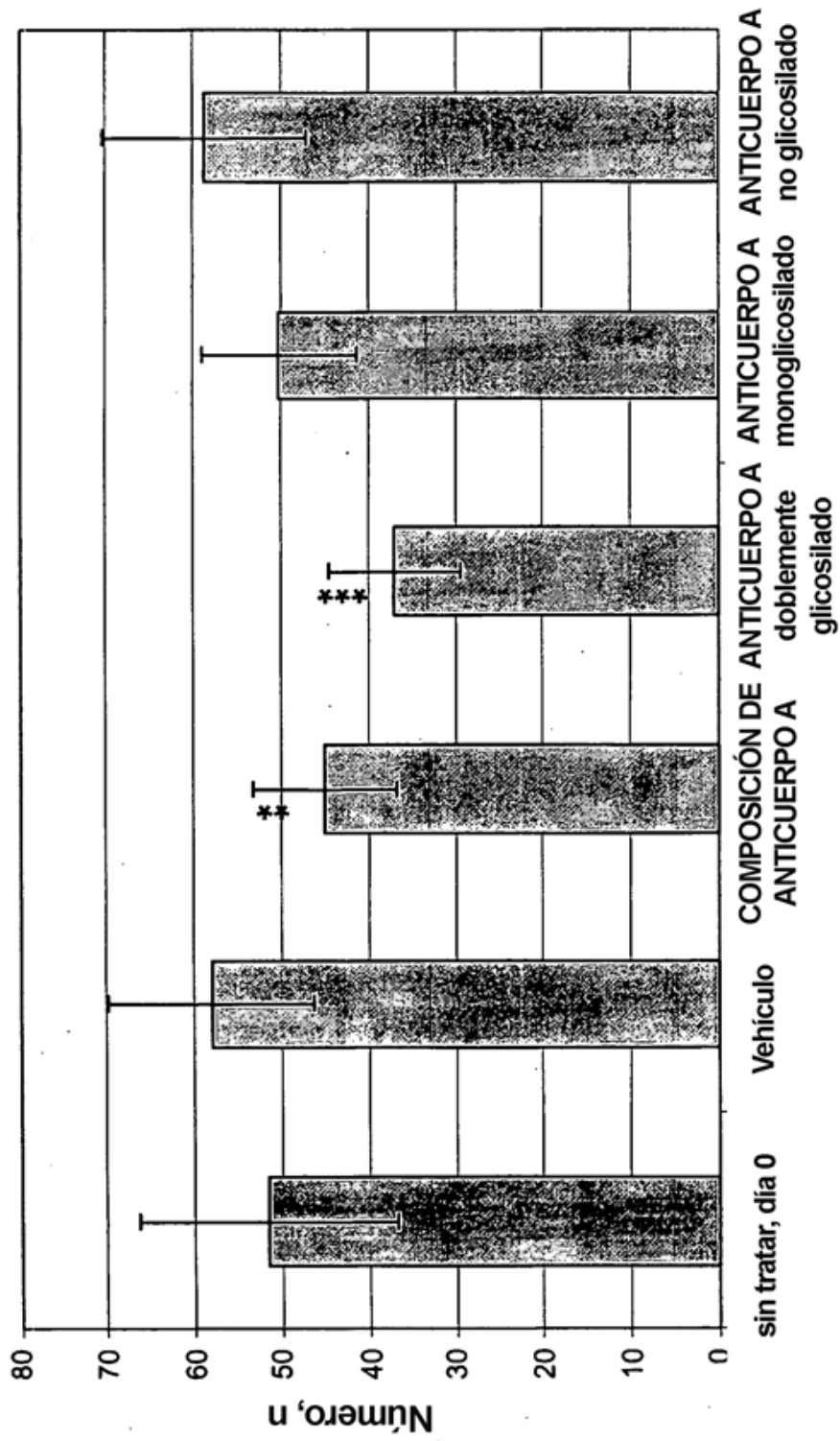


Figura 18B

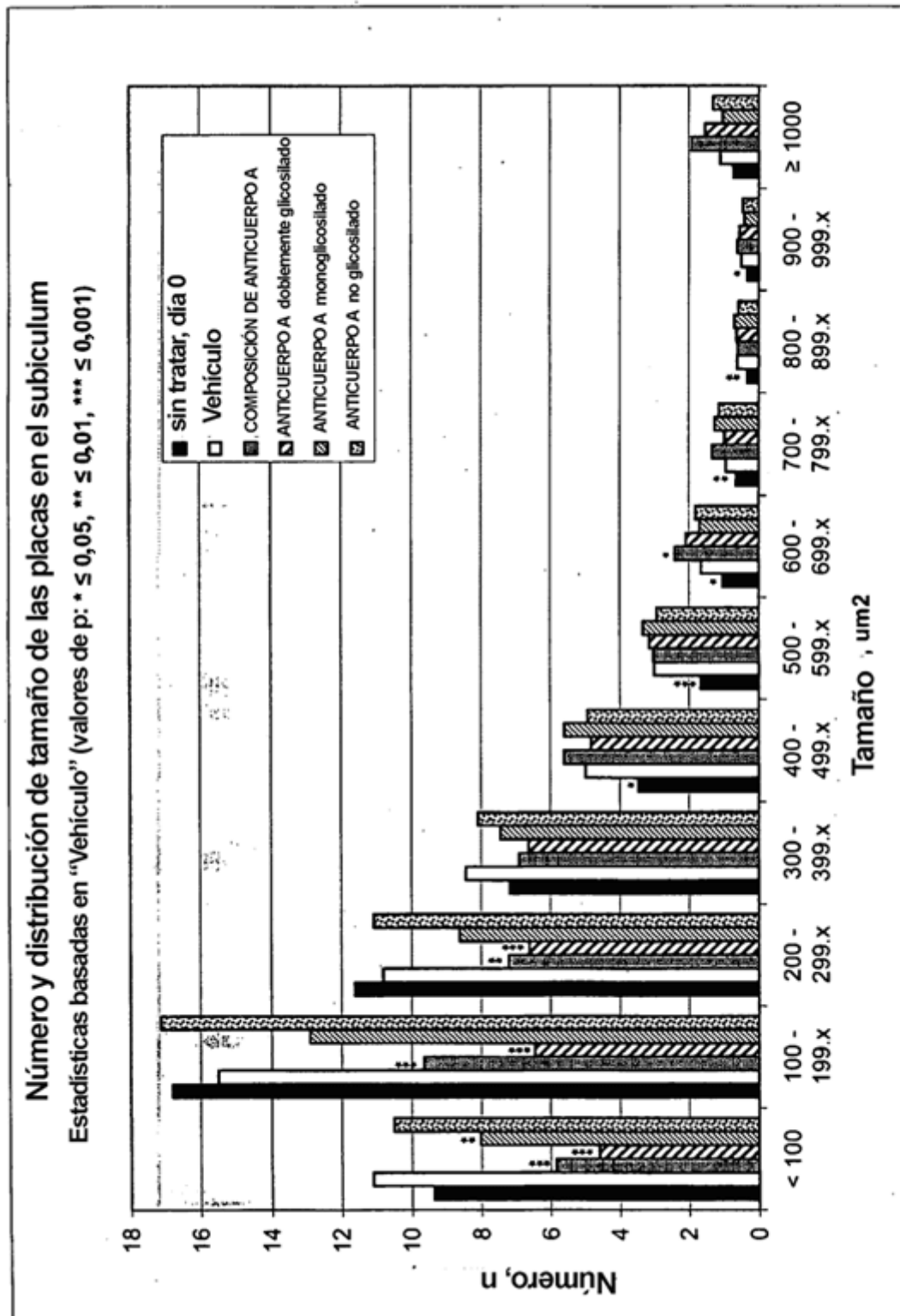


Figura 18C

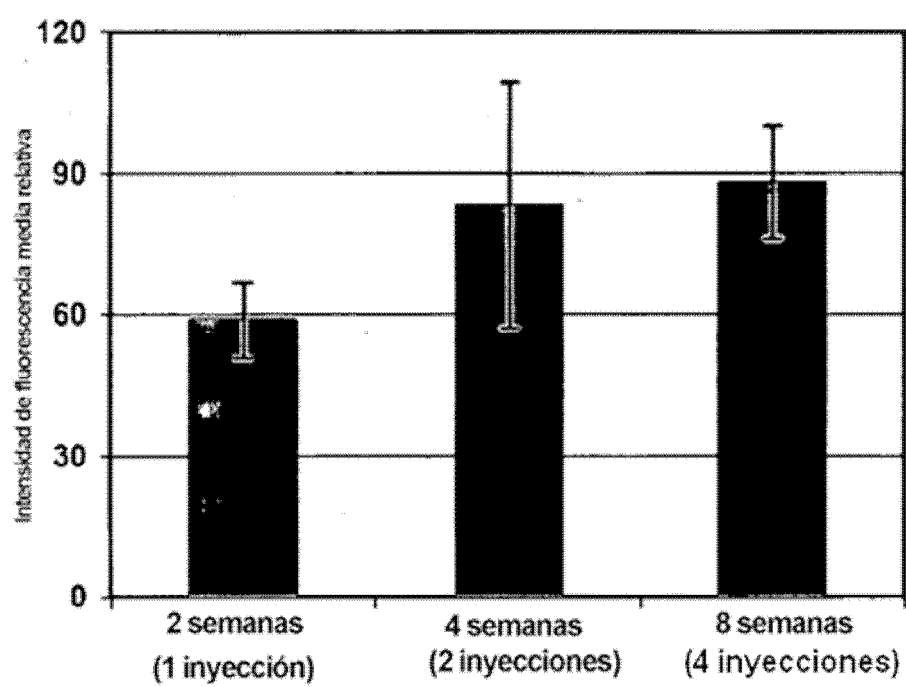


Figura 19

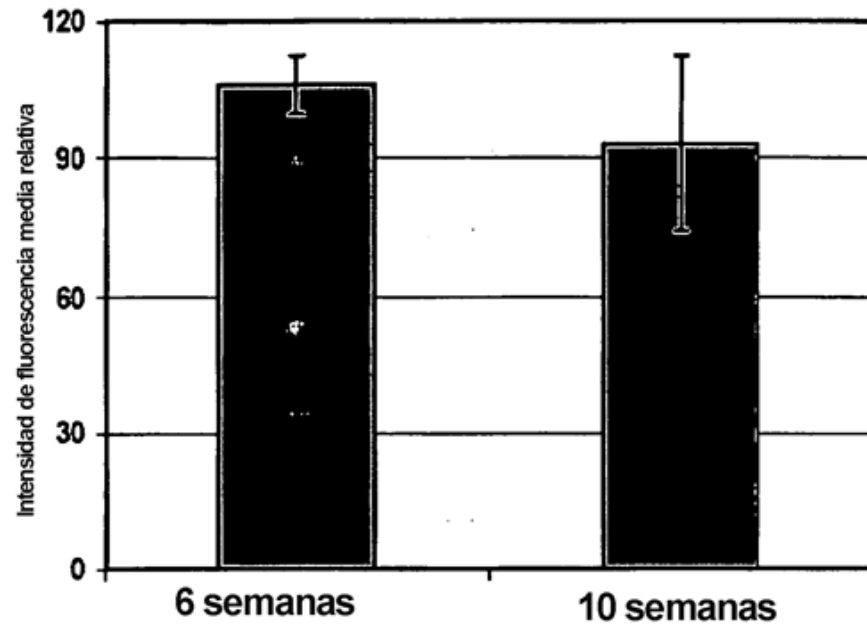


Figura 20

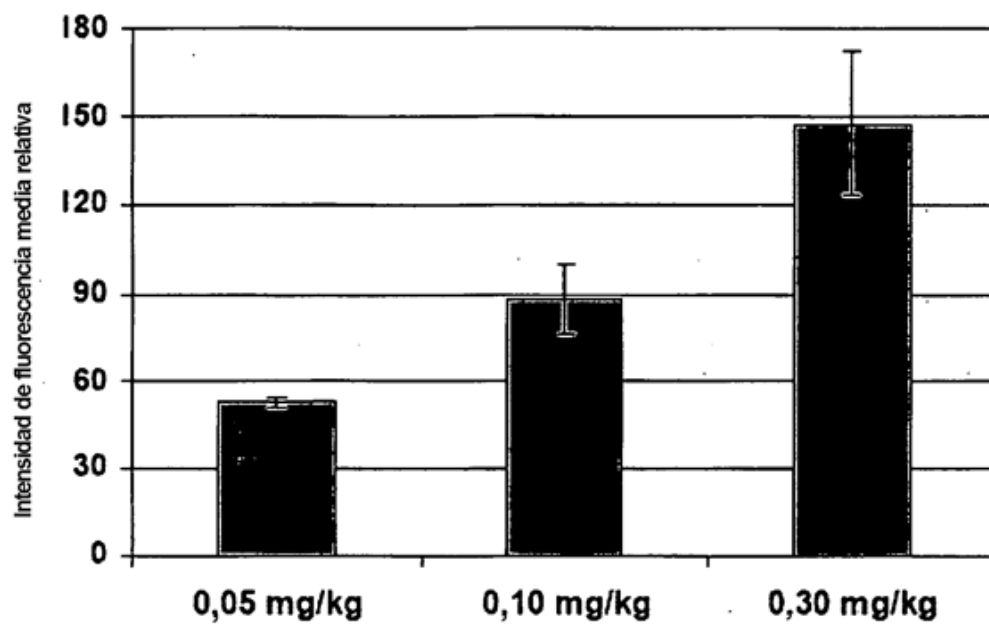


Figura 21

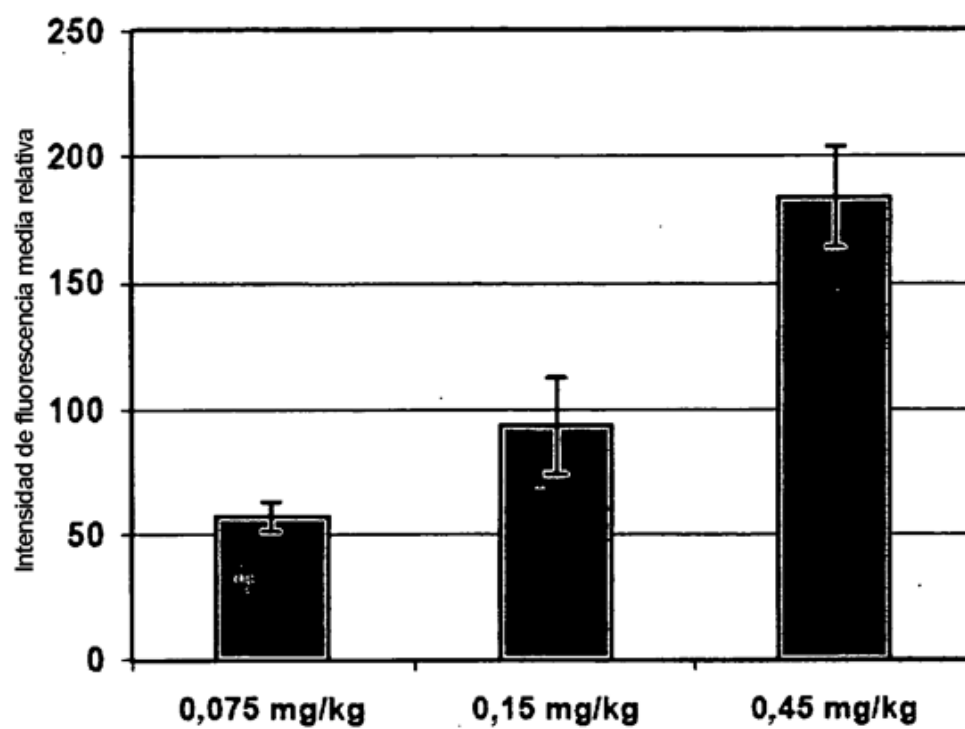


Figura 22

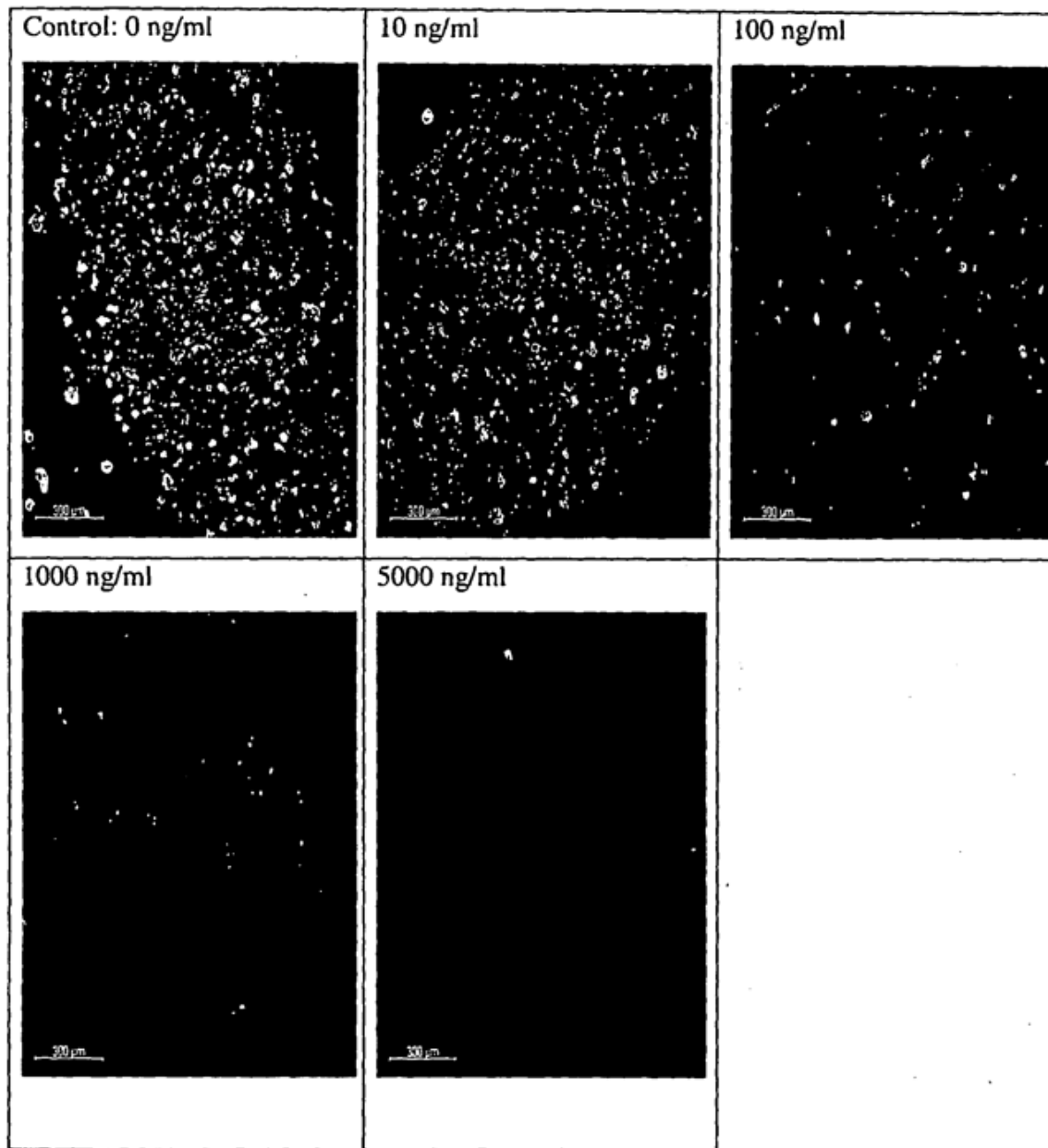


Figura 23

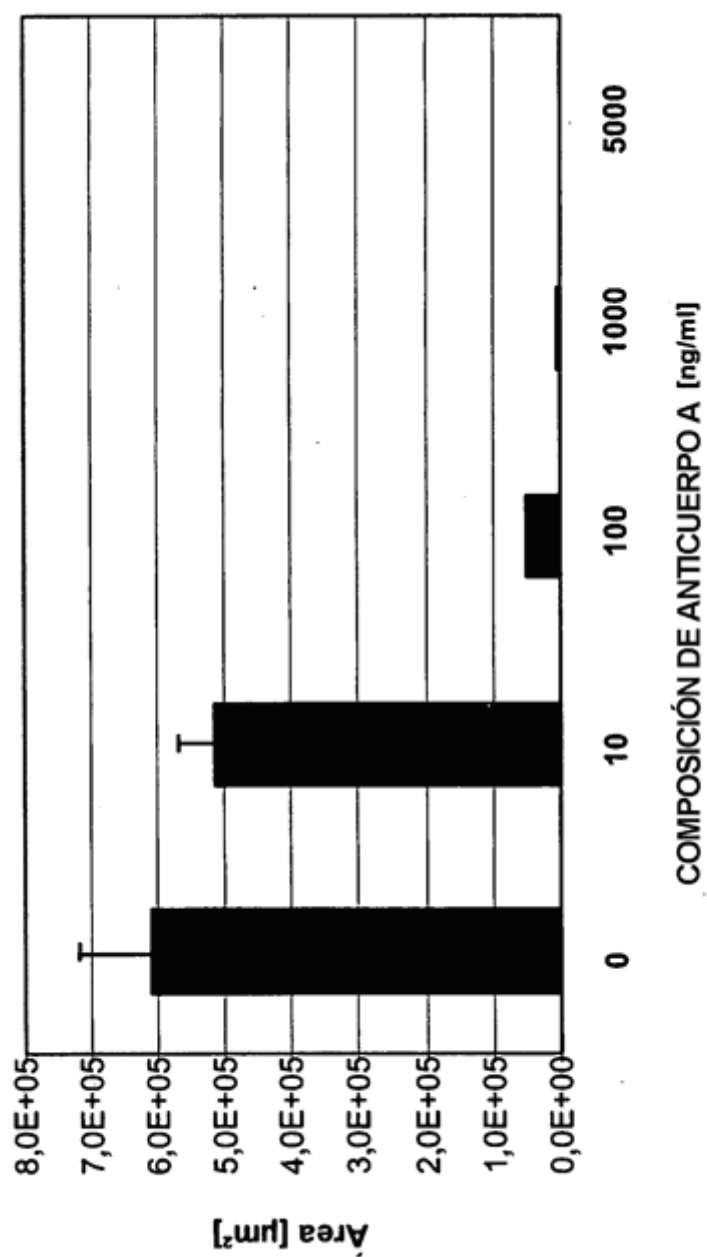


Figura 24A

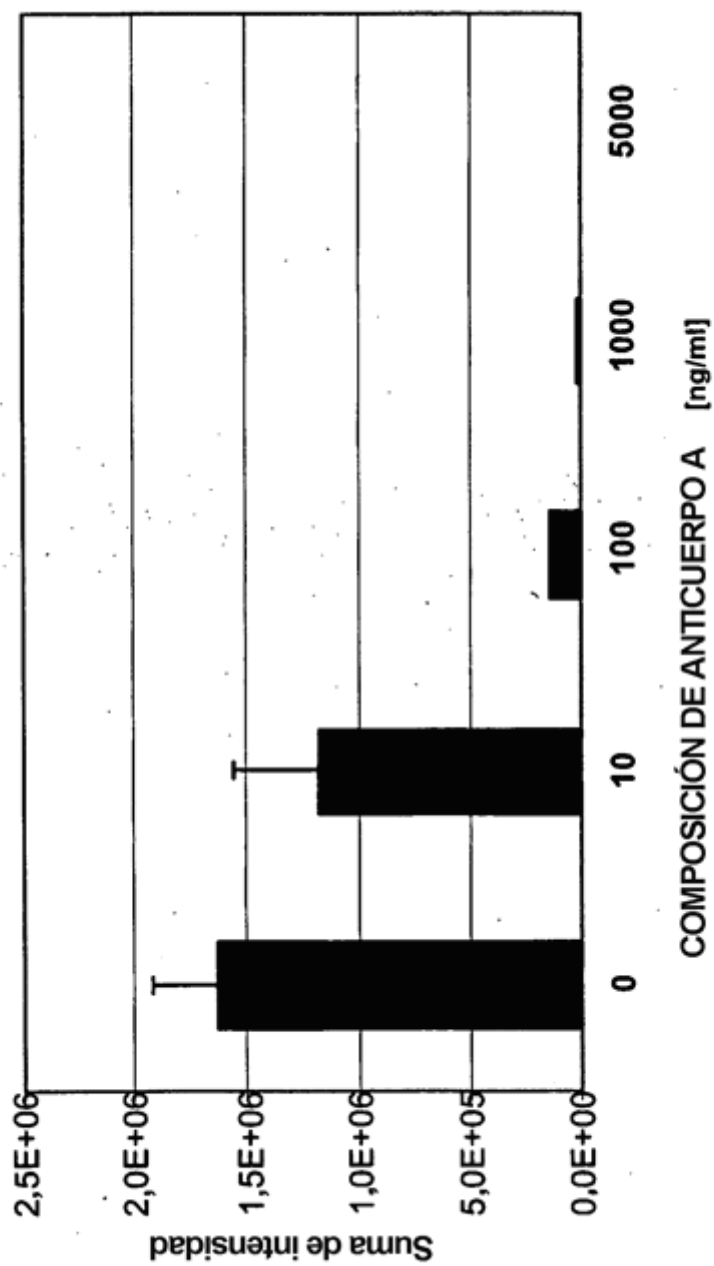


Figura 24B

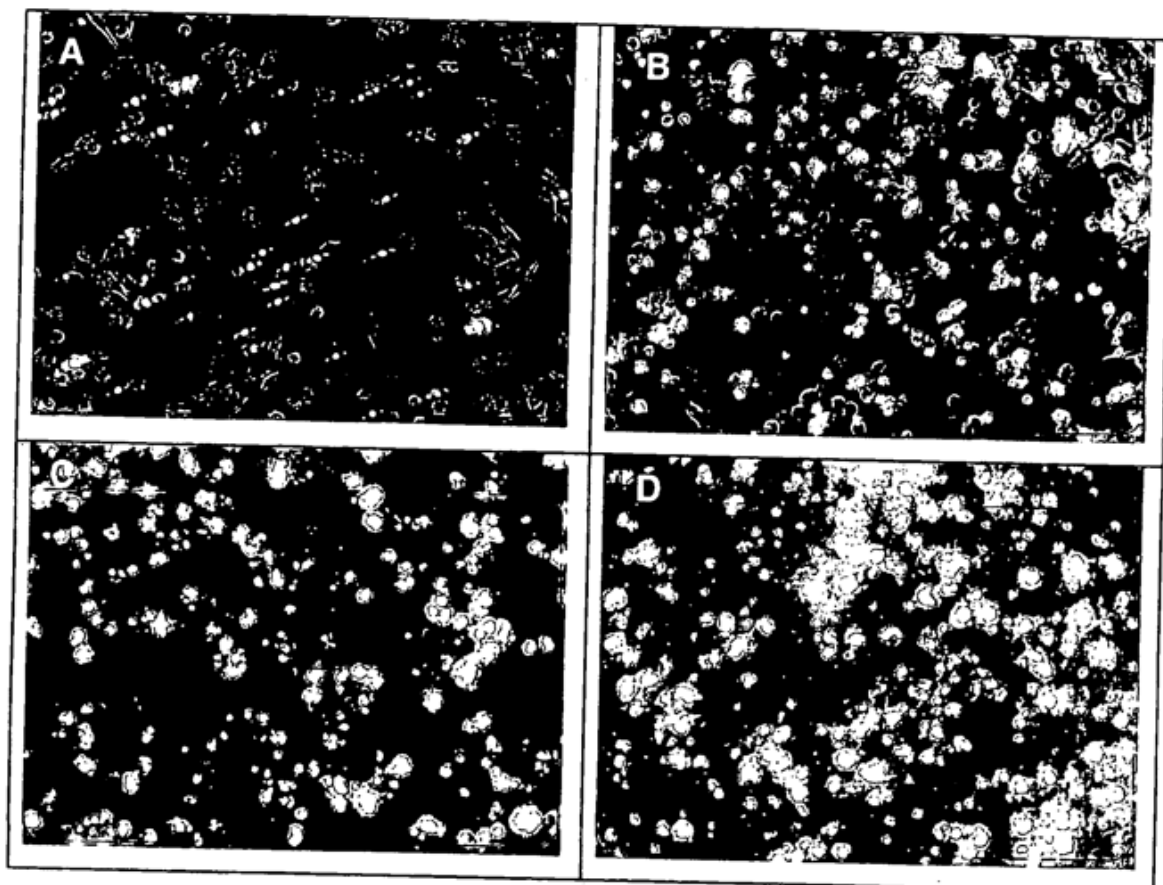


Figura 25

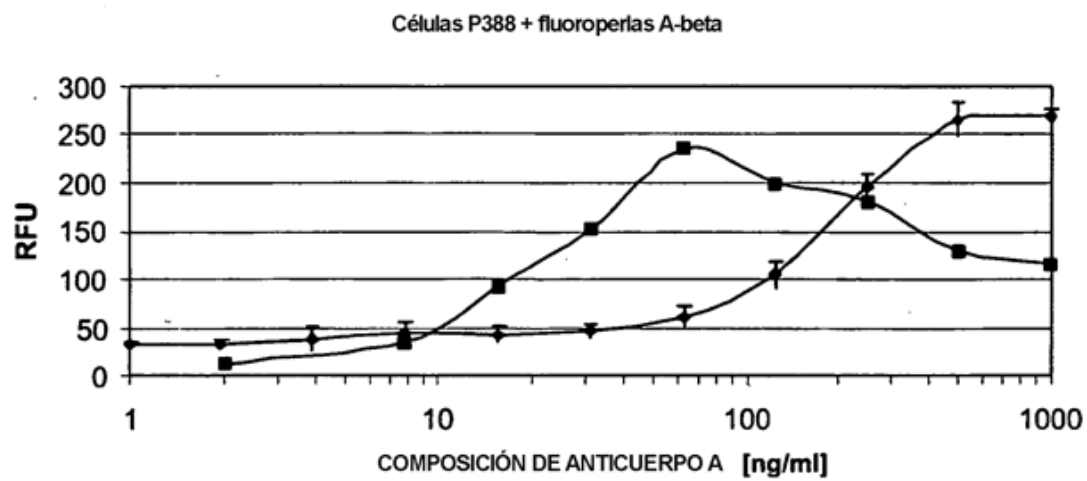


Figura 26

Nombre	Estructura ¹⁾	Nombre ²⁾	Estructura ¹⁾
Asn 306_G0		Asn 52_G2_0NANA-F	
Asn 306_G0-GlcNac		Asn 52_G2_1NANA-F	
Asn 306_G1		Asn 52_G2_2NANA-F	
Asn 306_G2		Asn 52_hyb_Man5_1NANA	
Asn 306_G0-F		Asn 52_hyb_Man4_1NANA	
Asn 306_G1-F		Asn 52_hyb_Man3_1NANA	
Asn 306_G2-F		Asn 52_Man5	
Asn 306_Man5			

1) Fucosa , Manosa , N-Acetilglucosamina , Galactosa , Ácido N-acetilneuramínico 

2) "hyb" indica estructuras híbridas

Figura 27